

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL
(FOR EVALUATION OF THE ACT DOCTORAL THESIS)

Año académico (academic year): 2016/17

DOCTORANDO (candidate PHD): **BORRERO CORTE, M. JOSÉ**
D.N.I./PASAPORTE (Id.Passport): ******732W**
PROGRAMA DE DOCTORADO (Academic Committee of the Programme): **D420 CIENCIAS DE LA SALUD**
DEPARTAMENTO DE (Department): **MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN (Phd title): **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 26/09/17, reunido el tribunal de evaluación, constituido por los miembros que suscriben el presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral con **Mención Internacional** (In today assessment met the court, consisting of the members who signed this Act, the candidate defended his doctoral thesis with mention as International Doctorate), elaborada bajo la dirección de (prepared under the direction of) AGUSTÍN ALBILLOS MARTÍNEZ // M. LETICIA MUÑOZ ZAMARRÓN.

Sobre el siguiente tema (Title of the doctoral thesis): **RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE A LA INDUCCIÓN DE PERITONITIS BACTERIANA EN RATAS CON CIRROSIS BILIAR**

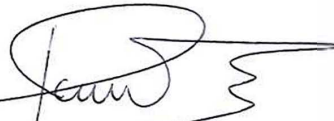
Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (**no apto, aprobado, notable y sobresaliente**) (After the defense and defense of the thesis, the court agreed to grant the GLOBAL RATING (fail, pass, good and excellent): **SOBRESALIENTE**

Alcalá de Henares, a 26 de IX de 2017



M. MUÑOZ ZAMARRÓN

Fdo. (Signed):



Rafael Benítez

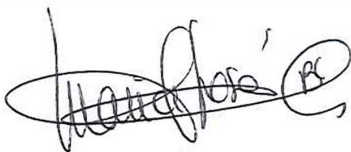
Fdo. (Signed):



MARGARET LARRIO

Fdo. (Signed):

FIRMA DEL ALUMNO (candidate's signature),

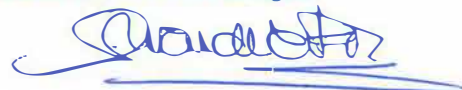


Fdo. (Signed): María José Borrero

Con fecha 4 de octubre de 2017, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad. (The grade may be "fail" "pass" "good" or "excellent". The panel may confer the distinction of "cum laude" if the overall grade is "Excellent" and has been awarded unanimously as such after secret voting.).

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:
(Incidents

/

Comments)

Por ausencia excusada del secretario titular, Dr. D. José Luis Calveta,
asiste la secretaria suplente, Dra. D^a Margaret Lario Martínez



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 4 de octubre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *BORRERO CORTE, M. JOSÉ*, el día 26 de septiembre de 2017, titulada *RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE A LA INDUCCIÓN DE PERITONITIS BACTERIANA EN RATAS CON CIRROSIS BILIAR*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 10 de octubre de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: BORRERO CORTE, M. JOSÉ

Secretario del Tribunal: JOSÉ LUIS CALLEJA PANERO.

Directores de Tesis: AGUSTÍN ALBILLOS MARTÍNEZ // M. LETICIA MUÑOZ ZAMARRÓN



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Departamento de Medicina



Programa de Doctorado en Medicina Clínica

**RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE
A LA INDUCCIÓN DE PERITONITIS BACTERIANA
EN RATAS CON CIRROSIS BILIAR**

TESIS DOCTORAL

MARÍA JOSÉ BORRERO CORTE
Alcalá de Henares, 2017

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Departamento de Medicina



Programa de Doctorado en Medicina Clínica

**RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE
A LA INDUCCIÓN DE PERITONITIS BACTERIANA
EN RATAS CON CIRROSIS BILIAR**

TESIS DOCTORAL

María José Borrero Corte

DIRECTORES DE TESIS

Agustín Albillos Martínez

Catedrático de Medicina,
Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá,
CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD),
Instituto de Salud Carlos III.

Leticia Muñoz Zamarrón

Investigadora Científica,
Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá,
CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD),
Instituto de Salud Carlos III.



**Melchor Álvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina y Director del
Departamento de Medicina y Especialidades Médicas**

INFORMA QUE:

El trabajo de investigación presentado por D^a. **M^a José Borrero Corte**, realizado bajo nuestra dirección, y titulado **“Respuesta del sistema inmune a la inducción de peritonitis bacteriana en ratas con cirrosis biliar”**, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde corresponda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a veinte de abril de dos mil diecisiete.





Agustín Albillos Martínez, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina y Especialidades Médicas de la Universidad de Alcalá y Leticia Muñoz Zamarrón, Investigadora del CIBERehd del Instituto de Salud Carlos III

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por D^a. **M^a José Borrero Corte**, realizado bajo nuestra dirección, y titulado **“Respuesta del sistema inmune a la inducción de peritonitis bacteriana en ratas con cirrosis biliar”**, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde corresponda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a veinte de abril de dos mil diecisiete.

Handwritten initials and marks.

Handwritten signature in blue ink.



AGRADECIMIENTOS

Y por fin llegó el momento que tanto esperaba. Todos estos años de trabajo plasmados en una Tesis Doctoral, mi ansiada Tesis Doctoral.

