




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Programa de Doctorado: Medicina
2015

**Alteraciones en el funcionalismo
de los macrófagos del sistema GALT
(Gut-associated lymphoid tissue).**

**Relación con la translocación
bacteriana y el desarrollo de peritonitis
bacteriana espontánea sobre
un modelo de cirrosis experimental.**

Tesis Doctoral
Ana Bargalló García

Directores de tesis:
Dr. Ramon Planas Vilà
Dr. Ramon Bartolí Solé

Servicio de Aparato Digestivo
Hospital Germans Trias i Pujol

A mis padres,
mis modelos en la medicina y en la vida.

Agradecimientos

La realización de la presente tesis no habría sido posible sin el apoyo y la colaboración, directa e indirecta, de muchas personas. Con estas líneas quiero expresar mi reconocimiento y mi agradecimiento a todas ellas. En primer lugar, querría dar las gracias a mis directores de tesis.

Al Dr. Ramon Planas Vilà, profesor titular de medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y jefe del servicio de Digestivo del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, por ofrecerme la oportunidad de realizar esta tesis; por haberme transmitido su pasión y su dedicación por el trabajo y por haber formado parte indispensable de mi formación como especialista.

Al Dr. Ramon Bartolí Solé, investigador senior de la línea de investigación experimental de las complicaciones de la cirrosis del Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, por haberme introducido en el mundo del estabulario y de la investigación básica. Agradecerle sus ánimos en los momentos iniciales de esta tesis cuando no veíamos la luz y y a lo largo de todo el camino, por su apoyo y por su trabajo diario, sin el que la elaboración de esta tesis no habría sido posible. Por su sonrisa constante a lo largo de estos años.

Quiero agradecer también su colaboración a las personas que han contribuido en el desarrollo de esta tesis: a Gemma Ódena, bióloga investigadora, por estar en el inicio y por su aportación en el desarrollo del diseño experimental; a Laura Abad, estudiante de máster, por su colaboración en el desarrollo del análisis de muestras; al Dr. Marco A. Fernández, jefe de la unidad de citometría de la fundación IGTP, por su colaboración en los análisis citométricos; a la Dra. Eva Musulen, del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, por su ayuda y colaboración desinteresada en el análisis de las muestras histológicas; a M^a Rosa Sarrias y a Josep Manyé, por sus consejos en el diseño experimental, sus aportaciones técnicas y su apoyo; a

David Arés, por su ayuda en la maquetación y edición impresa de la tesis.

Mi agradecimiento también al servicio de digestivo del Hospital Germans Trias i Pujol, especialmente a la Dra. Rosa Morillas, al Dr. Eugeni Domènech y al Dr. Eduard Cabré, que a lo largo de la residencia me transmitieron sus conocimientos, su espíritu crítico y su pasión por el trabajo bien hecho.

A mis compañeras de residencia y amigas, Miriam, Mercé, Elena, Yamile, Eva, Raquel, Isa e Ingrid, por estar a mi lado durante todo el camino, por las risas, el apoyo, los consejos y el trabajo compartido. Por una amistad que se ha mantenido más allá de nuestra formación como especialistas.

A mis compañeros de trabajo a lo largo de este tiempo, que me han facilitado el tiempo necesario para poder dedicarme a esta tesis. En sus inicios, al Servicio de Digestivo del Hospital Sant Joan de Deu de Manresa, donde empecé mi trayectoria laboral como especialista, y en especial al Dr. Francesc Vida, jefe de servicio, por permitirme compaginar trabajo e investigación. En la actualidad, al Servicio de Digestivo del Hospital Moises Broggi y de forma especial, al Dr. Alex Blasco, jefe del servicio de digestivo, por sus ánimos y sus consejos y por todas las facilidades que me ha dado, a pesar de la presión asistencial. A la Dra. Merce Navarro, amiga y médico incansable, compañera que me ha dado cobertura en numerosas ocasiones y siempre con una sonrisa. A Marta, Orlando, Alfredo, y David por sus ánimos.

Un agradecimiento sincero a mi familia, mis padres y mis hermanos, Marta, Conchi, Domi, por estar siempre conmigo. Finalmente, agradecer a Roberto su apoyo incondicional, sus consejos y su enorme paciencia, que valoro enormemente.

Muchas gracias a todos.

Índice

INTRODUCCIÓN	21	3 Cirrosis hepática y traslocación bacteriana	43
1 Sistema inmunológico intestinal	23	3.1 Traslocación bacteriana patológica en la cirrosis	43
1.1 Estructura anatómica del GALT	23	3.1.1 Definición de traslocación bacteriana patológica en la cirrosis	43
1.2 Estructura funcional del GALT	25	3.1.2 Alteración de la barrera intestinal en la cirrosis	46
1.2.1 La respuesta inmunitaria en el GALT	26	3.1.3 Endotoxemia en la cirrosis hepática	46
1.3 Tolerancia inmunológica	28	3.2 Disfunción inmunitaria en la cirrosis	46
1.3.1 Concepto de tolerancia oral	28	3.2.1 Alteraciones de la inmunidad innata en la cirrosis	46
1.3.2 Mecanismos de tolerancia oral	29	3.2.2 Alteraciones de la inmunidad adaptativa en la cirrosis	48
1.3.3 Patrones de tolerancia frente a antígenos alimentarios y flora comensal	30	3.3 Papel de la traslocación bacteriana en las complicaciones de la cirrosis	49
1.4 Papel de los macrófagos en el sistema GALT	30	3.3.1 Traslocación bacteriana patológica y fibrosis hepática	50
1.4.1 Macrófagos. Generalidades	30	3.3.2 Traslocación bacteriana patológica e hipertensión portal	50
1.4.2 Fagocitosis y killing intracelular	31	3.3.3 Traslocación bacteriana patológica y circulación hiperdinámica	50
1.4.3 Macrófagos del sistema GALT	32	3.3.4 Traslocación bacteriana patológica y encefalopatía hepática	50
1.4.4 Macrófagos intestinales en mucosa normal	34	3.3.5 Traslocación bacteriana patológica y fracaso renal	51
1.4.5 Macrófagos intestinales en la mucosa intestinal inflamatoria	34	3.3.6 Traslocación bacteriana patológica y coagulopatía	51
1.4.6 Células dendríticas y macrófagos intestinales	35	3.3.7 Traslocación bacteriana patológica y complicaciones infecciosas	51
3.3.8 Traslocación bacteriana patológica y acute-on-chronic liver failure			53
2 Traslocación bacteriana	37	4 Papel del norfloxacin en la cirrosis	55
2.1 Concepto de traslocación bacteriana	37	4.1 Efectos antibacterianos del norfloxacin	55
2.2 Mecanismos de traslocación bacteriana	37	4.2 Efectos hemodinámicos del norfloxacin	56
2.2.1 Barrera epitelial intestinal	37	4.3 Efectos inmunomoduladores del norfloxacin	56
2.2.2 Concepto de permeabilidad intestinal	39		
2.2.3 Rutas de diseminación sistémica	39		
2.3 Diagnóstico de traslocación bacteriana	39		
2.3.1 Métodos directos	39		
2.3.2 Métodos indirectos	39		
2.4 Impacto clínico de la traslocación bacteriana	40		

5 Modelos experimentales de peritonitis bacteriana espontánea	59	OBJETIVOS	65	RESULTADOS	91	5 Test de killing intracelular	110
5.1 Modelos experimentales de hipertensión portal	60	1 Justificación	67	1 Mortalidad, desarrollo de ascitis y diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea	93	6 Determinaciones analíticas en plasma	115
5.1.1 Modelos de hipertensión portal extrahepática	60	2 Hipótesis de trabajo	69	1.1 Mortalidad	93	6.1 Óxido nítrico	115
5.1.2 Modelos de hipertensión portal intrahepática	60	3 Objetivos	71	1.2 Desarrollo de ascitis	93	6.2 TNF α	116
5.2 Modelos experimentales de peritonitis bacteriana espontánea	61			1.3 Diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea	93	6.3 IFN γ	117
5.2.1 Diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea	61	MATERIALES Y MÉTODOS	73	2 Recuento y viabilidad celular	95	6.4 Proteína C reactiva	118
5.2.2 Traslocación bacteriana y desarrollo de peritonitis bacteriana espontánea	62	1 Animales y estabulación	75	2.1 Recuento celular total	95	6.5 Complemento (C3)	119
5.2.3 Alteración inmunitaria asociada a la cirrosis experimental	62	2 Diseño experimental	77	2.2 Viabilidad celular	95	6.6 Determinaciones plasmáticas y traslocación bacteriana	120
5.2.4 Contribuciones del modelo experimental de peritonitis bacteriana espontánea	62	2.1 Grupos de estudio	77	2.3 Fenotipo celular	95	6.7 Determinaciones plasmáticas y diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea	121
		2.2 Inducción de cirrosis	80	3 Estudio de traslocación bacteriana	99	7 Correlaciones	125
		2.3 Paracentesis exploradora	80	3.1 Cultivo de ganglio linfático mesentérico	99	7.1 Correlaciones entre fagocitosis y killing	125
		2.4 Diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea	80	3.1.1 Incidencia de traslocación bacteriana	99	7.2 Correlaciones entre fagocitosis y parámetros plasmáticos	125
		2.5 Laparotomía media y obtención de muestras	80	3.1.2 Caracterización de las bacterias traslocadas	100	7.3 Correlaciones entre killing intracelular y parámetros plasmáticos	125
		2.6 Obtención de un "pool de sueros"	81	3.1.3 Correlación entre traslocación bacteriana y peritonitis bacteriana espontánea	100	7.4 Correlaciones entre los parámetros plasmáticos y la endotoxemia	126
		2.7 Protocolo de digestión	81	3.2 Endotoxemia	101	7.5 Correlaciones entre los parámetros plasmáticos	127
		2.8 Recuento y viabilidad	82	4 Test de fagocitosis	103	8 Histología compartimental	129
		2.9 Test de fagocitosis	83	4.1 Fagocitosis en función del grupo de estudio	103	DISCUSIÓN	132
		2.10 Test de killing intracelular	86	4.1.1 Porcentaje de macrófagos con actividad fagocítica	103	CONCLUSIONES	143
		2.11 Estudio de traslocación bacteriana	87	4.1.2 Actividad fagocítica individual de los macrófagos	105	BIBLIOGRAFÍA	147
		2.12 Cuantificación plasmática de endotoxina, citoquinas, complemento y proteína C reactiva	88	4.2 Fagocitosis en función del suero utilizado	108		
		2.13 Estudio histológico	88	4.2.1 Porcentaje de macrófagos con actividad fagocítica	108		
		3 Análisis estadístico	89	4.2.2 Actividad fagocítica individual de los macrófagos	109		

Índice de figuras

INTRODUCCIÓN	21	Figura 17 Porcentaje de macrófagos con <i>E. coli</i> preopsonizados con pool de sueros de ratas cirróticas fagocitados en cada compartimento y según el grupo de estudio	105
Figura 1 Representación esquemática del GALT	24	Figura 18 Actividad fagocítica individual por compartimento y grupo experimental con <i>E. coli</i> preopsonizado con pool de sueros de ratas sanas	106
Figura 2 Activación y diferenciación de los linfocitos Th en función del estímulo antigénico	27	Figura 19 Actividad fagocítica individual por compartimento y grupo experimental con <i>E. coli</i> preopsonizado con pool de sueros de ratas cirróticas	107
Figura 3 Esquema de fagocitosis/killing por macrófagos	32	Figura 20 Ejemplo de estudio de fagocitosis: Identificación de los macrófagos de lavado peritoneal en una rata del grupo control según marcaje CD11b-APC y características morfológicas, e identificación de fagocitosis de <i>E. coli</i> -FITC preopsonizadas con pool de sueros de ratas sanas (imagen A) o pool de sueros de ratas cirróticas (imagen B)	108
Figura 4 Papel de los macrófagos intestinales en la regulación de la homeostasis intestinal y en la respuesta inflamatoria	33	Figura 21 Porcentaje de macrófagos con fagocitosis en función del pool de sueros utilizado en la preopsonización	109
Figura 5 Componentes de la barrera intestinal	38	Figura 22 Actividad fagocítica individual por compartimento en función del pool de sueros utilizado en la preopsonización	110
Figura 6 Teoría de la sepsis de origen intestinal: la TB es el estímulo que desencadena y mantiene una respuesta inflamatoria sistémica	41	Figura 23 Ejemplo de estudio de Killing intracelular en macrófagos de lavado peritoneal mediante la cuantificación de DHR-123 oxidada por especies reactivas de oxígeno durante el proceso de killing	111
Figura 7 TB patológica y estadios de la cirrosis hepática	45	A: Comparación según el estímulo antigénico B: Comparación entre los 4 grupos.	
Figura 8 Papel de la TB patológica en la progresión de la cirrosis hepática y sus complicaciones	49	Figura 24 Killing intracelular frente a <i>E. coli</i> , por compartimento y grupo de estudio	113
Figura 9 Patogénesis de las infecciones bacterianas en la cirrosis	52	Figura 25 Niveles de NO según el grupo experimental	116
		Figura 26 Niveles de TNF α según el grupo experimental	117
		Figura 27 Niveles de IFN γ según el grupo experimental	118
		Figura 28 Niveles de PCR según el grupo experimental	119
		Figura 29 Niveles de C3 según el grupo experimental	120
		Figura 30 Determinaciones plasmáticas en función de la evidencia de traslocación bacteriana en las ratas cirróticas	121
		Figura 31 Determinaciones plasmáticas en función de la evidencia de traslocación bacteriana y de PBE en las ratas cirróticas	122
MATERIALES Y MÉTODOS	73		
Figura 10 Esquema del diseño experimental A: Grupos de estudio B: Esquema de trabajo	78		
Figura 11 Cámara de Neubauer	83		
RESULTADOS	91		
Figura 12 Caracterización de la población de macrófagos mediante tinción con CD11b-APC, tamaño y granularidad	95		
Figura 13 Porcentaje de células CD11b+ según compartimento y grupo de estudio	97		
Figura 14 Incidencia de traslocación bacteriana según el grupo experimental	99		
Figura 15 Endotoxemia en los diferentes grupos de estudio	101		
Figura 16 Porcentaje de macrófagos con <i>E. coli</i> preopsonizados con pool de sueros de ratas sanas fagocitados en cada compartimento y según el grupo de estudio	104		

Índice de tablas

Figura 32	Determinaciones plasmáticas en función de la evidencia de traslocación bacteriana y de PBE en los grupos 2 y 4	123
Figura 33	Correlaciones entre el killing intracelular según el compartimento estudiado y los niveles plasmáticos de endotoxina, citocinas y complemento	126
Figura 34	Correlación entre la endotoxemia y los parámetros plasmáticos	127
Figura 35	Fotos de histología hepática de rata cirrótica (5x) A: tinción hematoxilina-eosina (H&E) B: tinción tricrómico de Masson (TM)	129
Figura 36	Fotos de histología hepática de rata sana (5x) A: tinción H&E B: tinción TM	129
Figura 37	Foto de muestra de ganglio linfático mesentérico (tinción H&E, 5x)	130
Figura 38	Fotos de muestras de Placa de Peyer (tinción H&E, 5x)	130
Figura 39	Fotos de muestras de intestino delgado (tinción H&E) A y B: controles sanos (10x) B y C: ratas cirróticas (5x y 20x).	131

INTRODUCCIÓN 21

Tabla 1	Alteración de la respuesta inmunitaria innata en la cirrosis	46
Tabla 2	Alteración de la respuesta inmunitaria adaptativa en la cirrosis	48

MATERIALES Y MÉTODOS 73

Tabla 3	Dosis a administrar de tetracloruro de carbono en función de la variación del peso del animal	80
Tabla 4	Esquema de las muestras analizadas mediante el kit de Phagotest	84
Tabla 5	Esquema de las muestras analizadas en el test de killing intracelular	86

RESULTADOS 91

Tabla 6	Cultivos positivos de líquido ascítico	94
Tabla 7	Recuento celular total y fenotipo celular por compartimento y grupo de estudio	96
Tabla 8	Cultivos positivos de ganglio linfático mesentérico	100
Tabla 9	Correlación entre el cultivo de ganglio linfático esentérico y el cultivo de líquido ascítico	100
Tabla 10	Killing intracelular por compartimento y grupo de estudio	112
Tabla 11	Determinaciones analíticas plasmáticas en los grupos de estudio	115
Tabla 12	Valores de los parámetros plasmáticos en función de la evidencia de traslocación bacteriana en las ratas cirróticas (grupos 2+3+4)	120
Tabla 13	Valores de los parámetros plasmáticos en función de la evidencia de traslocación bacteriana y peritonitis bacteriana espontánea en las ratas cirróticas (grupos 2+3+4)	121
Tabla 14	Valores de los parámetros plasmáticos en función de la evidencia de traslocación bacteriana y peritonitis bacteriana espontánea en los grupos 2 y 4	122

Abreviaturas

ACLF	acute-on-chronic liver failure	Mo	monocitos
ADN	ácido desoxirribonucleico	MALT	mucosal-associated lymphoid tissue (tejido linfoide asociado a mucosas)
APC	aloficocianina	MAMPs	patrones moleculares asociados a microbios
BGN	bacterias gram negativas	MHC-II	moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad tipo II
BGP	bacterias gram positivas	MO	médula osea
BSA	bovine serum albumin	m.o	microscopía óptica
C3	componente 3 del complemento	NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
CCl ₄	tetracloruro de carbono	NK	natural-killer
CD	células dendríticas	NLR	nod-like receptor
Cel.	células	NO	óxido nítrico
CK	células de Kupffer	PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
CPA	célula presentadora de antígenos	PBE	peritonitis bacteriana espontánea
DAMPs	patrones moleculares asociados al daño o lesión celular	PBS	phosphate buffered saline
DHR-123	dihidrorodamina 123	PCR	proteína C reactiva
DIS	descontaminación intestinal selectiva	PGE2	prostaglandina E2
DMN	dimetilnitrosamina	PI	permeabilidad intestinal
DMSO	dimetilsulfóxido	PMA	forbol miristato acetato
EAF	epitelio asociado a folículos	PMN	polimorfonucleares
EDTA	ácido etildiaminotetraacético	PP	placa de Peyer
EH	encefalopatía hepática	PRRs	receptores de reconocimiento de patrones
eNOS	sintetasa endotelial de óxido nítrico	RES	sistema retículo-endotelial
FBS	fetal bovine serum	ROS	especies reactivas de oxígeno
FITC	fluoresceína-5-isotiocianato	SDIAC	síndrome de disfunción inmunitaria asociado a la cirrosis
FMO	fracaso multiorgánico	SF	suero fisiológico
FVW	factor de Von Willebrand	SHR	síndrome hepatorenal
GALT	gut-associated lymphoid tissue (tejido linfoide asociado a mucosa intestinal)	SIBO	sobrecrecimiento bacteriano de intestino delgado
GLM	ganglio linfático mesentérico	SIRS	síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
GM	ganglio mesentérico	SMF	sistema fagocítico mononuclear
GVPH	gradiente de presión venosa hepática	SP	sangre periférica
HBSS	Hanks balanced salt solution	T _c	linfocitos T citotóxicos
H&E	hematoxilina-eosina	T _h	linfocitos T helper o colaboradores
HEV	vénulas de endotelio alto	T _r	linfocitos T reguladores
HTPo	hipertensión portal	TAA	tioacetamida
IFN γ	interferón gamma	TB	traslocación bacteriana
IgA	inmunoglobulina A	TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1	TJ	tight-junctions
IgG	inmunoglobulina G	TM	tricroómico de Masson
IgM	inmunoglobulina M	TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
IL-	interleuquina-	TNF β	factor de necrosis tumoral beta o linfotóxina
IMF	intensidad media de fluorescencia	TLR	toll-like receptor
iNOs	sintetasa inducible de óxido nítrico	TXA2	tromboxano A2
L.A	líquido ascítico	U.A	unidades arbitrarias
LIEs	linfocitos intraepiteliales	U.E	unidad de endotoxemia
LP	lámina propia		
LPS	lipopolisacárido		
M Φ	macrófagos		

Introducción

1 Sistema inmunológico intestinal

Las mucosas son las principales superficies de contacto de nuestro cuerpo con el medio y constituyen la principal puerta de entrada de diferentes agentes patógenos, de ahí su papel vital en la defensa inmunológica. El sistema inmunológico asociado a mucosas (MALT) está constituido por el tejido linfóide presente a lo largo de las mucosas (bronquial, intestinal, genitourinaria) y presenta relativa independencia del sistema inmunológico sistémico.

El tracto gastrointestinal constituye la superficie corporal con mayor exposición a microorganismos (alrededor de 400 m²). El tejido linfóide asociado a la mucosa intestinal o GALT (gut-associated lymphoid tissue) es el órgano inmunológico más extenso y complejo de nuestro organismo. Recibe diariamente una enorme carga antigénica y debe ser capaz de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos (alimentos y flora). Por tanto, debe ser capaz de presentar tres tipos de respuesta inmunológica según la circunstancia ¹:

- tolerancia inmunológica frente a los antígenos de la dieta.
- exclusión inmunológica frente a la flora comensal, evitando su entrada y la generación de respuesta inmunológica protectora ².
- respuesta inmunológica protectora local y, en ocasiones, sistémica frente a la entrada de patógenos invasivos.

Para ello, presenta una distribución anatómica y funcional muy especializada y diferente de la inmunidad sistémica, que le permite desarrollar su función protectora frente a la entrada de patógenos exteriores sin perder su capacidad de absorción de nutrientes y su tolerancia a la flora comensal.

1.1/Estructura anatómica del GALT

La descripción anatómica del sistema inmune de las mucosas es un paso preliminar necesario para comprender su fisiología, ya que anatomía y función están íntimamente ligados ³.

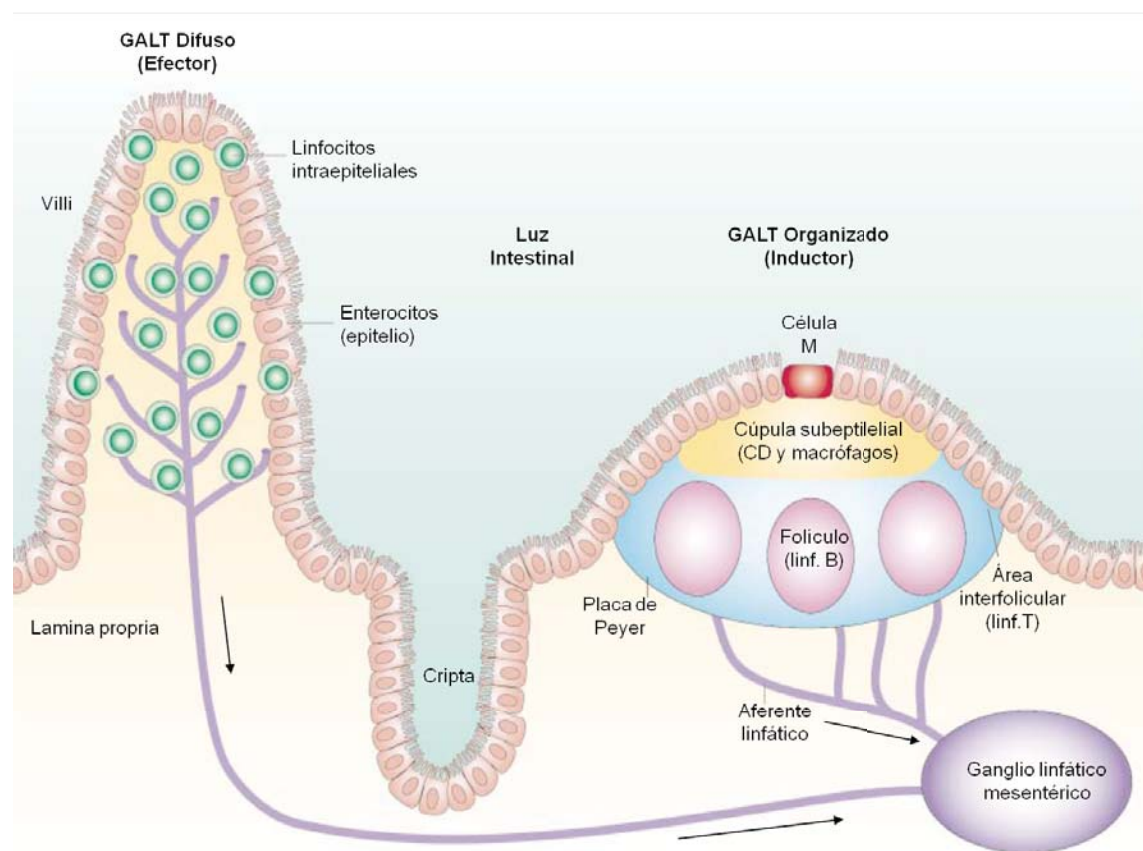
La **barrera epitelial** es un elemento clave en la prevención de la entrada de patógenos. Está constituida por elementos celulares y químicos que le otorgan esta función defensiva. El epitelio de la mucosa intestinal está formado por una capa única de células epiteliales que varía ligeramente en composición según su localización en la superficie o en la base de las criptas de Lieberkhün. Encontramos a las células progenitoras en la porción intermedia de las criptas, que se diferencian a enterocitos, células mucinosas y células neuroendocrinas, localizadas en la porción apical de las criptas, y a células de Paneth, localizadas en la base de las mismas. Los enterocitos son las células responsables de la absorción de nutrientes y de la secreción de electrolitos y también desempeñan un papel importante en el sistema GALT como veremos más adelante ⁴. En la superficie luminal de la mucosa intestinal, por encima de la capa epitelial, encontramos además una capa de moco secretada por las células mucinosas, péptidos antimicrobianos secretados por las células de Paneth

(defensinas, lisozima, fosfolipasa), inmunoglobulina A (IgA) secretora y la flora comensal. Todos estos componentes (barrera epitelial, barrera mucosa y moléculas secretadas) dificultan la adherencia e invasión de patógenos y constituyen la primera línea de defensa ^{4,5}.

Anatómicamente, el **GALT** se divide en dos compartimentos ^{6,7} (Figura 1):

- **GALT organizado**, constituido por folículos linfoides aislados a lo largo del intestino, folículos linfoides asociados o placas de Peyer (PP) y los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM).
- **GALT difuso**, integrado por poblaciones de linfocitos dispersas en el entramado epitelial (linfocitos intraepiteliales -LIEs-) o linfoplasmocitos en la lámina propia (células plasmáticas, linfocitos T y B, macrófagos, células dendríticas, granulocitos).

FIGURA 1: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GALT (ADAPTADO DE MOWATT, A. 2003 ⁷)



Las **Placas de Peyer** (PP) están formadas por agregados linfoides macroscópicos no encapsulados, localizados a lo largo de la porción antimesentérica de la submucosa ileal. El epitelio que las separa de la luz intestinal se denomina epitelio asociado a folículos (EAF) y se diferencia del epitelio intestinal normal por la presencia de células M y por presentar un ribete en cepillo menos pronunciado, un menor grosor de glicocálix así como de mucina y de moléculas secretadas (péptidos antimicrobianos, IgA) ⁵. Las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos luminales. Carecen de las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y, por tanto, no actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) sino que transportan los antígenos luminales a las PP. El EAF está en contacto con una área difusa denominada cúpula subepitelial donde en-

contramos células dendríticas (CD) y macrófagos (MΦ), que son CPA profesionales, y linfocitos. Bajo la cúpula, encontramos los agregados linfoides propiamente dichos, constituidos por diversas áreas foliculares. Las áreas foliculares están compuestas por linfocitos B IgM+, que son los precursores de las células plasmáticas productoras de IgA, y por linfocitos B memoria IgA, localizados en los centros germinales. En las áreas interfoliculares encontramos linfocitos T, mayoritariamente de tipo colaborador (Th), CD maduras y MΦ. A este nivel también encontramos vénulas postcapilares que favorecen la migración celular y la recirculación de linfocitos. Una característica anatómica diferencial de las PP respecto otros órganos linfoides secundarios es que carecen de vasos linfáticos aferentes, ya que la entrada de antígenos se realiza desde la luz intestinal a través del EAF ⁴.

Los **ganglios linfáticos mesentéricos** (GLM) se localizan en el mesenterio del tracto intestinal y presentan un desarrollo diferente a los ganglios linfáticos periféricos, con implicaciones en su funcionalidad. Se dividen en tres regiones diferenciadas:

- la corteza, que contiene folículos primarios y secundarios ricos en linfocitos B, CD y MΦ.
- la paracorteza, que contiene numerosos linfocitos T y CD.
- la médula, que es la región más interna del ganglio y está integrada por linfocitos B y T, células plasmáticas y abundantes MΦ.

Los **linfocitos intraepiteliales** (LIEs) se localizan en los espacios intraepiteliales del intestino, bajo las uniones estrechas o tight junctions y por encima de la membrana basal. Representan una población muy abundante de células inmunocompetentes y aunque muy heterogénea, la mayoría presenta un fenotipo supresor o citotóxico atípico que es específico de este compartimento (CD8αα+).

La **lamina propia** (LP), se encuentra entre el epitelio intestinal y la muscularis mucosa. Presenta una composición celular formada por células plasmáticas maduras productoras de IgA, linfocitos T memoria y T_H, MΦ, CD, mastocitos, polimorfonucleares... Todas estas células se encuentran en estado continuo de migración, diferenciación y renovación.

1.2/Estructura funcional del GALT

El GALT presenta una complejidad funcional que está en relación con su distribución y características anatómicas.

El **GALT organizado** (folículos linfoides aislados, PP, GLM) es **inductor** de la respuesta inflamatoria intestinal, es decir, es donde tienen lugar el procesamiento y la presentación antigénica a los linfocitos T y los linfocitos B naïves. Como se ha explicado previamente, las PP están recubiertas por el EAF que presenta unas características anatómicas especiales que le permiten su función principal de captación de antígenos de la luz intestinal. En las PP y en los GLM estos antígenos son procesados por las CPA y presentados a los linfocitos T y los linfocitos B, que se activan y proliferan y se distribuyen a través de la circulación sistémica a la mucosa intestinal. Los GLM son el cruce de caminos entre las vías de recirculación mucosa y periférica para las células inmunitarias circulantes. Es por ello que son un punto clave en la inducción de inmunidad sistémica o de tolerancia en respuesta a estímulos antigénicos ⁷.

El **GALT difuso** (LIE, LP) es **efector** de la respuesta inflamatoria intestinal, es decir, es donde se desempeña la respuesta inmunitaria local (protectora o de tolerancia). La presencia constante de diferentes tipos celulares a este nivel en condiciones normales hace pensar que la homeostasis en el intestino se caracteriza por un estado de inflamación fisiológica. Los LIEs presentan un fenotipo activado con capacidad inmunoreguladora de la respuesta citotóxica local y que proporciona una respuesta inmediata y muy efectiva sobre las células epiteliales infectadas por patógenos intracelulares. También desempeñan un papel importante en el proceso de tolerancia oral, ya que previenen de la sensibilización a antígenos luminales. La función principal de la LP es la prevención de la entrada y de la diseminación sistémica de patógenos a través de la mucosa intestinal, mediante el desarrollo de una respuesta inmunitaria local efectiva frente a la llegada de patógenos ⁵.

La **inmunidad innata** en el sistema GALT viene representada por los epitelios mucosos, el glicocálix y las moléculas antimicrobianas secretadas a la luz intestinal, las células fagocíticas (CD, MΦ, neutrófilos, mastocitos) y los linfocitos citotóxicos naturales. Ofrecen una respuesta inmunitaria innata rápida contra patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) reconocidos por receptores como los toll-like receptor (TLR) y los nod-like receptor (NLR) ⁸.

La **inmunidad adaptativa** ofrece una respuesta específica contra antígenos microbianos o particulados y en el GALT la desempeñan los LIEs, la IgA secretora, los linfocitos T y B activados en PP, GLM y LP y las células plasmáticas productoras de IgA. La IgA secretora es la inmunoglobulina más abundante en la mucosa intestinal y aporta una protección específica de las superficies mucosas en la primera línea de defensa frente a toxinas y a la colonización e invasión de patógenos. Es secretada por las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B activados en las PP o en los GLM y que posteriormente migran a la LP. Es resistente a la proteólisis intraluminal y no desencadena una respuesta inflamatoria, por lo que constituye un mecanismo ideal de defensa mucosa. Evita la penetración del antígeno mediante la formación de inmunocomplejos en la luz intestinal y también se une a los antígenos a nivel intraepitelial y subepitelial cuando estos atraviesan la barrera intestinal ^{4, 6, 9}.

1.2.1/La respuesta inmunitaria en el GALT

Fase de inducción:

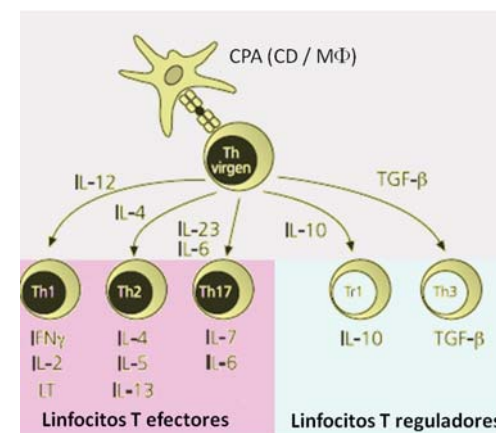
La respuesta inmunitaria se da en relación a un estímulo antigénico. La llegada de los antígenos lumbinales al GALT se puede dar a través de diferentes vías⁴:

- EAF, a través de las células M, especializadas en la captación antigénica de la luz intestinal.
- Epitelio intestinal de las vellosidades, a través de los enterocitos.
- Paracelular, a través de las prolongaciones paracelulares de las células dendríticas o MΦ en el epitelio intestinal.

La vía más conocida y estudiada de muestreo antigénico por parte del GALT es a través de las células M, en el EAF. Las características anatómicas de la membrana apical de las células M (escaso ribete en cepillo, escaso glicocálix) favorece la adhesión y captación de antígenos lumbinales (macromoléculas, partículas adhesivas, bacterias, virus, proteínas alimentarias, complejos IgA). Estos son transportados al bolsillo basolateral de la misma mediante un proceso de transcitosis activa. Los antígenos son liberados a nivel del bolsillo basolateral y la cúpula subepitelial, con casi nula degradación enzimática por su bajo contenido en lisozima. En este espacio encontramos CD y MΦ, que fagocitan y procesan los antígenos hasta péptidos antigénicos y posteriormente los expresan en la membrana plasmática asociados a MHC-II. De esta forma, actúan como CPA para los linfocitos T y los linfocitos B que se encuentran en la PP y en los GLM, a los que llegan a través de los conductos linfáticos eferentes. La presentación antigénica a los linfocitos T naïve de la PP o del GLM, da lugar a la formación de células T especializadas y al inicio de la respuesta inmune adaptativa ⁷.

El tipo de estímulo antigénico condiciona el perfil de citocinas secretadas en el momento del reconocimiento antigénico y de esta forma se regula la maduración y diferenciación de los linfocitos T en una determinada subpoblación efectora o reguladora (Figura 2). A su vez, cada subpoblación tiene un perfil de secreción de citocinas diferente que, además de condicionar su función inmune, hace que se amplifique a sí misma y ejerza un papel regulador sobre la otra ⁶.

FIGURA 2: ACTIVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T_h EN FUNCIÓN DEL ESTÍMULO ANTIGÉNICO (ADAPTADO DE RAMIRO-PUIG, E. 2008)



Dentro de los linfocitos T efectores:

- La IL-12 es la principal responsable de la diferenciación a linfocitos T_{h1}. Estos linfocitos se caracterizan por la secreción de IFN γ , IL-2 y linfoxina (TNF β), y su principal función es la defensa mediada por fagocitosis de patógenos intracelulares.
- La IL-4 promueve la subpoblación de linfocitos T_{h2}, que a su vez son productores de IL-4, IL-5 e IL-13, y actúan como mediadores de reacciones alérgicas y en la defensa frente a helmintos y artrópodos, mediante la estimulación de mastocitos y eosinófilos.
- La secreción de IL-23 por parte de las CPA como respuesta a algunas bacterias extracelulares, conduce a la diferenciación de linfocitos T_{h17}. Ésta subpoblación linfocitaria se caracteriza por la secreción de

IL-17 e IL-6 y parece estar implicada en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas, no cubiertas totalmente con las dos respuestas previas.

Existen dos tipos de linfocitos T reguladores, los linfocitos T_{h1}, que secretan IL-10, y los linfocitos T_{h3}, que secretan TGF- β . Estos linfocitos son especialmente importantes en el GALT por su capacidad reguladora de la respuesta inmunitaria en procesos inflamatorios e infecciosos y desempeñan un papel clave en la tolerancia oral frente a antígenos de la dieta y la microbiota. El Th3 responde a citocinas inmunosupresoras en el desarrollo de tolerancia oral ⁵.

Tras la activación de los linfocitos en las PP o en los GLM, algunos linfocitos T activados permanecerán en forma de células memoria y otras migrarán a los centros germinales de PP y GLM para promover el proceso final de diferenciación de los linfocitos B. La secreción de IL-4, IL-5 y TGF- β induce el cambio de expresión a IgA en los linfocitos B de los folículos y estos linfocitos B IgA+ madurarán y tendrán una expansión clonal.

Existen vías accesorias de muestreo antigénico independientes de las células M y el FAE.

El epitelio intestinal absorptivo constituye la mayor superficie de contacto antigénico. Sin embargo, presenta una menor accesibilidad a la penetración antigénica por la presencia de una capa de moco de mayor grosor así como un recubrimiento externo de glicocálix rico en enzima hidrolíticas, que impiden la entrada de macromoléculas y microorganismos. Sin embargo, los enterocitos expresan MHC-II y en algunas circunstancias son capaces de captar y procesar los antígenos solubles que llegan a su superficie y presentarlos a los LIEs y a los linfocitos de LP. De esta manera ejercen un papel en el mantenimiento de los linfocitos T reguladores y efectores previamente activados en GLM o PP. Los enterocitos también expresan diversas citocinas, receptores de citocinas y TLR, que les permiten iniciar respuestas celulares a determinadas estructuras microbianas desempeñando un papel importante en la regulación y en el mantenimiento de condiciones de inflamación crónica o de tolerancia local ⁷.

Las CD son capaces de extender sus dendritas o prolongaciones entre los enterocitos, sin distorsionar la integridad de la barrera epitelial, gracias a la expresión de proteínas asociadas a las uniones estrechas. De esta forma son capaces de realizar un muestreo de la luz intestinal, que probablemente está regulado por componentes bacterianos y señales epiteliales en respuesta a una infección bacteriana ^{4, 6}. Una vez activadas pueden actuar como CPA a los linfocitos T y linfocitos B presentes en la LP o migrar a los GLM donde realizaran su función de CPA. Parece que puedan estar implicadas en el fenómeno de exclusión inmunitaria que tiene lugar en respuesta a la flora comensal mediante la inducción de IgA específica en la LP.

Fase efectora:

Tanto los linfocitos T activados como los linfocitos B maduros se dirigen a la circulación sistémica desde el GLM, a través de los vasos eferentes y del conducto torácico. Presentan una recirculación sistémica, desde donde migran y se distribuyen a los tejidos efectores de la mucosa intestinal (LP y epitelio intestinal) para ejercer su función. Este fenómeno de “homing” ocurre porque los linfocitos activados en el GALT presentan un patrón de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas, que promueven su movilización hacia la mucosa intestinal. Las vénulas de endotelio alto (HEV) desempeñan un papel importante en este reclutamiento de células inmunes ya que, además de moléculas de adhesión celular, poseen unas diriginas vasculares específicas de cada tejido linfoide, que sirven para dirigir la extravasación de linfocitos de distintas subpoblaciones ^{6, 7, 10}.

Los linfocitos que alcanzan la LP del intestino se distribuyen en diferentes compartimentos. En la LP permanecen las células plasmáticas, para finalizar su maduración a células secretoras de IgA, y los linfocitos T_h (CD4+) que se distribuyen a lo largo de las vellosidades y las criptas. Los linfocitos T_c (CD8+) migran preferentemente al epitelio convirtiéndose en LIE ^{6, 7}. Los linfocitos T CD4+ son importantes en la regulación de la tolerancia inmunológica y los linfocitos T CD8+ tienen una actividad citotóxica potente ⁷.

En las vellosidades de las criptas de Lieberkühn observamos que en LP predomina un perfil de liberación de citocinas T_{h2} (IL-4, IL-5, IL-10) para estimular la proliferación de linfocitos B y células plasmáticas, que desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio. A nivel intraepitelial predomina la secreción de citocinas de perfil T_{h1} (IL-2, IFN γ) que modulan la respuesta inmune citotóxica local. En la base de las criptas, predomina la presencia de células plasmáticas productoras de IgA y la presencia de macrófagos carroñeros (scavenger), sin MHC-II, que realizan labores de fagocitosis de células apoptóticas ³.

Una vez los linfocitos T y B han alcanzado y se han distribuido por la LP y a nivel intraepitelial, quedan en un estado latente (células memoria) y cuando se reencuentren con el antígeno darán lugar a una respuesta inmunológica específica más vigorosa ⁶. Esta respuesta consiste en la secreción por parte de linfocitos T de IFN γ , IL-17, TNF α , linfotóxina- α y IL-2, que promueven la expansión clonal de linfocitos T y estimulan la subpoblación Th y linfocitos B. También estimularán a los M Φ y las CPA así como la activación de células endoteliales que expresaran moléculas de adhesión en el HEV. Los M Φ activados por IFN γ , secretaran citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18), así como radicales libres y metabolitos nitrogenados. Todo esto da lugar al reclutamiento y activación de leucocitos y a la inducción de inflamación local ¹⁰.

La alteración de alguno de estos factores defensivos que regulan la integridad de la mucosa intestinal puede conducir a un aclaramiento ineficaz de antígenos patógenos o a una alteración de la función celular reguladora de la respuesta inmune, que condiciona la aparición de daño tisular en la mucosa intestinal, un incremento de la permeabilidad intestinal y el sobrecrecimiento de microorganismos patógenos.

1.3/Tolerancia inmunológica

La mucosa intestinal constituye la mayor superficie de contacto con antígenos externos y al mismo tiempo es el área anatómica que presenta un tejido linfoide más abundante. Sin embargo, no todos los estímulos antigénicos en el GALT desencadenan una respuesta inmunológica sistémica.

El epitelio intestinal debe verse como una interfase entre el medio externo y el interno, en lugar de como una barrera, ya que permite la entrada selectiva de antígenos externos (alimentarios, muestreo de la microbiota) en condiciones normales ¹¹. En este contexto, es importante que ante la exposición a antígenos no patógenos no se desencadene una respuesta inflamatoria sistémica ¹².

1.3.1/Concepto de tolerancia oral

El concepto de tolerancia oral se describió por primera vez en 1909 cuando A. Besredka observó que los conejillos de indias que habían sido alimentados con pienso que contenía leche no podían

ser inmunizados contra las proteínas de la leche ¹¹. La tolerancia oral se define como la ausencia de respuesta inmunitaria sistémica frente a la exposición a un antígeno al que se ha estado previamente expuesto a través de tracto gastrointestinal ^{6, 7}. La mayor parte de la carga antigénica a la que se somete al GALT proviene de los alimentos y de la flora comensal, que en condiciones normales dan lugar a una respuesta inmunológica de tolerancia oral. El mecanismo de tolerancia oral es necesario, ya que la potente respuesta inmunitaria protectora que se desarrolla en respuesta a patógenos podría dar lugar a fenómenos de alergia alimentaria o enfermedades inflamatorias crónicas cuando se dirige contra antígenos de la dieta o de la flora comensal ⁵.

1.3.2/Mecanismos de tolerancia oral

Los mecanismos responsables de la tolerancia oral no son bien conocidos todavía y la mayor parte de la información disponible proviene de modelos experimentales ^{12, 13}.

El sistema GALT se caracteriza por un sistema diferenciado de moléculas de adhesión, citocinas, y células especializadas, que le confieren una predisposición natural a la inducción de tolerancia. En **condiciones de homeostasis tisular**, la mucosa intestinal, así como las PP y los GLM se caracterizan por tener un ambiente inmunosupresor en el que predominan las citocinas IL-10, TGF β y PGE₂ que estimulan un fenotipo inhibitorio en las células del GALT. En este contexto, las respuestas efectoras del GALT se basan en la producción de IgA y en respuestas celulares mediadas por linfocitos T_{h2} ^{5, 7}.

Los linfocitos T son las principales células implicadas en la inducción de tolerancia oral mediante dos mecanismos ⁴:

- La **anergia y delección clonal** es la respuesta que sigue a la administración oral de dosis altas de antígenos en modelos experimentales. Se caracteriza por una ausencia de proliferación de células T y una disminución de la producción de la citocina proinflamatoria IL-12, así como de la expresión de su receptor y de la expresión de receptores de MHC-II.
- La **supresión activa** por parte de linfocitos T CD4+ y CD8+ ocurre en respuesta a la administración reiterada de dosis bajas de antígenos orales. Estos linfocitos reguladores inhiben la respuesta antigénica mediante la secreción de citocinas anti-inflamatorias como TGF β , IL-10 e IL-4, que además estimulan la producción de IgA.