Tengo tanto que agradecer a tantas personas que se han cruzado conmigo en todos estos años que tengo miedo de olvidarme de alguien, si es así, lo siento.

En primer lugar me gustaría agradecer a la persona que me permitió descubrir este fantástico mundo de la investigación, el Doctor Agustín Albillos, dándome toda su confianza, apoyo, conocimientos y sobre todo su paciencia. Eternamente agradecida por hacerme conocedora de lo bonita y a la par difícil que es la investigación.

Al Doctor Melchor Álvarez de Mon, por permitirme utilizar todos los medios necesarios para la realización de este estudio.

A mis compañeros/amigos del laboratorio, por apoyarme en los buenos y malos momentos, por darme los consejos que tanto me han servido a lo largo de estos 9 años, comenzando por el "Agus team":

María, mi gran amiga, uno de mis mayores apoyos tanto profesional como personalmente, has sido y sigues siendo una de las personas a las que más echo de menos dentro de esas cuatro paredes, he de reconocer que al principio me asustaste con tu gran genio, pero conseguiste en poco tiempo ser una de mis mejores amigas.

Leticia, mi co-directora pero sobre todo mi otra gran amiga. No te puedes hacer una idea de todo lo que agradezco tus palabras, apoyo, ánimo, risas, lloros... Eres una gran persona con un gran corazón y espero que no cambies nunca.

Margaret, el lado humano y la última integrante del "Agus team", la calma personificada. Gracias por esas conversaciones y esas risas que hemos pasado juntas. Espero que estés bien en tu nuevo nido porque te lo mereces.

Terminados los agradecimientos a mi equipo más cercano, continúo con el resto de personas que me han acompañado de la mano:

Ana Mallo, tú mi Sara Aurelia y yo tu Marta Juana. Mil gracias por ser como eres, por todos los consejos y las riñas que me dabas. No sabes lo que te echo de menos.

David, otro gran amigo, agradecerte todas esas lecciones de ciencia y de vida que me has dado en las infinitas conversaciones que hemos tenido y que espero poder seguir teniendo contigo.

Miguel, mi amigo Mi, gracias por sacarme siempre una sonrisa, incluso en los momentos en los que me apetecía más llorar. Esos “chistes malos” han ayudado mucho. Espero que no tengas que arrastrar más esas cadenas que tanto te han pesado. No cambies.

Hugo, otra gran persona que por la desgracia de la investigación, está compartiendo sus conocimientos científicos en el extranjero. Gracias por hacerme reír tantas y tantas veces.

Esther, gracias por todas esas conversaciones en la cafetería y por tus consejos.

Pepe, gracias por todo tu apoyo, también quiero agradecerlo a tu mujer Cristina, ambos formáis la pareja perfecta. Sois encantadores y espero poder seguir disfrutando de vuestra compañía.

Lucho, en mi misma situación. Espero poder celebrar contigo que ambos seamos doctores por fin. Ánimo.

Juan, ese gran secretario que tanto me ha ayudado en mi estancia en el laboratorio, ¡por fin acabé la tesis!. Mil gracias.

Ismael, mi bro. Gracias por tratarme como una más, aunque las diferencias entre los laboratorios fueran tan grandes.

Al resto de integrantes del laboratorio con los que en algún momento me crucé, Carol, Zaida, Ana, Alfredo, Jorge... y como mención especial, Eduardo, mil gracias por todo lo que me ayudaste, siempre te recordaré.

También me gustaría agradecer a las secretarias del departamento por su gran ayuda a lo largo de estos años.

A José María Orellana, veterinario del centro de experimentación, porque sin su ayuda no se podría haber llevado a cabo este estudio. También agradecer a Mariano y Ángel, personal del centro, su apoyo en el tratamiento de los animales y conmigo.

A la Doctora Lourdes Lledó, del departamento de microbiología, porque sin su gran labor este estudio no habría podido ser finalizado.

Y fuera del terreno profesional, comienzo con los agradecimientos dentro del terreno personal:

A mis padres, Fina y Miguel, por su apoyo infinito en todas las etapas de mi vida, a mis hermanos Sebas, Soraya y Cinta, por estar siempre ahí y ser mis mejores amigos (mi otro gran equipo). A mis cuñados Jaione, Miguel y Diego y a mi querido sobrino Mikel. Todos juntos somos una gran familia, mi gran familia. Os quiero.

A mi mejor amiga Pilar, tengo tanto que agradecerte que no se ni cómo hacerlo. Hemos pasado muchos buenos momentos y por desgracia también algunos malos. Eres una gran luchadora, gracias por estar ahí siempre, yo también lo estaré para ti.

A Gustavo, mi alma gemela, mi amigo, mi compañero de piso, de odiseas y de fatigas, simplemente gracias.

A mi Marguis, otra de mis mejores amigas, no cambies nunca. Gracias por todos estos años a mi lado, aunque ya no estemos tan cerca.

A Idoia y Ricki, las personas que más me ayudaron a comenzar esta nueva etapa. Gracias.

Y por supuesto a la persona que me ha aguantado durante casi 20 años, mi compañero, amigo y mejor persona que he conocido nunca, Juanfran. Gracias por tu apoyo, por tu comprensión, por tu ayuda, por hacer todo lo posible para que pudiera terminar este trabajo pero sobre todo por darme a la persona que más quiero en este mundo, nuestra hija Julia. Nunca te lo agradeceré lo suficiente. Te quiero.

Por último, gracias a ti, Julia, mi pequeña Julia. Aún no eres consciente de lo que me has ayudado para la finalización de esta Tesis pero algún día te lo explicaré. Muchas gracias por venir a este mundo a alegrarme la vida con esa sonrisa. Tú eres quien ha hecho posible que aunque la vida estuviese siendo algo dura, me levantara cada día con una sonrisa y con ganas de comerme el mundo. Te quiero.

A todos vosotros, de corazón, gracias.

*Con todo mi cariño, a mis padres,
mis hermanos, Juanfran y Julia.*



*Monumento al animal de laboratorio,
por Alexey Agrikolyansky.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

1. Cirrosis hepática definición y complicaciones.
 - 1.1. Definición y estadíos de la cirrosis.
 - 1.2. Complicaciones de la cirrosis.
 - 1.2.1. Insuficiencia hepática.
 - 1.2.2. Hipertensión portal.
 - 1.2.3. Peritonitis bacteriana espontánea e infecciones bacterianas.
2. Heterogeneidad del sistema inmune.
 - 2.1. Componentes celulares del sistema inmune.
 - 2.2. Componentes moleculares del sistema inmune.
 - 2.3. Funcionamiento del sistema inmune: integración de la inmunidad innata y adquirida.
3. El hígado como órgano inmune.
4. Disfunción inmunológica asociada a la cirrosis.
 - 4.1. Estado de inmunodeficiencia.
 - 4.1.1. Sistema retículo endotelial.
 - 4.1.2. Sistema del complemento.
 - 4.1.3. Receptores de reconocimiento patrón.
 - 4.1.4. Alteraciones celulares.
 - 4.2. Activación del sistema inmune inflamatorio.
5. Sistema inmune en las infecciones bacterianas en la cirrosis hepática.
 - 5.1. Uso de medicamentos en las infecciones bacterianas en la cirrosis.
6. Justificación del modelo experimental.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelos experimentales.
 - 1.1. Cirrosis por ligadura y sección del conducto biliar.
 - 1.2. Peritonitis bacteriana inducida por inyección intraperitoneal de *Escherichia coli*.
 - 1.2.1. Transfección de *Escherichia coli* con el plásmido resistente a ampicilina.

- 1.2.2. Inducción de peritonitis bacteriana.
2. Diseño del estudio.
3. Estudio microbiológico.
4. Estudio del sistema inmune de líquido peritoneal/ascítico y sangre.
 - 4.1. Expresión de antígenos de superficie.
 - 4.2. Expresión de marcadores intracelulares.
 - 4.3. Determinación de mediadores inflamatorios solubles en líquido peritoneal/ascítico y plasma.
5. Análisis estadístico.

RESULTADOS

1. Traslocación y/o diseminación bacteriana tisular.
 - 1.1. Ratas control y cirróticas.
 - 1.2. Ratas control y cirróticas tras la inducción de peritonitis bacteriana.
2. Estudio inmunológico de líquido peritoneal/ascítico y sangre.
 - 2.1. Distribución de poblaciones y subpoblaciones del sistema inmune.
 - 2.1.1. Ratas control y cirróticas.
 - 2.1.2. Ratas control tras la inducción de peritonitis bacteriana.
 - 2.1.3. Ratas cirróticas tras la inducción de peritonitis bacteriana.
 - 2.2. Expresión de citoquinas intracelulares y solubles en líquido peritoneal/ascítico y sangre.
 - 2.2.1. Ratas control y cirróticas.
 - 2.2.2. Ratas control tras la inducción de peritonitis bacteriana.
 - 2.2.3. Ratas cirróticas tras la inducción de peritonitis bacteriana.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APC: Aloficocianina

APCs: Células presentadoras de antígenos

BBNSs: Betabloqueantes no selectivos

BCR: Receptor de células B

BDL: Ligadura y sección del conducto biliar

C3: Componente 3 del sistema del complemento

C4: Componente 4 del sistema del complemento

C5b-9: Complejo de ataque a membrana del sistema del complemento

CD: *Cluster* de diferenciación

cfu: Unidades formadoras de colonias

CO₂: Dióxido de carbono

CpG: Secuencias específicas de ADN que contienen dinucleótidos citosina-guanina no metilados

DCs: Células dendríticas

DMEM: Medio modificado de Eagle Dulbecco's

DS: Desviación estándar

E.coli: *Escherichia coli*

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente conjugado a enzimas

FCS: Suero fetal de carnero

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GALT: Tejido linfoide asociado al intestino

GLM: Ganglio linfático mesentérico

HBSS: Solución salina equilibrada de Hank

IBPs: Inhibidores de la bomba de protones

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

LA: Líquido ascítico

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

LB/amp: Medio de cultivo Luria Bertani suplementado con ampicilina

LBP: Proteína de unión al lipopolisacárido

LPS: Lipopolisacárido

LTA: Ácido lipoteicoico

MALT: Tejido linfoide asociado a las mucosas

MC: Memoria central

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1

MENT: Memoria efectora no terminada

MET: Memoria efectora terminada

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NK: Natural killer

NS: No significativo

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBE: Peritonitis bacteriana espontánea