La inmunoglobulina A (IgA) es la inmunoglobulina más abundante en la mucosa intestinal. Secretada por las células plasmáticas del GALT, la IgA secretora aporta una protección específica de las superficies mucosas en la primera línea de defensa. Se caracteriza por ser resistente a la proteólisis intraluminal y no desencadenar una respuesta inflamatoria, por lo que constituye un mecanismo ideal de defensa mucosa. Evita la penetración del antígeno mediante la formación de inmunocomplejos en la luz intestinal y también se une a los antígenos a nivel intraepitelial y subepitelial cuando estos atraviesan la barrera intestinal, favoreciendo su destrucción local ^{6, 14}. Las IgA, IgG y IgM séricas secretadas por el sistema GALT forman parte de la inmunidad sistémica y eliminan antígenos que ya han penetrado y desempeñan un papel en su opsonización y fagocitosis ⁶.

Las células epiteliales, CD y M Φ , juegan también un papel importante en el desarrollo de tolerancia oral, mediante la señalización intercelular así como la secreción de citocinas y la presentación antigénica.

Las **células epiteliales** son CPA altamente polarizadas que expresan TLR. En función de donde se produce el contacto con el antígeno se desencadenará un tipo de respuesta inmunológica diferente. La unión del ligando antigénico a los receptores de superficie apicales inducen señales inhibitorias mientras que la unión a los receptores basolaterales induce respuestas inflamatorias protectoras ¹⁵. La flora comensal probablemente estimula los TLR a nivel de la membrana apical dando lugar a respuestas tolerogénicas, mientras que los patógenos invasivos estimulan los TLR basolaterales desencadenando una respuesta inflamatoria completa.

Las **CD** presentan un papel importante en el muestro de antígenos lumbales mediante la emisión de prolongaciones digitiformes a la luz intestinal y actúan como CPA en los GLM dando lugar a respuestas inflamatorias o tolerogénicas.

Los **MΦ intestinales** presentan, como veremos más adelante, un fenotipo predominantemente antiinflamatorio con una alta capacidad bactericida y una expresión reducida de MHC-II, que promueven la inducción de linfocitos T reguladores implicados en los fenómenos de tolerancia inmunológica¹⁵.

Desde un punto de vista anatómico y funcional, los **GLM** son el punto clave en el desarrollo de la tolerancia oral a antígenos. En diferentes estudios experimentales murinos se ha objetivado que la ausencia de los mismos previene el desarrollo de tolerancia sistémica^{13,16}. En ausencia de GLM se objetivan cultivos positivos para bacterias comensales en otros órganos linfoides secundarios (bazo) que desencadenan una reacción inflamatoria frente a los mismos¹². Los GLM restringen la recirculación de CPA de forma local, evitando el desarrollo innecesario de respuesta sistémica.

1.3.3/Patrones de tolerancia frente a antígenos alimentarios y flora comensal

En cuanto a la tolerancia oral debemos diferenciar las respuestas que ocurren frente a los antígenos alimentarios y frente a la microbiota intestinal, ya que su llegada a la circulación sistémica tiene efectos diferentes¹¹.

Los antígenos alimentarios dan lugar a una tolerancia oral propiamente dicha. Son capaces de inducir una tolerancia tanto local como sistémica, ya que está demostrado que las proteínas de la dieta alcanzan la circulación sistémica sin desencadenar una respuesta inmunológica a este nivel^{11,12}.

La tolerancia oral frente a la microbiota consiste en respuestas antiinflamatorias locales asociadas a la secreción de IgA, que evitan su diseminación sistémica¹². La respuesta inmunológica local frente a la microbiota (secreción de IgA, mecanismo bactericida de MΦ y confinamiento a GLM) da lugar a una situación de ignorancia sistémica, que no tolerancia, evitando así las respuestas extraintestinales^{11,14,15}. Sin embargo, aunque la llegada de antígenos comensales a la circulación sistémica no es un hecho habitual, cuando esta sucede desencadena una respuesta inmunológica protectora sistémica^{11,12}.

1.4/Papel de los macrófagos en el sistema GALT

1.4.1/Macrófagos. Generalidades

El **sistema fagocítico mononuclear** (SMF) fue descrito en los años 70 por Van Furth en un intento de incluir todas las células altamente fagocíticas y sus precursoras¹⁷. Todas ellas provienen de la misma estirpe celular, la línea mieloide, que se origina en la médula ósea (MO), son transportadas en la sangre (monocitos) y distribuidas a sus lugares funcionales en los tejidos, donde finalizan su maduración (macrófagos tisulares). La célula principal del SFM es el macrófago (MF)¹⁸.

Desde el punto de vista histológico, un MF es una célula grande, de unos 15-30 μm de diámetro y con una estructura cambiante según su estado de actividad. Presenta una superficie irregular por la presencia de numerosas microvellosidades y prolongaciones digitiformes. El citoplasma es abundante y de aspecto granular por microscopía óptica (m.o). Presenta un núcleo redondo lobulado de ubicación excéntrica, un gran aparato de Golgi muy desarrollado, un retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y gran cantidad de vacuolas endocíticas, lisosomas ricos en enzimas hidrolíticas, proteasas y lipasas, fagolisosomas y cuerpos residuales. Podemos obtener una tinción selectiva de los mismos con azul de tripano ya que fagocitan el colorante y lo almacenan en su citoplasma en forma de gránulos visibles en m.o. En su superficie expresan receptores para la inmunoglobulina G (IgG) y el complemento, que les permiten la captación y fagocitosis de antígenos opsonizados, así con MHC-II, que les permite actuar como CPA¹⁹⁻²¹.

Desde un punto de vista **funcional**, los macrófagos son un componente esencial de la inmunidad innata (célula efectora y principal célula fagocítica) y desempeñan un papel central en los mecanismos de inflamación y de defensa del organismo además de funciones para el mantenimiento de la homeostasis tisular²².

Se dividen en dos subpoblaciones diferentes en base a los receptores de superficie que expresan y a los mediadores que secretan²³. Los **macrófagos M1** son MF proinflamatorios con una eleva-

da capacidad bactericida, que secretan altos niveles de citocinas proinflamatorias y metabolitos nitrogenados y de oxidación. Son estimulados por los linfocitos T_{h1} y el estímulo activador más importante es él IFNγ. Los **macrófagos M2**, activados por los linfocitos T_{h2} para combatir patógenos extracelulares y parásitos, desempeñan también una función en la promoción de la remodelación tisular así como funciones inmunoregulatoras. Esta clasificación se realizó en concordancia con el paradigma T_{h1} y T_{h2}.

En relación a los **macrófagos tisulares**, debemos también diferenciar dos tipos de MF: residentes y activados o inflamatorios. Los **MF residentes** son aquellos que están presentes en un tejido determinado en condiciones de normalidad. Los **MF inflamatorios** son aquellos que están presentes en un tejido determinado en respuesta a un estímulo exógeno. La diferencia entre ambos tipos de MF se ha basado en sus patrones de emigración bajo condiciones de homeostasis o de inflamación y no existen marcadores que nos permitan diferenciarlos^{22,24}. El desarrollo fenotípico y funcional de los MF tisulares depende del microambiente particular en los tejidos donde maduran.

1.4.2/Fagocitosis y Killing intracelular

El mecanismo microbicida de los MΦ se basa en la fagocitosis o internalización del patógeno y la posterior degradación del mismo (Figura 3).

La definición clásica de **fagocitosis** es la endocitosis de partículas mayores de 0,5 μm, que incluyen a la mayoría de bacterias, hongos, protozoos y otras células eucarióticas²⁵. Es, por tanto, el mecanismo mediante el cual las células fagocíticas (MΦ, CD, neutrófilos y células del sistema reticuloendotelial) son capaces de unirse a estos microorganismos e internalizarlos.

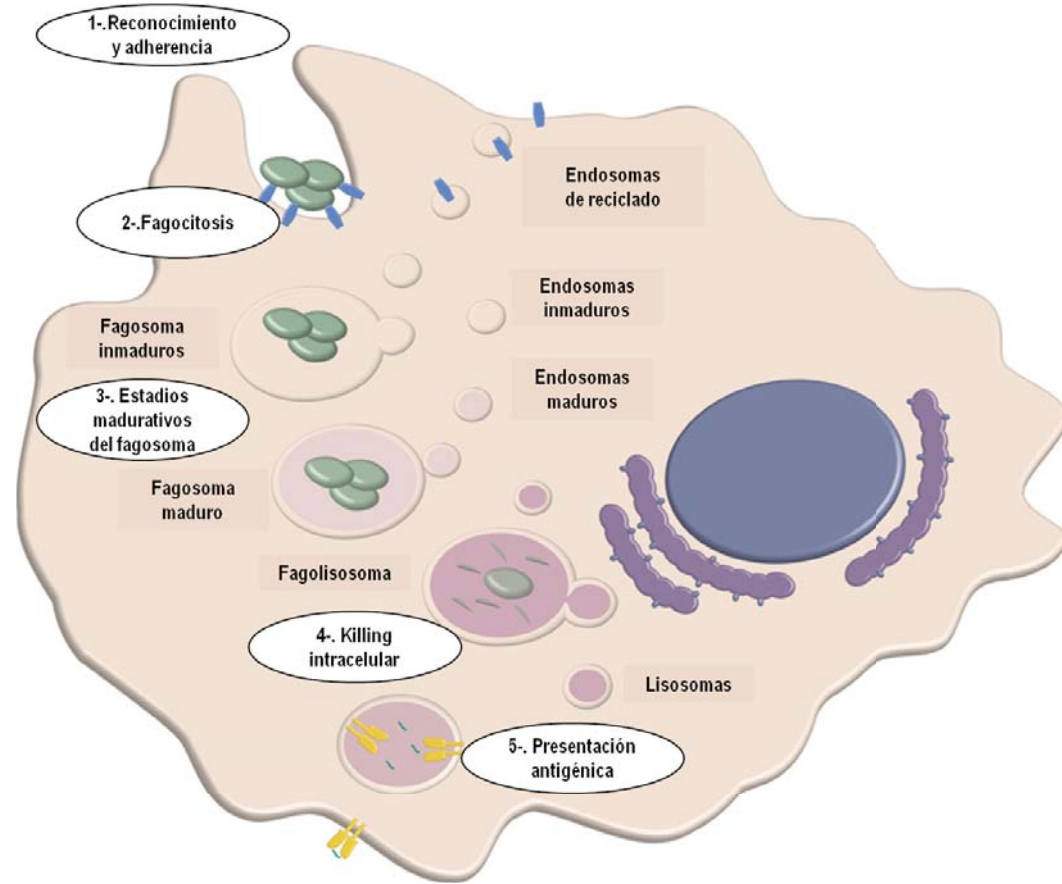
Este proceso se inicia siempre mediante la unión a receptores específicos en la membrana plasmática^{26,27}, que desencadenarán los cambios posteriores. Puede tratarse de una unión directa bacteria-MF mediante el reconocimiento de ligandos del patógeno (interacción entre los PAMPs y los PRRs) o puede ser una unión indirecta mediada inmunológicamente a través de la opsonización del patógeno, ya sea de forma específica (inmunoglobulinas) o inespecífica (sistema del complemento). En este caso, el MF tiene receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas adheridas a la superficie bacteriana y receptores del complemento^{25,27}.

Tras esta fase de reconocimiento y adherencia del microorganismo a la superficie de la célula fagocítica, tiene lugar la formación de pseudópodos por parte del macrófago, que engloban al microorganismo formando una vacuola fagocítica o fagosoma²⁵.

Una vez en el citoplasma del fagocito, los contenidos del fagosoma deben ser digeridos y destruidos. En este proceso se dan una serie de estadios madurativos del fagosoma mediante su fusión con endosomas tempranos y tardíos y finalmente con lisosomas, dando lugar a la formación final de un fagolisosoma²⁵. La **actividad bactericida o killing intracelular** del MΦ tiene lugar en el interior del fagolisosoma. Esta destrucción se lleva a cabo mediante varios mecanismos²⁸.

- la inducción de un estallido respiratorio oxidativo que da lugar a la creación de radicales superóxido a través de la inducción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa.
- la creación de radicales nitrogenados mediante la inducción de la NO-sintasa
- la liberación de enzimas tipo hidrolítico y la acidificación del pH tras la formación del fagolisosoma.

FIGURA 3: ESQUEMA DE FAGOCITOSIS/KILLING POR MACRÓFAGOS (ADAPTADO DE SMITH, L. 2013)



Los productos antigénicos resultantes de la digestión y degradación de estos patógenos serán posteriormente presentados a los linfocitos T para inducir la inmunidad adquirida ²⁸.

Todo este proceso conlleva en la mayoría de las ocasiones la destrucción de las bacterias ²⁹, aunque algunas pueden sobrevivir un cierto período de tiempo ³⁰ o escapar a estos mecanismos ^{25, 27, 28}. La no eliminación de estos microorganismos o la activación anómala y prolongada de estos MΦ genera una hiperproducción de citoquinas pro-inflamatorias que puede desencadenar un proceso inflamatorio crónico ³¹⁻³³.

1.4.3/Macrófagos del sistema GALT

Los **macrófagos intestinales** son una de las poblaciones leucocitarias más abundantes en la mucosa intestinal sana y constituyen el mayor contenido de MΦ del organismo. Se localizan a lo largo de toda la mucosa intestinal en contacto directo con el epitelio intestinal y presentan un gradiente de distribución en el tubo digestivo en relación al gradiente de la microbiota existente. Se localizan preferentemente en la LP, donde constituyen el 10-20% de las células mononucleadas, y en la cúpula subepitelial de las PP. Un pequeño porcentaje se encuentran también a nivel de las capas musculares del tubo digestivo ³⁴.

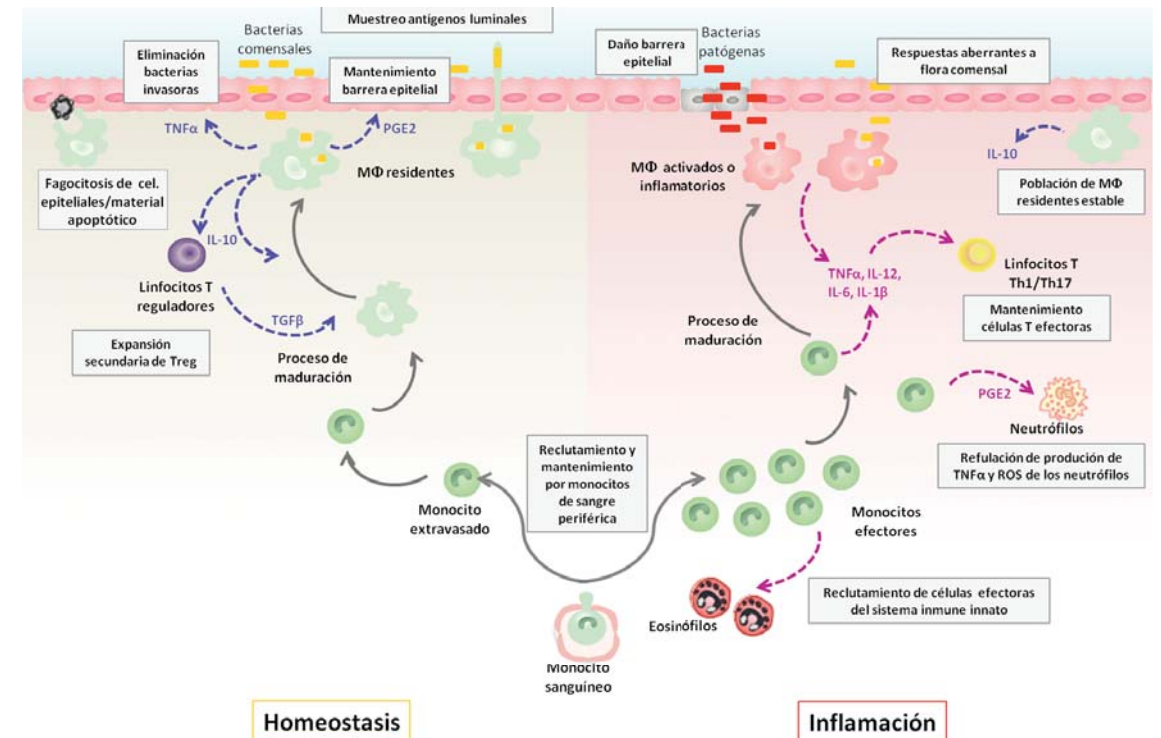
Los MΦ tisulares (epidermis, alvéolos, hepáticos, peritoneales...) derivan de precursores embriogénicos y en condiciones de homeostasis se renuevan de forma local. Sin embargo, los MΦ intestinales no presentan este automantenimiento y existe una reposición constitutiva a partir de los monocitos circulantes, que una vez entran en la mucosa intestinal maduran al fenotipo tisular. Este proceso de maduración viene determinado por el microambiente local de la mucosa intestinal, la presencia de factores de crecimiento y la relación con la microbiota intestinal ³⁴.

Los MΦ intestinales tampoco se adaptan correctamente al paradigma M1-M2, ya que presentan características de ambos grupos, como la expresión de MHC-II en superficie y la secreción constitutiva de TNFα propios de M1 y la expresión de CD206, CD163 o la producción de IL-10 propios de M2 ³⁵. Los MΦ intestinales son células con una gran plasticidad que les permite adaptarse a su entorno de forma compleja y específica, sin poder clasificarlos en ninguno de estos grupos.

Los MΦ intestinales pueden detectar e interactuar con bacterias o productos microbianos de varias maneras. De forma directa, mediante un muestreo de los antígenos luminales a través de prolongaciones digitiformes de los MΦ que se extienden entre las células epiteliales hasta el lumen, o bien mediante la adquisición del antígeno que alcanza la LP por pérdida de la integridad de la barrera epitelial. También puede ser de forma indirecta, mediante la fagocitosis de células que hayan adquirido el antígeno ²⁴ o a través de la señalización emitida por las células epiteliales que han detectado el antígeno.

Los MΦ intestinales son mediadores centrales de la homeostasis inmunológica y de la inflamación intestinal (Figura 4). A pesar de la proximidad con los antígenos luminales, la mucosa intestinal normalmente presenta mínimos signos de inflamación. Esto es posible, porque los MΦ intestinales presentan una adaptación funcional que les permite mantener la homeostasis tisular sin dar lugar a una activación continua inmunológica. En este sentido, el estado de la mucosa intestinal es un determinante clave. En condiciones normales, de integridad mucosa, los MΦ presentan una disminución de su actividad proestimuladora con una reducción en la secreción de citoquinas proinflamatorias pero sin afectación de su capacidad fagocítica y bactericida. En situaciones de inflamación mucosa, los MΦ intestinales cambian su perfil funcional aumentando su activación proinflamatoria. No existe información sobre si hay diferencias funcionales de los macrófagos intestinales en función de área anatómica intestinal donde se encuentren ²².

FIGURA 4: PAPEL DE LOS MΦ INTESTINALES EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS INTESTINAL Y EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA (ADAPTADO DE BAIN, C. 2014).



1.4.4/Macrófagos intestinales en mucosa normal

En condiciones de normalidad, los macrófagos intestinales desempeñan un papel importante en la remodelación tisular y en la prevención de respuestas inflamatorias contra bacterias comensales ³⁶.

Los MΦ intestinales participan en la remodelación tisular mediante dos mecanismos ³⁴. Por un lado, actuando como células “scavenger” que se encargan de eliminar células apoptóticas o senescentes. Por otro lado, mediante la secreción de citocinas y factores solubles que favorecen el mantenimiento de la homeostasis tisular. En este sentido, a destacar la secreción de PGE₂, que estimula la proliferación de células progenitoras en las criptas y de esta forma regula y favorece la integridad epitelial. También la secreción de TNFα, que regula el crecimiento epitelial y la permeabilidad intestinal y estimula las células mesenquimales subepiteliales que regulan la función epitelial.

En cuanto a su función inmunológica, los MΦ intestinales desempeñan su papel como células efectoras del sistema inmune innato, pero con particularidades que los diferencian de otros macrófagos tisulares. Presentan un fenotipo marcadamente antiinflamatorio sin perder una elevada capacidad fagocítica y bactericida. Esta diferenciación fenotípica viene marcada por el microambiente intestinal y los factores derivados del estroma ³⁴. Las citocinas fundamentales en este estado de hiporespuesta son la IL-10 y TGF-β. La IL-10 es una citocina inmunomoduladora que se produce en la LP en condiciones fisiológicas y que atenúa la función de los monocitos/macrófagos de forma directa y también indirectamente estimulando la producción de TGF-β de diferentes tipos celulares, incluidos MΦ y CD. IL-10 y TGF-β actúan de forma sinérgica reduciendo la expresión de receptores de superficie proinflamatorios ²². La IL-10 también promueve el mantenimiento de los linfocitos Tr en LP, que desempeñan un papel fundamental en la prevención de respuesta inflamatoria contra bacterias comensales o proteínas de la comida.

Al igual que otras células del sistema innato, los MΦ responden a PAMPS ofreciendo una respuesta rápida e inespecífica. En este sentido, los MΦ residentes expresan TLR pero hay una hiporespuesta a su activación regulada por una falta de expresión de moléculas coestimuladoras y por la presencia de IL-10, TGF-β, receptores de inhibición y señales de la propia microbiota. Esta situación de inercia o estado de refractariedad debe diferenciarse de la situación de “tolerancia a la endotoxina” en la que la exposición inicial a lipopolisacárido (LPS) suprime las respuestas siguientes a través del TLR-4. En mucosa intestinal normal, existe una supresión global del potencial estimulador de las MΦ intestinales, que asegura una ausencia de respuesta inapropiada a cualquiera de los constituyentes potencialmente inflamatorios de su entorno ^{24,36}. Existe por tanto una supresión de su respuesta inflamatoria pero no de su respuesta antimicrobiana o bactericida hacia los antígenos que penetran el epitelio.

En condiciones de normalidad y al igual que en otros tejidos, en la mucosa intestinal coexiste una población de MΦ residentes y una población de MΦ activados, que se mantienen en un equilibrio constante para mantener la homeostasis en el intestino sano y asegurar una inmunidad protectora cuando se requiera. Estos MΦ intestinales residentes en condiciones de normalidad son la población mayoritaria y se mantienen y se renuevan mediante una entrada continua y fisiológica de monocitos/macrófagos circulantes en la mucosa intestinal, que adquieren el fenotipo antiinflamatorio característico determinado por factores locales ^{22, 24, 34}.

1.4.5/Macrófagos intestinales en la mucosa intestinal inflamatoria

En la mucosa inflamatoria, los MΦ intestinales desempeñan un papel fenotípico y funcional diferente al que presentan bajo condiciones fisiológicas.

Cuando la homeostasis intestinal se ve alterada, varía la composición de MΦ intestinales en respuesta a estímulos locales de inflamación, dando lugar a un aumento de MΦ proinflamatorios o activados. Estos MΦ se caracterizan por la secreción de IL-1, IL-6, TNFα y radicales libres de oxígeno así como metabolitos nitrogenados y por la expresión de moléculas coestimuladoras de células T. De esta forma, estimulan a las células efectoras T y el reclutamiento de otras células inflamatorias (p.ej: polimorfonucleares, eosinófilos, mastocitos). Estos MΦ activados pueden reaccionar contra los antígenos lumbinales, actuar como células efectoras potentes, ejercer de CPA y producir un gran número de citocinas proinflamatorias ²². En situaciones de inflamación estos MΦ parece que

también pudieran migrar a GLM para activar linfocitos T, aunque es un hecho que no queda claro en los diferentes estudios ³⁴. Sin embargo, en este contexto inflamatorio, la subpoblación de MΦ residentes no cambia, lo que indica que son células maduras finales.

Por tanto, como hemos podido ver, los MΦ intestinales no son células inflamatorias por naturaleza sino que presentan una elevada plasticidad en respuesta a su entorno y coordinan los primeros estadios de la reparación tisular en respuesta a daño, infección o inflamación. Tras la desaparición del estímulo infeccioso o inflamatorio, la población de MΦ tisulares vuelve a la normalidad, mediante la reducción de MΦ proinflamatorios (apoptosis o conversión del fenotipo), y porque la población de MΦ residentes ha permanecido estable durante todo el proceso y desempeña un papel en la resolución del daño tisular y la restauración de la homeostasis intestinal, mediante la estimulación de linfocitos Tr ³⁴. La supresión de MΦ activados es un proceso activo y controlado, que puede observarse bajo la influencia de IL-10 o del tratamiento con esteroides ²³. La fagocitosis de material apoptótico también genera señales antiinflamatorias.

1.4.6/Células dendríticas y macrófagos intestinales

En el GALT las principales células del SMF son los macrófagos (MΦ) y las células dendríticas (CD)¹⁹.³⁷. Ambos tipos celulares desempeñan un papel central en la homeostasis intestinal, permitiendo respuestas protectoras robustas en relación a insultos patogénicos y evitando las mismas ante estímulos no patógenos.

Sin embargo, la identificación y diferenciación de ambos tipos celulares es difícil y controvertida. No puede hacerse una buena diferenciación en base a su morfología ya que las CD y los MΦ activados son similares ^{34,38}. Durante mucho tiempo su diferenciación se ha basado en la capacidad de presentación antigénica por parte de las CD, así como la expresión de MHC-II y CD11c. Sin embargo, en estudios posteriores se ha visto que estos no son rasgos diferenciales ya que los MΦ también presentan esta capacidad ^{34, 35, 38}. Dada la evidencia de ausencia de marcadores de superficie específicos de linaje celular y que el fenotipo de superficie se solapa muchas veces entre MΦ, CD y otras células mieloides, se hace necesaria la combinación de múltiples marcadores de superficie para su identificación ³⁴. Esto puede llevar a un número de subpoblaciones que es una función exponencial del número de marcadores de superficie, ya que ningún marcador distingue CD de MΦ ^{18,38}. Por ello, para algunos autores se hace difícil mantener esta diferenciación y se postula que pueda tratarse de diferentes fenotipos de la misma célula ³⁸, ya que como hemos visto, los fagocitos mononucleares son una población muy heterogénea con una gran plasticidad y diversidad funcional.

2 Traslocación bacteriana

2.1/Concepto de traslocación bacteriana

El concepto de **traslocación bacteriana (TB)** se define por primera vez en 1979 cuando Berg y colaboradores la definen como el paso de bacterias entéricas viables a través de la mucosa intestinal hacia LP, GLM y otros órganos extraintestinales³⁹. A partir de ese momento existen numerosos estudios experimentales en modelos animales que evidencian TB en situaciones clínicas diversas y su relación con el desarrollo de infección e inflamación sistémica.

En los años posteriores y con los avances en microbiología molecular, el concepto de TB se amplía incluyendo la traslocación tanto de gérmenes entéricos viables como de productos bacterianos (endotoxina, ADN bacteriano...) ⁴⁰⁻⁴². Estos productos bacterianos constituyen patrones moleculares asociados a patógenos o a microbiota (PAMPs o MAMPs) que también son capaces de activar respuestas inflamatorias mediante la activación del sistema inmune innato a través de los TLR.

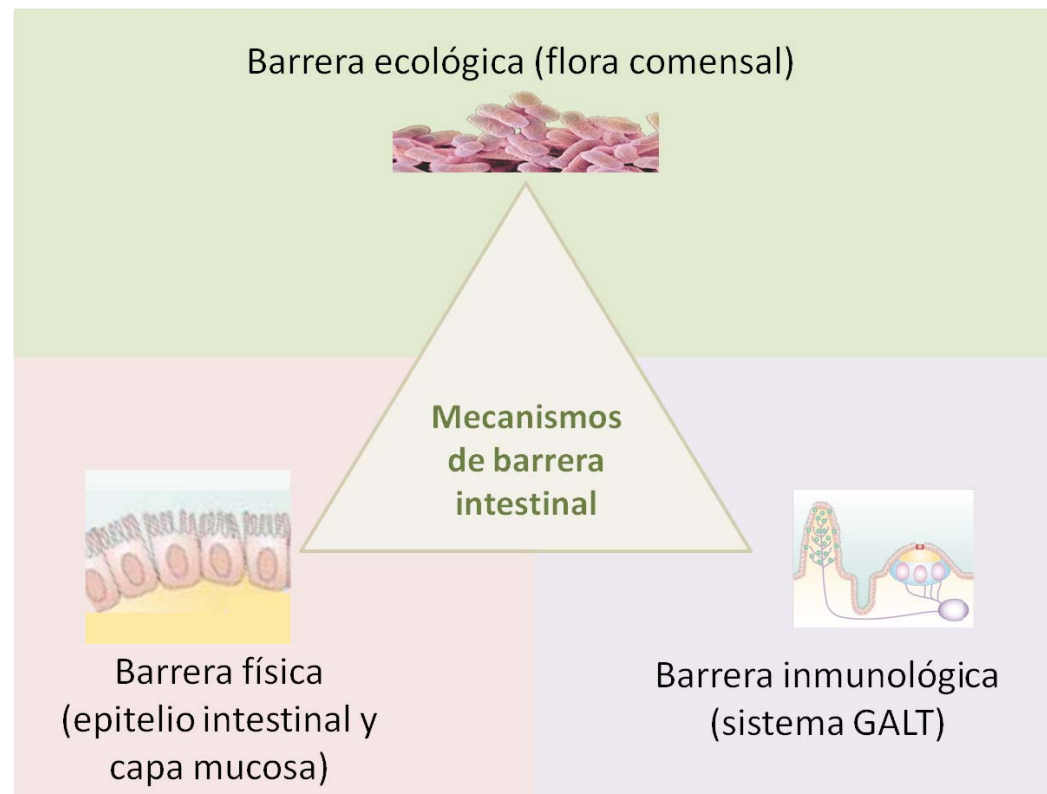
A lo largo del tracto gastrointestinal existe un gradiente de microbiota y el colon es la localización intestinal con mayor carga bacteriana. Por ello se podría pensar en el colon como el lugar de TB más evidente; sin embargo, no hay evidencia clínica o experimental al respecto ⁴³. Existen diversos estudios en modelos animales que identifican como lugares de TB el íleon distal y el ciego ⁴⁴⁻⁴⁶.

Las bacterias que traslocan con mayor frecuencia son patógenos intracelulares que resisten de alguna manera la capacidad bactericida de las células fagocíticas (p.ej.: Salmonella, Listeria). En cambio, la microbiota entérica habitual es fácilmente destruida tras su fagocitosis y únicamente sobrevive en situaciones de disfunción de los mecanismos de defensa. En estos casos, las bacterias que traslocan con mayor frecuencia son las bacterias gram negativas (Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y otras Enterobacteriaceae), enterococos y otros estreptococos ⁴⁷. Las bacterias anaeróbicas son las bacterias predominantes en la flora intestinal (100-1.000:1), sin embargo, raramente traslocan a no ser que exista daño físico de la barrera intestinal.

2.2/Mecanismos de traslocación bacteriana

2.2.1/Barrera epitelial intestinal

La barrera epitelial intestinal está compuesta por una estructura ya descrita en el primer capítulo que separa el medio interno del entorno luminal. Ejerce una función protectora que se sustenta en tres pilares (Figura 5): la microflora normal (barrera ecológica), las células epiteliales y el mucus (barrera mecánica) y la IgA secretora y las células inmunológicas del sistema GALT (barrera inmunológica) ⁴⁰. Las alteraciones en la microbiota intestinal, en la integridad de la mucosa intestinal o una disfunción inmunológica favorecerán la presencia de TB.



La **microbiota intestinal** desempeña importantes funciones fisiológicas entre las que se encuentra la protección frente a la entrada de patógenos invasivos, evitando su adherencia e inhibiendo su crecimiento mediante la competencia de nutrientes y la síntesis de sustancias antimicrobianas ^{40, 42}. También desempeña un papel fundamental en el desarrollo del sistema GALT ⁴⁸. La alteración de la microbiota intestinal, cualitativa (especies bacterianas) o cuantitativa (sobrecrecimiento bacteriano), constituye un factor de riesgo en el desarrollo de TB ^{9, 40, 42, 49}.

La **barrera epitelial**, descrita en el anterior capítulo, desempeña una función de barrera física con una permeabilidad selectiva. La entrada de antígenos luminales a través del epitelio intestinal puede ocurrir vía transcelular o vía paracelular ^{40, 43, 50}. La vía transcelular es la que tiene lugar a través de los enterocitos y las células M. En esta vía desempeñan un papel fundamental los TLR que son los responsables del reconocimiento de MAMPs e inicio de respuestas inflamatorias o de tolerancia ⁵¹. La vía paracelular es la que se produce a través de las uniones estrechas intercelulares. La vía principal de TB es transcelular ⁴⁰. La barrera epitelial puede verse alterada por lesión directa de los enterocitos o por reducción del flujo intestinal por fenómenos de isquemia-reperusión, dando lugar a un aumento de la permeabilidad intestinal que promueve la TB. Además, algunas bacterias patógenas aprovechan la ruta fisiológica de muestreo antigénico a través de las células M en el EAF para penetrar en el organismo. Otras son capaces de invadir la superficie apical o basolateral de los enterocitos, desencadenando la expresión de moléculas inflamatorias que producen cambios inflamatorios locales con alteración secundaria de la permeabilidad intestinal ⁵⁰. La vía de entrada paracelular se incrementa en situaciones patológicas en las que existe una disrupción de la barrera epitelial.

La barrera inmunológica, constituida por el GALT, es indispensable para ofrecer respuestas protectoras locales y evitar la diseminación e inflamación sistémica ⁴⁸. La disfunción de algún componente del sistema GALT puede favorecer la TB y el desarrollo de respuesta inmune sistémica ⁵².

La barrera epitelial intestinal se encuentra alterada en diversas situaciones clínicas que predisponen a la TB como son: obstrucción intestinal, ictericia obstructiva, cirugía intestinal urgente, enfermedad inflamatoria intestinal, nutrición parenteral total, situaciones de inmunosupresión... ^{43, 46}.

2.2.2/Concepto de permeabilidad intestinal

La **permeabilidad intestinal (PI)** es una característica funcional de la barrera epitelial intestinal. La mucosa intestinal permite la absorción selectiva de ciertas sustancias y nutrientes a la vez que previene de la entrada de sustancias potencialmente dañinas de la luz intestinal al medio interno.

La PI normal es aquella permeabilidad estable que existe en individuos sanos, sin signos de intoxicación, inflamación ni alteración de la función intestinal ⁵³. La PI alterada es aquella alteración no transitoria de la permeabilidad normal que conduce a una pérdida de la homeostasis intestinal, con alteración en su función y desarrollo de enfermedad ⁵³.

Todas aquellas condiciones que comporten un aumento de la PI favorecerán la TB y un aumento de la carga antigénica en la circulación, que comporta un incremento de la estimulación del sistema inmune sistémico y la activación de respuestas inflamatorias sistémicas ⁵⁴. Sin embargo, el aumento de PI puede ser causa o efecto de la TB y de la respuesta inflamatoria local y sistémica.

2.2.3/Rutas de diseminación sistémica

Tras sobrepasar la barrera epitelial y alcanzar la LP, existen diversos mecanismos de diseminación sistémica de las bacterias ^{40, 43}.

El drenaje linfático mesentérico se considera la principal vía de traslocación, siendo el GLM el primer o único punto donde pueden objetivarse bacterias comensales o patógenas viables u otros PAMPs.

También puede ocurrir a través del sistema venoso portal, con el hígado como primer órgano receptor de estos productos bacterianos, o transmural directa hacia la cavidad peritoneal.

2.3/Diagnóstico de traslocación bacteriana

La TB ha sido definida como el paso de bacterias o productos bacterianos al sistema venoso portal y órganos asociados, GLM o cavidad peritoneal ⁴⁰⁻⁴². Por tanto, su confirmación requiere la identificación de bacterias o antígenos bacterianos en alguno de estos niveles.

2.3.1/Métodos directos

La identificación de bacterias intestinales en los GLM se considera una evidencia directa de TB, por lo que el **cultivo positivo de GLM** es uno de los métodos más utilizados en estudios experimentales y clínicos, si bien en estudios clínicos en humanos el acceso a los mismos es limitado (situaciones quirúrgicas) ^{40, 41}.

Sin embargo, aunque la evidencia de cultivos positivos en GLM es el método directo más utilizado en el diagnóstico de TB, es probable que infraestime la TB ya que las técnicas de cultivo tradicionales permiten el cultivo de una minoría de bacterias intestinales y no permiten detectar bacterias viables no cultivables ^{40, 41, 52, 55}. Así pues, un cultivo positivo de GLM confirma la existencia de TB, pero la ausencia de un cultivo positivo no permite descartarla.

Otro método directo de determinación de TB es mediante la utilización de **bacterias marcadas con radiotrazador**. Estudios de TB mediante esta técnica confirman la TB de bacterias no viables en GLM y, por tanto, con cultivo negativo ⁴⁰.

2.3.2/Métodos indirectos

Los avances en microbiología molecular han ampliado las fronteras en la identificación de TB.

Se consideran métodos indirectos de determinación de TB:

- la evidencia de cultivos positivos en sangre portal o periférica.
- la detección de endotoxina en sangre periférica (SP).
- la detección de ADN microbiano en SP mediante técnicas de PCR.
- la valoración de la permeabilidad intestinal.

Estos métodos permiten la valoración de TB de forma menos invasiva ⁵².

La **endotoxina** y el **ADN microbiano** constituyen PAMPs capaces de desencadenar respuestas inflamatorias sistémicas. La detección de ADN microbiano ofrece una mayor sensibilidad respecto a los cultivos en SP y una elevada especificidad ^{40, 41}. La determinación de endotoxina, sin embargo, se correlaciona únicamente con TB de gérmenes entéricos BGN y no estima correctamente la TB de bacterias gram positivas ⁵⁶.

En algunos estudios se ha considerado **la valoración de la PI** como un método indirecto de TB, si bien el aumento de la PI es únicamente un factor favorecedor y no indispensable de la misma ^{40, 41, 52}.

2.4/Impacto clínico de la traslocación bacteriana

El fenómeno de TB puede ocurrir en individuos sanos de forma fisiológica. En condiciones normales tasas reducidas de TB, tanto de gérmenes como de endotoxina, se pueden considerar fisiológicas y son rápidamente eliminadas por el sistema fagocítico de la mucosa intestinal (MΦ, CD) y del hígado (células de Kupffer) ⁴². La tasa basal de TB, entendida como cultivo de GLM positivo, en estudios humanos está alrededor de 5-10% y en animales entorno a un 10-20% ⁴⁰. Esta **TB basal o fisiológica** permite el desarrollo del sistema GALT y el desarrollo de respuestas inmunológicas locales así como de tolerancia ⁴³.

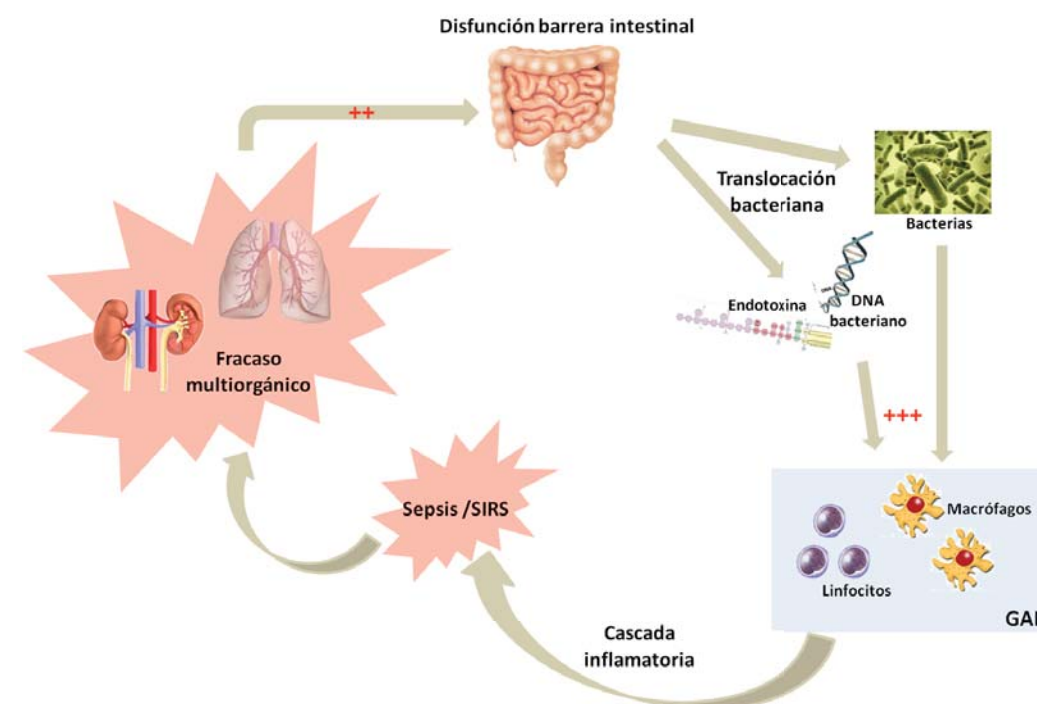
La TB se convierte en un fenómeno clínicamente significativo cuando produce complicaciones infecciosas e incrementa la morbimortalidad de los pacientes.

Existen diversos estudios clínicos en humanos donde se demuestra que la TB a GLM es un fenómeno frecuente, con tasas que oscilan entre el 4-59% de los pacientes según la condición clínica basal. Aunque la mayor parte de los pacientes que presentan TB carecen de complicaciones infecciosas, la existencia de la misma va ligada a una mayor frecuencia de las complicaciones sépticas respecto los pacientes en los que no se evidencia TB ⁴⁰.

Las tasas de TB aumentan en numerosas patologías graves como son: shock hemorrágico, pancreatitis aguda, ictericia obstructiva, cirugía abdominal, obstrucción intestinal, cirrosis hepática, grandes quemados, traumatismos severos, bypass cardiovascular, politraumatismo grave ^{41, 57}. En estas situaciones, la evidencia de TB es considerada como un factor pronóstico negativo que favorece situaciones de sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y fracaso multiorgánico (FMO). El SIRS es el conjunto de signos y síntomas clínicos que aparece como consecuencia de la activación de una respuesta inmunitaria sistémica que da lugar a fenómenos de inflamación. La sepsis es un tipo de SIRS secundario a un proceso infeccioso, en el que por tanto, se objetiva el germen responsable. En los casos de sepsis en estudios tanto experimentales como clínicos, los gérmenes hallados en GLM coinciden con los gérmenes causantes de las infecciones clínicas, lo que apoya la TB como origen de las mismas ^{41, 58}.

Se describe así la **teoría de la “sepsis de origen intestinal”** (Figura 6) en la que una alteración funcional de la barrera intestinal da lugar a una **TB patológica** que convierte al intestino en el órgano clave en la génesis de complicaciones infecciosas no determinadas, el desarrollo de SIRS y finalmente de FMO ^{43, 57} y muerte. El proceso de TB mediante la activación de los MΦ del GALT activa una cascada de respuesta inflamatoria mediada por citocinas, prostaglandinas, radicales libres de oxígeno y metabolitos nitrogenados, que convierte al intestino y en especial al GALT, en un órgano inflamatorio productor de citocinas que desencadenan y mantienen este proceso de inflamación sistémica ⁵¹.

FIGURA 6: TEORÍA DE LA SEPSIS DE ORIGEN INTESTINAL: LA TRASLOCACIÓN BACTERIANA ES EL ESTÍMULO QUE DESENCADENA Y MANTIENE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA. (ADAPTADO DE GATT, M. 2007)



Un gran número de estudios experimentales y clínicos han demostrado la relación entre aumento de la PI, el fenómeno de TB y el aumento de infecciones o SIRS ⁵⁷.

3 Cirrosis hepática y traslocación bacteriana

La cirrosis hepática es una entidad clínica que se asocia a un aumento en la TB. Este aumento es secundario a una alteración de la función de la barrera epitelial y a la existencia de una disfunción inmunitaria ⁴⁰.

La existencia de una **TB bacteriana patológica** es un punto clave en el desarrollo de las complicaciones infecciosas y hemodinámicas de la cirrosis hepática ⁵⁹.

3.1/Traslocación bacteriana patológica en la cirrosis

3.1.1/Definición de traslocación bacteriana patológica en la cirrosis

La TB es un fenómeno fisiológico que se da en condiciones de salud y que desempeña un papel clave en el desarrollo de la inmunidad. Sin embargo, en situaciones clínicas como la cirrosis hepática se objetiva un incremento cuantitativo de la TB, que da lugar al concepto de TB patológica ⁵⁹. Dadas las limitaciones de acceso a GLM y otros compartimentos para cuantificar la TB, no ha sido posible establecer un punto de corte en TB fisiológica y patológica.

La TB patológica ocasiona un aumento de la respuesta inflamatoria a productos bacterianos intestinales y un fracaso en la contención de la diseminación de bacterias entéricas, dando lugar al desarrollo de complicaciones infecciosas y lesión de otros órganos a distancia.