PBI: Peritonitis bacteriana inducida

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Tampón fosfato salino

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína peridín clorofila

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

PMN: Polimorfonucleares

PRR: Receptor de reconocimiento patrón

rpm: Revoluciones por minuto

SC: Sistema del complemento

SBI: Sobrecrecimiento bacteriano intestinal

SRE: Sistema retículo endotelial

SSE: Suero salino estéril

sTNFR: Receptor soluble del factor de necrosis tumoral

TB: Traslocación bacteriana

Tc: Células T citotóxicas (CD8⁺)

TCR: Receptor específico de células T

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta

Th: Células T cooperadoras (CD4⁺)

TLR: Receptores de tipo *Toll*

TNF: Factor de necrosis tumoral

Treg: Células T reguladoras

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

SUMMARY

Background: Bacterial infections are important causes of liver damage progression, development of complications and morbidity and mortality in cirrhosis. Its frequency is related to the immune system dysfunction, the alterations in the intestinal barrier function and the liver failure. Several studies indicate a higher prevalence of bacterial infections in cirrhosis caused mainly by an immune dysfunction.

The **aim** of this study was to investigate whether there is in fact a malfunction of the immune system in rats with bile duct ligation (BDL)-induced cirrhosis that facilitates the development of bacterial infections.

Material and methods: We studied bacterial translocation (BT) and dissemination, and the phenotype and activation status of the immune systems cells at the systemic circulation and the peritoneal cavity, in rats with BDL-induced cirrhosis (n=11), BDL-induced cirrhosis and induced bacterial peritonitis (IBP) (n=9), sham-operated rats (n=17) and sham-operated with IBP rats (n=12). Six weeks after inducing cirrhosis by BDL, bacterial peritonitis was induced to rats by intraperitoneal injection of *E.coli*-ampicilin⁺. Two hours later, rats were sacrificed and we examined BT, dissemination and phenotype and activation status of immune cell subpopulations.

Results: Experimental cirrhosis is associated with an increased BT rate and higher bacterial dissemination, before and after inducing bacterial peritonitis, when comparing with sham-operated rats. Cirrhotic rats show a systemic proinflammatory state with increased serum levels of TNF α and IFN γ . Ascitic fluid of cirrhotic rats show increased numbers of activated T and B lymphocytes, but a significant retraction of monocytes. TNF α and IFN γ levels in the ascitic fluid of cirrhotic rats are also increased when comparing to those in the peritoneal cavity of controls. IBP causes the systemic retraction of all the immune system populations, but increased serum levels of pro-inflammatory cytokines. Higher levels of TNF α secreted by Th lymphocytes, but not by monocytes, are detected in the ascitic fluid of cirrhotic rats after IBP.

Conclusion: In experimental cirrhosis, TB and dissemination of bacteria, both before and after induced bacterial peritonitis, are increased when comparing with sham-operated rats. This is due to the persistent bacterial stimulus, provoking activation of the immune cells, with an increased production of proinflammatory cytokines, and finally peritoneal and systemic inflammation, which, however is related to a dysfunction in the subpopulation of monocytes. This translates into an altered response of the immune system to the infection.

INTRODUCCIÓN

1. CIRROSIS HEPÁTICA: DEFINICIÓN Y COMPLICACIONES

1.1 Definición y estadios de la cirrosis

La cirrosis hepática es el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas. Es una alteración histopatológica difusa del hígado caracterizada por pérdida del parénquima hepático, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración estructuralmente anormales, dando lugar a una distorsión de la arquitectura hepática normal y a una alteración de la anatomía, de la vascularización hepática y de la microcirculación (**Anthony et al., 1978**). No obstante, la cirrosis es una entidad clínica definida por un espectro de manifestaciones clínicas características (**Kasper et al., 2004; Ginés et al., 2009**).

El proceso pasa por diferentes etapas histológicas que se han clasificado de diferentes maneras, pero la clasificación más empleada en la actualidad es la METAVIR, que clasifica la fibrosis en 4 etapas, que van desde la F0, que representa la falta de fibrosis; F1, fibrosis portal; F2, fibrosis periportal; F3 con puentes de fibrosis; hasta la F4, con nódulos de regeneración. En este contexto, una vez que se alcanza la última etapa, la cirrosis queda establecida y el proceso se considera finalizado desde el punto de vista patológico (**Bataller et al., 2005; García-Tsao et al., 2010**).

Desde el punto de vista clínico, la cirrosis se distingue entre compensada y descompensada, dos etapas con diferentes características, pronóstico y esperanza de vida (**D'Amico et al., 2006**). La cirrosis compensada es una fase asintomática, de duración variable en la que los pacientes pueden llegar a tener hipertensión portal y varices gastroesofágicas (**Benvegnù et al 2004; D'Amico et al., 2006**). A medida que la enfermedad progresa con el desarrollo de mayor hipertensión portal y mayor deterioro de la función hepática aparecen las complicaciones de la cirrosis descompensada como ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática o ictericia (**D'Amico et al., 2006**). La ascitis es la complicación que marca el inicio de la fase de cirrosis descompensada en la mayoría de los casos; por lo tanto, se considera el signo clave de esta etapa de la cirrosis (**D'Amico et al., 2006; Runyon et al., 2009**).