En la cirrosis hepática, la TB patológica, ya sea medida de forma directa mediante cultivo positivo de GLM o indirectamente mediante la medición de endotoxemia sistémica, aumenta con el grado de insuficiencia hepática y de hipertensión portal (HTPo) ^{60,61}. Sin embargo, otra medida indirecta de TB como es la detección de ADN bacteriano en la circulación sistémica no se ha asociado a diferencias con el grado de insuficiencia hepática ⁶².

La TB patológica existente en la cirrosis es diferente según el estadio ⁵⁹. En la cirrosis compensada (pre-ascítica) existe un aumento de la traslocación de productos bacterianos (ADN bacteriano, endotoxina), mientras que en la cirrosis descompensada (con ascitis) existe una TB patológica de gérmenes entéricos viables ⁵⁹. La TB de bacterias viables en GLM y localizaciones extraintestinales en pacientes con cirrosis hepática es secundaria probablemente a una alteración conjunta de la barrera intestinal y del aclaramiento inmune de las bacterias ⁵².

3.1.2/Alteración de la barrera intestinal en la cirrosis

En la cirrosis hepática se objetiva una alteración global (microbiota, integridad epitelial, GALT) de la función de la barrera epitelial que favorece una TB patológica ^{59,63}.

En referencia a la **microbiota intestinal**, en la cirrosis se aprecian cambios cuantitativos (sobrecrecimiento bacteriano) y cualitativos (disbiosis) de la misma.

Existe un sobrecrecimiento bacteriano de predominio en intestino delgado (SIBO), con un aumento de bacterias aeróbicas, que facilita la TB y el desarrollo de un perfil proinflamatorio a nivel intestinal. Los factores que promueven este SIBO en la cirrosis son: una hipomotilidad intestinal, una reducción de la secreción biliar así como una hipoclorhidria gástrica y factores intestinales inmunológicos (menor secreción de IgA y péptidos antimicrobianos) ⁵⁹.

La evidencia de un SIBO en la cirrosis se ha asociado al grado de insuficiencia hepática así como al antecedente de peritonitis bacteriana espontánea (PBE) y/o encefalopatía hepática (EH). En la cirrosis hepática avanzada se asocia a TB patológica, desarrollo de PBE y endotoxemia ^{9, 64}.

La **barrera epitelial** también se encuentra alterada en la cirrosis, afectando a sus tres componentes: mucoso, secretor y epitelial.

En cuanto al componente mucoso, en la cirrosis parecen existir cambios en las características de la capa de moco que recubre el epitelio intestinal, así como en la composición de la microbiota asociada a la capa mucosa respecto la microbiota fecal ⁵⁹.

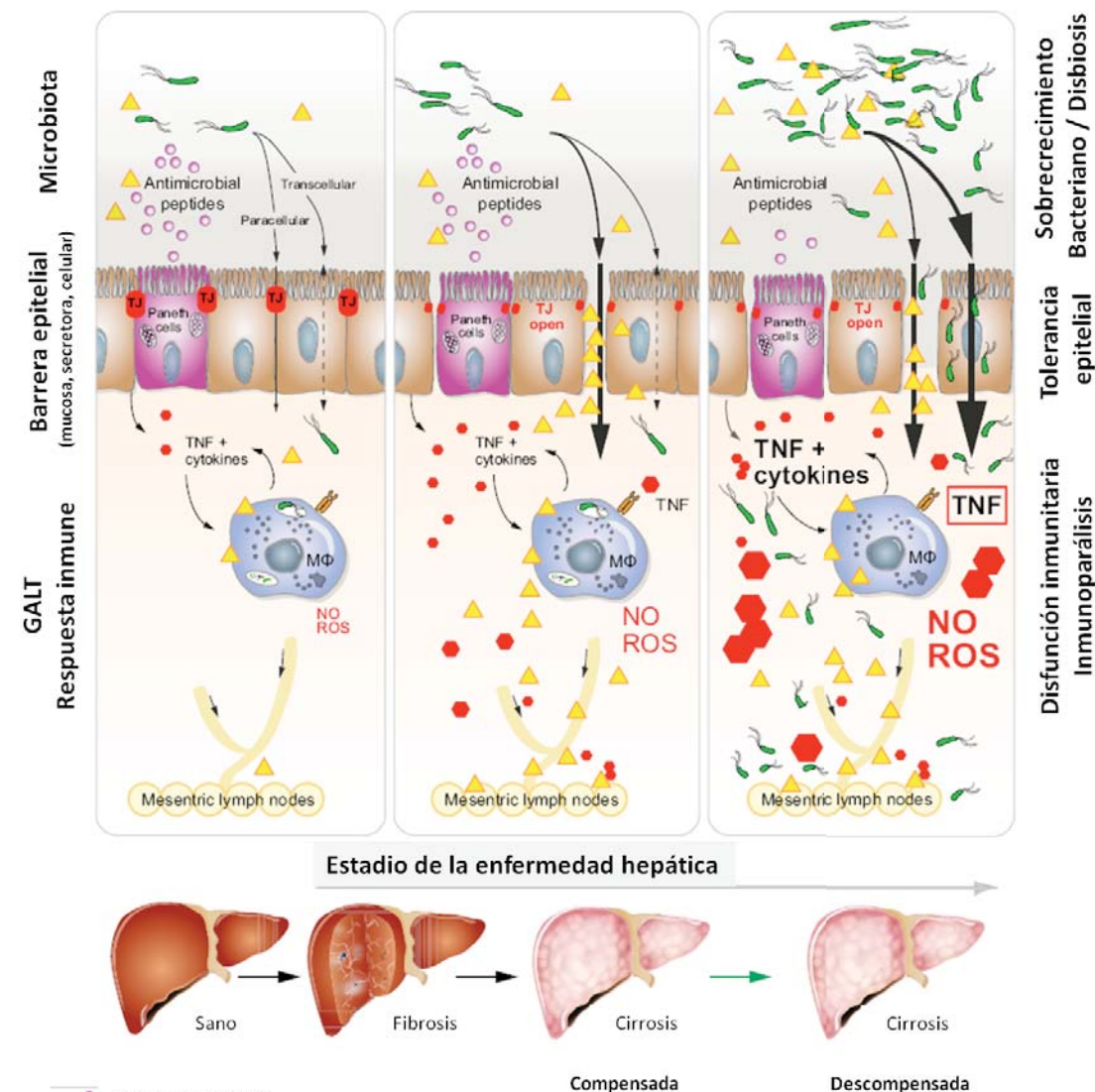
En cuanto al componente secretor, en modelos experimentales de cirrosis hepática se ha objetivado una disfunción de las células de Paneth con una menor secreción de péptidos antibacterianos, presentes habitualmente en la capa mucosa. Este hecho promueve la disbiosis intestinal y el SIBO ⁵⁹. En pacientes cirróticos también se ha objetivado una concentración de IgA fecal reducida, así como una menor secreción de IgA mucosa, sugiriendo su posible relación con la TB.

En cuanto al componente epitelial, en la cirrosis hepática existe un incremento en la PI secundario a cambios estructurales y funcionales de la barrera epitelial derivados de la propia hepatopatía. La HTPo da lugar a: un ensanchamiento de los espacios intercelulares con alteración de las uniones intercelulares estrechas o tight-junctions (TJ), congestión vascular, edema intestinal y proliferación fibromuscular, una relación vellosidad/cripta reducida, una muscularis mucosae engrosada y cambios inflamatorios locales con aumento del estrés oxidativo ^{9, 52, 64}. Los cambios inflamatorios del epitelio intestinal consisten en un infiltrado mononuclear y un aumento de los niveles de TNF α en LP, submucosa y GLM, que en modelos de cirrosis experimental se asocian a la TB. Sin embargo, no se ha podido determinar si son causa o consecuencia de la misma y parecen desempeñar un papel importante en la perdurabilidad del proceso. La alteración de las TJ se asocia a un aumento de la TB paracelular y los cambios inflamatorios epiteliales, que incrementan las transcitosis, se asocian a un aumento de la TB transcelular. La malnutrición asociada a la cirrosis es otro factor asociado a un incremento de la PI.

Finalmente, en la cirrosis existe una disfunción de la **respuesta inmunitaria** local (GALT) y sistémica, que conlleva una disminución en el aclaramiento de bacterias y productos bacterianos, aumentando así la TB ^{59, 64}. Existe una situación de relativa tolerancia epitelial a la TB secundario a la disfunción del sistema GALT y de la respuesta inflamatoria local ⁵⁹. Además, factores genéticos como la presencia de determinados polimorfismos de los receptores de patrones de respuesta molecular de superficie (TLR) e intracelulares (NLR) se han asociado a alteraciones en la barrera intestinal e incremento de TB, con un incremento en la susceptibilidad a desarrollar PBE.

La tasa de TB patológica aumenta de forma progresiva con el grado de insuficiencia hepática de la cirrosis ya que este a su vez se asocia a alteraciones más marcadas de la función de la barrera epitelial ⁵⁹ (Figura 7). La TB de bacterias viables (cultivo positivo en GLM) es superior en pacientes con cirrosis avanzada (Child-Pugh C) ^{59, 60}.

FIGURA 7: TRASLOCACIÓN BACTERIANA PATOLÓGICA Y ESTADIOS DE LA CIRROSIS HEPÁTICA (ADAPTADO DE WIEST, R. 2014)



El hígado desempeña un papel relevante en la TB, ya que es el primer órgano expuesto a productos bacterianos intestinales a través del sistema venoso portal y actúa como filtro hepático evitando su paso a la circulación sistémica. En la cirrosis se evidencia una alteración en esta función secundario a una disfunción del sistema reticuloendolelial (RES) y a la presencia de anastomosis portosistémicas ⁴⁹.

3.1.3/Endotoxemia en la cirrosis hepática

La endotoxina es un componente principal de la pared celular de las BGN y un potente activador de la respuesta inmunológica. La determinación de endotoxina en SP o portal es un medidor indirecto de TB ⁵².

En los pacientes cirróticos se objetivan unos niveles de endotoxemia más elevados que en la población sana, siendo mayores en la circulación portal que en la sistémica. Los niveles de endotoxina se correlacionan con el grado de insuficiencia hepática, con las complicaciones asociadas a la cirrosis (como la insuficiencia renal, la hemorragia digestiva por varices o la encefalopatía hepática) y con una mayor mortalidad ⁶⁴.

3.2/Disfunción inmunitaria en la cirrosis

La TB es clínicamente significativa cuando tiene lugar un defecto de los mecanismos de defensa inmunológicos, locales o sistémicos, que permite una diseminación sistémica de las bacterias trasladadas y favorece el desarrollo de infecciones, sepsis y SIRS ⁹.

La cirrosis constituye el estadio final de múltiples enfermedades hepáticas crónicas de etiología diversa y se asocia a una situación de disfunción inmunológica que se conoce como el síndrome de disfunción inmunitaria asociado a cirrosis (SDIAC) ⁶⁵. El SDIAC se caracteriza por una alteración del sistema inmune, tanto innato como adquirido, en la que concurren de forma simultánea mecanismos de inmunosupresión y de sobreestimulación que causan un incremento en la susceptibilidad a los procesos inflamatorios agudos y una respuesta inmunológica inapropiada, tanto local como sistémica ⁶⁶. El grado de disfunción inmunitaria es variable a lo largo de la enfermedad hepática, guardando relación con la gravedad y la etiología de la misma ⁶⁵. En contexto del SDIAC tiene lugar una TB patológica asociada a un aumento de la endotoxemia y a un aumento de la tasa de infecciones bacterianas sistémicas en la cirrosis.

El origen del SDIAC es multifactorial secundario a una estimulación continua del sistema inmunológico por MAMPs y DAMPs, a una reducción en la síntesis hepática de factores tróficos, al hiperesplenismo y a la propia etiología de la cirrosis. La interacción persistente de bacterias entéricas con estimulación del sistema inmune puede llevar a una situación de desgaste e inmunoparálisis que incrementa el riesgo de infecciones ⁶⁷.

3.2.1/Alteraciones de la inmunidad innata en la cirrosis

La inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa frente a patógenos. En la cirrosis se han objetivado alteraciones funcionales de neutrófilos, MΦ, células natural-killer (NK) y del sistema del complemento (Tabla 1). Todas estas alteraciones incrementan las susceptibilidad a padecer infecciones ⁶⁸.

TABLA 1: ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA EN LA CIRROSIS ⁶⁸

- Disminución de la quimiotaxis de los neutrófilos y MΦ.
- Disminución de la capacidad fagocítica de los neutrófilos y MΦ.
- Disminución de la capacidad bactericida de los neutrófilos y MΦ.
- Disminución de la actividad de las células NK.
- Disminución de la capacidad de opsonización del suero.
- Disminución de la función hemolítica del complemento.

Aunque existen pocos estudios al respecto, las alteraciones del sistema inmunitario que aumentan la susceptibilidad a las infecciones parecen estar determinadas básicamente por la insuficiencia hepática, mientras que la causa de la hepatopatía es un determinante secundario ⁶⁹.

Alteración de las vías de señalización TLR:

La activación del sistema inmune innato se basa en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a microbios comensales o patógenos oportunistas (MAMPs) e incluso a patrones moleculares asociados a daño o lesión celular (DAMPs). Esto es posible gracias a la presencia de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) presentes tanto en la superficie como en el citoplasma de las células del sistema inmune innato. La activación de los PRRs puede dar lugar a respuestas pro y antiinflamatorias así como inmunogénicas o de tolerancia. Los TLR y los NLR son subtipos de PRR ampliamente estudiados y es conocida su alteración en la cirrosis ⁶⁶.

Existen estudios en células hepáticas y en monocitos de SP donde se objetiva una alteración de la expresión y funcionalidad de los TLR en respuesta a estímulos agudos y crónicos. Las vías de TLR-2 y TLR-4 son las más importantes para el reconocimiento bacteriano. El TLR-2 responde predominantemente a los componentes de la pared celular de bacterias Gram positivas (BGP) y el TLR-4 está implicado en el reconocimiento de endotoxina de las BGN. En los pacientes cirróticos existe una alteración funcional de ambos receptores (expresión reducida y alteración de la vía de señalización intracelular) secundaria a una exposición prolongada a endotoxina. Las alteraciones de estos PRRs secundaria a la cirrosis así como la existencia de polimorfismos genéticos desempeñan un papel significativo en la susceptibilidad incrementada a las infecciones ^{9,66}.

Monocitos / Macrófagos:

Los monocitos (Mo) y los macrófagos (MΦ) tisulares son las principales células fagocíticas del sistema inmune innato y también desempeñan un papel en la presentación antigénica y la activación de la respuesta inmune adaptativa.

El SDIAC se caracteriza por una alteración en la función de los Mo en varios niveles: quimiotaxis reducida, aumento en la producción de radicales superóxido, disminución de la capacidad fagocítica y bactericida y una menor producción de enzimas lisosomales ⁶⁶. Todas estas alteraciones son relevantes en el desarrollo de las respuestas inflamatorias, la progresión de la cirrosis y el aumento de la susceptibilidad a las infecciones bacterianas.

En los pacientes con cirrosis y ascitis los Mo de SP se encuentran activados y presentan un aumento en la secreción de TNFα dependiente de endotoxina. Sin embargo, la respuesta inmune innata es disfuncional ya que presentan una menor capacidad de fagocitosis y killing ⁹. Además, en los pacientes cirróticos con insuficiencia hepática avanzada o con acute-on-chronic liver failure (ACLF) se observa una situación de inmunoparálisis secundaria a la endotoxemia crónica, que se caracteriza por una menor expresión de moléculas HLA-DR en los Mo que da lugar a un predominio de los mecanismos antiinflamatorios (incremento de IL-6 y IL-10) y a una supresión de los mecanismos proinflamatorios (reducción en los niveles de TNFα) ⁶⁶.

Los MΦ tisulares más ampliamente estudiados en la cirrosis han sido los hepáticos o células de Kupffer (CK), que desempeñan un papel clave en la patogénesis de la cirrosis hepática ⁶⁶. Las CK activadas por PAMPs/DAMPs participan en:

- la progresión de la fibrosis hepática a través de la estimulación de las células hepáticas estrelladas, que son las células responsables de la fibrogénesis ⁷⁰.
- el aumento de la presión portal, mediante la producción de agentes vasoconstrictores (tromboxano A2 -TXA2-) ⁷¹.
- el aumento de la TB y del riesgo de infecciones, secundario a una alteración en el número y en la capacidad fagocítica de la CK ⁷².

La mayoría de estudios se han hecho en Mo de SP o en CK que desde un punto de vista funcional parecen ser diferentes a los MΦ del sistema GALT (LP, PP, GLM), como vimos en capítulos anteriores, por lo que probablemente deban diferenciarse los mecanismo de respuesta innata sistémicos de los locales. En este sentido, los estudios de MΦ del GALT son escasos.

Neutrófilos:

En la cirrosis, los neutrófilos en SP también se encuentran en un estado de activación constante, probablemente secundario a la exposición continuada a endotoxina y productos bacterianos. Este

estado de activación constante origina una disfunción de la actividad inmunológica por agotamiento, que se caracteriza por una menor quimiotaxis, capacidad fagocítica y capacidad bactericida de estas células. Estas alteraciones se correlacionan con el aumento de la tasa de infecciones y la mortalidad en la cirrosis ^{66, 68}.

El plasma de los pacientes cirróticos tiene un papel relevante en la inducción de disfunción fagocítica de los neutrófilos y, a su vez, ésta se correlaciona con el grado de insuficiencia hepática ^{68, 73}.

A la alteración funcional de los neutrófilos en la cirrosis debe añadirse la existencia de una neutropenia secundaria al hiperesplenismo y al incremento de la apoptosis ⁶⁶.

Complemento:

En la cirrosis existe una alteración del complemento que se caracteriza por un descenso de los niveles (básicamente C3) y de la capacidad opsonica. Esta alteración del complemento da lugar a un reconocimiento bacteriano deficitario y una menor capacidad bactericida en la cirrosis y se correlaciona con un aumento de las infecciones y de PBE, así como con una peor función hepática ^{9, 66}.

La capacidad fagocítica de Mo, MΦ y neutrófilos puede verse reducida de manera intrínseca (como vimos previamente) o asociada a un déficit de opsonización, que se correlaciona con niveles bajos de C3 en suero y líquido ascítico (L.A).

3.2.2/Alteraciones de la inmunidad adaptativa en la cirrosis

En la cirrosis se objetiva también una alteración en la respuesta inmunológica adaptativa ⁶⁸ (Tabla 2).

La alteración del sistema inmune adaptativo da lugar a una respuesta inmunológica local deficiente a nivel de la mucosa intestinal, que favorece el acúmulo de bacterias en GLM y favorece su diseminación a localizaciones extraintestinales ⁹.

Linfocitos B:

Los linfocitos B se encuentran alterados en cuanto a su fenotipo y función, de forma que en la cirrosis se objetiva ⁶⁶:

- un descenso en el número de células B memoria.
- una menor respuesta a la activación tras el reconocimiento antigénico directo o a través de CPA, probablemente por una menor expresión de TLR.
- un aumento del cociente sérico IgA/IgG probablemente secundario a una estimulación antigénica mantenida (TB persistente), con un aumento en la síntesis de IgA de origen mucoso y un descenso en la síntesis de IgG.
- una reacción cruzada epítomos propios-ajenos.

TABLA 2: ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA EN LA CIRROSIS ⁶⁸

- Alteración en las CPA:
 - Reducción en la expresión de MHC-II en los MΦ.
 - Alteración en la maduración de las CD.
- Inhibición de la proliferación de linfocitos T y reducción en la síntesis de citocinas mediadas por linfocitos T.
- Inhibición de los mecanismos de coestimulación de respuesta inflamatoria de los linfocitos T.
- Alteración en la síntesis de TNF-α por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+.
- Incremento en la fracción de células CD4+.
- Aumento en la circulación de citocinas antiinflamatorias.

Linfocitos T:

En cuanto a los linfocitos T, en los pacientes con cirrosis avanzada se objetiva ⁶⁶:

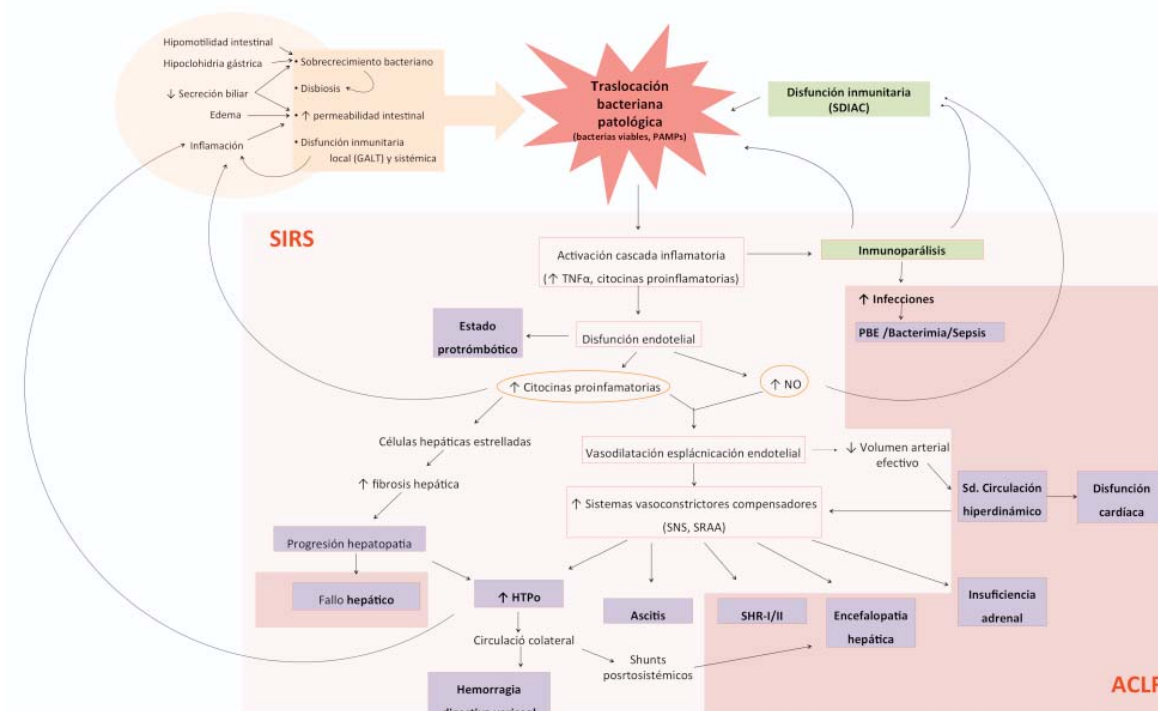
- un descenso del cociente CD4+/CD8+, que se asocia a un aumento en la fibrogénesis en estudios animales y humanos.
- secreción de citocinas con perfil fibrogenético (IL-17, IL-4, IL-13).
- depleción de células T totales y naïve.
- supresión en la expresión de moléculas coestimuladoras de la respuesta inmunológica durante la presentación antigénica.
- estimulación mantenida y agotamiento de las células T secundario a TB patológica (estimulación antigénica prolongada).

3.3/Papel de la traslocación bacteriana en las complicaciones de la cirrosis

La TB es clínicamente significativa cuando se asocia a un aumento de la morbimortalidad. En el caso de la cirrosis, la evidencia de una TB patológica se correlaciona con las complicaciones principales de la cirrosis (Figura 8): desarrollo de ascitis, hipertensión portal (HTPo) grave, coagulopatía, sangrado variceal, síndrome hepatorenal (SHR), peritonitis bacteriana espontánea (PBE) y encefalopatía hepática (EH), así como con la mortalidad asociada a la misma ^{42, 69}.

La TB de bacterias viables (cultivo positivo en GLM) es superior en pacientes con cirrosis avanzada (Child-Pugh C)60. Los niveles de TNFα en GLM se correlacionan también con el grado de insuficiencia hepática y con el desarrollo de infecciones bacterianas ^{59, 74}. La detección de ADN bacteriano en SP o L.A no se correlaciona con el grado de insuficiencia hepática ni la alteración hemodinámica, pero sí que muestra una correlación con una mayor producción de NO por parte de los MΦ peritoneales y una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias ⁵².

FIGURA 8: PAPEL DE LA TRASLOCACIÓN BACTERIANA PATOLÓGICA EN LA PROGRESIÓN DE LA CIRROSIS HEPÁTICA Y SUS COMPLICACIONES



3.3.1/Traslocación bacteriana patológica y fibrosis hepática

La inflamación persistente conduce a la progresión de la fibrosis hepática y al desarrollo de complicaciones asociadas a la misma.

Las bacterias y productos bacterianos traslocados activan las CK en el hígado a través de los TLRs y NLRs, dando lugar a la activación de vías de señalización con producción de mediadores inflamatorios. Las células hepáticas estrelladas y las células endoteliales hepáticas también son activadas por estos receptores (TLR, NLR) así como por la respuesta inflamatoria patológica de las CK, y son las responsables del desarrollo de la fibrosis hepática y de la disfunción de la microcirculación hepática, respectivamente ⁶⁴. Todo ello contribuye a la progresión de la fibrosis y al aumento de la resistencia vascular hepática, con un incremento secundario de la HTPo.

3.3.2/Traslocación bacteriana patológica e hipertensión portal

La HTPo en la cirrosis es un factor promotor de TB y de unos niveles elevados de endotoxina plasmática. A su vez, la TB y la endotoxemia agravan la HTPo mediante la inducción de vasodilatación esplácnica y sistémica y mediante la inducción de una respuesta inflamatoria a nivel hepático (TNF α) ⁶⁴. Se trata por tanto de un círculo que se auto perpetúa. En modelos experimentales murinos, la administración intraperitoneal de endotoxina puede incrementar la presión portal y esta a su vez incrementa la permeabilidad intestinal ^{49, 75}.

El endotelio vascular desempeña un papel importante en la regulación del tono vascular a través de la secreción de sustancias vasoactivas: vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO) o la prostaciclina, y vasoconstrictoras como el tromboxano-2 (TXA2). La disfunción endotelial en la cirrosis es la responsable de la reactividad vascular alterada, que es un factor clave en el desarrollo de HTPo mediante el aumento de la resistencia vascular intrahepática y portal ⁷⁶.

La activación de Mo/M Φ secundaria a una TB patológica (con producción de citocinas proinflamatorias, TXA2 y NO) se ha relacionado con la HTPo, con el desarrollo de sangrado variceal y con la mortalidad del paciente cirrótico ^{49, 66}.

A nivel hepático, la activación de las CK da lugar a un aumento en la producción de TXA2 que ocasiona un incremento en la resistencia portal y una disfunción secundaria de la microcirculación hepática ⁶⁴. A nivel mesentérico la producción de NO aumenta la vasodilatación esplácnica, que a su vez estimula los mecanismo vasoconstrictores compensatorios (sistema nervioso simpático, sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopresina), que dan lugar a un incremento en la HTPo, en la retención hidrosalina responsable de la producción de ascitis, y de la alteración del flujo sanguíneo a diferentes órganos favoreciendo su disfunción ⁷⁶.

3.3.3/Traslocación bacteriana patológica y circulación hiperdinámica

La cirrosis se caracteriza por un estado de circulación hiperdinámica que consiste en hipotensión arterial, resistencia vascular sistémica reducida, aumento del gasto cardíaco y una sensibilidad reducida a la acción de vasoconstrictores.

El principal estímulo vasodilatador en la cirrosis es el NO, que desempeña un papel importante en la patogénesis de la HTPo y del estado de circulación hiperdinámica propio de la cirrosis, así como en la integridad de la mucosa intestinal (aumento de la PI) y en la TB. En la cirrosis la existencia de una TB patológica con unos niveles de endotoxemia persistentemente elevados, dan lugar a un aumento en la inducción de la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) con un aumento de la producción vascular de NO ⁶⁴.

3.3.4/Traslocación bacteriana patológica y encefalopatía hepática

La EH abarca un amplio espectro de alteraciones neuropsiquiátricas asociadas a la insuficiencia hepática aguda y crónica y a la presencia de anastomosis portosistémicas.

La hiperamonemia objetivada en los cirróticos es un factor clave pero no único en la patogenia de la EH. Es bien conocido que las infecciones bacterianas son desencadenantes frecuentes de EH. Recientemente se han descrito otros factores asociados a la activación de la cascada inflamatoria que actúan de forma sinérgica con la alteración del metabolismo del amonio en el desarrollo de EH ⁷⁷.

En la cirrosis la coexistencia de un estado de hiperamonemia, una disfunción inmunológica y un estado de inflamación crónica dan lugar a un aumento del flujo cerebral y a la aparición de edema cerebral intra y extracelular, así como a un incremento del estrés oxidativo y aumento de la permeabilidad ⁷⁷. Así pues, el estado de inflamación sistémica secundario a una TB patológica es un factor clave en la patogénesis de la EH, tanto en su aparición como en la exacerbación de los síntomas crónicos ^{64, 67}. En estudios experimentales se ha demostrado la relación entre la aparición de EH y niveles elevados de endotoxina plasmática, así como su relación con cambios en la microbiota intestinal ^{78, 79}.

3.3.5/Traslocación bacteriana patológica y fracaso renal

La endotoxina es un vasoconstrictor renal que se correlaciona con unos niveles elevados de endotelina y un aclaramiento de creatinina reducido en los pacientes cirróticos.

La TB patológica induce un estado de inflamación sistémica con aumento de citocinas inflamatorias que predispone al desarrollo de un síndrome hepatorenal (SHR). La PBE y la sepsis en el cirrótico predisponen al desarrollo de SHR y este riesgo se mantiene a pesar de la resolución de la infección con antibioticoterapia, por lo que no depende exclusivamente de la virulencia intrínseca de la bacteria sino de la respuesta excesiva proinflamatoria y los cambios hemodinámicos asociado a la sepsis ^{64, 67}.

3.3.6/Traslocación bacteriana patológica y coagulopatía

Los pacientes cirróticos presentan riesgo de sangrado y de trombosis.

El riesgo hemorrágico es consecuencia de la plaquetopenia secundaria a hiperesplenismo y del déficit en la síntesis de factores de coagulación secundario a la insuficiencia hepática.

Sin embargo, la cirrosis constituye también un estado de riesgo protrombótico, sobretudo en la circulación portal. La respuesta de inflamación sistémica inapropiada que caracteriza la cirrosis, se acompaña de lesión y disfunción endotelial, que ocasiona un bajo grado de coagulación intravascular. El factor de Von Willebrand (FVW) es un marcador de daño endotelial, que se correlaciona y aumenta con el grado de insuficiencia hepática y de endotoxemia ⁶⁴. Niveles elevados de FVW son claves en la coagulopatía por su participación en la hemostasia primaria, como mediador de adherencia plaquetaria al endotelio, y en la coagulación, como transportador del factor VIII. Además niveles elevados de FVW participan en el estado de hipercoagulabilidad de estos pacientes, lo que contribuye al deterioro hepático por inducción de trombosis en la microcirculación hepática y aumento de la HTPo ⁷⁶. A nivel intestinal favorecen la existencia de cambios inflamatorios locales y de isquemia que favorecen a su vez la TB, cerrando de nuevo el círculo.

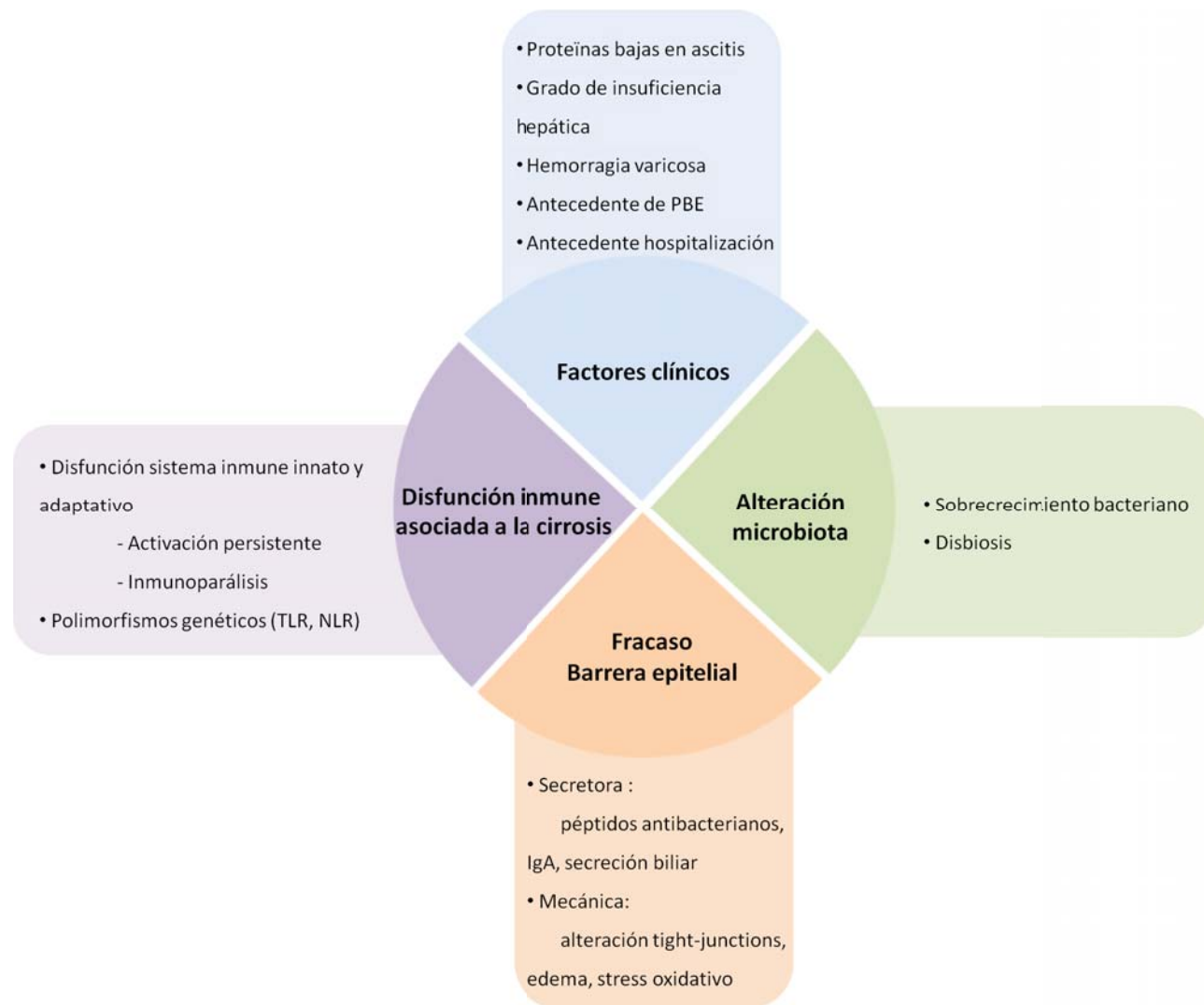
En la cirrosis, el subgrupo de pacientes infectados y los que presentan ACLF tienen una mayor activación de la coagulación intravascular por citocinas proinflamatorias, que da lugar a hipoxia tisular y fracaso orgánico. Además, la propia activación de la coagulación constituye un factor inductor de inflamación ⁶⁷.

3.3.7/Traslocación bacteriana patológica y complicaciones infecciosas

Las infecciones bacterianas son las responsables de una gran parte de la morbilidad y la mortalidad asociada a la cirrosis y son causa frecuente de descompensación aguda de la misma. La mayoría de estas infecciones son secundarias a BGN de origen entérico, postulándose la TB como la vía principal de infección en estos pacientes.

La **incidencia** de infecciones bacterianas en el paciente cirrótico es de 4 a 7 veces superior que la de la población general, con una incidencia aproximada del 30% de los pacientes cirróticos hospitalizados, si bien puede aumentar en contexto de hemorragia digestiva o insuficiencia hepática avanzada ^{72, 80}. Los factores clínicos asociados a un mayor riesgo de infección en el paciente cirrótico son: una insuficiencia hepática avanzada, hemorragia digestiva varicosa, proteínas bajas en líquido ascítico, antecedente previo de PBE o de hospitalización ⁶⁷.

FIGURA 9: PATOGÉNESIS DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS (ADAPTADO DE JALAN R, 2013)



Además de presentar un mayor riesgo de infecciones, la **gravedad** de las mismas también es mayor en los pacientes cirróticos, que presentan una mayor mortalidad asociada a sepsis y a fracaso orgánico⁸¹. Las infecciones bacterianas en la cirrosis conllevan una activación exagerada de la cascada inflamatoria y se asocian a un riesgo mayor de desarrollo de sepsis, disfunción renal, hemorragia varicosa, deterioro de la coagulación y aumento de la EH. Así pues, son un claro factor de mal pronóstico que comporta un incremento significativo en la mortalidad (25-50% en la cirrosis infectada frente al 5-20% en la cirrosis sin evidencia de infección)⁶⁷. Su efecto deletéreo en la supervivencia es mayor en la cirrosis descompensada y aumenta también en el caso de las infecciones nosocomiales, ya que la mayoría están causadas por bacterias multiresistentes que presentan mayores tasas de fracaso de respuesta al tratamiento y mayores tasas de shock séptico⁶⁷.

La evidencia de **SIRS en la cirrosis** tiene valor pronóstico incluso en ausencia de infección bacteriana objetivada, probablemente como indicador de infección bacteriana oculta, y contribuye

al desarrollo de fracaso orgánico (ACLF) mediante mecanismos inmunológicos, metabólicos y hemodinámicos⁸¹. La TB patológica, aplicando la teoría de la sepsis de origen intestinal, conduce a un estado patológico de inflamación sistémica que favorece el desarrollo de SIRS y fracaso orgánico. Así mismo, las infecciones bacterianas son un desencadenante conocido de SIRS, que se diagnostica en un 57-70% de los pacientes infectados⁶⁷.

La difícil aplicabilidad de los criterios diagnósticos clínicos de SIRS en el paciente cirrótico probablemente conduce a un infradiagnóstico del mismo. Los criterios diagnósticos de SIRS en la cirrosis tienen una especificidad menor para inflamación e infección, lo que dificulta el diagnóstico de sepsis en estos pacientes^{67, 76, 82}. En la cirrosis puede haber alteraciones del recuento leucocitario secundarias al hiperesplenismo, alteraciones de la frecuencia respiratoria secundarias a la existencia de ascitis o encefalopatía y alteraciones de la frecuencia cardíaca secundarias al síndrome hiperdinámico o a la toma de fármacos betabloqueantes⁶⁷.

Las infecciones bacterianas constituyen un estadio distintivo de la historia natural de la progresión de la cirrosis y el mayor evento precipitante de descompensación hepática y ACLF⁸³.

Las **infecciones más frecuentes** en el paciente cirrótico son: PBE (25%), infecciones urinarias (20%), infecciones respiratorias-neumonía (15%), infecciones de piel y tejidos blandos y la bacteriemia espontánea (12%)^{67, 84}.

La **peritonitis bacteriana espontánea** es una complicación frecuente y grave de los pacientes con cirrosis y ascitis. Es la complicación infecciosa más frecuente en los pacientes con cirrosis avanzada, con una prevalencia entorno al 3,5% en los pacientes ambulatorios y del 10-25% de los pacientes cirróticos hospitalizados⁶⁹.

La PBE consiste en una infección monomicrobiana del líquido ascítico (L.A), causada en su mayoría por gérmenes gram negativos de origen entérico, en especial *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. El diagnóstico se basa en un recuento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en L.A mayor a 250 células/ μ l, ya que es el marcador diagnóstico más sensible⁸⁵. La obtención de un cultivo positivo de L.A no es imprescindible para su diagnóstico, ya que esto ocurre en tan solo un 40% de los casos de PBE^{69, 85}. Existe también la situación de bacterioascitis, en la que el recuento de PMN es inferior a 250 células / μ l pero el cultivo es positivo y que, en ausencia de tratamiento, da lugar a una PBE en un 38% de los casos⁶⁹. Los tests basados en detección de ADN bacteriano mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa no mejoran la precisión diagnóstica de la PBE y no permiten determinar el perfil de resistencias bacterianas⁶⁹.

La hipótesis más aceptada en la actualidad para explicar la patogenia de la PBE es la TB, que da lugar a episodios de bacteriemia y colonización del L.A por gérmenes entéricos. El desarrollo final de PBE dependerá en gran medida de la capacidad antimicrobiana del L.A. Así pues, la PBE es la manifestación clínica evidente de TB patológica desde el intestino, mostrando la asociación existente entre la microbiota intestinal y las alteraciones de la inmunidad en el desarrollo de infecciones⁶⁹.

El tratamiento estándar de la PBE se basa en el uso de cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, en la actualidad es importante tener en consideración los factores de riesgo de resistencia al tratamiento estándar como son: infección nosocomial, profilaxis antibiótica con norfloxacino, el tratamiento con betalactámicos en los últimos 3 meses o el antecedente de infección por bacterias multiresistentes. En estos casos se aconseja utilizar antibioticoterapia de amplio espectro adaptada a los perfiles de resistencia local de cada centro⁸⁶.

La mortalidad hospitalaria de la PBE está entre el 30-50% y presenta un riesgo de recurrencia al año en los pacientes que sobreviven del 70%⁸⁷. Por este motivo, está indicada la administración de profilaxis antibiótica en los pacientes con alto riesgo de PBE⁶⁹.

3.3.8/Traslocación bacteriana patológica y acute-on-chronic liver failure

El **acute-on-chronic liver failure (ACLF)** es una entidad cada vez más reconocida en las complicaciones del paciente cirrótico. Se define como un deterioro agudo y progresivo de la función hepática en pacientes con una cirrosis establecida, que da lugar a fracaso de otros órganos extra-hepáticos (FMO) y se asocia a una elevada mortalidad a corto plazo^{67, 83}.

La causa más frecuente de ACLF es la infección bacteriana (33%)⁶⁷, si bien la evidencia de fracaso orgánico tiene lugar a menudo en ausencia de shock séptico⁸³.

El desarrollo de una respuesta inflamatoria excesiva en respuesta a estímulos infecciosos es clave en la patogénesis de esta entidad. En el paciente cirrótico se dan conjuntamente una respuesta inflamatoria exagerada junto con una alteración en los mecanismos de compensación antiinflamatorios, que conducen a un estado de inmunoparálisis⁶⁷. Este estado de inmunoparálisis predispone a su vez a la adquisición de infecciones y a la auto-perpetuación del ciclo. Todo ello da lugar un deterioro rápido de la función cardiovascular y de la perfusión de órganos así como daño directo de los mismos.

4 Papel del norfloxacinó en la cirrosis

El norfloxacinó fue la primera quinolona comercializada en 1980. Desde entonces los beneficios de su uso en la cirrosis han sido claramente demostrados en múltiples estudios. A sus efectos antibacterianos hay que sumar sus efectos sobre la circulación hiperdinámica propia de la cirrosis y sus probables efectos inmunomoduladores. Por ello, su papel completo en la cirrosis está aún por definir y parece que puede desempeñar un papel importante en el control de las complicaciones asociadas a la cirrosis, por mecanismos que van más allá de sus propiedades antibióticas⁸⁸.

4.1/Efectos antibacterianos del norfloxacinó

El norfloxacinó posee unos efectos antibacterianos bactericidas que se basan en su capacidad para inhibir la ADN-girasa bacteriana y la topoisomerasa IV, lo que inhibe la replicación y la transcripción del ADN bacteriano⁸⁹.

En la cirrosis la TB patológica es el desencadenante principal de las complicaciones infecciosas. Como ya vimos previamente, las bacterias que traslocan con mayor facilidad y son causantes habituales de sepsis son las bacterias aeróbicas Gram negativas (BGN). Por tanto, la reducción de la TB patológica es un punto clave en el control de las mismas.

La mayoría de los tratamientos para prevenir la TB en la cirrosis se han encaminado a modificar la microbiota intestinal, reduciendo el sobrecrecimiento bacteriano o cambiando la composición de la misma. La actuación a nivel de la integridad/permeabilidad de la barrera epitelial o del sistema inmune requiere mayor investigación.

En este contexto, nace el concepto de descontaminación intestinal selectiva (DIS), que consiste en la eliminación selectiva de BGN con antibióticos asociados o no a probióticos. La justificación del uso de norfloxacinó en la cirrosis se basa en los efectos antibacterianos que ejerce en la flora intestinal. En este punto, el norfloxacinó ha demostrado su capacidad, ejerciendo escaso efecto en la flora aeróbica Gram positiva y en la flora anaeróbica⁹⁰⁻⁹².

En el marco del paciente cirrótico, la profilaxis antibiótica con norfloxacinó ha demostrado su eficacia en:

- la prevención de la recurrencia de la PBE, con una reducción de la recurrencia de un 68% a un 20% tras el primer episodio⁹¹.
- la prevención del primer episodio de PBE en los pacientes con L.A bajo en proteínas (≤ 15 g/L)⁹³⁻⁹⁵. En los pacientes con proteínas bajas en L.A e insuficiencia hepática avanzada o función renal alterada, además de reducir la incidencia de PBE también ha demostrado su efecto en la prevención de SHR y un aumento en la supervivencia⁹⁵.
- la prevención de infecciones en pacientes con hemorragia digestiva^{96,97}.