A medida que la lesión progresa, se distorsiona cada vez más la arquitectura hepática, se produce la disfunción hepatocitaria y el incremento en la resistencia al flujo sanguíneo, lo que provocan la insuficiencia metabólica hepática y la hipertensión portal, respectivamente (**Popper et al., 1977; Rappaport et al., 1983; Bataller et al., 2005**). Las complicaciones clínicas derivadas de la hipertensión portal (ascitis, hemorragia por

varices, encefalopatía hepática) o la insuficiencia hepática (ictericia) son las que definen la cirrosis descompensada y predicen habitualmente una importante disminución de la supervivencia, y un mal pronóstico a corto plazo (**García-Tsao et al., 2010**).

1.2 Complicaciones de la cirrosis

1.2.1 Insuficiencia hepática

La insuficiencia hepática se produce como consecuencia de la necrosis de las células hepáticas y se define como la incapacidad del hígado para llevar a cabo su función sintética y metabólica (**Terés et al., 2009**).

Fisiopatológicamente se caracteriza por alteraciones en el almacenamiento de glucógeno que producen hipoglucemia, alteraciones en el metabolismo de las grasas como hipocolesterolemia, acidosis metabólica, trastornos en la síntesis de factores de coagulación que aumentan la tendencia al sangrado, hipoalbuminemia que conlleva alteraciones en la presión osmótica, alteraciones en la capacidad para sintetizar y secretar la bilis que provocan ictericia y alteraciones de la función fagocítica de las células de Kupffer que derivan en complicaciones infecciosas generalmente por bacterias Gram-negativas de origen intestinal. Por último, al fallar la función detoxificadora hepática, también se producen alteraciones en la función cerebral (encefalopatía hepática) (**Terés et al., 2009**).

1.2.2 Hipertensión portal

La hipertensión portal es la primera y más importante consecuencia de la cirrosis y está detrás de la mayoría de las complicaciones clínicas de la enfermedad. Se define como el incremento de la presión hidrostática en el interior del sistema venoso portal. Este incremento determina que el gradiente de presión entre la vena porta y la vena cava se eleve por encima del rango normal. El aumento sostenido de la presión portal ocasiona el desarrollo de circulación colateral, que deriva una parte del flujo sanguíneo portal a la circulación sistémica, sin pasar por el hígado (cortocircuito o *shunt* portosistémico), y que incluye las varices esofágicas (**Bosch, 2009**).

La trascendencia de este síndrome, muy frecuente en el curso de las enfermedades crónicas del hígado, está determinada por sus graves consecuencias, pero las manifestaciones clínicas dependen, en parte, del nivel del territorio portal en el que se localice la lesión y van desde la aparición de varices esofágicas,

esplenomegalia y/o hiperesplenismo y ascitis [con o sin peritonitis bacteriana espontánea (PBE)], hasta la pérdida de la función neurológica por encefalopatía hepática (**Bosch, 2009**).

Cuando existe hipertensión portal, una proporción sustancial del flujo portal no llega al hígado, puesto que es derivado a la circulación sistémica a través de una extensa red de colaterales. El aumento de la presión portal promueve la formación de esta circulación colateral portosistémica, y aparece un importante incremento del flujo sanguíneo, que contribuye a agravar la hipertensión portal impidiendo que la presión de la vena porta disminuya a pesar de la formación de colaterales. La elevación del flujo sanguíneo portal se debe a una vasodilatación esplácnica, ocasionada por la activación de factores endógenos, como el óxido nítrico, prostaciclina y glucagón entre otros. Así mismo, la excesiva producción de vasodilatadores determina una reducción de la sensibilidad vascular a vasoconstrictores endógenos, lo que explica que con frecuencia exista una marcada vasodilatación a pesar de la activación de los sistemas vasoconstrictores (**Bosch, 2009**).

El factor inicial que provoca la aparición de hipertensión portal en cirrosis es un aumento de la resistencia vascular. Pero esta no es una consecuencia fija e irreversible, sino que tiene un componente dinámico, susceptible de ser modificado por sustancias endógenas y fármacos vasoactivos. Un aumento del tono adrenérgico y una producción insuficiente de óxido nítrico en la microcirculación hepática pueden aumentar considerablemente la resistencia vascular hepática en la cirrosis. La resistencia vascular porto-colateral también es sensible a estímulos vasoactivos. Este concepto constituye la base para el uso de vasodilatadores en el tratamiento de la hipertensión portal (**Bosch, 2009**).

1.2.3 Peritonitis bacteriana espontánea e infecciones bacterianas

Las infecciones más frecuentes en los pacientes cirróticos son la PBE, la bacteriemia y las infecciones del tracto urinario, de las cuales el 80% están causadas por bacilos Gram-negativos, principalmente *Escherichia coli* (*E. coli*). Este hecho sugiere que la mayoría de las infecciones en la cirrosis son de origen entérico (**Albillos et al., 1990; Albillos et al., 2001; Bellot et al., 2008**). La hipótesis más aceptada para explicar la patogenia de la mayoría de las infecciones bacterianas en los pacientes cirróticos, especialmente la bacteriemia y la PBE, es el paso de bacterias viables desde la luz intestinal hacia los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y de allí hacia

la circulación sanguínea y hacia otros órganos extraintestinales. Este fenómeno así descrito se define como traslocación bacteriana (TB) (**Berg et al., 1979**). Por tanto, el criterio actual de TB exige la presencia de bacterias viables en los GLM, comprobada por la positividad de cultivos de los GLM. Se estima que la TB se presenta en un 25-30% de los pacientes cirróticos con mala función hepatocelular según los estudios clínicos y hasta en un 50-60% de las ratas cirróticas con ascitis (**García-Tsao et al., 1995**). La TB, además de ser un fenómeno clave en la patogenia de muchas de las infecciones en pacientes cirróticos, desempeña un papel en las alteraciones hemodinámicas e inmunológicas de la cirrosis mediada no sólo por el paso de bacterias viables a la circulación sistémica, sino también por sus componentes (la endotoxina y el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano han sido los más estudiados) (**Bellot et al., 2008**). Los mecanismos que influyen en la patogenia de la TB son fundamentalmente tres: el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI), un aumento en la permeabilidad intestinal y las alteraciones inmunológicas locales y sistémicas (**Bellot et al., 2008**).

El SBI se trata de un incremento de la flora bacteriana intestinal que se debe principalmente a un enlentecimiento de la velocidad de tránsito intestinal aunque también parecen intervenir otros factores, como la acidez gástrica, los defectos en la actividad inmune local de la mucosa intestinal y una disminución de las secreciones pancreatobiliares. A su vez, el enlentecimiento de la velocidad de tránsito intestinal en la cirrosis se debe, entre otros factores a un aumento de la actividad adrenérgica, de la síntesis de óxido nítrico y del estrés oxidativo de la pared intestinal (**Pérez-Páramo et al., 2000; Chang et al., 1998; Pardo et al., 2000**).

La barrera intestinal es una estructura física y funcional que tiene como objetivo la separación del medio externo – representado por el contenido luminal intestinal- y el medio interno. Está formada principalmente por un componente mucinoso secretado por las células epiteliales intestinales y por el epitelio intestinal que forma una capa con uniones intercelulares, o *tigh junctions*, lo que permite el paso selectivo de sustancias. En la cirrosis se producen alteraciones estructurales y funcionales en la mucosa intestinal que podrían aumentar la permeabilidad del intestino a bacterias y sus productos. El daño oxidativo de la mucosa intestinal (**Ramachandran et al., 2002**), así como la endotoxemia, los valores elevados de óxido nítrico y las citoquinas inflamatorias probablemente ejercen un papel en el aumento de la permeabilidad intestinal (**Dickinson et al., 1999**).

Inmunológicamente hablando, el intestino es un componente que contiene prácticamente todas las células implicadas en la respuesta establecida. El tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tejido inmune más grande del organismo, contiene cuatro compartimentos linfoides: placas de Peyer, linfocitos de lámina propia, linfocitos intraepiteliales y GLM, que intervienen en las respuestas adaptativa e innata. La cirrosis se asocia con descenso de la capacidad bactericida de macrófagos (**García González et al., 1993**) y neutrófilos (**Rajkovic et al., 1986**), disminución de la capacidad bactericida humoral de suero y líquido ascítico (LA) (lo que predispone al desarrollo de episodios de PBE) (**Such J et al., 1988; Runyon BA. 1988**) y disminución de la capacidad funcional del sistema retículo endotelial (SRE) representado por las células de Kupffer, probablemente impedidas de hacer su función por la existencia de *shunts* portosistémicos, lo que favorece el desarrollo de bacteriemias espontáneas y episodios de PBE (**Rimola et al., 1984**).

La PBE es una de las complicaciones más severas de la cirrosis y posee una alta tasa de mortalidad. Aproximadamente el 10-30% de los pacientes con cirrosis la sufren y generalmente afecta a pacientes en un estadio avanzado de la enfermedad (**Kiyici et al., 2006**). Se define como infección del LA en ausencia de un foco inflamatorio intraabdominal (**Rimola et al., 2000; García Tsao et al., 2005**) y sus factores de riesgo incluyen una pobre función hepática, la aparición de sangrado gastrointestinal, un bajo contenido proteico en el LA, elevados niveles de bilirrubina y trombocitopenia (**García-Tsao et al., 2004a**). La hipótesis más aceptada en la actualidad para explicar la patogenia de la PBE es la colonización del LA por gérmenes de origen intestinal, a partir de un episodio de bacteriemia (**Rimola et al., 1999**) (Figura 1). Desde la luz intestinal, las bacterias cruzan la barrera epitelial mucosa e infectan los GLM, proceso conocido como TB y anteriormente descrito, y desde allí alcanzan la circulación sanguínea a través de la vía linfática (**González et al., 2007**). Los mecanismos por los cuales las bacterias intestinales alcanzan la circulación sanguínea y la linfa son aún desconocidos. Debido al intercambio constante de fluido entre la sangre y el LA, las bacterias pueden pasar a la ascitis. Una vez que las bacterias han alcanzado el LA, el desarrollo de la PBE depende en gran medida de la capacidad antimicrobiana del líquido (**García-Tsao, 1992**). La mayor complicación de la PBE es la insuficiencia renal, la cual es probablemente debida a una mayor disfunción circulatoria, causada por la propia infección y/o por los efectos deletéreos en la circulación renal de los productos bacterianos y citoquinas (**García Tsao et al., 2004**).