El uso de norfloxacino en el paciente cirrótico no se aconseja de forma universal por el riesgo de aumento de variantes resistentes, restringiendo su uso a pacientes de alto riesgo de infección ⁶⁷. En este sentido, está indicado su uso como profilaxis primaria ⁶⁷ en los pacientes cirróticos que presentan una hemorragia digestiva o en los pacientes con una concentración baja de proteínas (<15 g/L) en L.A e insuficiencia hepática avanzada (Child-Pugh > 9 puntos o bilirrubina > 3 mg/dL) o insuficiencia renal (creatinina >1,2 mg/dL). También está indicado su uso como profilaxis secundaria en pacientes con antecedentes de PBE resuelta ⁶⁷.

4.2/Efectos hemodinámicos del norfloxacino

En el contexto de una TB patológica existe un aumento en la producción de NO, que es secundario a la estimulación de la sintetasa de NO inducible y endotelial (iNOS y eNOS). Este incremento de NO desempeña un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de la circulación hiperdinámica propia de la cirrosis, que se caracteriza por un gasto cardíaco elevado y una resistencia vascular sistémica disminuida.

Existen numerosos estudios experimentales en modelos animales que estudian el efecto de la administración de norfloxacino sobre la circulación hiperdinámica, y aunque todos ellos demuestran una reducción de NO, los resultados finales sobre la hemodinámica son contradictorios ⁹⁸⁻¹⁰⁰.

También se ha evaluado su efecto en pacientes cirróticos, en los que parece mejorar el estado de circulación hiperdinámica propia de la cirrosis ¹⁰¹⁻¹⁰³. El norfloxacino no parece tener un efecto directo en el tono vascular, así que el mecanismo postulado es que a través de la DIS y la consiguiente reducción en la TB atenúa el estado proinflamatorio y la producción de NO. De esta manera, da lugar a una reversión parcial de la vasodilatación crónica sistémica y periférica y de la circulación hiperdinámica del paciente cirrótico. A pesar de que en algún estudio hay una tendencia a reducir el gradiente venoso portal (GVPH) ¹⁰³, el tratamiento con norfloxacino no parece tener efecto en el GVPH ni en el flujo hepático ^{101, 104}.

4.3/Efectos inmunomoduladores del norfloxacino

Recientemente, a los efectos ya conocidos del norfloxacino en la cirrosis (prevención de las infecciones y mejoría de la disfunción circulatoria) se le han añadido propiedades inmunomoduladoras a través de mecanismos todavía no bien conocidos ¹⁰⁵. Si bien parece necesario que para poder ejercer sus efectos inmunomoduladores deba existir una estimulación previa de las células inmunes ¹⁰⁵, que en el caso de la cirrosis sería su activación por la TB. Esto abre nuevas opciones terapéuticas más allá de sus propiedades antibióticas, que requieren investigación ⁸⁸.

La cirrosis y la TB patológica existente se asocian a un estado de inflamación sistémica caracterizado por una activación continuada de las células del sistema inmune y un aumento de las citocinas inflamatorias circulantes.

Albillos y colaboradores ¹⁰¹ demostraron que la administración de norfloxacino reduce los niveles de marcadores indirectos de TB y los niveles plasmáticos de citocinas inflamatorias como el TNF α y la IL-6. Posteriormente, se ha demostrado que en los pacientes cirróticos en tratamiento con norfloxacino existe una correlación inversa entre sus niveles séricos y las concentraciones de TNF α , IL-12 y IFN γ ¹⁰⁶. El tratamiento antibiótico con norfloxacino en la cirrosis afecta a la expresión de TLR en la membrana celular de los Mo y, por consiguiente, el espectro de secreción de citocinas asociadas a estos receptores ¹⁰⁷ atenuando su espectro inflamatorio ⁶⁶.

Más recientemente, Gomez-Hurtado y colaboradores ¹⁰⁸ han demostrado en modelos murinos de cirrosis que el tratamiento con norfloxacino, además de reducir la TB por sus propiedades antibióti-

cas, ejerce una función inmunomoduladora del sistema GALT a través de la inducción de IL-10, atenuando la inflamación local intestinal y mejorando la integridad de la barrera intestinal.

5 Modelos experimentales de peritonitis bacteriana espontánea

El desarrollo de modelos animales experimentales para el estudio de determinadas patologías permite el estudio detallado de su fisiopatología y el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, terapéuticas y pronósticas. Para ello es necesario que imiten la patología objeto de estudio y que sean reproducibles y consistentes. Sin embargo, se debe ser prudente a la hora de valorar y extrapolar los resultados de los mismos, ya que se tratan de aproximaciones a la realidad clínica con limitaciones bien conocidas: diferencias clínicas en la enfermedad, condiciones experimentales, técnicas utilizadas y la propia biología del animal, entre otras.

Para escoger el modelo animal que se ajusta mejor a nuestro objeto de estudio, se deben tener en cuenta unas consideraciones generales ¹⁰⁹:

- la reproducibilidad del modelo.
- la especificidad del modelo, con el menor número de potenciales factores de confusión.
- los costes directos e indirectos, con el objetivo de un modelo coste-eficaz.
- la seguridad para el personal investigador.
- el tamaño del modelo animal, que puede influir tanto en la aplicación de técnicas como incrementar costes.
- la ética del modelo, con aceptación del mismo por parte del Comité de Ética de Experimentación Animal.
- la viabilidad del proyecto, según las características de cada equipo de investigación.

A estas consideraciones generales se le añadirán otros conceptos específicos en función del objeto de estudio.

Los modelos murinos son de especial interés por su tamaño, su facilidad de reproducción y mantenimiento en el estabulario, la posibilidad de manipulación genética y su similitud genética con los humanos ¹¹⁰.

En el caso de la cirrosis hepática, la elección del modelo animal vendrá determinada por el aspecto a ser estudiado, ya que no todos los modelos experimentales ofrecen las mismas respuestas. Podemos dividir los modelos animales en dos grupos ¹¹⁰:

- los utilizados para el estudio de la cirrosis y la hipertensión portal independientemente de su etiología.
- los modelos específicos para el estudio de determinadas hepatopatías (autoinmune, esteatohepatitis, colestásica, infecciosa).

Por la naturaleza de nuestro trabajo, nos centraremos en explicar los modelos clásicos de fibrosis hepática experimental y su utilidad en el estudio de la ascitis y las complicaciones infecciosas de la cirrosis.

5.1/Modelos experimentales de hipertensión portal

Los modelos de inducción de HTPo son numerosos y se pueden clasificar en intra y extrahepáticos.

5.1.1/Modelos de hipertensión portal extrahepática

Los modelos de HTPo extrahepática, mediante ligadura parcial de la vena porta o estenosis de la vena cava inferior, son útiles únicamente para los estudios de HTPo y de los cambios hemodinámicos derivados de la misma ¹⁰⁹. En estos modelos no se desarrolla cirrosis ni aparece ascitis.

5.1.2/Modelos de hipertensión portal intrahepática

Los modelos de HTPo intrahepática se pueden dividir, según el método empleado, en quirúrgicos o secundarios a la administración de hepatotoxinas. También pueden dividirse en función de la patología inducida, cirrosis con ascitis o únicamente elevación de la presión portal.

I - Ligadura del colédoco:

Se trata de un modelo quirúrgico para imitar la colestasis crónica mediante la inducción de una cirrosis biliar secundaria. Consiste en la realización de una laparotomía media, identificando y aislando el colédoco, al que se le practica una doble ligadura y resección del segmento intermedio ^{109, 110}.

Este modelo da lugar a una proliferación colangiolar, colestasis, inflamación portal y fibrosis, con desarrollo de HTPo a partir de las 2 semanas de la intervención y cirrosis a las 4-6 semanas de la misma. La mortalidad es del 20% a las 5 semanas. Aproximadamente un 60% de las ratas desarrollan cirrosis, que raramente se acompaña de ascitis ^{109, 110}.

II - Cirrosis hepática inducida por Thioacetamida (TAA):

La administración de TAA en modelos experimentales, sobretodo en ratas, induce el desarrollo de una cirrosis macronodular con HTPo a las 12 semanas y aproximadamente un 40% de los animales desarrollará ascitis.

Una de las características principales de este modelo es que la fibrosis no es reversible tras la retirada de la hepatotoxina y presenta una elevada mortalidad asociada al desarrollo de colangiocarcinoma y carcinoma hepatocelular, siendo ampliamente utilizado en el estudio de estas patologías ^{109, 110}.

III - Cirrosis hepática inducida por Dimethilnitrosamina (DMN):

Se trata de un agente hepatotóxico utilizado de forma experimental en el estudio de la cirrosis y la carcinogénesis hepática. Se asocia a una elevada mortalidad de los animales (40% a las 2 semanas), dando lugar a un estado precirrótico a partir de la segunda semana tras el tratamiento y al desarrollo de cirrosis, anastomosis porto-sistémicas y ascitis franca a partir de las 13 semanas ¹⁰⁹. Se trata de una sustancia peligrosa con restricciones de uso por su elevado potencial carcinogénico.

IV - Cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄):

El CCl₄ es una sustancia de elevada hepatotoxicidad, que actúa sobre el hepatocito a dos niveles: una acción inicial y directa dañando las membranas plasmáticas, lisosomales y mitocondriales y una segunda fase debida a la toxicidad inducida por los metabolitos generados por el citocromo P450. Todo ello da lugar a una necrosis centrolobulillar y al desarrollo posterior de fibrosis y cirrosis ¹¹⁰.

La administración crónica de CCl₄ induce daño hepático crónico y cirrosis. Ha sido un modelo ampliamente utilizado en modelos murinos y, aunque se han descrito diferentes vías de administración, la más usada es la orogástrica ¹¹⁰. Previa a la administración de CCl₄, se administra fenobarbital que es un inductor enzimático que potencia su efecto.

Con este modelo, las ratas desarrollan una cirrosis micronodular, HTPo, desarrollo de colaterales (30-60%) y circulación hiperdinámica a partir de las 8-15 semanas y la mayoría desarrollará ascitis entre la semana 8 y la semana 20 ¹⁰⁹. Una limitación de este modelo es la gran variabilidad en la respuesta de los animales al tóxico, que se subsana mediante la administración de dosis individualizadas en función de la ganancia o pérdida de peso en respuesta a la dosis previa ^{111, 112}.

La mortalidad asociada a este modelo es elevada, sobre todo si se mantiene hasta el desarrollo de ascitis.

Este modelo ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la fisiopatología de la cirrosis y de la reversibilidad de la fibrosis ¹¹⁰, así como en la fisiopatología de la ascitis y de las infecciones del líquido ascítico ¹¹³.

5.2/Modelos experimentales de peritonitis bacteriana espontánea

El modelo animal experimental más ampliamente utilizado para el estudio de la ascitis y la PBE ha sido la inducción de cirrosis mediante administración de CCl₄. Este modelo fue descrito por primera vez por Proctor y Chatamra ¹¹¹ y posteriormente modificado por Runyon et al ¹¹², que desarrolló el primer modelo de cirrosis y ascitis infectada. Este método presentaba una mortalidad precoz elevada (53%), una eficacia alta en el desarrollo de cirrosis y ascitis en los animales supervivientes (93%) y unas tasas aceptables de infección del L.A (55%). La aparición de PBE se asociaba a una mortalidad elevada y la mayoría de los diagnósticos de PBE se hicieron en el examen post-mortem.

A partir de ese momento, el modelo de rata cirrótica mediante la administración orogástrica de dosis semanales individualizadas de CCl₄ en función del peso del animal ha sido el modelo más ampliamente utilizado en investigación para el estudio de la PBE experimental ¹¹³. Un paso clave en este modelo es la detección precoz de ascitis, mediante paracentesis repetidas o por el incremento del peso del animal y el abombamiento de los flancos, ya que a partir de este momento la dosis de CCl₄ debe reducirse ¹¹¹.

El modelo de inducción de cirrosis mediante administración orogástrica de CCl₄ ha demostrado ser un modelo útil para el estudio de la patogenia de la PBE y otras infecciones que complican la cirrosis ya que:

- la mayoría de animales que superan la fase aguda de hepatotoxicidad hepática por CCl₄ desarrollan una cirrosis hepática micronodular a diferencia de otros modelos que no lo hacen o lo hacen de forma irregular ¹¹³.
- la ascitis aparece de forma casi constante a las 7-22 semanas desde el inicio de la administración del tóxico ¹¹³, en contraposición a otros modelos de HTPo intrahepática en que la presencia de ascitis es menos frecuente.
- el desarrollo espontáneo de PBE ^{112, 114}.
- se trata de un modelo experimental válido para estudios de TB, sin objetivarse lesiones intestinales asociadas a la administración del tóxico ¹¹⁵.
- es un modelo reproducible sin requerir una metodología compleja ^{111, 112}.

Sus limitaciones son:

- la mortalidad elevada antes de la aparición de ascitis, en torno al 50-55%, que se concentra en las primeras 4-5 semanas como consecuencia de la toxicidad aguda del CCl₄ ^{112, 114}.
- tiempo de administración del tóxico hasta la aparición de ascitis variable pero largo, 12 semanas de media.

5.2.1/Diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea

En la mayoría de estudios experimentales en ratas cirróticas con ascitis, el diagnóstico de PBE se basa en la identificación de la infección del L.A mediante la obtención de cultivos positivos. Esto constituye una limitación del modelo ya que no permite diferenciar PBE de bacteriascitis ¹¹³.

Existe variabilidad en la incidencia de infección del L.A en los diferentes estudios, que probablemente sea un reflejo del estadio del daño hepático en el momento de evaluar el L.A ¹¹³. De esta forma, la tasa de infección es elevada (50-70%) cuando se evalúa poco antes de la muerte ^{112, 116, 117} y menor cuando el animal es sacrificado en un tiempo fijo tras la formación de ascitis (34%) ⁴⁴ o tras iniciar la administración de la hepatotoxina (11%) ¹¹⁸.

La mayoría de los episodios de PBE son secundarios a BGN aeróbicas, al igual que en la PBE humana aunque con algunas diferencias:

- La frecuencia de bacterias entéricas diferentes de *E. coli*, como *Proteus* sp, *Enterococcus*, *Klebsiella* y *Pseudomona*, es ligeramente superior ^{44, 58, 92, 112, 114, 117, 119, 120}.
- Hasta un 10% de la PBE experimental es polimicrobiana ^{44, 58, 92, 112, 114, 117, 119, 120}.
- La intensidad de la respuesta inflamatoria peritoneal es menor en el modelo de rata, con un menor recuento de polimorfonucleares en L.A ^{92, 112, 114}.

5.2.2/Traslocación bacteriana y desarrollo de peritonitis bacteriana espontánea

La mayoría de estudios experimentales definen TB como evidencia de cultivos positivos de bacterias viables en GLM. Recientemente se considera que esta definición probablemente infravalora la verdadera TB ya que no tiene en cuenta la traslocación de productos bacterianos, como la endotoxina, que también han demostrado su efecto patogénico en las descompensaciones de la cirrosis ¹²¹.

En el modelo animal de rata cirrótica mediante inducción con CCl₄, la TB ocurre en alrededor del 50% de las ratas cirróticas mientras que se observa en un 10% de las ratas no cirróticas ¹¹³.

Los estudios experimentales basados en este modelo han permitido establecer una relación estrecha entre la TB a GLM y la infección del L.A. La evidencia de TB en GLM (cultivos positivos) ocurre en la mayoría de las ratas con L.A infectado (80-100%) ^{44, 58, 114, 116-120, 122} y entre un 30-60% de las ratas cirróticas con ascitis no infectada. Existe además una elevada concordancia entre las bacterias aisladas en L.A y en GLM, lo que apoya la hipótesis de que la TB de microorganismos entéricos a GLM es un paso inicial en el desarrollo de PBE ^{58,121}. La bacteriemia portal ocurre en una cuarta parte de las ratas cirróticas y también presenta una elevada concordancia con el cultivo de GLM.

Sin embargo, en todas las series existe un pequeño porcentaje de ratas con PBE pero sin evidencia de TB que puede ser debido a ¹¹³:

- un porcentaje de PBE de origen no enteral.
- la baja sensibilidad en los métodos actuales para detectar bacterias viables en GLM.
- el papel del sistema inmunológico en el aclaramiento de las bacterias traslocadas.

Una limitación de este modelo es que no permite diferenciar un aumento de TB de una respuesta inmunológica deficiente.

5.2.3/Alteración inmunitaria asociada a la cirrosis experimental

En la cirrosis existe un defecto de la inmunidad a nivel de los GLM que condiciona un defecto en el aclaramiento de las bacterias traslocadas y permite la llegada de las mismas y los productos bacterianos al torrente circulatorio. Este hecho se acompaña de un incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias mediadas por endotoxina, así como un incremento de TNF α y NO ^{16, 18-21}.

Los estudios basados en modelos de cirrosis experimental han mostrado una alteración de la barrera intestinal secundaria a esta respuesta proinflamatoria, que da lugar a una alteración de la permeabilidad intestinal incrementando la susceptibilidad a la TB ¹²⁶.

También existen diversos estudios experimentales in vitro e in vivo que muestran un defecto en la respuesta inmunitaria a nivel de GLM, con deficiencias en la capacidad bacteriostática y opsónica del suero, en la fagocitosis de los neutrófilos y en la proporción de células efectoras circulantes, que tiene como resultado final un incremento de la tasa de TB debida a un aclaramiento inefectivo ¹¹³.

5.2.4/Contribuciones del modelo experimental de peritonitis bacteriana espontánea

El modelo de rata cirrótica mediante inducción por CCl₄ ha permitido confirmar la hipótesis patogénica de la PBE y analizar experimentalmente los mecanismos para el desarrollo de la misma ¹¹².

Los hallazgos más relevantes han sido la identificación de la TB a los GLM como el paso clave para el desarrollo de PBE ^{114, 116, 118}. La disponibilidad de un modelo animal para el estudio de la TB ha abierto importantes líneas de investigación para comprender los mecanismos que favorecen esta TB en la cirrosis ^{58, 119, 127}.

Además, ha permitido ampliar el conocimiento de la barrera intestinal, que sobrepasa el concepto exclusivamente anatómico ¹¹³ y está constituida por tres pilares que interaccionan entre sí: la micro-

biota intestinal (barrera ecológica), la integridad de la mucosa intestinal (barrera física) y el sistema inmunitario local y sistémico (barrera inmunológica) ¹²⁴.

Este modelo también ha permitido un mayor conocimiento de la fisiopatología y de los factores pronósticos asociados al desarrollo de PBE. Estos van más allá de la infección o la sepsis, e incluyen cambios hemodinámicos asociados a la cirrosis avanzada y la activación del sistema inmunitario con el desarrollo de una respuesta proinflamatoria exagerada ^{101, 123, 125}, que desempeñan un papel importante en la patogénesis de las complicaciones de la cirrosis.

Estos modelos también permiten investigar sobre opciones terapéuticas. En el modelo animal, el sobrecrecimiento bacteriano es una condición necesaria para el desarrollo de TB ^{45, 119, 128}, por lo que la posibilidad de manipular la carga bacteriana intestinal en un intento de reducir la TB ha sido una herramienta terapéutica propuesta ^{45, 92, 117, 121, 122, 128-130}. Otras aproximaciones terapéuticas han contemplado el uso de dosis bajas de IGF-1, una hormona anabólica con actividad pleiotrópica que se encuentra disminuida en la cirrosis contribuyendo a la malnutrición que presentan estos pacientes. Diversos estudios experimentales han mostrado efectos hepatoprotectores y antiinflamatorios, fortaleciendo la barrera intestinal y reduciendo la TB ^{131, 132}.

La alteración inmunitaria asociada a la cirrosis y la activación exagerada de la cascada inflamatoria también parece ejercer un papel importante en el desarrollo de las infecciones asociadas a la cirrosis, por lo que también se han ensayado opciones terapéuticas a este nivel en modelos animales ¹³³.

El modelo de rata cirrótica por CCl₄ ha permitido establecer una relación entre la alteración de la microbiota intestinal, la alteración de la integridad de la barrera intestinal y la TB a GLM. Se trata de un modelo experimental de PBE que ha permitido identificar la TB y sus mecanismos en la cirrosis e investigar nuevas herramientas terapéuticas ¹¹³.

Objetivos

1 Justificación

La peritonitis bacteriana espontánea es una complicación grave de la cirrosis descompensada. En su fisiopatología son claves la traslocación de las bacterias entéricas de la luz intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos, así como la depresión de los mecanismos inmunológicos en el paciente cirrótico.

Las células inmunitarias del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) son esenciales en el desarrollo de la respuesta inmunológica intestinal local, la prevención de la entrada de patógenos y el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Los macrófagos del GALT desempeñan un papel importante en el mantenimiento de una adecuada respuesta inmunológica, adaptada al entorno local y a la presencia de bacterias entéricas.

En estudios recientes se ha observado que el norfloxacino, además de su capacidad bactericida, presenta un efecto inmunomodulador que podría favorecer la respuesta inmunológica en los pacientes con cirrosis descompensada. Sin embargo, se desconoce cuál es su efecto en las células del GALT.

2 Hipótesis de trabajo

Nuestras hipótesis de trabajo son:

- En la cirrosis, los macrófagos de los distintos compartimentos del GALT presentarían una disminución de la fagocitosis y de la lisis intracelular de enterobacterias traslocadas desde el intestino. Esta incapacidad para eliminar las bacterias entéricas podría desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la traslocación bacteriana y el desarrollo de peritonitis bacteriana espontánea.
- El tratamiento con norfloxacino en la cirrosis podría restaurar la funcionalidad de los macrófagos del GALT.

3 Objetivos

Por ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos en un modelo experimental de rata con cirrosis y ascitis:

- 1 Determinar si existe un déficit en la función de los macrófagos del sistema GALT que conduce al fallo en la eliminación de las enterobacterias y a qué nivel: opsonización, fagocitosis y/o Killing intracelular.
- 2 Determinar y comparar este posible déficit con macrófagos del compartimento intraperitoneal.
- 3 Determinar el papel inmunomodulador del norfloxacina sobre el funcionalismo de los macrófagos del sistema GALT.

Materiales y métodos

1 Animales y estabulación

Se utilizaron un total de 64 ratas Sprague-Dawley machos (Harlan Ibérica) con un peso inicial de 100-120 g.

Los animales fueron estabulados en jaulas de policarbonato en grupos de dos y mantenidos a una temperatura constante de 20-22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Se alimentaron con dieta estándar de mantenimiento para ratas (Teklad Global 2014, Harlan Ibérica) y agua de bebida ad libitum, a la que se añadió fenobarbital (Luminal, Kern Pharma) como inductor enzimático del citocromo P450 hepático a una concentración de 1,5 mmol/L.

El estudio se llevó a cabo siguiendo la normativa de la “Guía para el bienestar y uso de los animales de laboratorio”, con la autorización del comité de ética de experimentación animal del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.

2 Diseño experimental

2.1/Grupos de estudio

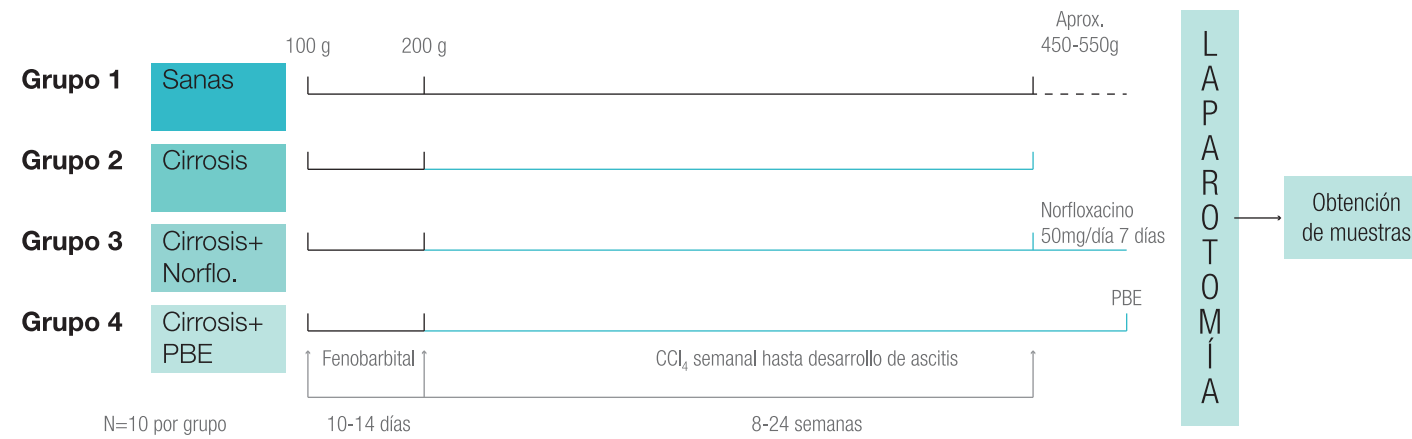
De las 64 ratas iniciales, 10 actuaron de grupo control sano y se indujo cirrosis y ascitis a 54 ratas mediante el modelo de inducción de cirrosis por CCl_4 . Este modelo tiene una mortalidad elevada^{112, 113} y en nuestro estudio, de los animales a los que se indujo cirrosis sobrevivieron hasta el momento de la aparición de ascitis 32 animales que se distribuyeron en tres grupos experimentales. Al final, se incluyeron 40 animales que se distribuyeron en cuatro grupos experimentales de 10 ratas cada uno (Figura 10):

- **Grupo 1: Ratas sanas, (n=10)**
Grupo de ratas sanas que actuaron como grupo control y que no recibieron CCl_4 , solamente agua.
- **Grupo 2: Ratas cirróticas con ascitis, (n=10)**
Este grupo recibió CCl_4 hasta el desarrollo de cirrosis con ascitis. En este momento los animales fueron sacrificados para la extracción de muestras.
- **Grupo 3: Ratas cirróticas con ascitis tratadas con Norfloxacin, (n=10)**
Al igual que el grupo anterior, este grupo recibió CCl_4 hasta el desarrollo de ascitis. Una vez diagnosticada la presencia de ascitis mediante paracentesis exploradora, se le administró por vía orogástrica Norfloxacin (50 mg/día durante 7 días) y, a continuación, los animales fueron sacrificados para la extracción de muestras.
- **Grupo 4: Ratas cirróticas con ascitis y diagnóstico de PBE, (n=10)**
Este grupo de animales también recibió CCl_4 hasta desarrollar ascitis. Cada 48-72 horas se realizaron cultivos de líquido ascítico hasta obtener un cultivo positivo. En ese momento el animal se sacrificaba para la extracción de muestras.

FIGURA 10: ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

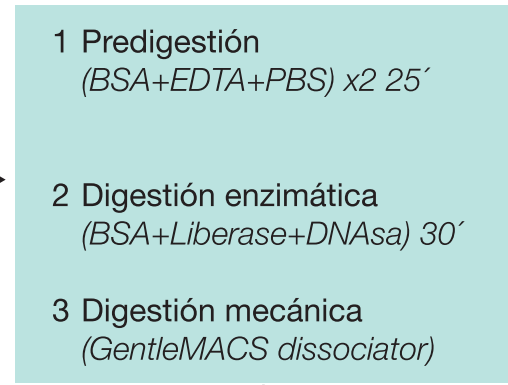
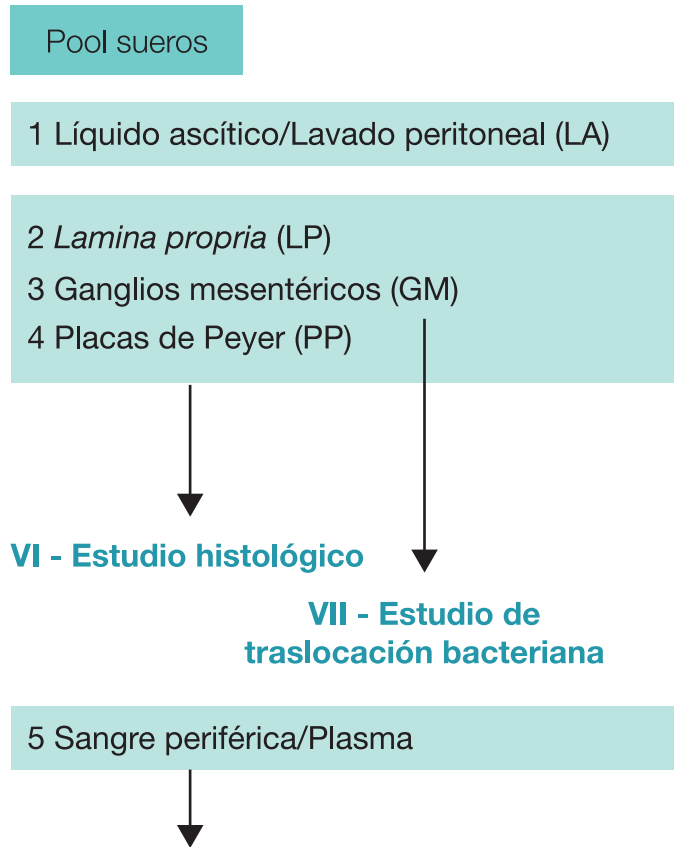
A - GRUPOS DE ESTUDIO

B - ESQUEMA DE TRABAJO



I - Obtención de muestras

II - Protocolo de digestión



III - Suspensión celular

Recuento y viabilidad

E coli preopsonizadas con pool de sueros (control/cirrosis)

IV - Test Fagocitosis Phagotest®

V - Test Killing ROS

CITOMETRÍA

Determinación cuantitativa de fagocitosis

Macrófagos CD11b+

Determinación cuantitativa del estallido oxidativo

VIII - Determinación de TNFα, IFNγ, PCR, C3 y NO

2.2/Inducción de cirrosis

La inducción de cirrosis hepática se inició cuando los animales alcanzaron un peso de 200 ± 15 gramos. En este momento, se administró CCl_4 a una concentración del 99,9 % (Sigma Aldrich, Madrid), una vez a la semana, por vía intragástrica mediante una sonda de metal (Popper and Sons, New Hyde Park, NY), en un volumen inicial de 20 μL . Los volúmenes siguientes se ajustaron a los cambios de peso del animal hasta el momento de la aparición de ascitis según el modelo de Runyon y colaboradores¹¹² (Tabla 3). Además de la administración de CCl_4 , se administró fenobarbital (Luminal, Kern Pharma) en el agua, como inductor enzimático del citocromo P_{450} hepático, a una concentración de 1,5 mmol/L, para acelerar el proceso de inducción de cirrosis.

TABLA 3: DOSIS A ADMINISTRAR DE TETRACLORURO DE CARBONO EN FUNCIÓN DE LA VARIACIÓN DEL PESO DEL ANIMAL

Variación de peso 48h después de la última dosis	<6 semanas de tratamiento variación dosis de CCl_4	>6 semanas de tratamiento variación dosis de CCl_4
Estable o aumento	Incremento en 60 μL	Incremento en 80 μL
Descenso 2% - 5,9%	Incremento en 40 μL	Incremento en 60 μL
Descenso 6% - 10%	Incremento en 20 μL	Incremento en 40 μL
Descenso 10,1% - 15%	Mantener dosis	Mantener dosis
Descenso > 15%	Disminución en 40 μL	Disminución en 40 μL

2.3/Paracentesis exploradora

Ante la sospecha clínica de ascitis (grupos 2, 3 y 4), ésta se confirmó mediante la realización de una paracentesis exploradora. Se rasuró el abdomen del animal, tras la desinfección con solución yodada y se procedió a una punción aspiradora mediante una aguja de 25 G y jeringa de insulina en la fosa ilíaca izquierda.

2.4/Diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea

En el grupo 4, ratas cirróticas con ascitis y PBE, se realizaron paracentesis exploradoras cada 48-72 h para determinar la presencia de PBE. El líquido ascítico obtenido (0,5-1 mL) se inoculó en 5 mL de medio de cultivo enriquecido para organismos aeróbicos Hemoline performance dúo (Biomérieux España, SA, Madrid). Las muestras positivas se cultivaron a 37°C por duplicado en placas Macconkey, Columbia ANC+ 5% sangre de cordero y Chromid CPS (Biomérieux España, SA, Madrid), para la identificación de los microorganismos.

2.5/Laparotomía media y obtención de muestras

Los animales se anestesiaron con una sobredosis de (Ketamina/Xylacina) y, bajo campana de flujo laminar para evitar contaminaciones, se obtuvieron las distintas muestras biológicas en este orden:

1 Líquido ascítico/lavado peritoneal (LA): Se recogió líquido ascítico de los animales cirróticos (grupos 2, 3 y 4) para la recolección de $\text{M}\Phi$ peritoneales mediante un abocath de 25 G conectado a una jeringa de 5 mL. A los animales controles (grupo1) se les realizó un lavado intraperitoneal con 20 mL de PBS, se masajó el abdomen durante unos minutos y, a continuación, se recogió la mayor parte del PBS inyectado (15-18 mL) para la recolección de $\text{M}\Phi$ peritoneales.

Tras la obtención del L.A, se realizó una laparotomía media para la extracción del resto de muestras:
2 Sangre periférica (SP): Se extrajeron 5 mL de sangre de la vena cava inferior para la obtención de plasma, que se centrifugó y guardó a -80°C hasta su procesamiento para la cuantificación de endotoxina, óxido nítrico (NO), $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, Proteína C reactiva (PCR) y C3 complemento.

3 Ganglios linfáticos mesentéricos (GM): Se recogieron todos los ganglios linfáticos mesentéricos visibles y se guardaron en suero fisiológico estéril hasta su procesamiento. Una parte de estos GM se procesaron para el estudio de la traslocación bacteriana, otra parte para la obtención de $\text{M}\Phi$ y una tercera parte para el estudio histológico.

4 Lámina propia ileocecal (LP): Se extrajeron el ciego y la válvula ileocecal en su totalidad y se lavaron con suero fisiológico (SF) frío para eliminar todas las heces. El procedimiento de limpieza se repitió cuatro veces y finalmente se sumergió la muestra en SF con gentamicina (1,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) hasta su procesamiento para la obtención de $\text{M}\Phi$ de la lámina propia y para el estudio histológico.

5 Placas de Peyer (PP): Se extrajo prácticamente todo el intestino delgado (sobretudo yeyuno e ileon) y se limpió, de manera similar al ciego, con SF frío para eliminar las heces. A continuación, se abrió longitudinalmente y se resecaron todas las placas de Peyer visibles. Estas se guardaron en SF frío con gentamicina (1,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) hasta su procesamiento para la obtención de $\text{M}\Phi$ y para el estudio histológico.

2.6/Obtención de un “pool de sueros”.

Previamente a la puesta en marcha del protocolo experimental, se establecieron dos grupos de 5 ratas cada uno para la obtención de un “pool” de sueros de ratas sanas y un “pool” de sueros de ratas cirróticas por CCl_4 , una vez diagnosticada la cirrosis y ascitis mediante paracentesis.

Se sacrificaron los animales y mediante punción cardíaca se obtuvo unos 15 mL de sangre por animal, que se centrifugó para obtener el suero. Éste se almacenó en alícuotas de 0,25mL a -80°C hasta su utilización en los tests de fagocitosis y Killing intracelular.

2.7/Protocolo de digestión

Las muestras de ciego, placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos fueron sometidas a un procedimiento de digestión mecánica y enzimática para obtener una suspensión celular que permitiera realizar los procedimientos siguientes de contaje y viabilidad y los tests de fagocitosis y killing intracelular.

Las muestras de ascitis/lavado peritoneal se reservaron a 4°C y fueron directamente procesadas para el contaje y los tests de fagocitosis y killing intracelular.

1 Preparación de las muestras:

- **Ciego:** Se seleccionó una porción de alrededor de 1 g del área ileocecal y se cortó en secciones de unos 2-3 mm² sobre una placa de Petri en hielo.
- **Placas de Peyer:** Se cortaron las placas de Peyer obtenidas en 2 o 3 secciones cada una según el tamaño.
- **Ganglios mesentéricos:** Se cortaron los ganglios en 2 o 3 secciones según el tamaño.

2 Predigestión del ciego y de las placas de Peyer para eliminar las células epiteliales:

Reactivos:

- 20 mL de solución de predigestión: BSA 1,5% 0,15g + EDTA 10 mM 0,037 g + PBS.
- 20 mL de Hanks balanced salt solution (HBSS).

Procedimiento:

Se depositaron las muestras troceadas de ciego y placas de Peyer en tubos tipo falcon de 15 mL de capacidad con 5 mL de solución de predigestión cada uno y se incubaron a 37°C en agitación a 120 rpm durante 20 minutos. A continuación, se agitaron los tubos en vórtex durante 10 segundos y se filtró el contenido mediante una gasa recuperando el tejido. Este procedimiento se realizó dos veces. Para eliminar los restos de EDTA se depositó el tejido en un nuevo tubo con 10 mL de HBSS, se incubó 5 minutos en las mismas condiciones anteriores y se filtró nuevamente recuperando el tejido.

Con este procedimiento se eliminaron las células epiteliales quedando al descubierto la lámina propia del intestino tanto ileocecal como de las placas de Peyer que, junto a las muestras de ganglios mesentéricos, se sometieron posteriormente a una digestión mecánica y enzimática.

3 Digestión del ciego (lámina propia), las placas de Peyer y los ganglios mesentéricos:**Reactivos:**

- 5,5 mL solución de digestión: Liberase Blendzyme Roche 400 µg/mL (2 mL) + DNAsa I 20µL + BSA 1,5% (0.076 g en 3,5 mL HBSS+).
- 150 mL PBS frío.

Procedimiento:

Las muestras de tejido se depositaron junto con la solución de digestión (2,5 mL de solución en el tubo de ciego y 1,5 mL de solución en los tubos de placas de Peyer y ganglios mesentéricos) en tres tubos especiales, C Tube gentleMACSTM, adaptados a un dispositivo para disgregación celular (gentleMACSTM Dissociator). Se utilizó el programa de disgregación celular del dispositivo m_brain_01 (adaptado de datos no publicados, en ausencia de un protocolo específico para este tejido en el momento del estudio).

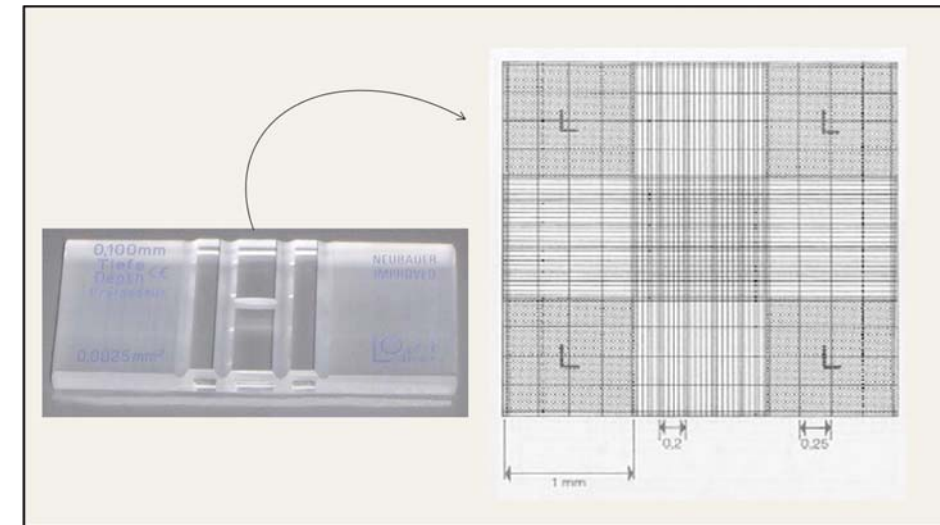
Seguidamente, se incubaron las muestras en estos mismos tubos a 37°C en agitación a 100 rpm durante 30 minutos. De nuevo, se utilizó el programa de disgregación Program B del dispositivo gentleMACSTM Dissociator. La suspensión celular obtenida de los tres compartimentos se filtró a través de un filtro de nylon de 100 µm adaptado a un tubo falcon de 50 mL (BD Falcon cell strainer, BD Biosciences Europe, Belgium). A continuación, se añadió PBS hasta un volumen de 40 mL para lavar la suspensión celular y se centrifugó a 280 g a 4°C durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante de todas las muestras y se resuspendieron nuevamente en 40 mL de PBS y se filtraron a través de un filtro de nylon de 40 µm, realizándose un nuevo centrifugado a 280 g a 4°C durante 5 minutos.

En este punto del protocolo se añadieron las muestras de ascitis/lavado peritoneal, a las que también se les añadió PBS hasta un volumen de 40 mL y se centrifugaron de la misma manera. Finalmente, se eliminó casi la totalidad del sobrenadante y las células obtenidas se resuspendieron en 1 mL PBS para su posterior análisis.

2.8/Recuento y viabilidad

Se hizo recuento del número de células totales obtenidas y del porcentaje de células viables en cada muestra mediante una cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano. Este colorante vital difunde al interior de las células y éstas, activamente, lo expulsan al exterior, de forma que las células vivas son transparentes a la luz del microscopio mientras que las células muertas adquieren un color azul.

Para ello se pipetearon 15 µl de las suspensiones celulares que se mezclaron con otros 15 µL de una solución de azul de tripano al 4% (sigma) y se depositaron en una cámara de Neubauer (Figura 11).

FIGURA 11: CÁMARA DE NEUBAUER

Se contaron las células de los cuadrados L (las transparentes -vivas- y las azules -muertas-, por separado) en el microscopio óptico a 40x.

La concentración de células se calculó con la siguiente fórmula:

- **Número de células/mL** = $2 \times 10.000 \times n^{\circ} \text{ cel. (L1+L2+L3+L4)} / 4$
- **Viabilidad celular (%)** = $\text{cel. transparentes} \times 100 / \text{cel. totales (transparentes + azules)}$

Se ajustó la concentración de las distintas suspensiones celulares a 2.500-4.000 células/µL.

2.9/Test de fagocitosis

El test de fagocitosis se cuantificó por citometría mediante un kit comercial (Phagotest®, Glycotope Biotechnology GmbH, Alemania), ampliamente utilizado para determinar la capacidad fagocítica de las células¹³⁴⁻¹⁴⁰.

Se basa en la incubación de las células seleccionadas con una suspensión de *E. coli* esterilizados y marcados con fluorocromo FITC. Permite detectar las células que han fagocitado *E. coli* por la presencia del fluorocromo FITC y además cuantificar la cantidad de bacterias fagocitadas según la intensidad de fluorescencia.

Este kit está optimizado para el uso de sangre total heparinizada, aunque según las especificaciones técnicas se puede adaptar a otro tipo de muestras como suspensiones celulares. En nuestro trabajo realizamos un estudio previo con nuestras muestras para conseguir unas condiciones experimentales óptimas (datos no publicados), que consistieron en modificar el tiempo de incubación, alargándolo de 10 a 30 minutos y añadir un procedimiento de selección de los MΦ de la suspensión celular mediante tinción con anti CD11b-APC. Se escogió este anticuerpo ya que es el único anticuerpo disponible para rata que marca una proteína de superficie. Esto permite marcar los MΦ de rata in vivo, a diferencia de otros marcadores que al ser citoplasmáticos precisan la permeabilización de las células con la consiguiente pérdida de funcionalidad. Sin embargo, CD11b (miembro de la familia de las integrinas) se expresa en la superficie de varios leucocitos que además de los macrófagos incluyen a monocitos, neutrófilos, linfocitos “natural Killer” y granulocitos. Por tanto, la identificación de los MΦ se realizó mediante el marcaje celular con este anticuerpo junto a las características morfológicas (tamaño y granularidad) propias de los macrófagos.

De esta manera, se seleccionaron los macrófagos CD11b+ marcados con el fluorocromo APC y de estos se cuantificó el número de células positivas por fluorocromo FITC (% de macrófagos con *E. coli* fagocitadas) y también la cantidad de bacterias fagocitadas (actividad fagocítica individual). Además se comparó la capacidad opsonica del suero de rata sana frente a la de suero de rata cirrótica preopsonizando los *E. coli* con un “pool” de sueros obtenidos previamente.

1 Preparación de las muestras:

De cada animal, se prepararon cuatro tubos con la suspensión de células de cada uno de los compartimentos del sistema GALT (LP, PP, GM) y de líquido ascítico/lavado peritoneal (LA) y a su vez con cada una de las condiciones experimentales necesarias para calcular el índice de fagocitosis, dando lugar a un total de 16 tubos/rata (Tabla 4).

TABLA 4: ESQUEMA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE EL KIT DE PHAGOTEST		
Tubo Nº	Compartimento GALT	Condición experimental
T1	Ganglio Mesentérico (GM)	+ suero rata sana a 37°C
T2		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 0°C
T3		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 37°C
T4		+ suero rata cirrosis + <i>E. coli</i> a 37°C
T5	Lámina propia (LP)	+ suero rata sana a 37°C
T6		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 0°C
T7		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 37°C
T8		+ suero rata cirrosis + <i>E. coli</i> a 37°C
T9	Placas de Peyer (PP)	+ suero rata sana a 37°C
T10		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 0°C
T11		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 37°C
T12		+ suero rata cirrosis + <i>E. coli</i> a 37°C
T13	Lavado peritoneal/Ascitis (LA)	+ suero rata sana a 37°C
T14		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 0°C
T15		+ suero rata sana + <i>E. coli</i> a 37°C
T16		+ suero rata cirrosis + <i>E. coli</i> a 37°C

De esta forma:

- Las muestras de **compartimento + suero rata sana a 37°C** determinan la fluorescencia inespecífica.
- Las muestras de **compartimento + suero rata sana + *E. coli* a 0°C** determinan el valor de fluorescencia debida a “fagocitosis basal”.
- Las muestras de **compartimento + suero rata sana + *E. coli* a 37°C** y **compartimento + suero rata cirrosis + *E. coli* a 37°C** son las muestras “problema”.