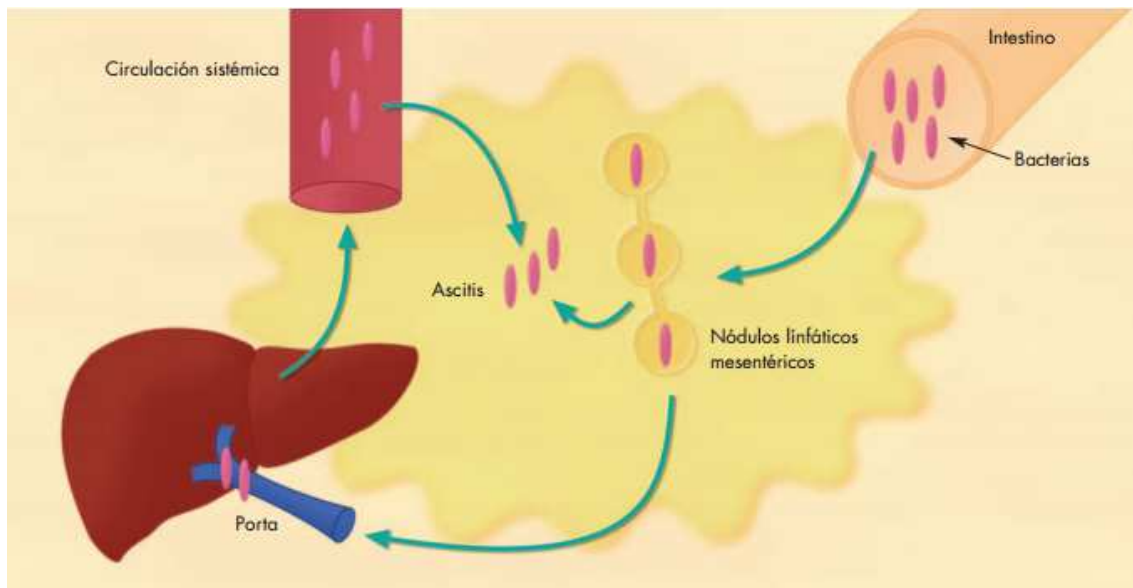


Figura 1. Esquema de la patogenia de la PBE (Uceda *et al.*, 2005).

2. HETEROGENEIDAD DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune constituye una compleja red estructural y funcional de múltiples células y moléculas cuya característica biológica esencial es la capacidad de reconocimiento específico por medio de interacciones entre sus componentes con los restantes componentes del organismo y con los posibles elementos extraños (antígenos) que puedan penetrar en el cuerpo humano (Janeway, 2004). Este reconocimiento desencadena respuestas frente a aquellas células o partículas portadoras del antígeno inductor. La capacidad de reconocimiento antígeno específico y de desarrollo de una respuesta efectora concede al sistema inmune una importante función defensiva frente a la agresión por componentes extraños no propios, como los gérmenes, o la transformación neoplásica de células propias. Pero a pesar de que la respuesta inmune sea esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular, en ocasiones puede contribuir a aumentar el daño en los tejidos (Henson, 2005).

El sistema inmune está formado por órganos linfoides primarios y secundarios en los cuales se generan, seleccionan y adquieren su función las células implicadas en la respuesta inmune. Los órganos linfoides primarios o hematopoyéticos, médula ósea y timo, tienen como función principal la generación de componentes celulares del sistema inmune. Los órganos linfoides secundarios, ganglios linfáticos y bazo, forman una extensa red por todo el organismo a través de la cual recirculan las células maduras del sistema inmune, entran en contacto con los posibles antígenos y sufren los procesos de selección, activación y proliferación necesarios para establecer la

respuesta inmune. Existen otros órganos secundarios formados por agrupaciones de células asociadas a mucosas (MALT), principalmente la piel, y a tubo digestivo (GALT), que engloba las amígdalas, las placas de Peyer y el apéndice, son zonas en contacto directo con el exterior y por lo tanto constituyen la primera línea de defensa contra componentes extraños (Delves *et al.*, 2000 a y b; Janeway, 2004).

Dependiendo del antígeno y de los mecanismos empleados por el sistema inmune en su reconocimiento, se pueden generar dos tipos de respuestas diferentes pero íntimamente relacionadas, la respuesta inmunológica innata, primera línea de defensa capaz de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y la respuesta inmunológica adquirida, que se caracteriza por el reconocimiento de moléculas extrañas a través de receptores presentes en células T y células B, amplificando y reclutando mecanismos efectores de la respuesta innata que le permite el control y eliminación del microorganismo. Estos dos brazos biológicos están estrechamente relacionados y se sinergizan optimizando los mecanismos de defensa inmunológicos (Chaplin *et al.*, 2006).

2.1 Componentes celulares del sistema inmune

Los componentes celulares del sistema inmune son los linfocitos, agrupados en linfocitos T, linfocitos B y natural killer (NK), y las células mieloides, que constituyen un grupo heterogéneo de células entre las cuales se incluyen los monocitos/macrófagos y las células dendríticas (DCs).

Los linfocitos son células efectoras, que contribuyen con la respuesta inmunológica adquirida, pero que necesitan de la colaboración de células presentadoras de antígeno (APCs) para su activación y regulación. Estas APCs, que contribuyen con la respuesta inmunológica innata, entran en contacto con el antígeno, lo procesan y lo presentan a los linfocitos cuando recirculan por los órganos linfoides secundarios (MacKay *et al.*, 1992; Delves *et al.*, 2000 a y b; Parkin *et al.*, 2001; Janeway, 2004).