Esto nos permite realizar el cálculo del índice de fagocitosis de cada compartimento, que resulta de restarle la fluorescencia inespecífica y la fluorescencia secundaria a la fagocitosis basal a la fluorescencia de la muestra “problema”.

Ejemplo cálculo índice fagocitosis de Ganglio Mesentérico (IF-GM):

- IF-GM suero sano = fluorescencia T3 - fluorescencia T2 - fluorescencia T1
- IF-GM suero cirrosis = fluorescencia T4 - fluorescencia T2 - fluorescencia T1

2 Phagotest:

De cada animal, se prepararon cuatro tubos con la suspensión de células de cada uno de los compartimentos del sistema GALT (LP, PP, GM) y de líquido ascítico/lavado peritoneal (LA) y a su vez con cada una de las condiciones experimentales necesarias para calcular el índice de fagocitosis, dando lugar a un total de 16 tubos/rata (Tabla 4).

Reactivos:

- Kit Phagotest®:
 - Reactivo A: tampón de lavado.
 - Reactivo B: suspensión de *E. coli* marcadas con FITC [2 x 10⁹ bact/mL].
 - Reactivo C: solución “quenching” para eliminar fluorescencia de las bacterias adheridas pero no fagocitadas.
 - Reactivo D: solución de fijación de células.
 - Anticuerpo anti CD11b-APC.
 - Fetal bovine serum (FBS).
 - Sodium azida.
 - Agua destilada.
- E. coli* preopsonizados

Procedimiento:

En primer lugar se procedió a la preparación de los *E. coli* preopsonizados. Para ello, se pipetearon 125 µL de la suspensión de *E. coli* y se mezclaron con la misma cantidad del pool de sueros de ratas sanas para obtener las 8 muestras necesarias (Tabla 4). También se pipetearon otros 65 µL de *E. coli* con la misma cantidad de pool de sueros de ratas cirróticas para obtener las 4 muestras necesarias (Tabla 4).

Todo el procedimiento se realizó sobre hielo, a excepción de las incubaciones a 37°C en las muestras que lo requerían y del procedimiento de fijación que se realizó a temperatura ambiente. Se depositaron 100 µL de la suspensión celular de cada uno de los compartimentos en tubos de polipropileno para citometría. Se añadieron 30 µL de las bacterias preopsonizadas con los sueros correspondientes o únicamente suero según la muestra. Se agitaron en vórtex y se incubaron (a 0°C en hielo o a 37°C en baño maría, según la muestra) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se mantuvieron todos los tubos en hielo para detener la fagocitosis y a continuación se añadió 100 µL de solución C “quenching solution” agitando nuevamente en vórtex. Se lavaron las muestras añadiendo 3 mL de tampón de lavado (reactivo A) a cada tubo y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado una vez más.

A continuación se procedió a la tinción de los MΦ mediante anticuerpo CD11b-APC. Para ello se añadió en primer lugar 50 µL de FBS descomplementado, para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo, seguida de 1 µL del anticuerpo y se dejó incubando 25 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, se lavó cada muestra con 3 mL de reactivo A y centrifugando 5 minutos a 300g a 4°C, descartando el sobrenadante. Se fijaron las muestras con 2 mL de solución de fijación (reactivo D), dejándolas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. Se centrifugaron durante 5 minutos a 300g a 4°C y se descartó nuevamente el sobrenadante. Posteriormente se lavaron con reactivo A y se centrifugaron a 300 g 5 minutos y a 4°C. Se descartó casi la totalidad del sobrenadante dejando unos 100 µL y se resuspendieron las células para su lectura en el citómetro.

Esta lectura se realizó en un citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Se obtuvieron de 20.000 a 25.000 células por muestra y los resultados se analizaron con el software específico Cell-Quest PRO de la Unidad de citometría de la fundación.

2.10/Test de killing intracelular

La capacidad bactericida de los macrófagos de los distintos compartimentos se evaluó mediante la cuantificación por citometría de flujo de la oxidación de Dihidrorodamina 123 (DHR-123) por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el proceso de "Killing intracelular". La DHR-123 es permeable a la membrana de la célula y una vez en su interior es oxidada a rodamina 123 por los peroxinitros formados como resultado de la activación del sistema NADPH oxidasa en el fagosoma de las células y que es excitable a 488nm y emite a 515nm. Este método ha sido ampliamente utilizado para determinar la capacidad bactericida de las células fagocíticas^{136, 140-142}.

1 Preparación de las muestras:

Este ensayo se realizó en suspensiones celulares de los tres compartimentos del sistema GALT (GM, LP y PP) así como de líquido ascítico/lavado peritoneal (LA) y también en 4 condiciones experimentales necesarias para calcular el índice de Killing, obteniendo un total de 16 muestras (Tabla 5).

De esta forma:

- Las muestras de **compartimento a 37°C** determinan la fluorescencia generada por la presencia de ROS de manera inespecífica.
- Las muestras de **compartimento + *E. coli* a 0°C** determinan la fluorescencia generada por ROS debida a la "actividad bactericida basal".
- Las muestras de **compartimento + *E. coli* a 37°C** son las muestras "problema" y determinan la fluorescencia generada por ROS debido a la actividad bactericida generada ante un estímulo bacteriano.
- Las muestras de **compartimento + PMA + *E. coli* a 37°C** determinan la capacidad máxima de generación de ROS ante un estímulo químico producido por phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) junto a la presencia de *E. coli*.

TABLA 5: ESQUEMA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN EL TEST DE KILLING INTRACELULAR

Tubo Nº	Compartimento GALT	Condición experimental
T1	Ganglio Mesentérico (GM)	a 37°C
T2		+ <i>E. coli</i> a 0°C
T3		+ <i>E. coli</i> a 37°C
T4		+ PMA + <i>E. coli</i> a 37°C
T5	Lámina propia (LP)	a 37°C
T6		+ <i>E. coli</i> a 0°C
T7		+ <i>E. coli</i> a 37°C
T8		+ PMA + <i>E. coli</i> a 37°C
T9	Placas de Peyer (PP)	a 37°C
T10		+ <i>E. coli</i> a 0°C
T11		+ <i>E. coli</i> a 37°C
T12		+ PMA + <i>E. coli</i> a 37°C
T13	Lavado peritoneal/Ascitis (LA)	a 37°C
T14		+ <i>E. coli</i> a 0°C
T15		+ <i>E. coli</i> a 37°C
T16		+ PMA + <i>E. coli</i> a 37°C

Esto nos permite realizar el cálculo del killing intracelular como generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de cada compartimento, que resulta de restarle la fluorescencia inespecífica y la fluorescencia secundaria a la actividad bactericida basal a la fluorescencia de la muestra "problema". También permite calcular la capacidad máxima de killing o generación de ROS (maxROS), que resulta también de restar tanto la fluorescencia inespecífica como la basal a la fluorescencia de la muestra con PMA y *E. coli*.

Ejemplo cálculo killing intracelular de Ganglio Mesentérico (ROS-GM) y la capacidad máxima de generación de ROS (maxROS-GM):

- ROS-GM= fluorescencia T3- fluorescencia T1- fluorescencia T2
- maxROS-GM-GM= fluorescencia T4 - fluorescencia T1 - fluorescencia T2.

2 Procedimiento de killing intracelular:

Reactivos:

- Suspensión de *E. coli* [2 x 10⁹ bact/mL].
- Dihidrorhodamine 123 (DHR-123) 5 mM.
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 1,62 mM.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO).
- Anticuerpo anti CD11b-APC.
- Tampón de lavado: 1 mL FBS + 50 µL sodium azida + 49 mL PBS.
- Agua destilada.

Procedimiento:

Todo el procedimiento se realizó sobre hielo, excepto las incubaciones a 37°C en las muestras que lo requerían, y manteniendo los tubos protegidos de la luz. Se depositaron 100 µL de la suspensión celular de cada uno de los compartimentos en tubos de polipropileno para citometría. Se procedió a la tinción de los MΦ mediante anticuerpo CD11b-APC. Para ello se añadió 50 µL de FBS descomplementado para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo, seguida de 1 µL del anticuerpo y se dejó incubando 25 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavó cada muestra con 3 mL de tampón de lavado y centrifugando 5 minutos a 300g a 4°C, descartando el sobrenadante dejando unos 100 µL y se resuspendieron las células. A continuación se añadieron 0,1 µL de DHR-123 a cada tubo y se dejaron a oscuras durante 12 minutos a 37°C en baño maría. Seguidamente se añadieron 30 µL de la solución de *E. coli* y se incubaron durante 30 minutos a 37°C o a 0°C según correspondiera. Diez minutos antes de finalizar la incubación se añadieron 2 µL de PMA a las muestras correspondientes. Finalmente se añadió 3 mL de PBS y se centrifugó a 300g 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante dejando unos 100µL y se resuspendieron las células para su lectura en el citómetro.

La lectura de la muestra se realizó en el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Se analizaron 20.000 células, seleccionadas por los parámetros de tamaño y granularidad, además de ser positivas para CD11b en el citómetro. La producción de radicales libres de oxígeno se midió en unidades arbitrarias de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en el canal de fluorescencia FL2 (585nm). Los resultados se analizaron con el software específico Cell-Quest PRO de la Unitat de citometría de la fundación.

2.11/Estudio de traslocación bacteriana

En nuestro estudio se definió la presencia de TB como la obtención de un cultivo positivo de ganglio mesentérico.

Para ello se homogeneizaron con ayuda de un "potter" varios trocitos de GLM en medio de cultivo enriquecido para organismos aeróbicos Hemoline performance dúo (Biomérieux España, SA, Madrid). Las muestras positivas se cultivaron a 37°C por duplicado en placas Macconkey, Columbia

ANC+ 5% sangre de cordero y Chromid CPS (Biomérieux España, SA, Madrid), para la identificación de los microorganismos.

2.12/Cuantificación plasmática de endotoxina, citoquinas, complemento y proteína C reactiva

En el estudio se cuantificaron los niveles plasmáticos de citoquinas (TNF α e IFN γ), la proteína del complemento C3, así como los niveles de proteína C reactiva (PTX1) mediante kits de ELISA (abcam PLC, Cambridge Science Park, Cambridge, UK). También se determinaron los niveles de óxido nítrico (NO) mediante un ensayo colorimétrico (abcam PLC, Cambridge Science Park, Cambridge, UK) y los niveles de endotoxemia mediante un ensayo colorimétrico específico Limulus Amebocyte Lysate Chromogenic Endpoint Assay proteína (Hycult biotech Frontstraat 2A Uden, Netherlands). Todas la valoraciones se hicieron por duplicado y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.13/Estudio histológico

Se recogieron muestras de hígado (diagnóstico de cirrosis), intestino, placas de Peyer y ganglios mesentéricos para estudio histológico.

Los tejidos se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina. Secciones de 5 micras de grosor se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE). Se utilizó la tinción de tricrómico de Masson para identificar la fibrosis en el tejido hepático.

3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc.).

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar o proporciones según se requiera. Para las comparaciones entre grupos se utilizó el test ANOVA de una variable o el test no paramétrico correspondiente, Kruskal-Wallis. Las comparaciones post hoc para identificar parejas de grupos diferentes hasta el nivel de 0,05 se realizaron mediante el test U de Mann-Whitney. Las comparaciones de las proporciones entre grupos se realizaron mediante el test χ^2 o Fisher según la muestra.

El criterio adoptado de significación estadística fue $p < 0,05$, excepto para las correlaciones uno a uno que fue de $p < 0,01$.

Resultados

1 Mortalidad, desarrollo de ascitis y diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea

1.1/Mortalidad

La mortalidad global del estudio fue del 37,5% (24 ratas). La mortalidad fue nula en el grupo 1 o control (grupo 1, n=10), como era de esperar, y del 40,74% (22 ratas) en el global de ratas cirróticas hasta el desarrollo de ascitis. A partir del desarrollo de ascitis las ratas se distribuyeron en los tres grupos experimentales restantes:

- Grupo 2 de ratas cirróticas con ascitis (n=10), que fueron sacrificadas en el momento de diagnóstico de la ascitis.
- Grupo 3 de ratas cirróticas con ascitis, que recibieron un curso de tratamiento con norfloxacino durante 7 días, previo al sacrificio. Tras el desarrollo de ascitis y hasta el sacrificio de los animales no hubo mortalidad añadida en este grupo.
- Grupo 4 de ratas cirróticas con ascitis y diagnóstico de PBE (n=12), momento en que se sacrificaba al animal. Tras el desarrollo de ascitis y hasta el sacrificio de los animales, hubo 2 muertes previas al diagnóstico de PBE, con un tamaño muestral final en el grupo de 10 animales.

1.2/Desarrollo de ascitis

En los grupos de ratas cirróticas (grupos 2, 3 y 4), la ascitis se diagnosticó entre la semana 9 y 24, siendo la media de 17,2 semanas. No se evidenciaron diferencias en el tiempo de desarrollo de ascitis entre los tres grupos de cirrosis.

1.3/Diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea

En el grupo 4 (n=10), el diagnóstico de PBE se realizó entre los días 1 y 14 tras el desarrollo de ascitis, siendo la media de 8,5 días.

En 7 casos la infección del líquido ascítico fue monomicrobiana (70%) y en 3 casos casos fue polimicrobiana (30%), con la identificación de 2 gémenes. En todos los casos, los gémenes iden-

tificados fueron enterobacterias anaerobias, bacilos Gram negativos (en 6 animales) y cocos Gram positivos (en 4 animales) (Tabla 6).

TABLA 6: CULTIVOS POSITIVOS DE LÍQUIDO ASCÍTICO

Caso	Cultivo líquido ascítico
1	<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp
2	<i>Enterococcus</i> spp
3	<i>E. coli</i>
4	<i>Enterococcus</i> spp, <i>Proteus</i>
5	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i>
6	<i>Proteus</i>
7	<i>E. coli</i>
8	<i>E. coli</i>
9	<i>E. coli</i>
10	<i>Enterococcus</i> spp

2 Recuento y viabilidad celular

2.1/Recuento celular total

El recuento celular total fue variable en función de los compartimentos y del grupo experimental de estudio, como se puede ver en la tabla 7. No hubo diferencias significativas en el recuento celular total entre los diferentes grupos experimentales.

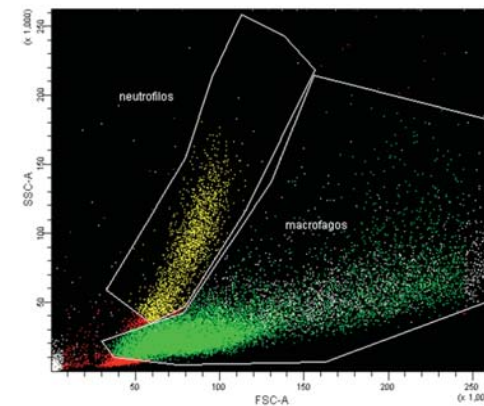
2.2/Viabilidad celular

La viabilidad celular, determinada por la exclusión de azul de tripano, fue en todos los casos superior al 95%.

2.3/Fenotipo celular

El fenotipo celular, identificado mediante citometría por el marcaje celular con anti CD11b-APC (Figura 12), mostró un porcentaje global de células viables CD11b+ del 2,82% en ganglio linfático mesentérico, 6,73% en lámina propia, 11,47% en placa de Peyer y 75,76% en líquido peritoneal, independientemente del grupo experimental.

FIGURA 12: CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE MACRÓFAGOS MEDIANTE TINCIÓN CON CD11b-APC, TAMAÑO Y GRANULARIDAD.



El porcentaje de células viables CD11b+ por compartimento y por grupo experimental, se exponen en la tabla 7.

En líquido ascítico se observó un porcentaje significativamente mayor de células CD11b+ en el grupo control frente al resto de grupos de ratas cirróticas, que no presentaron diferencias significativas entre ellas (Figura 13).

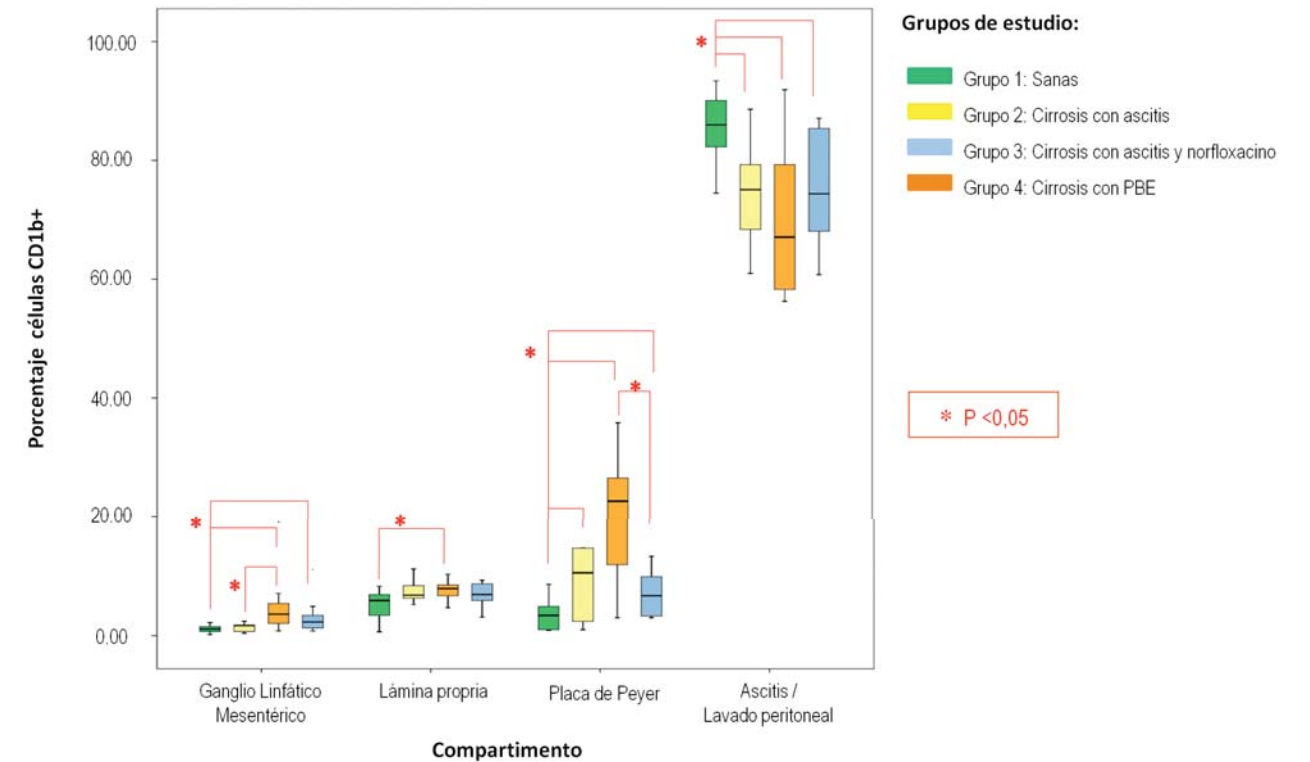
En placa de Peyer, de nuevo se observaron diferencias significativas en el porcentaje de CD11b+ del grupo control (con un menor porcentaje, en este caso) frente al resto de ratas cirróticas, y sobre todo con el grupo de PBE ($P < 0,001$). Así mismo, también se objetivaron diferencias significativas entre el grupo infectado y el grupo con profilaxis antibiótica, presentando este último un descenso en el porcentaje de células CD11b+ (Figura 13).

TABLA 7: RECUENTO CELULAR TOTAL Y FENOTIPO CELULAR POR COMPARTIMENTO Y GRUPO DE ESTUDIO (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR)			
Compartimento	Grupo experimental	Recuento celular total (x 106/mL)	Células CD11b+(%)
Ganglio linfático mesentérico	Grupo 1	53,32 ±13,41	1,16 ±0,20
	Grupo 2	38,83 ±6,03	1,74 ±0,46
	Grupo 3	54,02 ±7,13	3,22 ±0,97
	Grupo 4	44,62 ±3,89	5,11 ±1,88
Lámina propia	Grupo 1	14,19 ±3,34	4,98 ±0,87
	Grupo 2	21,06 ±5,93	7,16 ±0,85
	Grupo 3	22,31 ±2,52	6,94 ±0,62
	Grupo 4	25,07 ±2,73	7,72 ±0,53
Placa de Peyer	Grupo 1	44,46 ±10,62	3,66 ±0,89
	Grupo 2	29,99 ±5,48	12,98 ±3,82
	Grupo 3	43,23 ±4,23	8,3 ±1,85
	Grupo 4	46,59 ±3,98	20,15 ±3,42
Líquido ascítico / Lavado peritoneal	Grupo 1	21,96 ±3,42	85,02 ±2,19
	Grupo 2	29,93 ±9,73	71,63 ±5,22
	Grupo 3	32,61 ±3,47	75,91 ±3,12
	Grupo 4	35,79 ±5,13	70,47 ±4,30

En lámina propia, sólo se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con PBE, con un mayor porcentaje de células CD11b+ en el grupo infectado.

En ganglio linfático mesentérico, el grupo control presentó un porcentaje significativamente menor de células CD11b+ que el grupo infectado y con profilaxis, mientras que no se observaron diferencias con el grupo con ascitis. Además, se objetivaron diferencias significativas entre el grupo con ascitis y el grupo con PBE (Figura 13).

FIGURA 13: PORCENTAJE DE CÉLULAS CD11b+ SEGÚN COMPARTIMENTO Y GRUPO DE ESTUDIO



En todos los compartimentos del GALT (ganglio, lámina propia y placa de Peyer) el porcentaje de células CD11b+ fue menor en el grupo control respecto al grupo de ratas cirróticas, mientras que esta relación en líquido ascítico/lavado peritoneal se invierte (Figura 13).

3 Estudio de traslocación bacteriana

3.1/Cultivo de ganglio linfático mesentérico

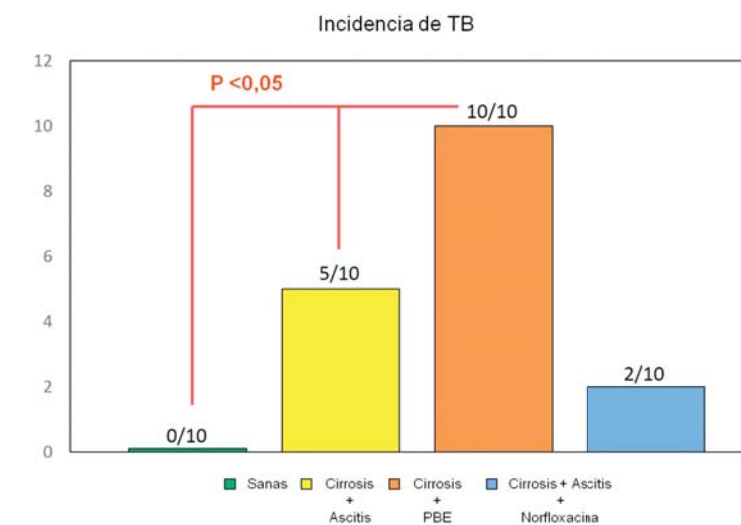
El diagnóstico de TB en nuestro estudio se definió como la obtención de un cultivo positivo de ganglio mesentérico.

3.1.1/Incidencia de traslocación bacteriana

Se diagnosticó TB en 17 de las 40 ratas incluidas en el estudio, con una incidencia global del 42,5% y una incidencia en el grupo de ratas cirróticas (grupos 2+3+4) del 56,7%.

Se evidenció TB en todos los animales del grupo de ratas con ascitis y diagnóstico de PBE (grupo 4), y por el contrario, no se objetivó ningún caso en el grupo control (grupo 1). El grupo de ratas cirróticas con ascitis (grupo 2) presentó traslocación bacteriana en el 50% de los casos (5 ratas). El grupo de ratas cirróticas con ascitis tratadas con norfloxacino (grupo 3) presentó 2 casos de TB. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de ratas cirróticas con PBE y sin PBE (Figura 14).

FIGURA 14: INCIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA SEGÚN EL GRUPO EXPERIMENTAL



3.1.2/Caracterización de las bacterias traslocadas

De los 17 casos de TB identificada, en 10 casos el cultivo fue positivo a 2 gérmenes y 7 casos a una única bacteria traslocada. En todos los casos las bacterias traslocadas fueron enterobacterias, bacilos Gram negativos en 11 animales y bacterias Gram positivas en 11 animales.

En la tabla 8 se muestran las bacterias identificadas en cada grupo experimental. En el grupo 3, tratado con norfloxacino, presentaron traslocación bacteriana 2 animales y en ambos casos las bacterias identificadas fueron bacterias Gram positivos, sin evidencia de TB por bacterias Gram negativas.

TABLA 8: CULTIVOS POSITIVOS DE GANGLIO LINFÁTICO MESENTÉRICO			
Caso	Grupo 2 Cirrosis con ascitis	Grupo 3 Cirrosis con ascitis y norfloxacino	Grupo 4 Cirrosis con PBE
1	Enterococcus spp	Bacilli Gram+	Enterococcus spp
2	<i>E. coli</i>	Bacilli Gram+	<i>E. coli</i> / Enterococcus spp
3	Proteus		<i>E. coli</i> / Enterococcus spp
4	<i>E. coli</i>		Enterococcus spp / Proteus
5	<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> / Klebsiella
6	Bacilli Gram+		Proteus
7	Bacilli Gram+		<i>E. coli</i> / Proteus
8	Enterococcus spp		<i>E. coli</i> / Bacilli Gram+
9			<i>E. coli</i> / Proteus
10			Enterococcus spp

3.1.3/Correlación entre traslocación bacteriana y peritonitis bacteriana espontánea

Todas las ratas del grupo 4 (diagnóstico de PBE) presentaron traslocación bacteriana. Las bacterias identificadas en el ganglio linfático mesentérico y en el líquido ascítico, presentaron una buena correlación como puede observarse en la tabla 9, sin objetivar crecimiento en líquido ascítico de ninguna bacteria que no haya sido traslocada a ganglio mesentérico.

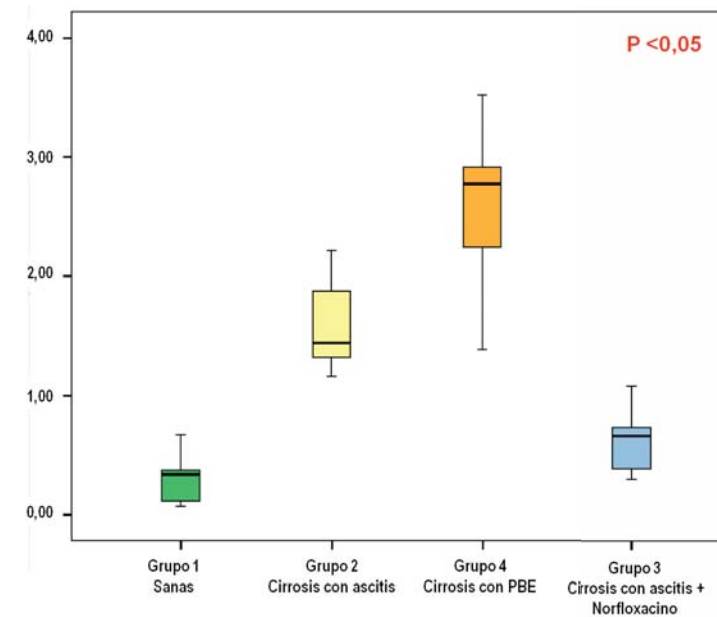
TABLA 9: CORRELACIÓN ENTRE EL CULTIVO DE GANGLIO LINFÁTICO MESENTÉRICO (GLM) Y EL CULTIVO DE LÍQUIDO ASCÍTICO (L.A)		
Caso	Cultivo GLM	Cultivo L.A
1	Enterococcus spp	<i>E. coli</i> , Enterococcus spp
2	<i>E. coli</i> , Enterococcus spp	Enterococcus spp
3	<i>E. coli</i> , Enterococcus spp	<i>E. coli</i>
4	Enterococcus spp, Proteus	Enterococcus spp, Proteus
5	<i>E. coli</i> , Klebsiella	<i>E. coli</i> , Klebsiella
6	Proteus	Proteus
7	<i>E. coli</i> , Proteus	<i>E. coli</i>
8	<i>E. coli</i> , Bacilli Gram+	<i>E. coli</i>
9	<i>E. coli</i> , Proteus	<i>E. coli</i>
10	Enterococcus spp	Enterococcus spp

3.2/Endotoxemia

La endotoxemia es un marcador indirecto de traslocación bacteriana.

Los niveles plasmáticos de endotoxina se hallaron aumentados en los grupos 2 ($1,58 \pm 0,12$ UE/mL) y 4 ($2,53 \pm 0,21$ UE/mL), en comparación con los grupos 1 ($0,31 \pm 0,58$ UE/mL) y 3 ($0,64 \pm 0,09$ UE/mL). Se observó un gradiente de endotoxemia: cirrosis con PBE > cirrosis con ascitis > cirrosis con ascitis y norfloxacino > grupo control. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p < 0,001$) (Figura 15).

FIGURA 15: INCIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA SEGÚN EL GRUPO EXPERIMENTAL



4 Test de fagocitosis

4.1/Fagocitosis en función del grupo de estudio

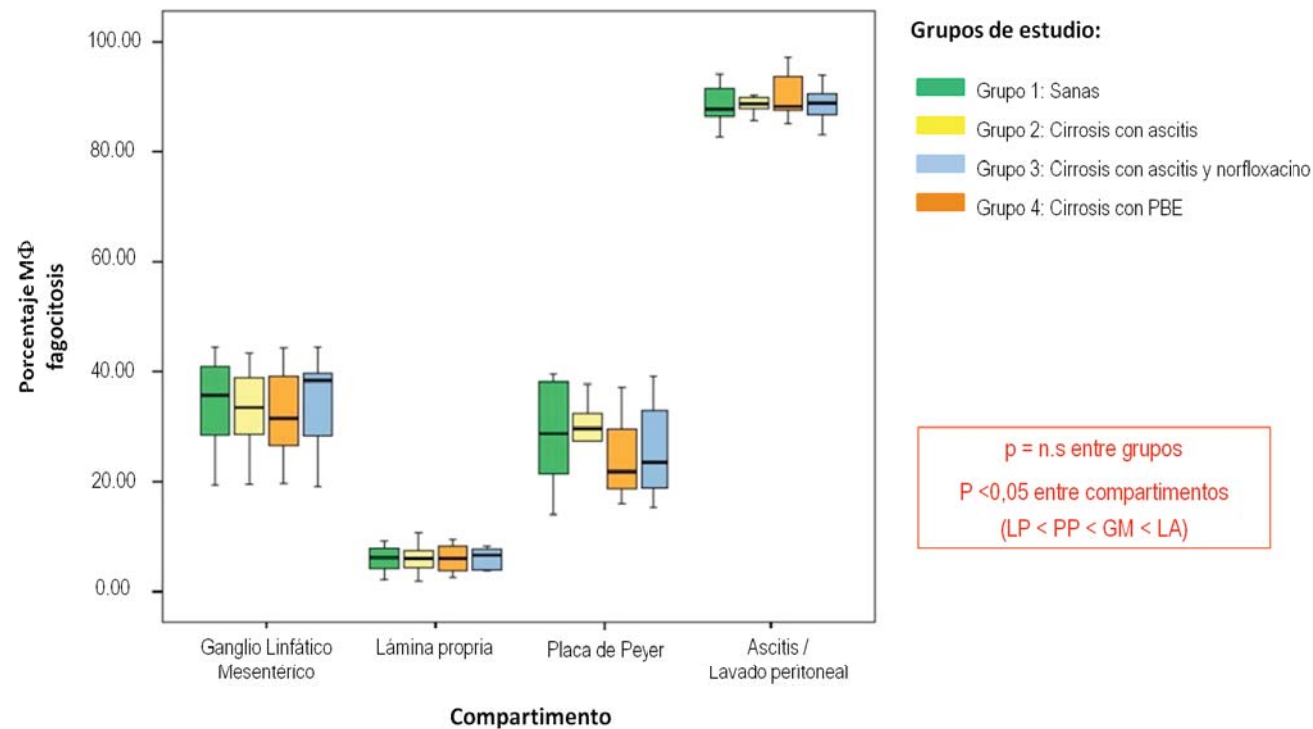
Se analizó la capacidad fagocítica intrínseca de los MΦ de los diferentes compartimentos en los cuatro grupos experimentales.

4.1.1/Porcentaje de macrófagos con actividad fagocítica

Se analizó el porcentaje de MΦ que presentaba fagocitosis en cada compartimento, con *E. coli* preopsonizados con pool de sueros de ratas sanas (Figura 16):

- **Ganglio Mesentérico:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 33,58% \pm 2,92%, en el grupo 2 fue del 33,06% \pm 2,3%, en el grupo 3 fue del 34,29% \pm 2,55% y en el grupo 4 fue del 32,47% \pm 2,64%.
- **Lámina propia:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 8,33% \pm 2,5%, en el grupo 2 fue del 5,83% \pm 0,84%, en el grupo 3 fue del 6,22% \pm 0,57% y en el grupo 4 fue del 9,29% \pm 3,61%.
- **Placa de Peyer:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 28,57% \pm 2,84%, en el grupo 2 fue del 28,83% \pm 1,99%, en el grupo 3 fue del 25,21% \pm 2,43% y en el grupo 4 fue del 24,88% \pm 2,38%.
- **Ascitis/Lavado peritoneal:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 88,46% \pm 1,22%, en el grupo 2 fue del 89,66% \pm 1,29%, en el grupo 3 fue del 88,51% \pm 1,21% y en el grupo 4 fue del 89,93% \pm 1,41%.

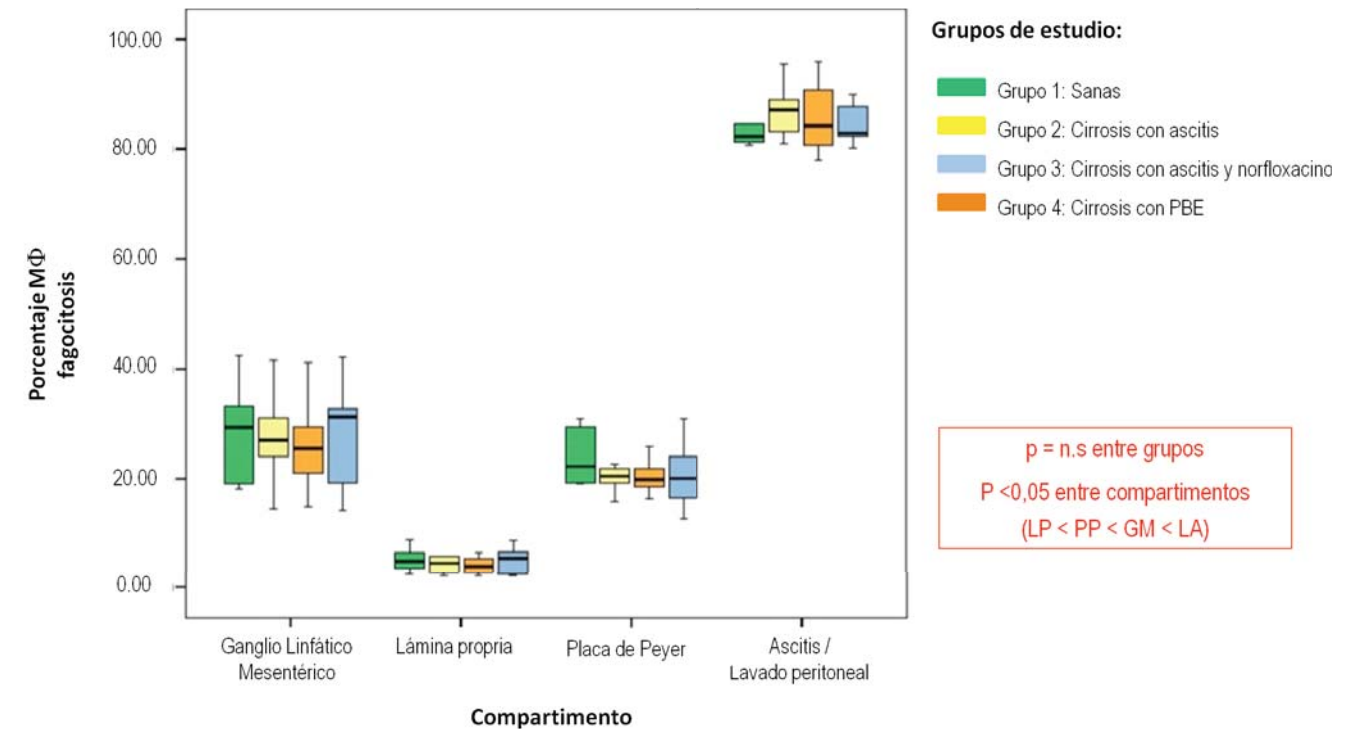
FIGURA 16: PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS CON *E. COLI* PREOPSONIZADOS CON POOL DE SUEROS DE RATAS SANAS FAGOCITADOS EN CADA COMPARTIMENTO Y SEGÚN EL GRUPO DE ESTUDIO



Se analizó el porcentaje de MΦ que presentaba fagocitosis en cada compartimento, con *E. coli* preopsonizados con pool de sueros de ratas cirróticas (Figura 17):

- **Ganglio Mesentérico:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 28,78% ±2,68%, en el grupo 2 fue del 26,88% ±2,37%, en el grupo 3 fue del 28,49% ±3,02% y en el grupo 4 fue del 25,90% ±2,48%.
- **Lámina propia:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 7,14% ±2,14%, en el grupo 2 fue del 5,57% ±1,16%, en el grupo 3 fue del 5,18% ±0,75% y en el grupo 4 fue del 5,35% ±1,43%.
- **Placa de Peyer:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 24,12% ±1,58%, en el grupo 2 fue del 21,33% ±1,47%, en el grupo 3 fue del 21,11% ±1,87% y en el grupo 4 fue del 20,78% ±1,83%.
- **Ascitis/Lavado peritoneal:** la media de MΦ con fagocitosis en el grupo 1 fue del 81,67% ±2,78%, en el grupo 2 fue del 87,38% ±1,69%, en el grupo 3 fue del 84,32% ±1,13% y en el grupo 4 fue del 85,81% ±2,06%.

FIGURA 17: PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS CON *E. COLI* PREOPSONIZADOS CON POOL DE SUEROS DE RATAS CIRRÓTICAS FAGOCITADOS EN CADA COMPARTIMENTO Y SEGÚN EL GRUPO DE ESTUDIO



No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos al analizar el porcentaje de macrófagos con fagocitosis en los diferentes compartimentos. Sin embargo, sí que se objetivaron diferencias significativas entre el porcentaje de MΦ con fagocitosis de los diferentes compartimentos con un gradiente de fagocitosis de mayor a menor: líquido ascítico > ganglio linfático mesentérico > placa de Peyer > lámina propia. Este gradiente se mantuvo en todos los grupos experimentales (Figura 16 y figura 17).

4.1.2/Capacidad fagocítica individual de los macrófagos

También se estudió la capacidad fagocítica individual de los MΦ activados en cada compartimento, mediante la cuantificación por citometría de las bacterias fagocitadas, y se analizaron las diferencias.

En el caso de los *E. coli* preopsonizados con pool de sueros de ratas sanas, el análisis de la capacidad fagocítica individual por compartimento y grupo fue (Figura 18):

- **Ganglio Mesentérico:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 374,8 ±24,50 unidades arbitrarias (U.A) , en el grupo 2 fue de 345,6 ±20,13 U.A, en el grupo 3 fue de 360,90 ±21,49 U.A y en el grupo 4 fue de 373,40 ±24,31 U.A.
- **Lámina propia:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 645,70 ±54,98 U.A, en el grupo 2 fue de 604,10 ±44,65 U.A, en el grupo 3 fue de 649,40 ±61,13 U.A y en el grupo 4 fue de 594,60 ±54,99 U.A.
- **Placa de Peyer:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 420,40 ±35,96 U.A, en el grupo 2 fue de 338,10 ±26,19 U.A, en el grupo 3 fue de 407,60 ±50,79 U.A y en el grupo 4 fue de 353,56 ±28,28 U.A.
- **Ascitis/Lavado peritoneal:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 1936,40 ±167,57 U.A, en el grupo 2 fue de 2042,56 ±130,48 U.A, en el grupo 3 fue de 2003,11 ±147,83 U.A y en el grupo 4 fue de 1747,22 ±165,43 U.A.

FIGURA 18: ACTIVIDAD FAGOCÍTICA INDIVIDUAL POR COMPARTIMENTO Y GRUPO EXPERIMENTAL CON *E. COLI* PREOPSONIZADO CON POOL DE SUEROS DE RATAS SANAS

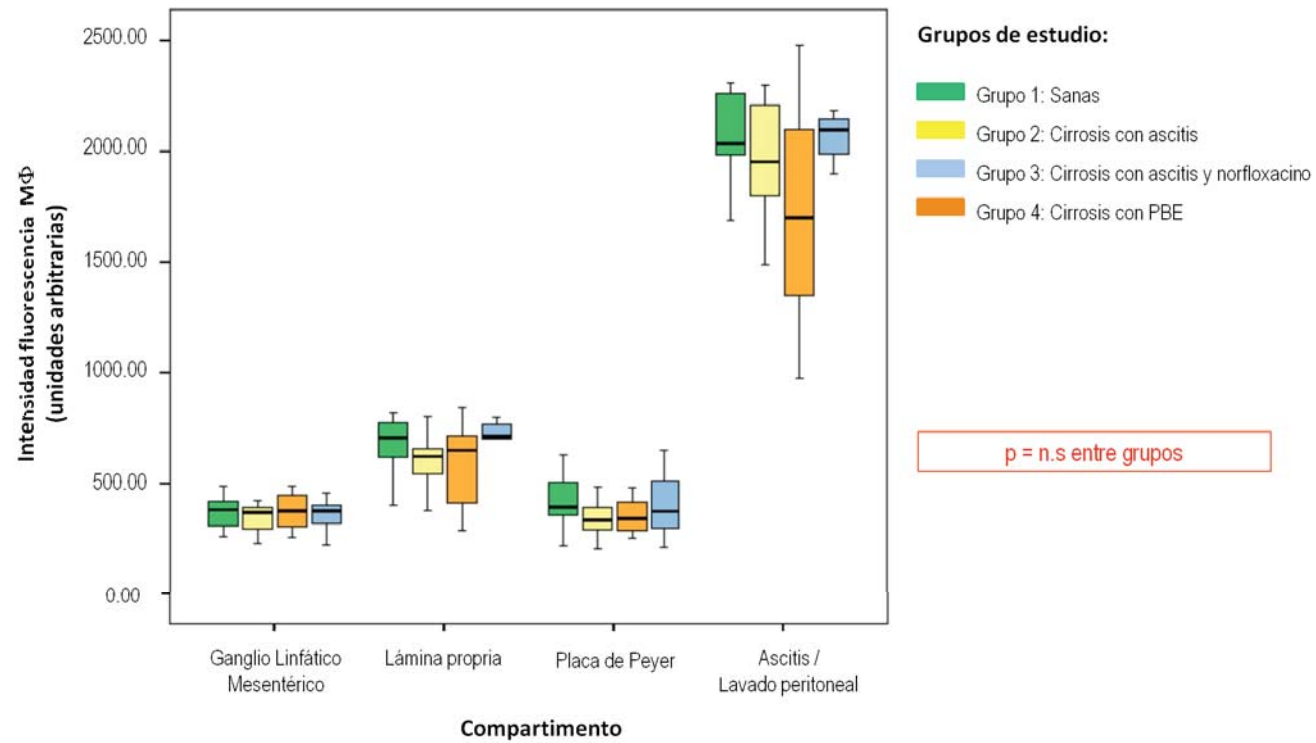
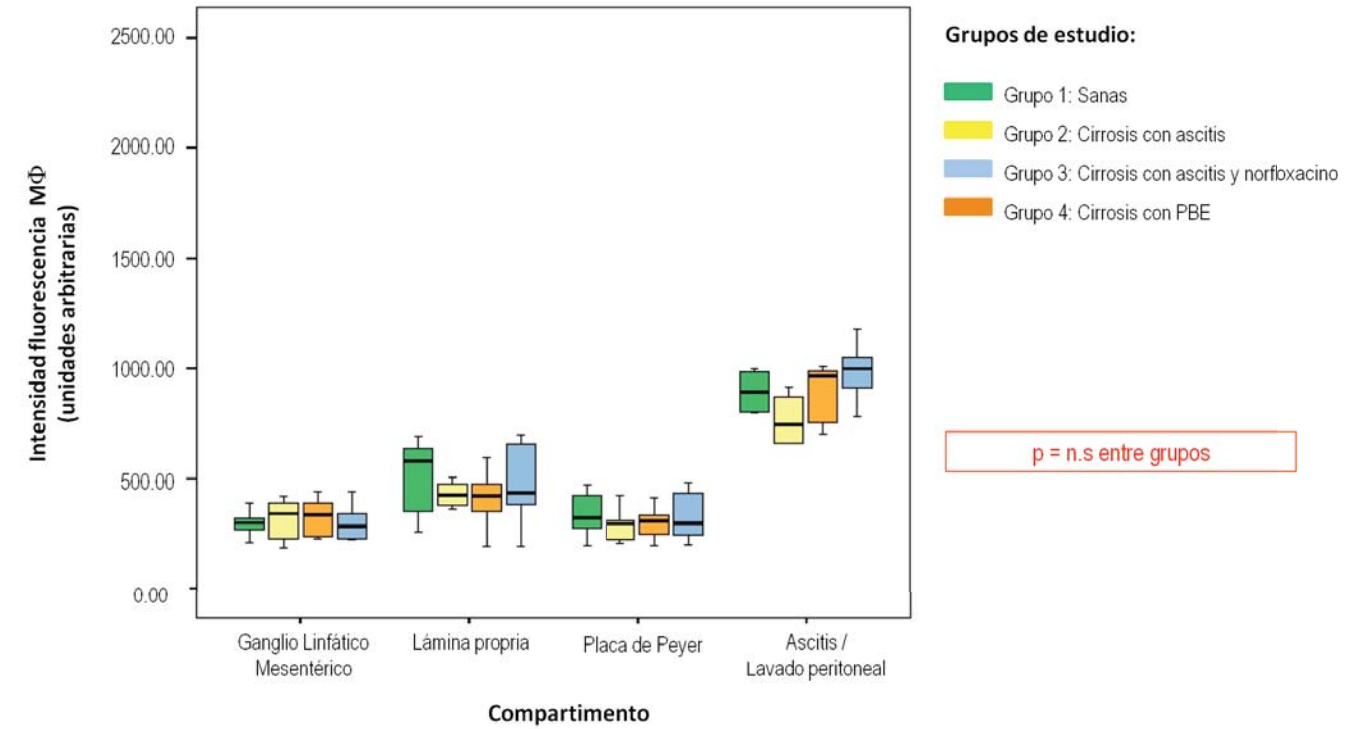


FIGURA 19: ACTIVIDAD FAGOCÍTICA INDIVIDUAL POR COMPARTIMENTO Y GRUPO EXPERIMENTAL CON *E. COLI* PREOPSONIZADO CON POOL DE SUEROS DE RATAS CIRRÓTICAS



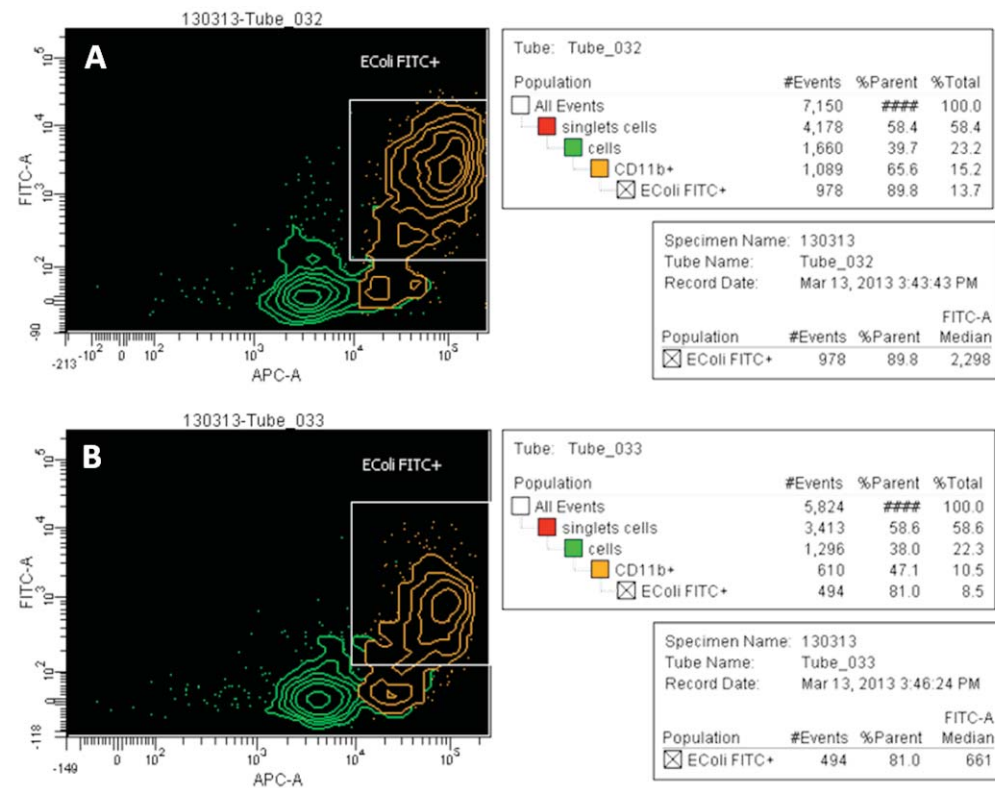
En el caso de los *E. coli* preopsonizados con pool de sueros de ratas cirróticas, el análisis de la capacidad fagocítica individual por compartimento y grupo fue (Figura 19):

- **Ganglio Mesentérico:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 292,10 ±17,06 U.A, en el grupo 2 fue de 318,10 ±27,21 U.A, en el grupo 3 fue de 293,20 ±22,56 U.A y en el grupo 4 fue de 326,50 ±26,52 U.A.
- **Lámina propia:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 513,30 ±51,11 U.A, en el grupo 2 fue de 427,90 ±16,13 U.A, en el grupo 3 fue de 478,30 ±52,35 U.A y en el grupo 4 fue de 412,50 ±34,75 U.A.
- **Placa de Peyer:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 336,90 ±30,84 U.A, en el grupo 2 fue de 284,70 ±20,24 U.A, en el grupo 3 fue de 331,20 ±34,16 U.A y en el grupo 4 fue de 289,56 ±22,71 U.A.
- **Ascitis/Lavado peritoneal:** con una actividad fagocítica media que en el grupo 1 fue de 878,40 ±79,27 U.A, en el grupo 2 fue de 682,36 ±149,30 U.A, en el grupo 3 fue de 979,44 ±100,44 U.A y en el grupo 4 fue de 878,22 ±43,37 U.A.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos al analizar la capacidad fagocítica individual de los macrófagos en los diferentes compartimentos.

En la figura 20 se muestra un ejemplo sobre el análisis de la actividad fagocítica realizado.

FIGURA 20: EJEMPLO DE ESTUDIO DE FAGOCITOSIS: IDENTIFICACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS DE LAVADO PERITONEAL EN UNA RATA DEL GRUPO CONTROL SEGÚN MARCAJE CD11b-APC Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, E IDENTIFICACIÓN DE FAGOCITOSIS DE *E. COLI*-FITC PREOPSONIZADAS CON “POOL” DE SUEROS DE RATAS SANAS (IMAGEN A) O POOL DE SUEROS DE RATAS CIRRÓTICAS (IMAGEN B)



4.2/Fagocitosis en función del suero utilizado

Dado que los resultados de fagocitosis (porcentaje total de células con fagocitosis y capacidad intrínseca de fagocitosis) no mostraron diferencias entre los grupos experimentales, se decidió evaluar la influencia de la opsonización en la capacidad fagocítica de los macrófagos de los diferentes compartimentos. Por este motivo, se analizó la fagocitosis en función del suero utilizado en la opsonización de las bacterias (pool de sueros de ratas sanas vs. pool de sueros de ratas cirróticas), independientemente del grupo experimental, con un tamaño muestral de 40 animales por grupo.

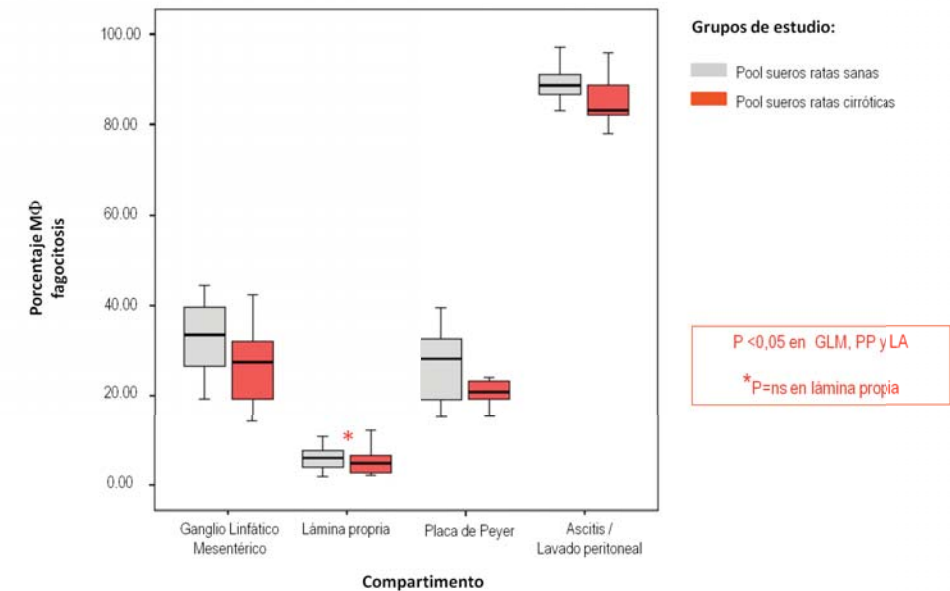
4.2.1/Porcentaje de macrófagos con actividad fagocítica

Se comparó el porcentaje de MΦ con fagocitosis en cada compartimento en función de una preopsonización de los *E. coli* con pool de sueros de ratas sanas o cirróticas, objetivando una fagocitosis menor en el grupo de suero cirrótico en todos los compartimentos (Figura 21):

- **Ganglio linfático mesentérico:** 33,35% ± 1,26% cuando se usó el pool de ratas sanas frente al 27,51% ± 1,29% cuando se usó el pool de sueros de ratas cirróticas.
- **Lámina propia:** 7,42% ± 1,11% frente al 5,81% ± 0,71%.
- **Placa de Peyer:** 26,92% ± 1,21% frente al 21,86% ± 0,84%.
- **Líquido ascítico/lavado peritoneal:** 89,12% ± 0,62% frente al 84,71% ± 1,05%.

Estas diferencias fueron significativas en todos los compartimentos (p<0,05) salvo en lámina propia.

FIGURA 21: PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS CON FAGOCITOSIS EN FUNCIÓN DEL POOL DE SUEROS UTILIZADO EN LA PREOPSONIZACIÓN



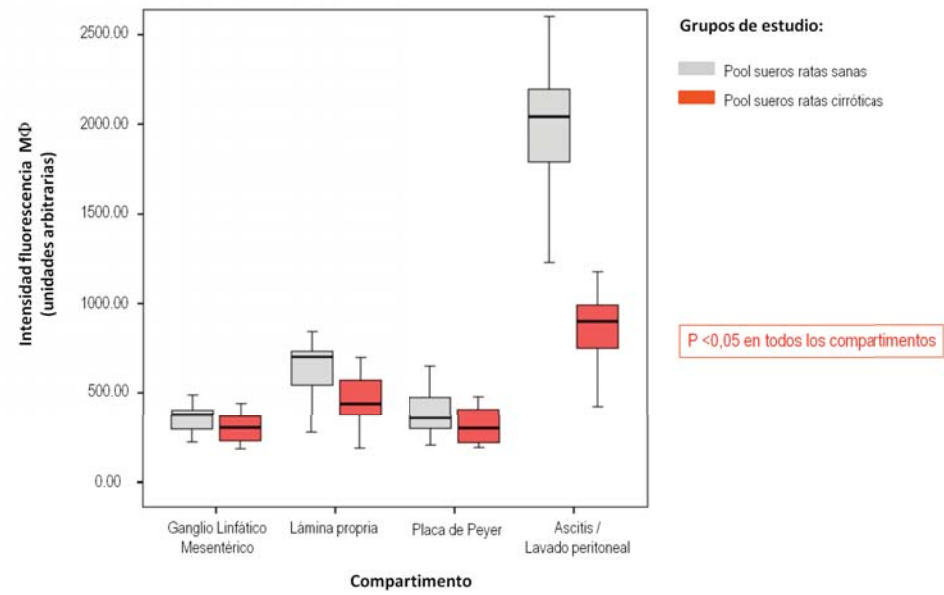
4.2.2/Capacidad fagocítica individual de los macrófagos

Se comparó la capacidad fagocítica individual de los MΦ que presentaban fagocitosis, en cada compartimento y en función de la preopsonización de los *E. coli* con pool de sueros de ratas sanas o cirróticas. Se objetivó una reducción de la capacidad fagocítica individual de los MΦ en el grupo de suero cirrótico en todos los compartimentos (Figura 22):

- **Ganglio linfático mesentérico:** 363,68 ± 11,06 U.A cuando se usó el pool de ratas sanas frente al 307,48 ± 11,63 U.A cuando se usó el pool de sueros de ratas cirróticas
- **Lámina propia:** 623,45 ± 26,36 U.A frente al 458,00 ± 20,85 U.A.
- **Placa de Peyer:** 380,59 ± 18,65 U.A frente al 311,13 ± 13,90 U.A.
- **Líquido ascítico/lavado peritoneal:** 1932,43 ± 76,33 U.A frente al 855,25 ± 50,89 U.A.

Estas diferencias fueron significativas en todos los compartimentos (p<0,05) del estudio.

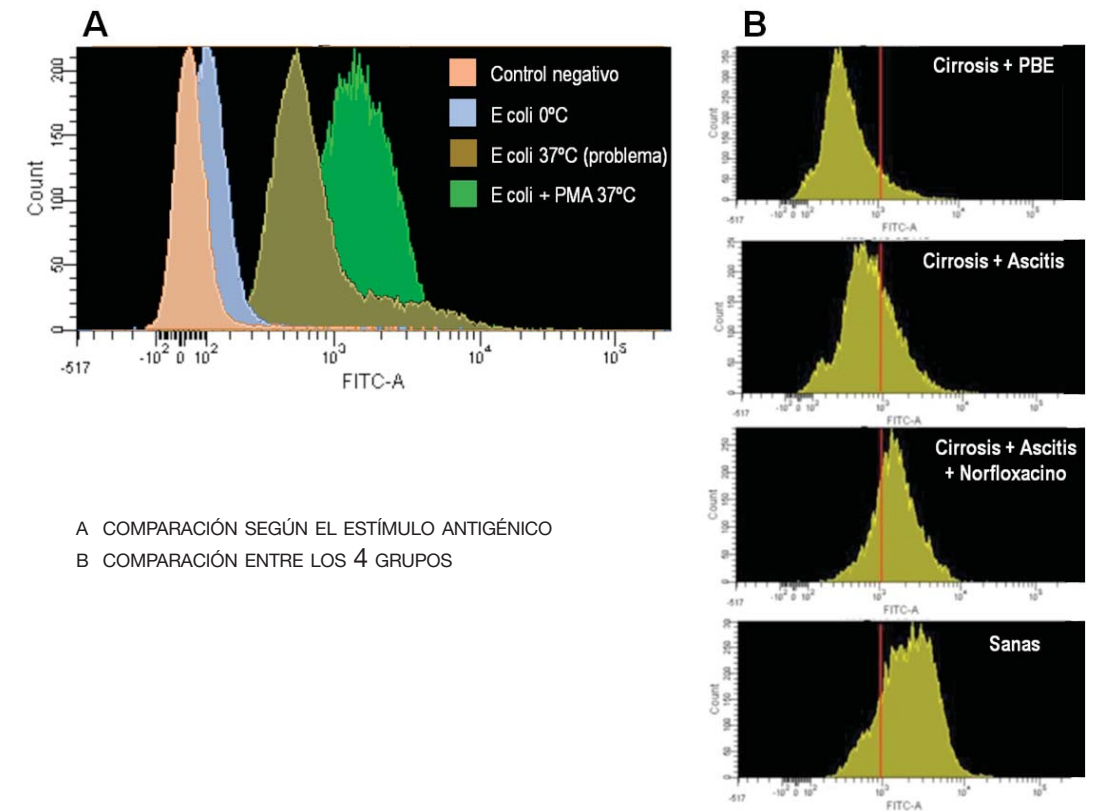
FIGURA 22: ACTIVIDAD FAGOCÍTICA INDIVIDUAL POR COMPARTIMENTO EN FUNCIÓN DEL POOL DE SUEROS UTILIZADO EN LA PREOPSONIZACIÓN



5 Test de killing intracelular

Se analizó la capacidad bactericida o killing intracelular de los MΦ mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) analizando la oxidación de DHR-123 tras 2 estímulos antigénicos: *E. coli* solo y *E. coli* + PMA. Esto nos permitió evaluar, en cada compartimento, la capacidad bactericida de los MΦ ante un estímulo antigénico bacteriano y su capacidad bactericida máxima, respectivamente. La figura 23 muestra un ejemplo del estudio de killing realizado.

FIGURA 23: EJEMPLO DE ESTUDIO DE KILLING INTRACELULAR EN MACRÓFAGOS DE LAVADO PERITONEAL MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE DHR-123 OXIDADA POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO DURANTE EL PROCESO DE KILLING



A COMPARACIÓN SEGÚN EL ESTÍMULO ANTIGÉNICO
 B COMPARACIÓN ENTRE LOS 4 GRUPOS

Los resultados obtenidos de la medición de la capacidad bactericida media basal, ante un estímulo antigénico bacteriano y ante un estímulo máximo pueden observarse en la tabla 10:

TABLA 10: KILLING INTRACELULAR POR COMPARTIMENTO Y GRUPO DE ESTUDIO (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR)

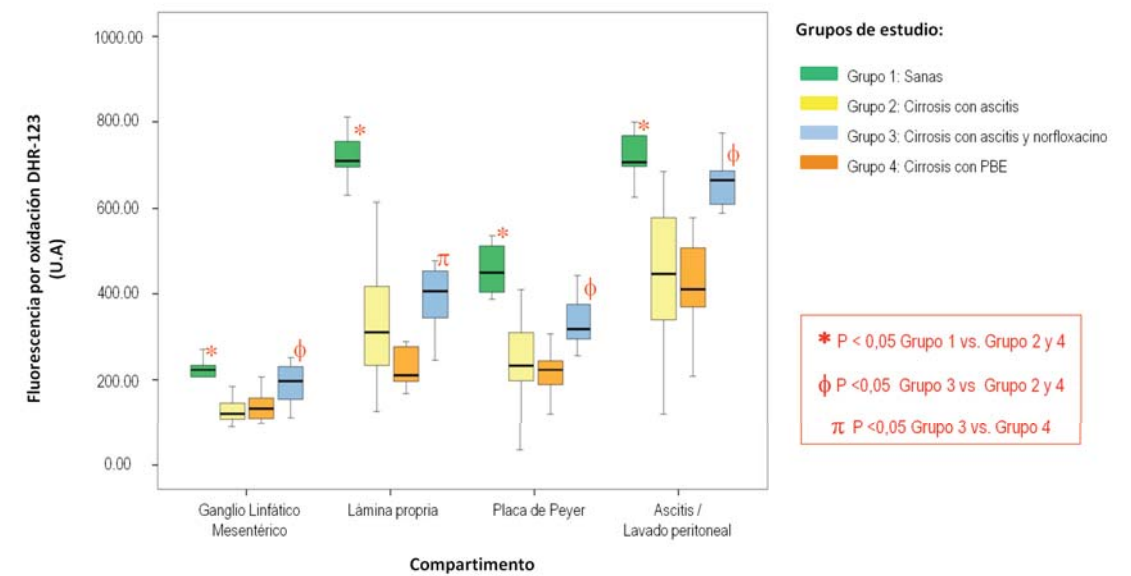
Compartimento	Grupo experimental	Killing intracelular basal (nm)	Killing intracelular <i>E. coli</i> (nm)	Killing intracelular máximo (<i>E. coli</i> + PMA) (nm)	Diferencia Killing <i>E. coli</i> -estímulo máximo (nm)
Ganglio linfático mesentérico	Grupo 1	38,80 ±5,14	217,40 ±11,47	379,50 ±27,23	41,67 ±2,73
	Grupo 2	34,00 ±2,29	120,50 ±11,77	276,8 ±35,59	50,81 ±5,37
	Grupo 3	38,6 ±2,93	191,70 ±14,14	373,90 ±17,06	46,89 ±5,68
	Grupo 4	38,4 ±2,64	137,90 ±11,04	290,90 ±30,61	49,91 ±3,61
Lámina propia	Grupo 1	49,6 ±2,96	716,90 ±19,43	798,20 ±37,23	11,24 ±3,07
	Grupo 2	50,80 ±4,88	336,10 ±46,78	481,20 ±37,61	31,64 ±5,94
	Grupo 3	50,50 ±5,01	394,00 ±23,69	559,30 ±18,09	29,85 ±3,17
	Grupo 4	49,70 ±2,35	250,30 ±36,64	309,60 ±34,46	22,05 ±6,28
Placa de Peyer	Grupo 1	52,44 ±6,01	428,44 ±41,27	545,56 ±17,01	20,11 ±8,19
	Grupo 2	45,60 ±3,98	231,60 ±32,66	347,50 ±38,91	34,65 ±3,66
	Grupo 3	51,10 ±5,93	333,40 ±19,21	515,80 ±23,25	35,19 ±2,67
	Grupo 4	45,50 ±4,02	227,50 ±19,88	291,00 ±24,85	24,17 ±5,65
Líquido ascítico / Lavado peritoneal	Grupo 1	64,90 ±2,59	703,20 ±25,65	1701,30 ±43,98	58,43 ±1,87
	Grupo 2	58,60 ±3,07	448,10 ±57,18	1288,67 ±117,28	64,76 ±4,27
	Grupo 3	64,78 ±3,81	657,56 ±20,31	1314,00 ±94,36	48,74 ±2,19
	Grupo 4	58,50 ±4,34	417,80 ±33,81	657,78 ±66,21	32,69 ±7,63

No hubieron diferencias en la generación de ROS basal entre los grupos a estudio. Tras la exposición a un estímulo, los hallazgos más relevantes del test de killing fueron (Figura 24):

- la evidencia de un killing intracelular significativamente menor en los grupos 2 y 4 (cirrosis con ascitis con/sin PBE) frente al grupo control, en todos los compartimentos.
- la evidencia de una recuperación de la capacidad bactericida de los macrófagos en el grupo tratado con norfloxacino (grupo 3), con diferencias significativas frente a los grupos 2 y 4 (cirrosis con ascitis con/sin PBE) en todos los compartimentos salvo en LP, donde sólo se mantuvieron las diferencias significativas con el grupo infectado.

En todos los grupos experimentales y compartimentos el valor de la capacidad bactericida ante un estímulo máximo (*E. coli* + PMA) frente a un estímulo por *E. coli* fue siempre superior de forma significativa. La diferencia entre el killing máximo y el killing frente a *E. coli* fue siempre menor en el grupo control en todos los compartimentos a excepción del líquido ascítico/lavado peritoneal.

FIGURA 24: KILLING INTRACELULAR FRENTE A *E. COLI*, POR COMPARTIMENTO Y GRUPO DE ESTUDIO



6 Determinaciones analíticas en plasma

Se realizaron determinaciones plasmáticas de óxido nítrico (NO), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón gamma (IFN γ), proteína C reactiva (PCR) y de la fracción del complemento C3, en todos los animales del estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

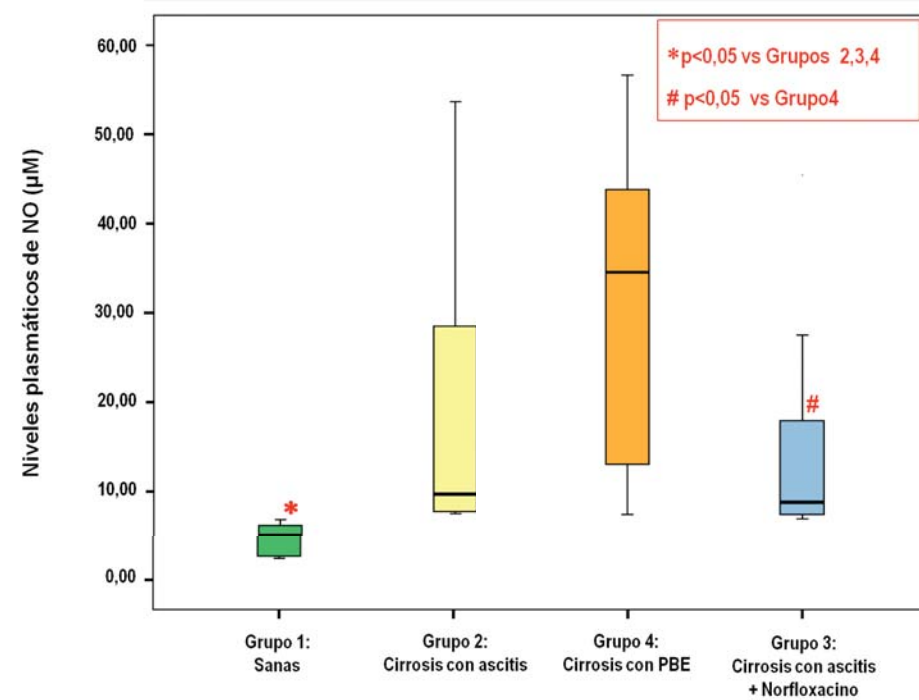
TABLA 11: DETERMINACIONES ANALÍTICAS PLASMÁTICAS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR)

	NO (μ M)	TNF- α (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	PCR (μ g/mL)	C3 (mg/mL)
Grupo 1	4,64 \pm 0,59	46,00 \pm 2,85	24,80 \pm 0,48	104,15 \pm 3,79	2,04 \pm 0,15
Grupo 2	18,12 \pm 5,12	61,95 \pm 3,32	44,28 \pm 2,84	114,67 \pm 4,86	1,19 \pm 0,11
Grupo 3	14,76 \pm 3,99	58,93 \pm 3,89	37,48 \pm 3,49	110,75 \pm 5,96	1,31 \pm 0,07
Grupo 4	32,12 \pm 5,51	82,34 \pm 6,20	60,22 \pm 5,03	136,09 \pm 6,12	1,18 \pm 0,08

6.1/Óxido nítrico

Los niveles plasmáticos de NO fueron significativamente superiores en todos los grupos de ratas cirróticas (grupo 2, 3 y 4) frente al grupo control. Se detectaron también diferencias significativas entre el grupo 4 (cirrosis con PBE) y el grupo 3 (cirrosis con ascitis y norfloxacino), que no se mantuvieron con el grupo 2 (cirrosis y ascitis) (Figura 25).

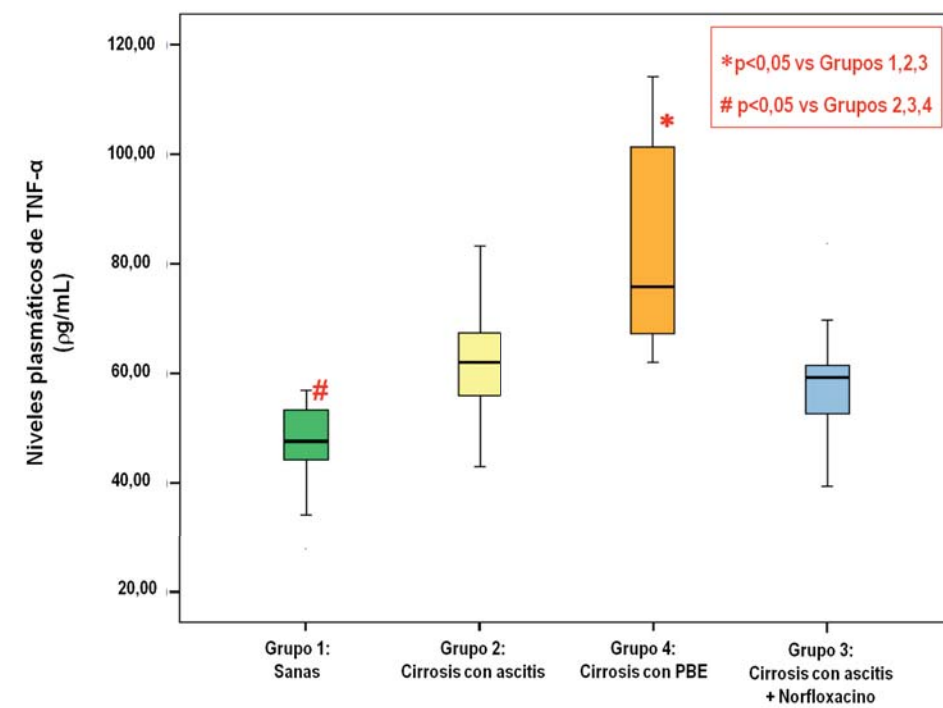
FIGURA 25: NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO SEGÚN EL GRUPO EXPERIMENTAL



6.2/TNFα

Los niveles plasmáticos de TNFα fueron superiores en el grupo de ratas con PBE (grupo4) y estas diferencias fueron significativas con el resto de grupos del estudio. Por el contrario, los niveles más bajos de TNFα se presentaron en el grupo control, con diferencias significativas frente a todos los grupos de cirrosis (Figura 26).

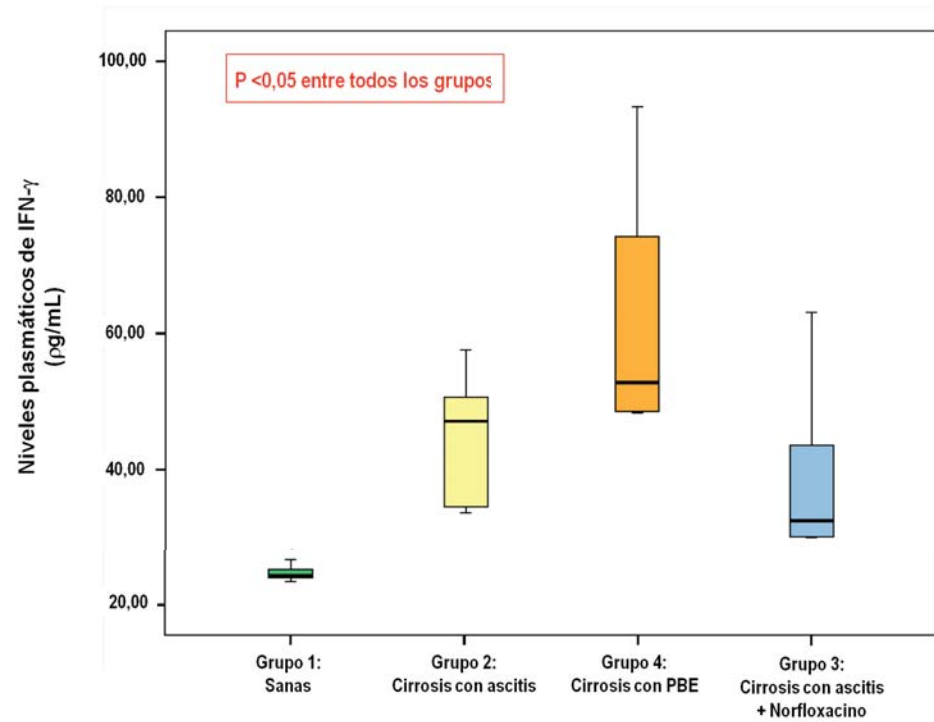
FIGURA 26: NIVELES DE TNFα SEGÚN EL GRUPO EXPERIMENTAL



6.3/IFNγ

Se objetivó un gradiente en los niveles de IFNγ de forma que los valores más elevados se observaron en el grupo 4 (infectado), seguido del grupo 2 (cirrosis con ascitis), a continuación el grupo 3 (profilaxis antibiótica) y, con los valores más reducidos, el grupo control. Estas diferencias fueron significativas entre todos los grupos. De esta manera, la profilaxis antibiótica permitió reducir de forma significativa los niveles de IFNγ respecto a las ratas cirróticas con ascitis con o sin PBE (Figura 27).

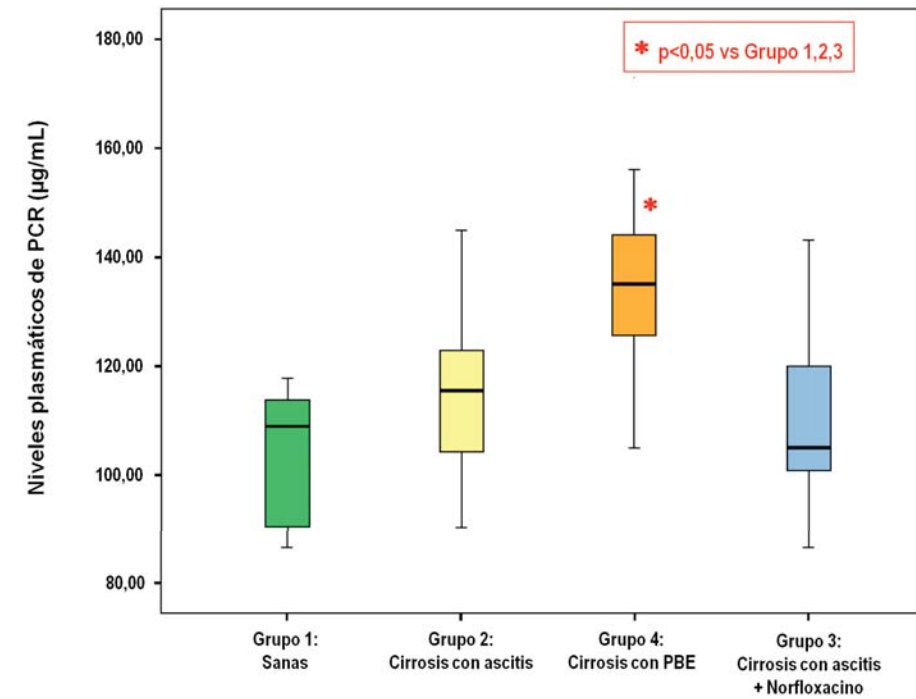
FIGURA 27: NIVELES DE IFN γ SEGÚN EL GRUPO EXPERIMENTAL



6.4/Proteína C reactiva

Los niveles plasmáticos de PCR fueron significativamente superiores en el grupo con PBE frente al resto de grupos. No hubo diferencias significativas en los niveles de PCR en ausencia de PBE (Figura 28).

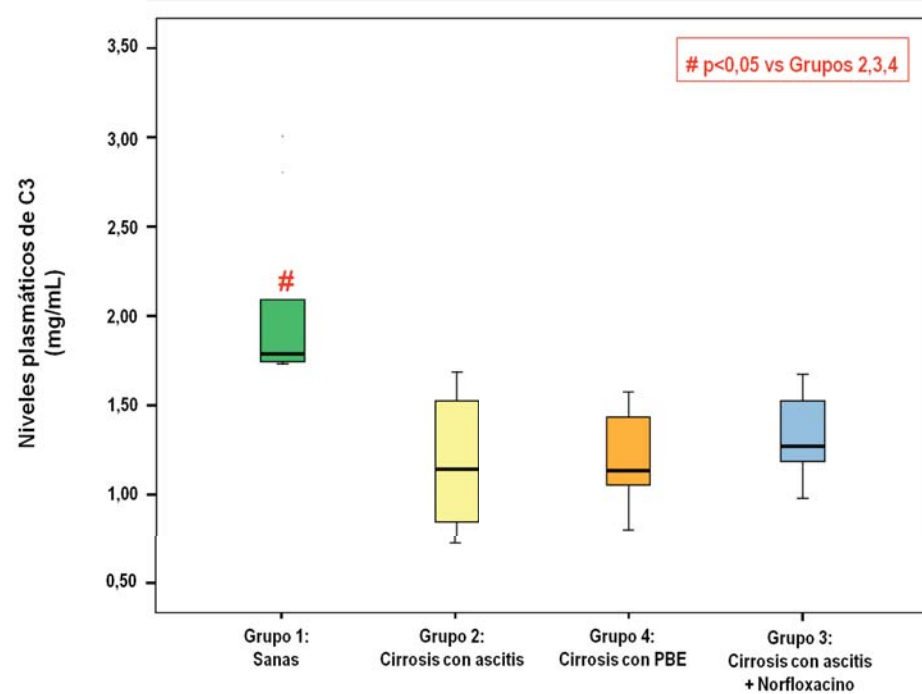
FIGURA 28: NIVELES DE PCR SEGÚN EL GRUPO EXPERIMENTAL



6.5/Complemento (C3)

No hubo diferencias en los niveles de C3 en los diferentes grupos de ratas cirróticas con ascitis (grupos 2, 3 y 4), que presentaron unos niveles de complemento significativamente menores frente al grupo control (Figura 29).

FIGURA 29: NIVELES DE C3 SEGÚN EL GRUPO EXPERIMENTAL



6.6/Determinaciones plasmáticas y traslocación bacteriana

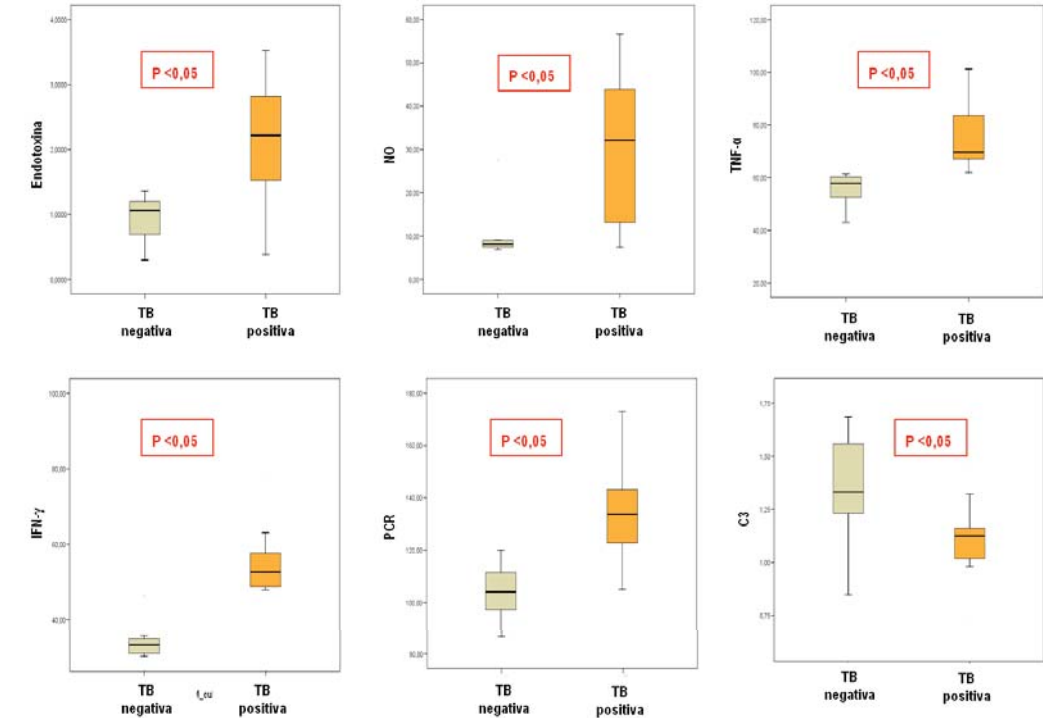
Se analizaron las posibles diferencias en las determinaciones plasmáticas en función de la presencia o no de traslocación bacteriana y en el contexto de la cirrosis con descompensación ascítica. El grupo control se excluyó de este análisis dado que no se evidenció ningún caso de TB, por lo que este análisis se realizó sobre las 30 ratas cirróticas (grupos 2, 3 y 4).

Aquellos animales que presentaron TB (n=17) tuvieron valores significativamente superiores de endotoxemia así como de los niveles plasmáticos de NO, TNF α , IFN γ y PCR, frente a los animales sin evidencia de TB (n=13). Por el contrario, los niveles de C3 fueron significativamente superiores en los animales sin evidencia de TB (Tabla 12, Figura 30).

TABLA 12: VALORES DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS EN FUNCIÓN DE LA EVIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA EN LAS RATAS CIRRÓTICAS (GRUPOS 2+3+4) (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR). EN TODOS LOS CASOS LAS DIFERENCIAS FUERON SIGNIFICATIVAS (P<0,05)

(n=30, grupos 2+3+4)	TB negativa (n=13)	TB positiva (n=17)
Endotoxina (UE/mL)	0,91 \pm 0,11	2,11 \pm 0,21
NO (μ M)	9,56 \pm 1,51	30,92 \pm 4,07
TNF- α (pg/mL)	54,49 \pm 2,04	77,87 \pm 4,01
IFN- γ (pg/mL)	34,38 \pm 1,39	57,22 \pm 3,14
PCR (μ g/mL)	103,56 \pm 2,94	133,46 \pm 4,06
C3 (mg/mL)	1,38 \pm 0,07	1,12 \pm 0,06

FIGURA 30: DETERMINACIONES PLASMÁTICAS EN FUNCIÓN DE LA EVIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA EN LAS RATAS CIRRÓTICAS



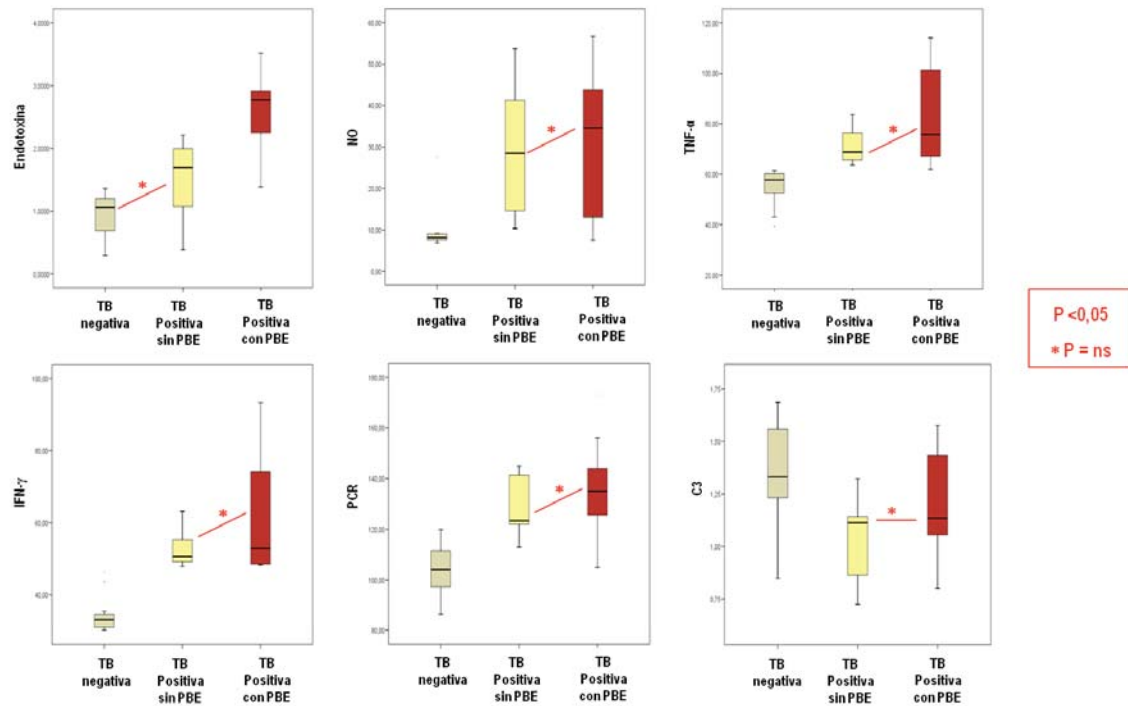
6.7/Determinaciones plasmáticas y diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea

Se realizó el mismo análisis sobre el grupo de ratas cirróticas (grupos 2, 3 y 4, n=30), pero esta vez, agrupándolas en aquellas que no presentaban TB (n=13), aquellas con evidencia de TB pero sin PBE (n=7) y aquellas con TB y PBE (n=10). El objetivo de este análisis fue hallar posibles diferencias entre los 3 estadios evolutivos dentro de la fisiopatología de la PBE en la cirrosis. Los valores de los parámetros analíticos pueden observarse en la tabla 13.

TABLA 13: VALORES DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS EN FUNCIÓN DE LA EVIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA Y PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA EN LAS RATAS CIRRÓTICAS (GRUPOS 2+3+4) (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR)

(n=30, grupos 2+3+4)	TB negativa (n =13)	TB positiva sin PBE (n =7)	TB positiva con PBE (n =10)
Endotoxina (UE/mL)	0,91 \pm 0,11	1,49 \pm 0,27	2,53 \pm 0,21
NO (μ M)	9,56 \pm 1,51	29,21 \pm 6,42	32,12 \pm 5,51
TNF- α (pg/mL)	54,49 \pm 2,04	71,47 \pm 3,21	82,34 \pm 6,20
IFN- γ (pg/mL)	34,38 \pm 1,39	52,95 \pm 2,09	60,22 \pm 5,03
PCR (μ g/mL)	103,56 \pm 2,94	129,69 \pm 4,75	136,09 \pm 6,12
C3 (mg/mL)	1,38 \pm 0,07	1,03 \pm 0,08	1,18 \pm 0,08

FIGURA 31: DETERMINACIONES PLASMÁTICAS EN FUNCIÓN DE LA EVIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA Y DE PBE EN LAS RATAS CIRRÓTICAS



Tal y como puede observarse en la figura 31, los valores de endotoxina, citocinas proinflamatorias, NO y PCR fueron superiores en el grupo de animales con TB y PBE, seguidos del grupo con TB sin PBE y finalmente, con valores inferiores, en ausencia de TB. El mismo gradiente pero a la inversa puede observarse en el caso de C3. Estas diferencias son significativas en todos los parámetros entre el grupo sin TB y el grupo con PBE, que representan las 2 condiciones clínicas extremas. En la comparación de los grupos con TB con o sin PBE, la endotoxemia es el único parámetro analítico con valores significativamente superiores en el grupo infectado. En cambio, en la comparación del grupo con TB sin PBE frente al grupo sin TB, todos los parámetros analíticos salvo la endotoxemia son significativamente superiores.

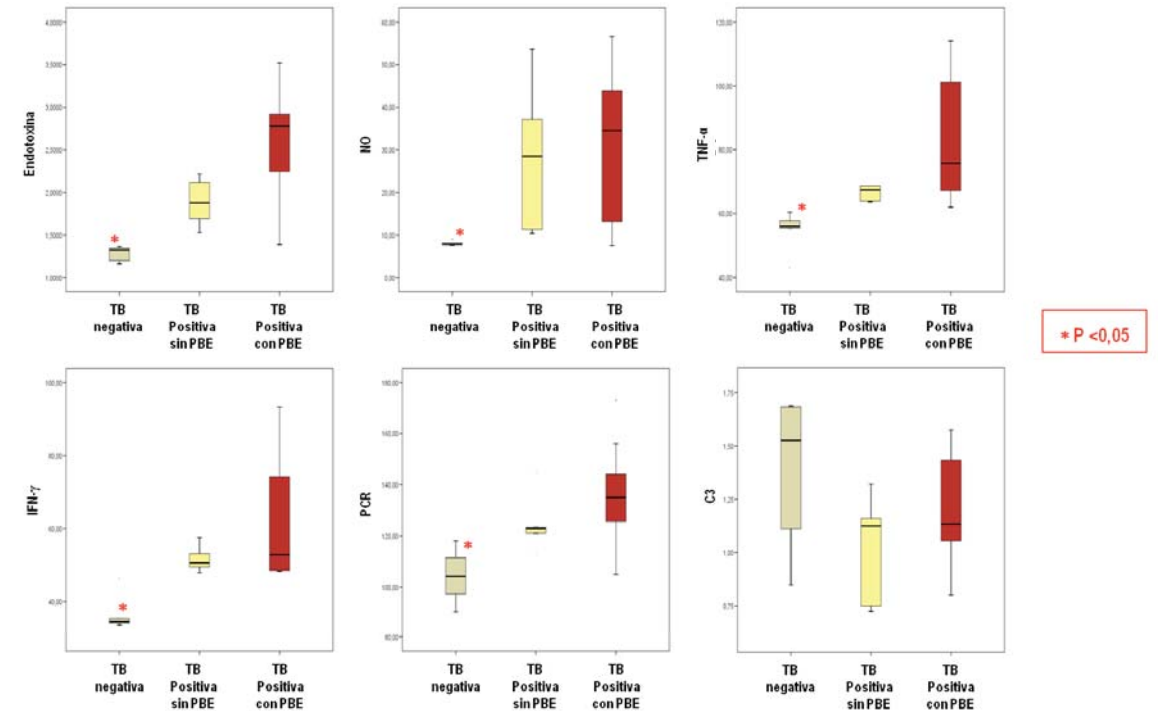
Se realizó un segundo análisis, excluyendo también al grupo que recibió norfloxacino (grupo3) además del grupo control y, por tanto, valorando los resultados en los 2 grupos de ratas cirróticas con ascitis (grupo 2) y con ascitis y PBE (grupo 3). De esta forma, se restaba el posible efecto del fármaco en estas determinaciones. Los valores de los parámetros analíticos pueden observarse en la tabla 14.

TABLA 14: VALORES DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS EN FUNCIÓN DE LA EVIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA Y PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA EN LOS GRUPOS 2 Y 4 (MEDIA ± ERROR ESTÁNDAR)

n=20 (grupos 2+4)	TB negativa (n = 5)	TB positiva sin PBE (n = 5)	TB positiva con PBE (n =10)
Endotoxina (UE/mL)	1,28 ±0,04	1,88 ±0,13	2,53 ±0,21
NO (µM)	8,02 ±0,27	28,21 ±8,17	32,12 ±5,51
TNF-α (pg/mL)	54,51 ±3,00	69,38 ±3,59	82,34 ±6,20
IFN-γ (pg/mL)	36,83 ±2,39	51,74 ±1,69	60,22 ±5,03
PCR (µg/mL)	104,29 ±4,91	125,05 ±5,31	136,09 ±6,12
C3 (mg/mL)	1,38 ±0,17	1,02 ±0,12	1,18 ±0,08

En este caso, el grupo con TB se homogeniza en los valores de todas las determinaciones plasmáticas, sin hallar diferencias significativas en ningún parámetro en lo que referente a la presencia o ausencia de PBE. Sin embargo, las diferencias entre el grupo sin TB y el grupo con TB sin PBE se hacen más significativas, incluyendo la endotoxina, y los mismo pasa al comparar la ausencia de TB con la presencia de PBE. En ningún caso, hay diferencias significativas en los niveles de C3 entre los grupos analizados (Figura 32).

FIGURA 32: DETERMINACIONES PLASMÁTICAS EN FUNCIÓN DE LA EVIDENCIA DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA Y DE PBE EN LOS GRUPOS 2 Y 4



7 Correlaciones

7.1/Correlaciones entre fagocitosis y killing

No se halló correlación entre la actividad fagocítica y la capacidad bactericida intracelular en la comparación entre grupos de estudio, en el análisis animal-animal ni en función de la existencia o no de traslocación bacteriana.

7.2/Correlaciones entre fagocitosis y parámetros plasmáticos

No se halló correlación entre los niveles plasmáticos de NO, TNF α , IFN γ , PCR o C3 y la actividad fagocítica en ninguno de los compartimentos a estudio por grupo experimental.

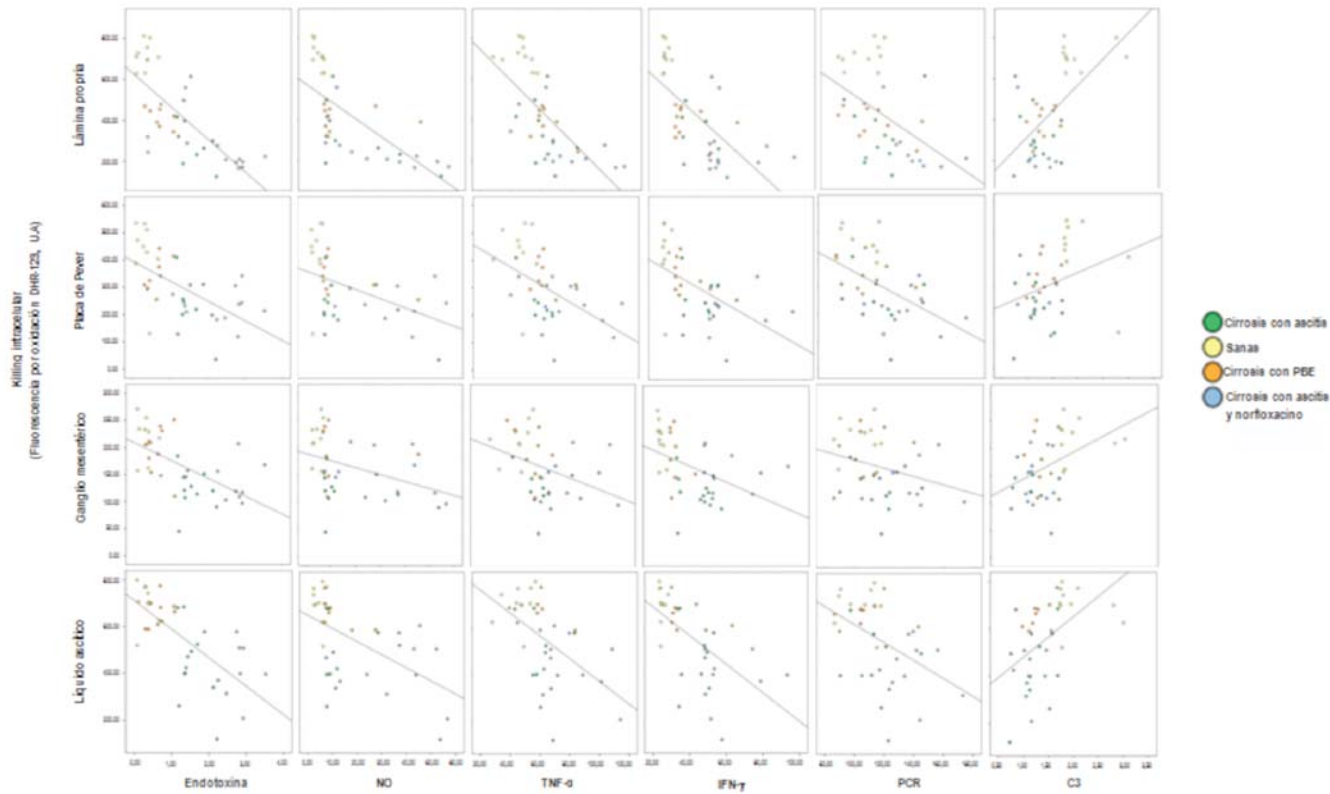
Tampoco se halló correlación entre la actividad fagocítica de ningún compartimento y los niveles de endotoxina en plasma.

7.3/Correlaciones entre killing intracelular y parámetros plasmáticos

A diferencia de la fagocitosis, sí que se halló una correlación significativa, que en la mayoría de casos fue $p < 0,01$, entre los niveles plasmáticos de NO, TNF α , IFN γ , PCR, C3 y endotoxina y la capacidad bactericida o killing intracelular de los macrófagos de los diferentes compartimentos del GALT y del líquido ascítico. Esta correlación se mantuvo en todos los compartimentos analizados (Figura 33).

Se trató de una correlación negativa con la endotoxemia, las citocinas proinflamatorias, el NO y la PCR, de forma que niveles plasmáticos mayores se asociaron a una menor capacidad bactericida de los macrófagos. En el caso de C3, la correlación fue positiva, con una mayor capacidad de killing en contexto de niveles más elevados de complemento (Figura 33).

FIGURA 33: CORRELACIONES ENTRE EL KILLING INTRACELULAR SEGÚN EL COMPARTIMENTO ESTUDIADO Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE ENDOTOXINA, CITOCINAS Y COMPLEMENTO



Analizando la nube de puntos en el diagrama de dispersión se observó una distribución en función del grupo experimental de estudio que se mantuvo en todos los compartimentos, de forma que:

- los controles se distribuyeron en los niveles más altos de killing intracelular, asociados a niveles más elevados de complemento y menores de endotoxemia, citocinas proinflamatorias y NO.
- las ratas cirróticas con PBE se distribuyeron en los valores con menor capacidad de killing, asociados a niveles plasmáticos mayores de citocinas, endotoxemia y NO así como menor cantidad de C3.
- las ratas cirróticas con ascitis y aquellas que recibieron norfloxacino se distribuyeron entre estas 2 poblaciones experimentales opuestas.

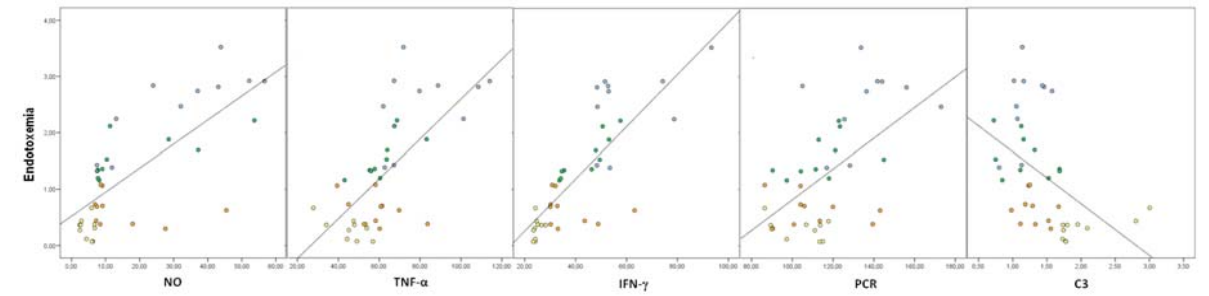
7.4/Correlaciones entre los parámetros plasmáticos

Los niveles plasmáticos de PCR, NO, TNF α e IFN γ se correlacionaron de forma positiva y significativa entre ellos. En relación a los niveles de C3, estos mostraron una tendencia a relacionarse de forma inversa con el resto de parámetros, aunque esta correlación fue más débil y sin alcanzar la significancia estadística.

7.5/Correlaciones entre los parámetros plasmáticos y la endotoxemia

La endotoxemia, evidencia indirecta de TB, presentó una correlación positiva y significativa ($p < 0,01$) con los niveles plasmáticos de NO, TNF α , IFN γ y PCR. La correlación con los niveles de C3 no fue tan marcada y no fue significativa (Figura 34).

FIGURA 34: CORRELACIÓN ENTRE LA ENDOTOXEMIA Y LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS



8 Histología compartimental

La presencia de una cirrosis establecida en los grupos 2, 3 y 4 se confirmó mediante el estudio histopatológico del hígado (Figura 35) de todos los animales. En el grupo control la histología hepática fue normal (Figura 36).

FIGURA 35: FOTOS DE HISTOLOGÍA HEPÁTICA DE RATA CIRRÓTICA (5X)

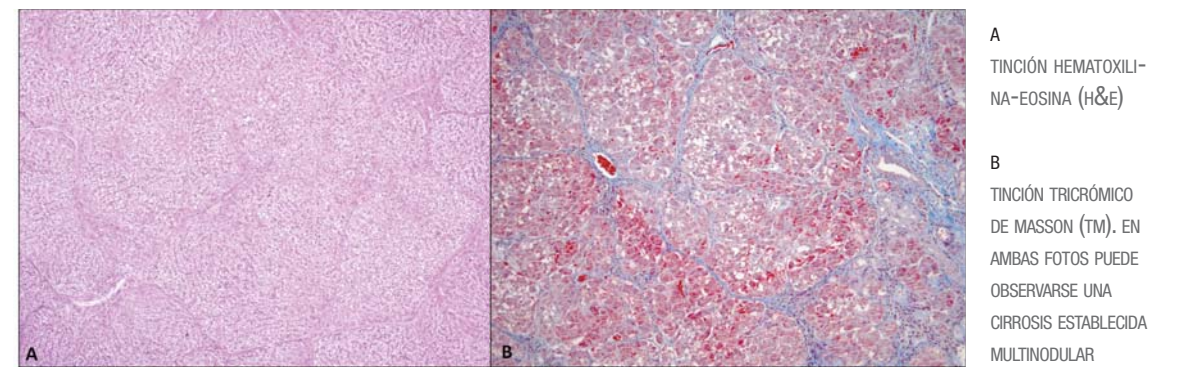
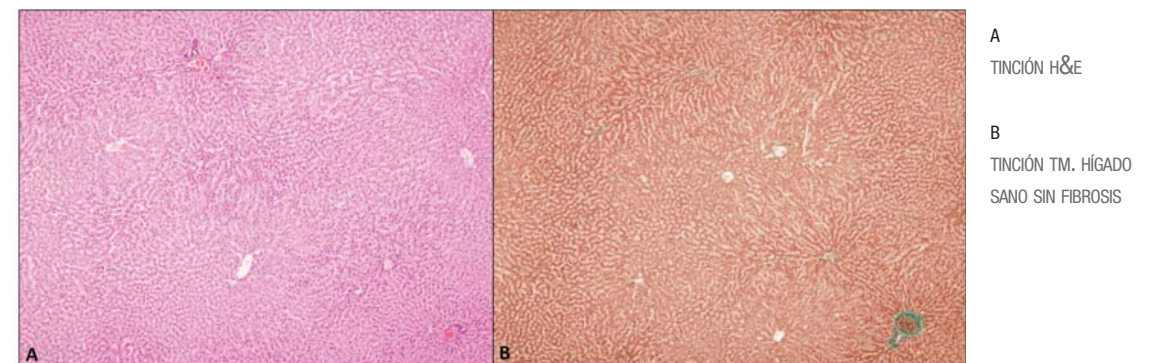


FIGURA 36: FOTOS DE HISTOLOGÍA HEPÁTICA DE RATA SANA (5X)



También se obtuvieron muestras histológicas de los compartimentos a estudio: ganglio linfático mesentérico (Figura 37), placa de Peyer (Figura 38) e intestino delgado (Figura 39).

FIGURA 37: FOTO DE MUESTRA DE GANGLIO LINFÁTICO MESENTÉRICO (TINCIÓN H&E, 5X)

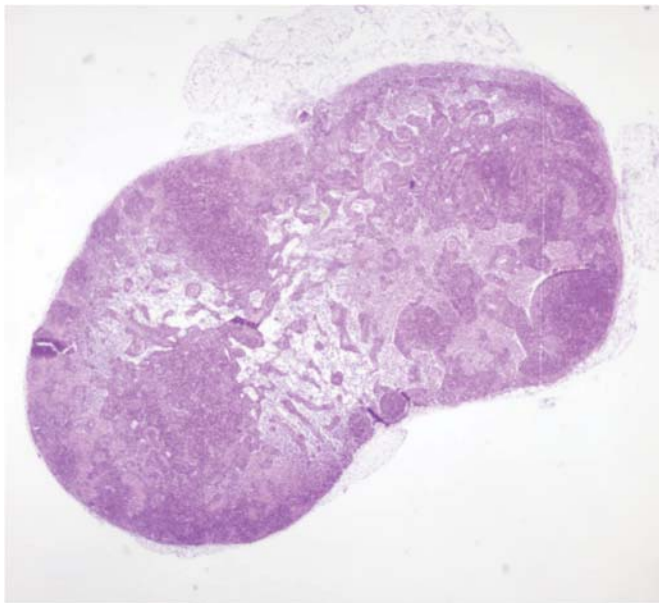


FIGURA 38: FOTOS DE MUESTRAS DE PLACA DE PEYER (TINCIÓN H&E, 5X). SE PUEDEN OBSERVAR VARIOS NÓDULOS LINFOIDES AGREGADOS QUE CONSTITUYEN LA PLACA DE PEYER Y ESTÁN EN ÍNTIMA ASOCIACIÓN CON LA LÁMINA PROPIA Y LA SUBMUCOSA

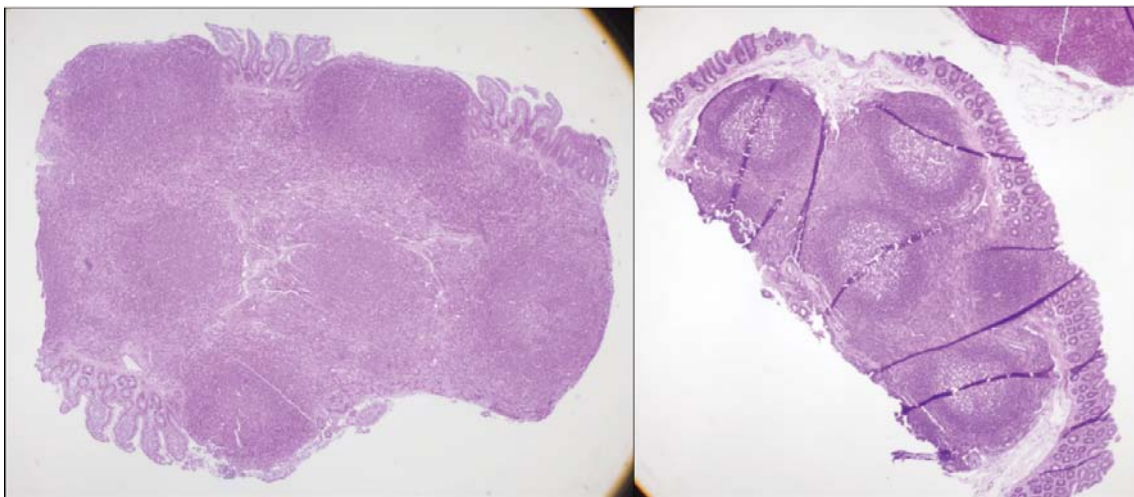
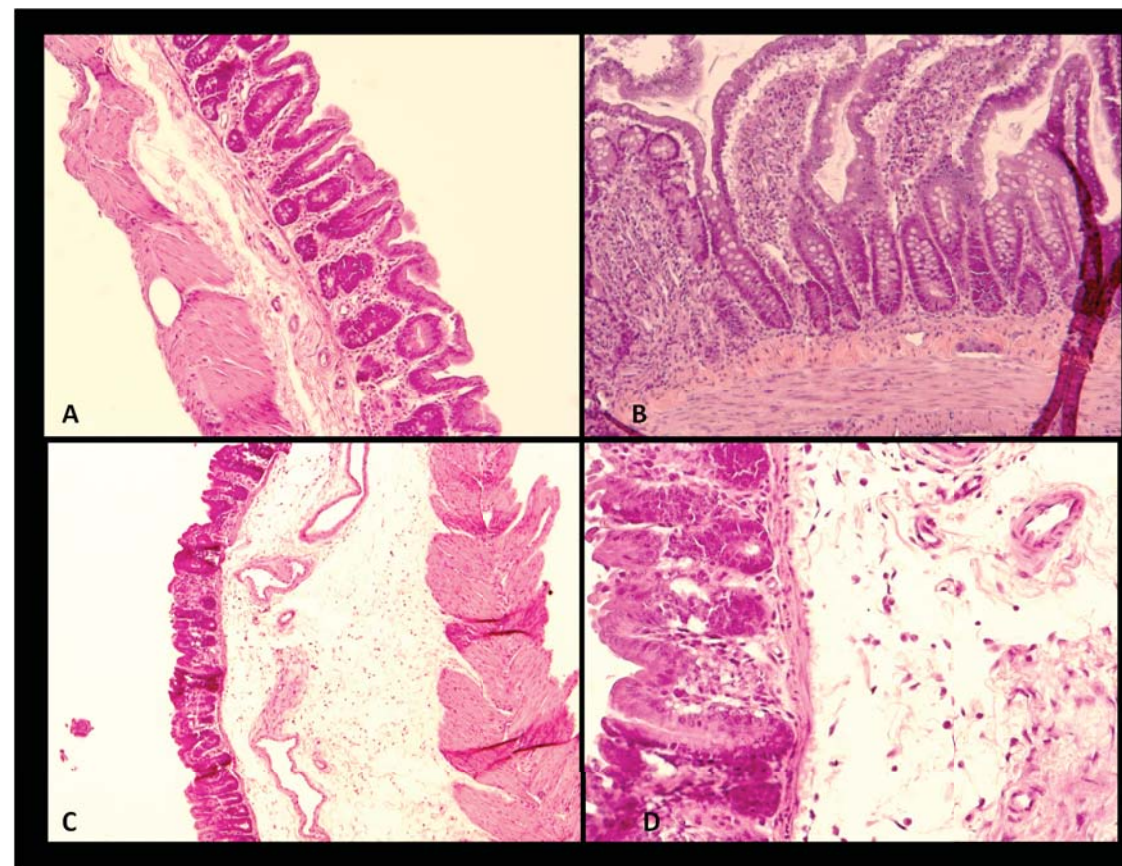


FIGURA 39: FOTOS DE MUESTRAS DE INTESTINO DELGADO (TINCIÓN H&E)



LAS FOTOS A Y B CORRESPONDEN A CONTROLES SANAS (10X) Y LAS FOTOS B Y C CORRESPONDEN A RATAS CIRRÓTICAS (5X Y 20X, RESPECTIVAMENTE). EN ESTAS PUEDE OBSERVARSE UNA MUCOSA PRESERVADA CON CIERTO GRADO DE DILATACIÓN VASCULAR Y DE EDEMA MUCOSO, AUNQUE ESTOS HALLAZGOS NO FUERON CONSTANTES EN LOS ANIMALES CIRRÓTICOS

Discusión

En la fisiopatología de la peritonitis bacteriana espontánea intervienen múltiples factores que favorecen el desarrollo de una traslocación bacteriana patológica^{59, 63}. Uno de los factores clave es la alteración inmunológica asociada a la cirrosis^{59, 63}. En este sentido, existen numerosos estudios experimentales y clínicos que demuestran una inmunosupresión sistémica (sistema reticuloendotelial hepático¹⁴³⁻¹⁵¹, inmunidad humoral¹⁵²⁻¹⁵⁵, neutrófilos^{152, 156-158}) y peritoneal (capacidad opsónica y bactericida de la ascitis)^{152, 159-162} asociada a la cirrosis y, sin embargo, los estudios que analizan el funcionalismo del sistema GALT en la cirrosis son escasos^{163, 164}.

Dentro del sistema GALT, los macrófagos son la principal célula responsable de la eliminación de los patógenos desempeñando un papel fundamental en la prevención de la TB, tanto por la fagocitosis y eliminación de las bacterias traslocadas como por su presentación al sistema inmune adaptativo. Por tanto, son células clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal donde presentan respuestas inmunológicas adaptadas al entorno local y a la presencia de bacterias entéricas¹⁶⁵. En la cirrosis existen estudios que evalúan la función de los monocitos circulantes y de los macrófagos hepáticos y peritoneales¹⁶⁶⁻¹⁶⁹, que presentan una mayor accesibilidad, y numerosos estudios basados en inmunohistoquímica de tejidos^{170, 171}, pero de nuevo faltan estudios sobre el funcionalismo de estas células en el sistema GALT¹⁷².

Los estudios que evalúen la interacción del patógeno con los macrófagos son necesarios para entender las respuestas celulares e inmunes del intestino y permitirán aportar información valiosa sobre la patogénesis de las infecciones y, en nuestro caso, de la TB.

Por este motivo, en la presente tesis se ha efectuado una aproximación a los mecanismos implicados en la alteración de los macrófagos del sistema GALT en la cirrosis con ascitis a través de su estudio en un modelo de cirrosis experimental en ratas.

El modelo experimental de inducción de cirrosis y ascitis se basó en la administración intragástrica de CCl_4 junto con la administración en la bebida de fenobarbital. Este modelo ya ha sido validado ampliamente para investigar la patogenia de las infecciones bacterianas en la cirrosis^{111, 112, 114}. La tasa de mortalidad en nuestro estudio fue del 40,74%, similar a la descrita en otras series, así como el tiempo hasta el desarrollo de ascitis.

El diagnóstico de peritonitis bacteriana espontánea (PBE) se basó en la obtención de cultivos positivos de líquido ascítico, ya que en ratas la eficacia de un nivel de PMN en ascitis superior a 250 mm^3 para el diagnóstico de PBE es controvertida, en contraste con la patología humana^{85, 114}. Este criterio está aceptado ampliamente en modelos animales experimentales de cirrosis y ascitis,

a pesar de que no permite diferenciar la PBE de la bacterioascitis, que son dos entidades clínicas diferentes en la patología humana. En el 70% de los casos la PBE fue monomicrobiana, lo que se corresponde con tasas similares obtenidas en estudios experimentales previos, donde se describen tasas de PBE polimicrobiana que oscilan entre el 7-33%^{112, 116}. Todas las bacterias identificadas en líquido ascítico corresponden a enterobacterias con un espectro bacteriano (60% *E. coli*, 40% Enterococo, 20% Proteus y 10% Klebsiella) similar al descrito en estudios previos¹⁷³, y en todos los casos se confirmó la existencia de TB con una buena correlación de los cultivos de GLM y líquido ascítico, hecho que apoya la TB de bacterias entéricas como principal mecanismo patogénico de la PBE.

La incidencia de TB en ratas cirróticas con ascitis fue del 56,7%, en contraposición a la tasa nula en nuestro grupo control. Esta tasa es similar a la descrita en otras comunicaciones (45-88%)^{44, 114, 116-118, 127-129, 174, 175}.

También se analizaron los niveles plasmáticos de endotoxina, que mostraron una buena correlación con el diagnóstico de TB mostrando un gradiente de endotoxemia de mayor a menor: cirrosis con PBE > cirrosis con ascitis > cirrosis con ascitis y norfloxacino > sanas. Esto se explica por la ausencia de TB evidenciada en el grupo control, así como la evidencia de una menor TB en el grupo de cirrosis con ascitis que recibió norfloxacino y que fue a expensas de bacterias gram positivas. Ya se ha descrito en la literatura la ineficacia de la endotoxemia como medidor de TB cuando esta se da por bacterias que no son gram negativas⁵⁶. En estudios previos animales ya se ha mostrado la buena correlación de los niveles plasmáticos de endotoxina con la evidencia de TB y PBE¹⁷⁶. A pesar de que se evidenciaron unos niveles de endotoxemia superiores en las ratas cirróticas con TB y PBE frente a las ratas cirróticas con TB sin PBE, estas diferencias no fueron significativas, probablemente por el tamaño muestral del estudio. Al incluir en el análisis a los animales que recibieron tratamiento con norfloxacino, la endotoxemia sí que fue significativamente superior en el grupo infectado, lo que se explica nuevamente porque la TB en este grupo fue a expensas de bacterias gram positivas. Estos resultados difieren de los observados en un estudio clínico realizado por Frances R y colaboradores¹⁷⁷ en pacientes con cirrosis y ascitis donde no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de endotoxina según la evidencia o no de TB, PBE o profilaxis secundaria con norfloxacino. Sin embargo, en dicho estudio y por motivos obvios el diagnóstico de TB se basó en la detección de ADN bacteriano en plasma o líquido ascítico, lo cual si bien ha demostrado ser un buen marcador indirecto de TB probablemente no traduce la misma situación clínica que la obtención de un cultivo positivo.

Una de las principales dificultades de nuestro proyecto fue establecer el modelo experimental óptimo para la obtención y estudio de los macrófagos del sistema GALT. El estudio de las subpoblaciones de macrófagos residentes en diferentes tejidos plantea un reto experimental, ya que son células con una elevada plasticidad, que están adaptadas a una actividad especializada en su entorno local¹⁶⁵ y que pueden verse alteradas durante los procedimientos experimentales¹⁷⁸. Las condiciones experimentales (tiempo del procedimiento, proceso de aislamiento celular, entorno, inmunomarcaje, cultivo) influyen de forma notable en la obtención de macrófagos (número y viabilidad)¹⁷⁸⁻¹⁸¹, así como en el fenotipo y funcionalismo de los mismos^{169, 178, 179, 181, 182}. Por este motivo, se ha postulado que los estudios directos inmediatamente tras el aislamiento celular probablemente sean mejores en los estudios funcionales de los macrófagos, incluso a expensas de la pureza de la muestra¹⁷⁹.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar el funcionalismo de los macrófagos (fagocitosis y killing) de los diferentes compartimentos del sistema GALT en los grupos experimentales descritos, así como detectar las posibles diferencias intercompartimentales de las subpoblaciones de macrófagos. Por este motivo nuestro diseño metodológico posee una serie de rasgos característicos. En primer lugar, se desarrolló un protocolo de aislamiento basado en la obtención de suspensiones celulares y estudio de funcionalismo directo sobre las mismas. Se descartó la posibilidad de trabajar con cultivos celulares de macrófagos ya que en estudios previos se ha observado que alteran su capacidad fagocítica¹⁷⁹ y que el tiempo de cultivo homogeniza las muestras por una maduración funcional en el entorno del cultivo¹⁸³ que limita la posibilidad de analizar diferencias intercompartimentales. Otro punto importante, fue la utilización de liberasa TM (Roche diagnostics)¹⁸⁴ para la digestión tisular a diferencia del uso de colagenasa utilizada en otros estudios^{37, 180, 181, 183, 185, 186}. El tipo y concentración de la colagenasa es

un paso crucial en la digestión enzimática de los tejidos y la actividad puede ser variable en función del laboratorio, tipo de colagenasa e incluso el lote utilizado, siendo las colagenasas tipo IV y tipo VIII (Sigma Aldrich) las más ampliamente utilizadas. Durante el diseño del protocolo metodológico no obtuvimos resultados óptimos con el uso de colagenasa mientras que el uso de liberasa TM, que es una mezcla de colagenasa purificada y proteasas neutras, nos permitió optimizar los resultados asegurando la reproducibilidad del estudio¹⁸⁷. Finalmente, tras la obtención de las suspensiones celulares, el inmunomarcaje de los macrófagos planteó otro desafío metodológico ya que, aunque existe una larga lista de marcadores en ratón y en humanos, la disponibilidad en rata es más restrictiva^{22, 35, 37, 165, 173, 188}. En nuestro diseño escogimos el anti-CD11b en lugar del anti-CD68 porque, a diferencia del segundo, es un marcador de superficie, lo que nos permite identificar células sin necesidad de permeabilizarlas, por lo que siguen siendo viables y de esta forma pueden ser utilizadas en estudios funcionales.

En este contexto, y ante la ausencia de protocolos específicos de obtención de macrófagos de LP en ratas, desarrollamos un protocolo experimental¹⁸⁷ que permitió optimizar la metodología de aislamiento, con un menor tiempo de procedimiento asociado a un buen rendimiento celular (número y viabilidad) y que permitió el estudio funcional posterior.

Con todo ello, en nuestro trabajo obtuvimos suspensiones con un recuento celular variable en función de los compartimentos pero siempre superiores a 107 células/mL, con una viabilidad celular >95% (similar a otros estudios en la literatura^{37, 189}). La cantidad de células CD11b fue en todos los casos >106/mL por animal y por compartimento, lo que permitió analizar cada animal por separado sin necesidad de hacer pools celulares por compartimento a diferencia de otros estudios descritos en la literatura^{183, 184}. No disponemos de estudios comparables frente a los que evaluar el número de células CD11b+ obtenidas en cada compartimento en nuestro protocolo, ya que en la mayoría de estudios están hechos en humanos^{167, 168} o en ratones^{169, 181}, en algunos casos la cuantificación es histológica basada en tinciones inmunohistoquímicas^{171, 190} y en otros el contenido celular se cuantifican por peso de tejido^{173, 191}. El porcentaje de macrófagos en LP es algo menor aunque equiparable al descrito en modelos de ratones¹⁸⁶, si bien, al igual que en estos, el porcentaje de macrófagos aumenta en condiciones proinflamatorias locales¹⁸⁰. En nuestro estudio el grupo de ratas sanas y, por tanto, con una exposición nula a TB presentó un menor porcentaje de células CD11b+ respecto el resto de grupos de ratas cirróticas en todos los compartimentos del GALT.

Los estudios de funcionalismo celular se realizaron sobre las suspensiones celulares obtenidas de cada compartimento y de cada animal.

El test de fagocitosis se cuantificó por citometría mediante un kit comercial (Phagotest®, Glycotope Biotechnology GmbH, Alemania) que ya ha demostrado su validez¹³⁴⁻¹⁴⁰ y permite analizar tanto el porcentaje de células con fagocitosis como el grado de actividad fagocítica individual de cada célula. En nuestro trabajo no hallamos diferencias cualitativas ni cuantitativas en la actividad fagocítica de los macrófagos en función del grupo experimental de estudio en ninguno de los compartimentos analizados. Este es el primer trabajo que analiza el funcionalismo de los macrófagos del GALT por lo que no podemos comparar nuestros resultados con estudios previos. Estos hallazgos difieren de los reportados en monocitos de sangre periférica en cirrosis, en los que se observa una marcada reducción de la fagocitosis^{192, 193}; sin embargo, monocitos y macrófagos tisulares son células funcionalmente diferentes. En 1993, Mayanski y colaboradores¹⁹⁴ describieron, utilizando el mismo modelo experimental de cirrosis, una alteración en la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales. Esta alteración no era evidente en condiciones basales pero se ponía de manifiesto tras la administración de un estímulo adicional, que era incapaz de aumentar su capacidad fagocítica a diferencia de lo que ocurría con los controles. Por tanto, se postuló la existencia de una disfunción latente de la capacidad fagocítica de los macrófagos en respuesta a un estímulo, que relacionaron con la endotoxemia asociada a la cirrosis. Sin embargo, en nuestro trabajo no hallamos correlación entre la actividad fagocítica de los macrófagos y los niveles de endotoxina en plasma.

Si bien no hallamos diferencias en la capacidad fagocítica de los macrófagos en función del grupo experimental, la opsonización previa de los *E. coli* con suero de rata cirrótica se asoció a un detrimento funcional significativo de la fagocitosis (cuantitativo, con un menor porcentaje de macrófagos

con fagocitosis, y cualitativo, con una menor capacidad fagocítica individual) en comparación con la opsonización con suero control. Por tanto, a pesar de que la capacidad fagocítica intrínseca de los macrófagos permaneció invariable en los diferentes grupos de estudio, en nuestro trabajo demostramos una alteración funcional de la fagocitosis secundaria a una opsonización deficitaria del suero cirrótico. Otros trabajos clínicos en cirrosis humana que han analizado el funcionalismo de los macrófagos peritoneales, a diferencia de nuestro estudio, han observado un defecto intrínseco de la fagocitosis no asociado a la opsonización¹⁶⁷, si bien tanto la metodología como el modelo de estudio son diferentes. El efecto inhibitorio del plasma de sujetos cirróticos en la capacidad fagocítica y bactericida de las células del sistema innato ya ha sido descrito en estudios previos^{193, 195}, que atribuían el mismo a la presencia de endotoxina. No obstante, otro estudio más reciente⁷³ que también confirmó el mismo efecto negativo del plasma cirrótico sobre la capacidad fagocítica de los neutrófilos, no halló correlación con los niveles de endotoxina ni con la presencia de ADN bacteriano circulante. En este estudio sugieren la posible correlación entre los defectos de fagocitosis y la gravedad de la inflamación, medida mediante la cuantificación de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, en nuestro trabajo no hallamos correlación entre los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ) ni con los niveles de proteínas de respuesta aguda inflamatoria (PCR). En estos estudios no se analizó de forma específica la actividad opsónica del suero, ya que los *E. coli* fagocitados ya estaban preopsonizados dentro del preparado comercial, a diferencia de nuestro trabajo en que la opsonización se realizó con pool de sueros control o cirrótico, y es por este motivo, que a pesar que puedan haber otros factores que influyan de forma negativa en la fagocitosis, concluimos que una opsonización deficitaria asociada al suero de rata cirrótica da lugar a una fagocitosis deficitaria en macrófagos que, de por sí, parecen competentes. Es bien conocida la relación entre la capacidad opsónica del suero y los niveles de complemento, que en la cirrosis son deficitarios y se asocian a un aumento en el riesgo de infecciones y PBE^{9,66}. En nuestro trabajo, objetivamos unos niveles de C3 significativamente menores en todos los grupos de ratas cirróticas frente al grupo control, por lo que podemos inferir que los niveles bajos de C3 en el pool de sueros de ratas cirróticas se asocian a una menor opsonización y, consecuentemente, a una menor capacidad fagocítica.

Nuestro trabajo de forma similar a otros^{68, 73} pone de manifiesto el papel relevante del plasma de los pacientes cirróticos en la inducción de disfunción fagocítica del sistema fagocítico mononuclear, que queda parcialmente explicado por un defecto en la opsonización pero sin poder aclarar el papel de otros posibles factores asociados.

La metodología usada en nuestro trabajo nos permitió encontrar diferencias intercompartimentales en la actividad fagocítica de los macrófagos. Tanto el porcentaje de macrófagos activados como la capacidad fagocítica individual de los mismos fueron significativamente superiores en líquido ascítico respecto a los diferentes compartimentos del GALT. Los macrófagos de los diferentes compartimentos del GALT no mostraron diferencias en la capacidad fagocítica individual de los mismos, sin embargo sí que hubieron diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos activados con fagocitosis, con un gradiente GLM>PP>LP. Esto probablemente traduce el funcionalismo del GALT y la adaptación del funcionalismo de los macrófagos a su entorno. Los macrófagos peritoneales son el pool con mayor número celular y que presenta mayor activación probablemente en relación a la movilización de monocitos/macrófagos inflamatorios a cavidad peritoneal en contexto del desarrollo de ascitis o de inyección de suero en la cavidad peritoneal. Posteriormente, el GLM constituye un punto clave de interconexión entre la inmunidad local y sistémica, y la fagocitosis y eliminación de los antígenos en este nivel son esenciales en el control de una TB. Las diferencias entre PP y LP son menores, con una mayor actividad inmunológica en PP que constituye un órgano inmunológico específico. Este resultado podría ser reflejo del hecho que los macrófagos del sistema inmune intestinal tienen que mantener un cierto equilibrio entre una respuesta inmune contra los patógenos y toxinas intestinales y una tolerancia frente a las bacterias comensales y alimentos. Esto implicaría la aparición de mecanismos inmunosupresores selectivos naturales como una capacidad fagocítica mas restringida¹⁶.

El test de killing intracelular de los macrófagos de los distintos compartimentos se evaluó mediante la cuantificación por citometría de flujo de la oxidación de DHR-123. A diferencia de los

resultados observados en el test de fagocitosis, en nuestro trabajo se objetivó una disfunción significativa del killing intracelular de los macrófagos de todos los compartimentos estudiados asociada a la cirrosis. A falta de otros estudios similares, estos resultados son acordes a los obtenidos en el estudio de monocitos de pacientes cirróticos^{192, 193}, que muestran también una menor capacidad bactericida. Nuestros resultados difieren de los obtenidos en dos estudios recientes sobre macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis^{167, 168}, en los que se describe un aumento del estallido oxidativo en respuesta a un estímulo (PMA) o a dos estímulos (PMA + LPS) respecto a los controles, si bien el incremento de respuesta a un estímulo máximo es inferior en el grupo cirrosis (40% vs 130%). Estas diferencias pueden ser secundarias al diseño experimental, como admiten los propios autores, en relación a una activación de los macrófagos durante el procedimiento de obtención, así como a las diferencias atribuibles al modelo de cirrosis de estudio, en nuestro caso animal. En nuestro trabajo el estímulo máximo (*E. coli* + PMA) indujo un estallido oxidativo siempre superior al estímulo bacteriano (*E. coli*) y, a diferencia de este último estudio, el incremento del killing fue superior en los animales cirróticos frente a los controles, aunque no de forma significativa, sugiriendo una respuesta bactericida más débil frente a estímulos bacterianos en la cirrosis que puede verse potenciada incrementando el estímulo. Sin embargo, a pesar del potencial incremento de la capacidad bactericida de los macrófagos en función del estímulo antigénico recibido, tanto el killing frente a *E. coli* como el killing máximo fueron significativamente inferiores en los grupos de cirrosis con ascitis, con o sin PBE. En cuanto al estallido oxidativo basal, previo a la administración de cualquier estímulo, no hallamos diferencias significativas entre el grupo control y los diferentes grupos de estudio, a diferencia de los hallazgos descritos en neutrófilos de pacientes cirróticos, que presentan una activación basal aumentada que condiciona una respuesta fagocítica y bactericida deficiente frente a estímulos bacterianos^{157, 195}. En nuestro trabajo no analizamos el efecto del plasma en el killing intracelular, que en otros estudios ha mostrado desempeñar un importante papel^{157, 192, 193, 195, 196} pero sí que demostramos una alteración de la capacidad bactericida generalizada de los macrófagos en todos los compartimentos.

A pesar de la relación descrita en algunos estudios entre fagocitosis y killing^{167, 197} en la que un intenso estallido oxidativo se asoció a una menor fagocitosis secundaria a la supresión en la expresión de receptores de endocitosis, en nuestro trabajo no hallamos ninguna correlación entre fagocitosis y killing. Esto quizás pueda explicarse porque en nuestro caso no hemos detectado un aumento del estallido oxidativo asociado a la cirrosis.

Tanto en la cirrosis humana como en modelos experimentales de cirrosis existe una activación sistémica anómala del sistema inmunitario, con un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias^{101, 173, 198, 199}. Este hecho se confirma en nuestro trabajo, donde objetivamos una elevación significativa de citocinas proinflamatorias, analizadas mediante la determinación de TNF α e IFN γ , así como una elevación de los niveles de PCR, asociado a la cirrosis con ascitis y con un gradiente de inflamación superior en el grupo PBE, seguido del grupo con ascitis y, finalmente, del grupo que recibió tratamiento con norfloxacino. Todos estos parámetros se correlacionaron de forma positiva y significativa con la endotoxemia y, en consecuencia y lógicamente, con la presencia de TB que mantiene el mismo gradiente (grupo infectado [10] > cirrosis con ascitis [5] > tratamiento con norfloxacino [2] > grupo control [0]). Esto se explica porque a pesar de la evidencia de una disfunción sistémica inmune ya presente en ratas cirróticas compensadas o pre-ascíticas¹⁷³ en las que no se describe TB, en el modelo de rata cirrótica con ascitis la TB es una vía principal en el mantenimiento de la cascada inflamatoria sistémica¹⁹⁹. Los niveles plasmáticos de NO mostraron el mismo gradiente descrito previamente, con una correlación positiva y significativa con los niveles de endotoxina en plasma y con la presencia o no de TB.

Todos los parámetros plasmáticos analizados, salvo los niveles de C3, se correlacionaron de forma positiva y significativa entre ellos y con la presencia de TB por lo que nos planteamos su posible utilidad en la práctica clínica como parámetro indirecto de identificación de TB y, por tanto, con implicaciones pronósticas en la cirrosis hepática descompensada. En este sentido la determinación de PCR probablemente es insuficiente, ya que en nuestro trabajo tiene una menor sensibilidad para la TB y una mayor especificidad para el diagnóstico de PBE, que es el único grupo en el que se

encuentra aumentada de forma significativa respecto al resto de grupos del estudio, sin diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en ausencia de infección. Este resultado es coherente con estudios clínicos en que señalan la PCR como el mejor parámetro plasmático para el diagnóstico de infección bacteriana en la cirrosis²⁰⁰. En cuanto a las citocinas proinflamatorias, el IFN γ es la única en la que además de conservar el gradiente explicado previamente, estas diferencias son significativas entre todos los grupos de estudio y, por tanto, quizás podría ser un predictor precoz de complicación infecciosa, con implicaciones pronósticas y terapéuticas. Este aspecto requiere más estudios.

La cirrosis con ascitis se asocia a niveles bajos de C3 en líquido ascítico y en suero que se asocian a un aumento del riesgo de infecciones y de PBE^{154, 161, 162, 201-205}. De forma similar, en nuestro trabajo objetivamos unos niveles de C3 significativamente reducidos en todos los grupos de ratas cirróticas frente al grupo control. La evidencia de TB en los animales cirróticos se asoció a unos niveles significativamente menores de C3 en plasma, si bien no hubo diferencias significativas con la presencia o ausencia de infección.

A diferencia de la fagocitosis, en nuestro trabajo objetivamos una correlación de la capacidad bactericida de los macrófagos con la endotoxemia y los marcadores plasmáticos de inflamación. Una mayor endotoxemia que se asoció a una mayor activación inflamatoria sistémica se correlacionó de forma significativa ($p < 0,01$) con un defecto en el killing intracelular de los macrófagos del GALT y de líquido ascítico. De la misma forma, la hipocomplementemia se correlacionó también de forma significativa ($p < 0,05$) con una menor capacidad de killing. Estos hallazgos difieren de los reportados en el funcionalismo de los neutrófilos en la cirrosis, en que tanto la endotoxemia como los títulos altos de IFN γ y TNF α se asocian a una estimulación intensa del estallido oxidativo^{157, 195}.

Finalmente otro de nuestros objetivos fue analizar el posible efecto inmunomodulador del norfloxacino en los macrófagos del GALT y peritoneales. El norfloxacino es un fármaco ampliamente utilizado en la profilaxis de las infecciones bacterianas y de la PBE en la cirrosis⁶⁷. Esto se debe en parte a su capacidad bacteriostática/bactericida⁹⁰⁻⁹² que junto a un potencial efecto inmunomodulador¹⁰⁵ permite modificar la TB patológica.

La influencia positiva del norfloxacino en la TB se confirmó en nuestro estudio de forma cuantitativa, con una menor evidencia de TB en el grupo que recibió tratamiento con norfloxacino (20% en el grupo 3 frente al 50% en el grupo 2), así como cualitativa, con un cambio en el espectro de bacterias traslocadas, sin evidencia de traslocación de BGN. Dado que la endotoxemia es un indicador indirecto de TB de BGN⁵⁶, el efecto del norfloxacino en la TB se asoció a unos niveles de endotoxemia significativamente menores frente al resto de grupos de ratas cirróticas. El tratamiento con norfloxacino, al igual que en estudios previos^{101, 106}, también se asoció a una reducción de los marcadores sistémicos de inflamación (IFN γ , TNF α y PCR). En cuanto al posible efecto inmunomodulador del norfloxacino en el funcionalismo de los macrófagos, la administración de norfloxacino al grupo de ratas cirróticas con ascitis tuvo un efecto restaurador de su capacidad bactericida, con un incremento significativo del killing frente al grupo de cirrosis con ascitis con o sin PBE, en la mayoría de compartimentos del GALT y en líquido ascítico.

De esta forma, se plantean varias vías que pueden explicar la acción inmunomoduladora del norfloxacino tanto a nivel sistémico como a nivel local, sobre los macrófagos de los compartimentos estudiados. La capacidad bactericida/bacteriostática del norfloxacino, que modifica la microbiota intestinal, disminuye y cambia el espectro de la TB patológica de BGN (principal mecanismo de mantenimiento de la cascada inflamatoria sistémica¹⁹⁹), lo que conduce a una reducción de los niveles plasmáticos de endotoxina y a una atenuación de la activación inflamatoria sistémica propia de la cirrosis. Nuestros hallazgos son coherentes con este mecanismo de acción. Por otro lado, las quinolonas han demostrado poseer efectos inmunomodulares en estudios in vitro e in vivo, que aunque no se comprenden en su totalidad parecen estar relacionados con la síntesis de citocinas mediante la modificación de vías de señalización intracelular y que dependen de la concentración intracelular del fármaco¹⁰⁵. Este efecto se ha observado en estudios murinos de cirrosis que han mostrado la acción inmunomoduladora del norfloxacino sobre el GALT mediante la estimulación de la secreción de citocinas antiinflamatorias^{88, 108} (esencialmente IL-10), que atenuaron la inflamación

local intestinal y mejoraron la integridad de la barrera intestinal, disminuyendo la translocación de bacterias o productos bacterianos. Este aspecto no ha sido analizado en nuestro trabajo.

En resumen, el tratamiento con norfloxacino ejerce su acción local actuando en los tres niveles de la barrera intestinal: de forma directa a nivel de la barrera ecológica, influyendo en la composición de la microbiota intestinal⁹², y de la barrera inmunológica, promoviendo un ambiente antiinflamatorio^{88, 108}, y de forma secundaria en la barrera epitelial, promoviendo la integridad de la misma. Este efecto local intestinal se traduce en una menor TB y endotoxemia y de forma secundaria una menor actividad inflamatoria sistémica.

En nuestro trabajo, el grupo de tratamiento con norfloxacino presentó una atenuación de la cascada inflamatoria sistémica (que se podría explicar por lo expuesto previamente), así como una optimización de la capacidad bactericida de los macrófagos, si bien no analizamos el ambiente inflamatorio local. En el estudio de otras patologías que afectan la mucosa intestinal, los defectos en la capacidad bactericida de los macrófagos son responsables de respuestas inflamatorias locales que pueden desencadenar un proceso inflamatorio crónico³¹⁻³³. Una limitación de nuestro estudio fue que al no haber estudiado el microambiente inflamatorio local no pudimos correlacionar la mejora del killing intracelular de los macrófagos objetivada con el cambio del espectro de citocinas local. Es posible que el tratamiento con norfloxacino promueva la restauración a un fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos del GALT, de forma directa mediante mecanismos de señalización intracelular y de forma indirecta mediante su acción bactericida y control de la inflamación local. Aunque hubiera sido deseable un grupo control de ratas sanas con norfloxacino para profundizar en los efectos meramente inmunomoduladores del norfloxacino no asociados a la TB, en estudios previos se ha observado que la administración de quinolonas en animales sanos, voluntarios sanos o la exposición celular in vitro no ejerce ningún efecto inmunomodulador apreciable y que este efecto se ha objetivado únicamente cuando algún tipo de estímulo o desencadenante ha sido aplicado a las células o a los animales experimentales^{105, 206}.

Los macrófagos del GALT constituyen una pieza clave en el control de la TB patológica asociada a la cirrosis, sin embargo, hasta la fecha los estudios que hayan analizado su funcionalismo son escasos. En este sentido, creemos que el presente trabajo aporta, por un lado, una metodología novedosa que permite el estudio del funcionalismo de células a priori difíciles de estudiar por su elevada plasticidad en función de los estímulos externos; y por otro lado, aporta información valiosa, sobre la alteración presente en estas células en la cirrosis. En nuestro trabajo se objetivó un aumento de la población de macrófagos en todos los compartimentos del GALT y en L.A, probablemente ligado al contexto inflamatorio propio de la cirrosis. Estos M Φ presentaron un déficit de fagocitosis secundario a un déficit en la capacidad opsonica del suero de ratas cirróticas, a pesar de que no hallamos alteraciones de su capacidad fagocítica intrínseca. Por otro lado, se objetivó una depresión de la capacidad bactericida de los M Φ del GALT y peritoneales asociada a la cirrosis, que se correlacionó de forma inversa con la activación inflamatoria sistémica. El norfloxacino demostró su efecto inmunomodulador sobre los macrófagos, mediante una restauración del killing intracelular, que probablemente sea secundario a su eficacia en el control de la TB y del microambiente inflamatorio local, así como un posible efecto directo intracelular.

Conclusiones

- La principal vía de infección del líquido ascítico en el modelo de rata cirrótica con ascitis por CCl_4 es la traslocación bacteriana de gérmenes entéricos.
- La endotoxemia es un marcador indirecto de traslocación bacteriana por bacterias gram negativas.
- El tratamiento con norfloxacino es capaz de disminuir la traslocación bacteriana a expensas de gérmenes gram negativos, en este modelo experimental.
- Las ratas cirróticas con ascitis presentan un aumento de los parámetros plasmáticos de inflamación analizados, que se correlacionan con la evidencia de traslocación bacteriana y con el desarrollo de peritonitis bacteriana espontánea.
- El norfloxacino es capaz de mejorar los parámetros de inflamación sistémica asociados a la cirrosis en este modelo experimental.
- La obtención de macrófagos de los distintos compartimentos del GALT en ratas mediante digestión enzimática con LiberasaTM y digestión mecánica con GentleMACs, proporciona un número de células con una viabilidad y una funcionalidad preservadas, que son adecuadas para posteriores estudios funcionales.
- Los macrófagos del GALT y peritoneales presentan una capacidad fagocítica diferente en función del compartimento analizado, siendo superior en líquido ascítico, seguido de ganglio linfático mesentérico, placa de Peyer y, finalmente, lámina propia.
- Los macrófagos del GALT y peritoneales no presentan diferencias de killing intracelular en función del compartimento analizado.
- Los macrófagos del GALT y peritoneales en este modelo de rata cirrótica con ascitis presentan una alteración global de su funcionalidad:
 - Sistémica, con una menor capacidad de opsonización del suero de rata cirrótica que condiciona una menor fagocitosis.
 - Intrínseca, con un menor killing intracelular en los macrófagos de las ratas cirróticas, a pesar de mantener su capacidad fagocítica intrínseca.
- El killing intracelular de los macrófagos del GALT y peritoneales se correlaciona de forma inversa con los niveles plasmáticos de endotoxina, NO, PCR, $\text{TNF}\alpha$ y $\text{IFN}\gamma$, y de forma directa con los niveles de C3.
- La administración de norfloxacino en ratas cirróticas con ascitis restaura la capacidad bactericida de los macrófagos de la mayoría de los compartimentos del sistema GALT y peritoneales.

Bibliografía

- 1 Vega Lopez M. Inmunobiología de las mucosas , un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo. *CINVESTAV*. 2007:55-60.
- 2 Brandtzaeg PER. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;964:13-45.
- 3 Vega-Lopez MA, Telemo E, Bailey M, Stevens K, Stokes CR. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol*. 1993;37(1):49-60. doi:10.1016/0165-2427(93)90015-V.
- 4 Montilla NA, Blas MP, Santalla ML, Villa JMM. Mucosal immune system: A brief review. *Immunología*. 2004;23:207-216.
- 5 Acheson DWK, Luccioli S. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(2):387-404. doi:10.1053/ybega.2004.449.
- 6 Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch a., Castell M. El intestino: Pieza clave del sistema inmunitario. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2008;100(1):29-34. doi:10.4321/S1130-01082008000100006.
- 7 Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-341. doi:10.1038/nri1057.
- 8 Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol*. 2003;74(4):479-485. doi:10.1189/jlb.0203082.
- 9 Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(3):422-433. doi:10.1002/hep.20632.

- 10 Kobozev I, Karlsson F, Grisham MB. Intestinal Inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1207(Suppl 1):86-93. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05711.x.Gut-associated.
- 11 Faria AMC, Gomes-Santos AC, Gonçalves JL, et al. Food components and the immune system: From tonic agents to allergens. *Front Immunol*. 2013;4(MAY):1-16. doi:10.3389/fimmu.2013.00102.
- 12 Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*. 2005;115(2):153-162. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02159.x.
- 13 Spahn TW, Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut*. 2004;53(3):456-465. doi:10.1136/gut.2003.023671.
- 14 MacPherson AJ, Uhr T. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1029:36-43. doi:10.1196/annals.1309.005.
- 15 Rescigno M, Lopatin U, Chieppa M. Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(6):669-675. doi:10.1016/j.coi.2008.09.007.
- 16 Worbs T, Bode U, Yan S, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med*. 2006;203(3):519-527. doi:10.1084/jem.20052016.
- 17 van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*. 1972;46(6):845-852.
- 18 Hume D a. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):49-53. doi:10.1016/j.coi.2005.11.008.
- 19 Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
- 20 Kühnel W. Atlas Color de Citología E Histología. Vol 11a edició. (*Panamericana EM, ed.*); 2005.
- 21 Ross M, Pawlina W. Histología: Texto Y Atlas Color Con Biología Celular Y Molecular. Vol 5a Edición. (*Buenos Aires EMP, ed.*); 2007.
- 22 Schenk M, Mueller C. Adaptations of intestinal macrophages to an antigen-rich environment. *Semin Immunol*. 2007;19(2):84-93. doi:10.1016/j.smim.2006.09.002.
- 23 Ma J, Chen T, Mandelin J, et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(11):2334-2346. doi:10.1007/s00018-003-3020-0.
- 24 Platt AM, Mowat AM. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett*. 2008;119(1-2):22-31. doi:10.1016/j.imlet.2008.05.009.
- 25 Smith LM, May RC. Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(2):4754-490. doi:10.1042/BST20130014.
- 26 Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:901-944. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816.
- 27 Sansonetti P. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. *Semin Immunol*. 2001;13(6):381-390. doi:10.1006/smim.2001.0335.
- 28 Ismail N, Olano JP, Feng HM, Walker DH. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;207(2):111-120. doi:10.1016/S0378-1097(01)00553-5.
- 29 Goldmann O, Rohde M, Chhatwal GS, Medina E. Role of Macrophages in Host Resistance to Group A Streptococci. *Infect Immun*. 2004;72(5):2956-2963. doi:10.1128/IAI.72.5.2956-2963.2004.
- 30 Kubica M, Guzik K, Koziel J, et al. A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: The silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2008;3(1). doi:10.1371/journal.pone.0001409.
- 31 Saini LS, Galsworthy SB, John M a, Valvano M a. Intracellular survival of Burkholderia cepacia complex isolates in the presence of macrophage cell activation. *Microbiology*. 1999;145 (Pt 1:3465-3475. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627044>.
- 32 Tawfik A, Flanagan PK, Campbell BJ. Escherichia coli-host macrophage interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):8751-8763. doi:10.3748/wjg.v20.i27.8751.
- 33 Caprilli R, Frieri G. The dyspeptic macrophage 30 years later: An update in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Liver Dis*. 2009;41(2):166-168. doi:10.1016/j.dld.2008.09.012.
- 34 Bain CC, Mowat AM. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev*. 2014;260(1):102-117. doi:10.1111/imr.12192.
- 35 Bain CC, Mowat AM. Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2494-2498. doi:10.1002/eji.201141714.
- 36 Mowat AM, Bain CC. Mucosal Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammation. *J Innate Immun*. 2011;3(6):550-564. doi:10.1159/000329099.
- 37 Pavli P, Maxwell L, Van de Pol E, Doe F. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1996;104(1):124-132.
- 38 Hume D a. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*. 2008;181(9):5829-5835. doi:10.4049/jimmunol.181.9.5829.
- 39 Berg RD, Owens WE. Inhibition of translocation of viable Escherichia coli from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism. *Infect Immun*. 1979;25(3):820-827.

- 40 Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(4):464-471. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.04933.x.
- 41 Tsujimoto H, Ono S, Mochizuki H. Role of translocation of pathogen-associated molecular patterns in sepsis. *Dig Surg*. 2009;26(2):100-109. doi:10.1159/000206143.
- 42 Van Leeuwen P a, Boermeester M a, Houdijk a P, et al. Clinical significance of translocation. *Gut*. 1994;35(1 Suppl):S28-S34. doi:10.1136/gut.35.1_Suppl.S28.
- 43 Gatt M, Reddy BS, MacFie J. Review article: Bacterial translocation in the critically ill - Evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25(7):741-757. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03174.x.
- 44 Pérez-Paramo M, Muñoz J, Albillos A, et al. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology*. 2000;31(1):43-48. doi:10.1002/hep.510310109.
- 45 Pardo A, Bartolí R, Lorenzo-Zuñiga V, et al. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology*. 2000;(31):858-863. doi:10.1053/he.2000.5746.
- 46 Çelik A, Keskinoglu A. Hemorrhagic Shock and Bacterial Translocation. *J Appl Res*. 2005;5(1).
- 47 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(5):1032-1038.
- 48 Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*. 2005;93 Suppl 1:S41-S48. doi:10.1079/BJN20041356.
- 49 Seo YS, Shah VH. The role of gut-liver axis in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension. *Clin Mol Hepatol*. 2012;18(4):337-346. doi:10.3350/cmh.2012.18.4.337.
- 50 Sansonetti P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*. 2002;50 Suppl 3:III2-I8. doi:10.1136/gut.50.suppl_3.iii2.
- 51 Neal MD, Leaphart C, Levy R, et al. Bacteria Across the Intestinal Barrier. *J Immunol*. 2012.
- 52 Wang L, Llorente C, Hartmann P, Yang A-M, Chen P, Schnabl B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods*. 2015;421:44-53. doi:10.1016/j.jim.2014.12.015.
- 53 Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14(1):189. doi:10.1186/s12876-014-0189-7.
- 54 Caserta L, De Magistris L, Secondulfo M, et al. Assessment of intestinal permeability and orocecal transit time in patients with systemic sclerosis: Analysis of relationships with epidemiologic and clinical parameters. *Rheumatol Int*. 2003;23(5):226-230. doi:10.1007/s00296-003-0286-3.
- 55 Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(4):415-425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.
- 56 González-Navajas J, Bellot P, Francés R, et al. Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin q. 2008;48:61-67. doi:10.1016/j.jhep.2007.08.012.
- 57 García De Lorenzo Y Mateos A, Acosta Escribano J, Rodríguez Montes J a. Importancia clínica de la translocación bacteriana. *Nutr Hosp*. 2007;22(SUPPL. 2):50-55.
- 58 Llovet JM, Bartolí R, March F, et al. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: Molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol*. 1998;28(2):307-313. doi:10.1016/0168-8278(88)80018-7.
- 59 Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;60(1):197-209. doi:10.1016/j.jhep.2013.07.044.
- 60 Cirera I, Bauer T, Navasa M, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2001;34(1):32-37. doi:10.1016/S0168-8278(00)00013-1.
- 61 Lin RS, Lee FY, Lee SD, et al. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol*. 1995;22(2):165-172. doi:10.1016/0168-8278(95)80424-2.
- 62 Such J, Francés R, Muoz C, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology*. 2002;36(1):135-141. doi:10.1053/jhep.2002.33715.
- 63 Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: Pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*. 2013;33(1):31-39. doi:10.1111/liv.12021.
- 64 Fukui H. Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia. *World J Hepatol*. 2015;7(3):425. doi:10.4254/wjh.v7.i3.425.
- 65 Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(9):727-738. doi:10.1016/j.cgh.2011.02.031.
- 66 Sipeki N, Antal-Szalmás P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2564-2577. doi:10.3748/wjg.v20.i10.2564.
- 67 Jalan R, Fernandez J, Wiest R, et al. Bacterial infections in cirrhosis: A position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol*. 2014;60(6):1310-1324. doi:10.1016/j.jhep.2014.01.024.
- 68 Nakamura I. Impairment of innate immune responses in cirrhotic patients and treatment by branched-chain amino acids. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7298-7305. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7298.
- 69 Lutz P. Spontaneous bacterial peritonitis: The clinical challenge of a leaky gut and a cirrhotic liver. *World J Hepatol*. 2015;7(3):304. doi:10.4254/wjh.v7.i3.304.

- 70 Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(46):7413-7420.
- 71 Steib CJ, Gerbes AL, Bystron M, et al. Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A2. *J Hepatol*. 2007;47(2):228-238. doi:10.1016/j.jhep.2007.03.019.
- 72 Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology*. 1984;4(4):53-58.
- 73 Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol*. 2011;55(3):574-581. doi:10.1016/j.jhep.2010.11.034.
- 74 Genescà J, Martí R, Rojo F, et al. Increased tumour necrosis factor alpha production in mesenteric lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut*. 2003;52(7):1054-1059.
- 75 Steib CJ, Hartmann AC, v Hesler C, et al. Intraperitoneal LPS amplifies portal hypertension in rat liver fibrosis. *Lab Invest*. 2010;90(7):1024-1032. doi:10.1038/labinvest.2010.60.
- 76 Di Martino V. New prognostic markers in liver cirrhosis. *World J Hepatol*. 2015;7(9):1244. doi:10.4254/wjh.v7.i9.1244.
- 77 Aldridge DR, Tranah EJ, Shawcross DL. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *J Clin Exp Hepatol*. 2014;5:S7-S20. doi:10.1016/j.jceh.2014.06.004.
- 78 Òdena G, Miquel M, Serafin A, et al. Rifaximin, but not growth factor 1, reduces brain edema in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol*. 2012;18(17):2084-2091. doi:10.3748/wjg.v18.i17.2084.
- 79 Miquel M, Bartolí R, Òdena G, et al. Rat CCl₄-induced cirrhosis plus total portal vein ligation: A new model for the study of hyperammonaemia and brain oedema. *Liver Int*. 2010;30(7):979-987. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02273.x.
- 80 Casado-Martin M, González-García J, Rodríguez-Manrique M, Lázaro-Sáez M, Amat-Alcaraz S. Infecciones bacterianas en los pacientes con cirrosis hepática. *Rev Andaluza Patol Dig*. 2010;33(5):340-345.
- 81 Bruns T, Zimmermann HW, Stallmach A. Risk factors and outcome of bacterial infections in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2542-2554. doi:10.3748/wjg.v20.i10.2542.
- 82 Cervoni J-P, Thévenot T, Weil D, et al. C-Reactive protein predicts short-term mortality in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2012;56(6):1299-1304. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.030.
- 83 Moreau R, Jalan R, Gines P, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013;144(7). doi:10.1053/j.gastro.2013.02.042.
- 84 Thulstrup AM, Sørensen HT, Schønheyder HC, Møller JK, Tage-Jensen U. Population-based study of the risk and short-term prognosis for bacteremia in patients with liver cirrhosis. *Clin Infect Dis*. 2000;31(6):1357-1361. doi:10.1086/317494.
- 85 Pere Gines, Paolo Angeli, Kurtz lenz, Soren Moller, Kevin Moore, Richard Moreau, Carlo Merkel GG-T. Clinical Practice Guidelines EASL clinical practice guidelines on the management of ascites , spontaneous bacterial peritonitis , and hepatorenal syndrome in cirrhosis Clinical Practice Guidelines. *J Hepatol*. 2010;53(May):397-417. doi:10.1016/j.jhep.2010.05.004.
- 86 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(5):1551-1561. doi:10.1002/hep.25532.
- 87 González Alonso R, González García M, Albillos Martínez A. Fisiopatología de la translocación y la peritonitis bacteriana espontánea en la cirrosis. *Gastroenterol Hepatol*. 2007;30(2):78-84. doi:10.1157/13099277.
- 88 Gustot T. New findings about an "old" drug: Immunomodulatory effects of norfloxacin in cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;61(4):725-726. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.028.
- 89 Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2000;31 Suppl 2:S24-S28. doi:10.1086/314056.
- 90 Nord CE. Effect of quinolones on the human intestinal microflora. *Drugs*. 1995;49 Suppl 2:81-85. doi:10.2165/00003495-199500492-00013.
- 91 Ginés P, Rimola A, Planas R, et al. Norfloxacin Prevents Spontaneous Bacterial Peritonitis Recurrence in Cirrhosis: Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Vol 12*. 1990. doi:10.1002/hep.1840120416.
- 92 Llovet JM, Bartoli R, Planas R, et al. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology*. 1996;23(4):781-787. doi:10.1053/jhep.1996.v23.pm0008666332.
- 93 Novella M, Solà R, Soriano G, et al. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology*. 1997;25(3):532-536. doi:10.1002/hep.510250306.
- 94 Grangie JD, Roulot D, Pelletier G, et al. Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: A double-blind randomized trial. *J Hepatol*. 1998;29(3):430-436. doi:10.1016/S0168-8278(98)80061-5.
- 95 Fernández J, Navasa M, Planas R, et al. Primary Prophylaxis of Spontaneous Bacterial Peritonitis Delays Hepatorenal Syndrome and Improves Survival in Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2007;133(3):818-824. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.065.
- 96 Rimola A, Bory F, Teres J, Perez-Ayuso RM, Arroyo V, Rodes J. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology*. 1985;5(3):463-467. doi:10.1002/hep.1840050320.
- 97 Soriano G, Guarner C, Tomás A, et al. *Norfloxacin Prevents Bacterial Infection in Cirrhotics with Gastrointestinal Hemorrhage. Vol 103*. 1992.

- 98 Tazi KA, Moreau R, Hervé P, et al. Norfloxacin reduces aortic NO synthases and proinflammatory cytokine up-regulation in cirrhotic rats: Role of Akt signaling. *Gastroenterology*. 2005;129(1):303-314. doi:10.1053/j.gastro.2005.04.016.
- 99 Hennenberg M, Trebicka J, Buecher D, Heller J, Sauerbruch T. Lack of effect of norfloxacin on hyperdynamic circulation in bile duct-ligated rats despite reduction of endothelial nitric oxide synthase function: Result of unchanged vascular Rho-kinase? *Liver Int*. 2009;29(6):933-941. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02010.x.
- 100 Rabiller A, Nunes H, Lebrec D, et al. Prevention of Gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(4):514-517. doi:10.1164/rccm.200201-027OC.
- 101 Albillos A, la Hera A de, González M, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology*. 2003;37(1):208-217. doi:10.1053/jhep.2003.50038.
- 102 Chin-Dusting JPF, Rasaratnam B, Jennings GLR, Dudley FJ. Effect of fluoroquinolone on the enhanced nitric oxide-induced peripheral vasodilation seen in cirrhosis. *Ann Intern Med*. 1997;127(11):985-988.
- 103 Rasaratnam B, Kaye D, Jennings G, Dudley F, Chin-Dusting JPF. The Effect of Selective Intestinal Decontamination on the Hyperdynamic Circulatory State in Cirrhosis: A Randomized Trial. *Ann Intern Med*. 2003;139(3).
- 104 Kemp W, Colman J, Thompson K, et al. Norfloxacin treatment for clinically significant portal hypertension: results of a randomised double-blind placebo-controlled crossover trial. *Liver Int*. 2009;29(3):427-433. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01850.x.
- 105 Dalhoff A, Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(6):359-371. doi:10.1016/S1473-3099(03)00658-3.
- 106 Zapater P, Caño R, Llanos L, et al. Norfloxacin Modulates the Inflammatory Response and Directly Affects Neutrophils in Patients With Decompensated Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2009;137(5). doi:10.1053/j.gastro.2009.07.058.
- 107 Testro AG, Gow PJ, Angus PW, et al. 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(2):199-205. doi:10.1016/j.jhep.2009.11.006.
- 108 Gómez-Hurtado I, Moratalla A, Moya-Pérez Á, et al. Role of interleukin 10 in norfloxacin prevention of luminal free endotoxin translocation in mice with cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2013.
- 109 Abraldes J-G, Pasarín M, García-Pagán J-C. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 2006;12(41):6577-6584.
- 110 Liu Y, Meyer C, Xu C, et al. Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(5):G449-G468. doi:10.1152/ajpgi.00199.2012.
- 111 Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*. 1982;83(6):1183-1190. doi:10.1159/000128407.
- 112 Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 1991;100(2):489-493.
- 113 Albillos A, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Experimental Models of Spontaneous Bacterial Peritonitis. In: LTD BP, ed. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. Vol 2nd Editio. Oxford, UK: *Blackwell Publishing Ltd*; 2005:409-421. doi:10.1002/9780470987476.ch33.
- 114 Llovet JM, Bartoli R, Planas R, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut*. 1994;35(11):1648-1652. doi:10.1136/gut.35.11.1648.
- 115 Albillos A, Pérez-Paramo M, Muñoz J. Prokinetics reduce bacterial translocation in cirrhosis: will sweeping the gut keep the fluid clean? *Gastroenterology*. 2001;(120):314-316.
- 116 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(5):792-796. doi:10.1016/S0168-8278(94)80241-6.
- 117 Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology*. 1995;21(6):1719-1724.
- 118 Garcia-Tsao G, Lee FAY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology*. 1995;108(6):1835-1841. doi:10.1016/0016-5085(95)90147-7.
- 119 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(6):1372-1378. doi:10.1016/S0168-8278(97)80474-6.
- 120 Casafont F, Sánchez E, Martín L, Agüero J, Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology*. 1997;25(6):1334-1337. doi:10.1002/hep.510250605.
- 121 Guarner C, González-Navajas JM, Sánchez E, et al. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl₄-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology*. 2006;44(3):633-639. doi:10.1002/hep.21286.
- 122 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(4):501-506. doi:10.1016/S0168-8278(02)00003-X.
- 123 Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest*. 1999;104(9):1223-1233. doi:10.1172/JCI7458.
- 124 Albillos A, De la Hera A. Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis and bacterial translocation: Working out the role of probiotics and antioxidants. *J Hepatol*. 2002;37(4):523-526. doi:10.1016/S0168-8278(02)00265-9.

- 125 Wiest R, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial Translocation Up-regulates GTP-Cyclohydrolase I in Mesenteric Vasculature of Cirrhotic Rats. *Hepatology*. 2003;38(6):1508-1515. doi:10.1016/j.hep.2003.09.039.
- 126 Chamulitrat W, Skrepnik N V, Spitzer JJ. Endotoxin-induced oxidative stress in the rat small intestine: role of nitric oxide. *Shock*. 1996;5(3):217-222.
- 127 Sánchez E, Casafont F, Guerra a, de Benito I, Pons-Romero F. Role of intestinal bacterial overgrowth and intestinal motility in bacterial translocation in experimental cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005;97(11):805-814. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16438624.
- 128 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(3):551-557. doi:10.1053/jhep.2003.50116.
- 129 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(10):1957-1962. doi:10.1023/A:1026649730012.
- 130 Sánchez E, Nieto JC, Boulosa A, et al. VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Liver Int*. 2015;35(3):735-745. doi:10.1111/liv.12566.
- 131 Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, et al. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology*. 1997;113(5):1682-1691. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352873.
- 132 Lorenzo-Zúñiga V, Rodríguez-Ortigosa CM, Bartolí R, et al. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut*. 2006;55(9):1306-1312. doi:10.1136/gut.2005.079988.
- 133 Francés R, Chiva M, Sánchez E, et al. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF- α monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol*. 2007;46(5):797-803. doi:10.1016/j.jhep.2006.11.018.
- 134 Hirt W, Nebe T, Birr C. Phagotest and Bursttest (Phagoburst), test kits for study of phagocyte functions. *Wien Klin Wochenschr*. 1994;106(8):250-252.
- 135 Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, et al. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2005;11(48):7661-7665.
- 136 Gutowska I, Bańkiewicz M, Machaliński B, Chlubek D, Stachowska E. Blood arachidonic acid and HDL cholesterol influence the phagocytic abilities of human monocytes/macrophages. *Ann Nutr Metab*. 2010;57(2):143-149. doi:10.1159/000321546.
- 137 Khedmat S, Hadjati J, Irvani A, Nourizadeh M. Effects of enamel matrix derivative on the viability, cytokine secretion, and phagocytic activity of human monocytes. *J Endod*. 2010;36(6):1000-1003. doi:10.1016/j.joen.2010.02.032.
- 138 Filias A, Theodorou GL, Mouzopoulou S, Varvarigou A a, Mantagos S, Karakantza M. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatr*. 2011;11(1):29. doi:10.1186/1471-2431-11-29.
- 139 Małaczewska J, Siwicki AK, Wójcik RM, Kaczorek E, Turski WA. Effect of oral administration of kynurenic acid on the activity of the peripheral blood leukocytes in mice. *Cent Eur J Immunol*. 2014;1(1):6-13. doi:10.5114/ceji.2014.42115.
- 140 Coopamah MD, Freedman J, Semple JW. Anti-D initially stimulates an Fc-dependent leukocyte oxidative burst and subsequently suppresses erythrophagocytosis via interleukin-1 receptor antagonist. *Blood*. 2003;102(8):2862-2867. doi:10.1182/blood-2003-04-1029.
- 141 Kampen AH, Tollersrud T, Larsen S, Roth JA, Frank DE, Lund A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;97(1-2):105-114. doi:10.1016/j.vetimm.2003.08.018.
- 142 Grzybowski J. New cytokine dressings. II. Stimulation of oxidative burst in leucocytes in vitro and reduction of viable bacteria within an infected wound. *Int J Pharm*. 1999;184(2):179-187. doi:10.1016/S0378-5173(99)00064-2.
- 143 Rimola a, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology*. 1984;4(1):53-58. doi:S0270913984000367 [pii].
- 144 Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, et al. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 1994;19(3):628-634.
- 145 Tanimoto A, Yuasa Y, Shinmoto H, et al. Superparamagnetic iron oxide-mediated hepatic signal intensity change in patients with and without cirrhosis: pulse sequence effects and Kupffer cell function. *Radiology*. 2002;222(3):661-666. doi:10.1148/radiol.2223010690.
- 146 Tonan T, Fujimoto K, Qayyum A, et al. CD14 expression and Kupffer cell dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis: superparamagnetic iron oxide-magnetic resonance image and pathologic correlation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(4):789-796. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.07057.x.
- 147 Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology*. 2015;62(1):279-291. doi:10.1002/hep.27793.
- 148 Cheong H, Lee SS, Lee JS, Kim J, Kim SW, Lee WJ. Phagocytic function of Kupffer cells in mouse nonalcoholic fatty liver disease models: Evaluation with superparamagnetic iron oxide. *J Magn Reson Imaging*. 2015;41(5):1218-1227. doi:10.1002/jmri.24674.
- 149 Arii S, Monden K, Itai S, et al. Depressed function of Kupffer cells in rats with CCl₄-induced liver cirrhosis. *Res Exp Med (Berl)*. 1990;190(3):173-182.
- 150 Noda T, Mimura H, Orita K. Assessment of Kupffer cell function in rats with chronic liver injury caused by CCl₄. *Hepatogastroenterology*. 1990;37(3):319-323.

- 151 Nakatani Y, Fukui H, Kitano H, et al. Endotoxin clearance and its relation to hepatic and renal disturbances in rats with liver cirrhosis. *Liver*. 2001;21(1):64-70.
- 152 Rabinovitz M, Gavaler JS, Kumar S, Kajani M, Van Thiel DH. Role of serum complement, immunoglobulins, and cell-mediated immune system in the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). *Dig Dis Sci*. 1989;34(10):1547-1552.
- 153 Fierer J, Finley F. Deficient Serum Bactericidal Activity Against Escherichia Coli in Patients with Cirrhosis of the Liver. *J Clin Invest*. 1979;63(5):912-921.
- 154 Homann C, Varming K, Hogasen K, et al. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. *Gut*. 1997;40(4):544-549.
- 155 Doi H, Iyer TK, Carpenter E, et al. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology*. 2012;55(3):709-719. doi:10.1002/hep.24689.
- 156 Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis*. 2000;182(2):526-533. doi:10.1086/315742.
- 157 Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol*. 2015;55(3):574-581. doi:10.1016/j.jhep.2010.11.034.
- 158 Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology*. 1986;6(2):252-262.
- 159 Runyon B a. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 1986;91:1343-1346.
- 160 Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients. *J Infect Dis*. 1983;147(6):1011-1017.
- 161 Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol*. 1988;6(1):80-84.
- 162 Mustafa G, Khan M, Alam K, et al. Study on ascitic fluid complement 3 level in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis and without spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(79):1905-1907.
- 163 Muñoz L, José Borrero M, Ubeda M, et al. Interaction between intestinal dendritic cells and bacteria translocated from the gut in rats with cirrhosis. *Hepatology*. 2012;56(5):1861-1869. doi:10.1002/hep.25854.
- 164 Inamura T, Miura S, Tsuzuki Y, et al. Alteration of intestinal intraepithelial lymphocytes and increased bacterial translocation in a murine model of cirrhosis. *Immunol Lett*. 2003;90(1):3-11.
- 165 Weber B, Saurer L, Mueller C. Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. *Semin Immunopathol*. 2009;31(2):171-184. doi:10.1007/s00281-009-0156-5.
- 166 Nieto JC, Sanchez E, Romero C, et al. Impaired innate immune response of leukocytes from ascitic fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis. *J Leukoc Biol*. August 2015. doi:10.1189/jlb.3AB0315-106R.
- 167 Ahmed AMM, Bomford A, Nouri-Aria KT, Davies T, Smith R, Williams R. Peritoneal macrophages from patients with cirrhotic ascites show impaired phagocytosis and vigorous respiratory burst. *Results Immunol*. 2011;1(1):53-59. doi:10.1016/j.rinim.2011.08.004.
- 168 Ahmed AM, Kadaru AG, Omer I, et al. Macrophages from patients with cirrhotic ascites showed function alteration of host defense receptor. *J Clin Exp Hepatol*. 2014;4(4):279-286. doi:10.1016/j.jceh.2014.08.003.
- 169 Medina E, Goldmann O. In vivo and ex vivo protocols for measuring the killing of extracellular pathogens by macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2011;Chapter 14(February):Unit 14.19.1-17. doi:10.1002/0471142735.im1419s92.
- 170 Bjerke K, Halstensen TS, Jahnsen F, Pulford K, Brandtzaeg P. Distribution of macrophages and granulocytes expressing L1 protein (calprotectin) in human Peyer's patches compared with normal ileal lamina propria and mesenteric lymph nodes. *Gut*. 1993;34(10):1357-1363. doi:10.1136/gut.34.10.1357.
- 171 Osterberg J, Ljungdahl M, Haglund U. Influence of cyclooxygenase inhibitors on gut immune cell distribution and apoptosis rate in experimental sepsis. *Shock*. 2006;25(2):147-154. doi:10.1097/01.shk.0000189843.78729.e2\r00024382-200602000-00008 [pii].
- 172 Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CEI, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol*. 2013;58(6):1125-1132. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.038.
- 173 Úbeda M, Muñoz L, Borrero M-J, et al. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis. *Hepatology*. 2010;52(6):2086-2095. doi:10.1002/hep.23961.
- 174 Zhang S-C, Wang W, Ren W-Y, He B-M, Zhou K, Zhu W-N. Effect of cisapride on intestinal bacterial and endotoxin translocation in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2003;9(3):534-538.
- 175 Sztrymf B, Libert J-M, Mougeot C, et al. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20(10):1538-1544. doi:10.1111/j.1440-1746.2005.03914.x.
- 176 Sugano S. Endotoxin levels in cirrhotic rats with sterile and infected ascites. *Gastroenterol Jpn*. 1992;27(3):348-353.
- 177 Francés R, González-Navajas JM, Zapater P, et al. Bacterial DNA induces the complement system activation in serum and ascitic fluid from patients with advanced cirrhosis. *J Clin Immunol*. 2007;27(4):438-444. doi:10.1007/s10875-007-9090-2.
- 178 Paulnock D. Macrophages. Practical Approach. Vol Oxford Uni. (Paulnock D, ed.). Oxford; New York: *Oxford University Press*, 2000.; 2000.
- 179 Chiang C-S, Chen F-H, Hong J-H, et al. Functional phenotype of macrophages depends on assay procedures. *Int Immunol*. 2008;20(2):215-222. doi:10.1093/intimm/dxm137.

- 180 Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, Neurath MF. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat Protoc.* 2007;2(10):2307-2311. doi:10.1038/nprot.2007.315.
- 181 Geem D, Medina-Contreras O, Kim W, Huang CS, Denning TL. Isolation and Characterization of Dendritic Cells and Macrophages from the Mouse Intestine. *J Vis Exp.* 2012;(63):2-7. doi:10.3791/4040.
- 182 Dras B. Differential effects of anti-rat CD11b monoclonal antibodies on granulocyte adhesiveness. 1999.
- 183 Liu LM, MacPherson GG. Rat intestinal dendritic cells: immunostimulatory potency and phenotypic characterization. *Immunology.* 1995;85(1):88-93. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7635526.
- 184 Rydström A, Wick M. Monocyte Recruitment, Activation, and Function in the Gut-Associated Lymphoid Tissue during Oral Salmonella Infection. *J Immunol.* 2007;178(29):5789-5801.
- 185 Carrasco A, Mañe J, Santaolalla R, et al. Comparison of lymphocyte isolation methods for endoscopic biopsy specimens from the colonic mucosa. *J Immunol Methods.* 2013;389(1-2):29-37. doi:10.1016/j.jim.2012.12.006.
- 186 Denning TL, Wang Y, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol.* 2007;8(10):1086-1094. doi:10.1038/ni1511.
- 187 Bargallo A, Abad L, Odena G, Planas R, Bartoli R. New method for isolation of rat lamina propria macrophages in colonic tissue. *J Immunol Methods.* 2014;408:132-136. doi:10.1016/j.jim.2014.05.002.
- 188 Haverson K, Riffault S. Antigen presenting cells in mucosal sites of veterinary species. *Vet Res.* 37(3):339-358. doi:10.1051/vetres:2006005.
- 189 Smythies LE, Sellers M, Clements RH, et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest.* 2005;115(1):66-75. doi:10.1172/JCI200519229.
- 190 Mahida YR, Patel S, Gionchetti P, Vaux D, Jewell DP. Macrophage subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. *Gut.* 1989;30(6):826-834. doi:10.1136/gut.30.6.826.
- 191 Lee SH, Starkey PM, Gordon S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med.* 1985;161(3):475-489. doi:10.1084/jem.161.3.475.
- 192 Holdstock G, Leslie B, Hill S, Tanner A, Wright R. Monocyte function in cirrhosis. *J Clin Pathol.* 1982;35(9):972-979. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=497847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- 193 Hassner a, Kletter Y, Shlag D, Yedvab M, Aronson M, Shibolet S. Impaired monocyte function in liver cirrhosis. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981;282(6272):1262-1263. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1505383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- 194 Mayanski DN, Schwartz YSH, Kutina SN. Mononuclear phagocyte system responsiveness in CCl₄-induced liver cirrhosis. 1993:229-236.
- 195 Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology.* 2007;46(3):831-840. doi:10.1002/hep.21737.
- 196 O'Brien AJ, Fullerton JN, Massey KA, et al. Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. *Nat Med.* 2014;20(5):518-523. doi:10.1038/nm.3516.
- 197 Ezekowitz RA, Austyn J, Stahl PD, Gordon S. Surface properties of bacillus Calmette-Guérin-activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose-specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia. *J Exp Med.* 1981;154(1):60-76. doi:10.1084/jem.154.1.60.
- 198 Albillos A, Hera Ad AD La, Reyes E, 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(4):624-631. doi:10.1016/j.jhep.2003.12.010.
- 199 Muñoz L, Albillos A, Nieto M, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-α production: First steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology.* 2005;42(2):411-419. doi:10.1002/hep.20799.
- 200 Tsiakalos A, Karatzaferis A, Ziakas P, Hatzis G. Acute-phase proteins as indicators of bacterial infection in patients with cirrhosis. *Liver Int.* 2009;29(10):1538-1542. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02088.x.
- 201 Runyon B a. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 1988;8(3):632-635.
- 202 Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, et al. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology.* 1993;104:1133-1138. doi:S0016508593001271 [pii].
- 203 Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Serum bactericidal and opsonic activities in patients with non-alcoholic cirrhosis. *Q J Med.* 1985;56(220):431-437.
- 204 Sese E, Xiol X, Castellote J, Rodriguez-Farinas E, Tremosa G. Low complement levels and opsonic activity in hepatic hydrothorax: its relationship with spontaneous bacterial empyema. *J Clin Gastroenterol.* 2003;36(1):75-77.
- 205 Propst-Graham KL, Preheim LC, Vander Top E a, Snitily MU, Gentry-Nielsen MJ. Cirrhosis-induced defects in innate pulmonary defenses against *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiol.* 2007;7:94. doi:10.1186/1471-2180-7-94.
- 206 Azuma Y, Shinohara M, Murakawa N, Endo M, Ohura K. Possible interaction between new quinolones and immune functions in macrophages. *Gen Pharmacol.* 1999;32(5):609-614. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10382865>.