Los linfocitos T, cuya identidad viene definida por la expresión clonal en su membrana citoplasmática de receptores específicos de células T (TCR), se caracterizan por reconocer antígenos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o HLA) expresadas por las APCs. Tras el reconocimiento antigénico se produce la activación de los linfocitos T y su transformación en células efectoras cuya función estará determinada por el microambiente inmunológico. Se dividen en dos clases principales, los linfocitos T citotóxicos (Tc) que matan células

infectadas por virus, y los linfocitos T cooperadores (Th), que activan a otros tipos celulares como las células B y los macrófagos. A su vez, dentro de los linfocitos Th existe una polarización hacia Th1, Th2, Th17 o T reguladoras (Treg) (Zhu *et al.*, 2008) (Figura 2), caracterizada por un patrón de expresión de citoquinas específico. Así, en la respuesta tipo Th1 las células Th producen Interferón gamma (IFN γ) e interleuquina 2 (IL-2), en la respuesta Th2 producen IL-4 e IL-5 (Delves *et al.*, 2000 a y b; Kidd, 2003; Janeway, 2004), en la respuesta Th17 producen factor de crecimiento transformante beta (TGF β), IL-6, IL-21 e IL-23 y cuando funcionan como Treg secretan TGF β e IL-2 (Díaz *et al.*, 2013).

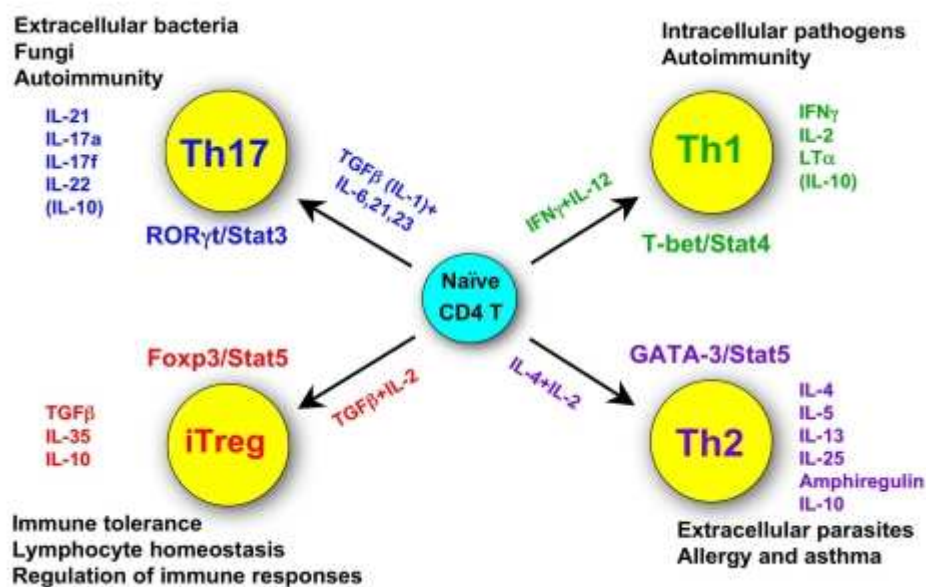


Figura 2. Distinta polarización de las células Th: funciones, productos, factores de transcripción y citoquinas (Zhu *et al.*, 2008).

Los linfocitos B se caracterizan por la expresión en su membrana del receptor de células B (BCR) cuyo componente principal son las inmunoglobulinas (Igs) que funcionan como receptores de antígenos. El reconocimiento del antígeno por la Ig desencadena la activación y diferenciación de las células B en células plasmáticas que secretan anticuerpos. Además de su función efectora, los linfocitos B también son APCs capaces de activar a los linfocitos T y capacitarlos para desarrollar sus funciones de reconocimiento y eliminación de antígenos (Janeway, 2004).

Las células NK carecen de receptores específicos de antígeno y forman parte del sistema inmune innato. Engloban una población heterogénea de linfocitos con actividad citotóxica capaz de detectar y lisar células tumorales o infectadas por virus

independientemente del reconocimiento antigénico (**Ortaldo et al., 1984; Janeway, 2004**).

Las células NK-T son una pequeña población de linfocitos T que se origina en el timo y que poseen TCRs que reconocen lípidos. Son capaces de producir con rapidez citoquinas como la IL-4 y el IFN γ después de su activación y pueden ayudar a los linfocitos B a producir anticuerpos contra antígenos lipídicos. Además, son capaces de mediar respuestas inmunitarias innatas contra algunos microorganismos patógenos o incluso regular respuestas inmunitarias adaptativas secretando, sobre todo, citoquinas (**Bendelac et al., 2007**).

Los monocitos/macrófagos son las principales células del sistema inmune innato implicadas en la inflamación y la respuesta ante los patógenos (**Auffray et al., 2009**). Poseen una capacidad fagocítica de amplio espectro, se distribuyen por todo el cuerpo y su morfología varía dependiendo del tipo de tejido al que se asocian (**Beutler, 2004**). Los monocitos circulantes en la sangre periférica son una población heterogénea de células capaces de extravasarse a los tejidos dando lugar a células especializadas (monocitos residentes) o de migrar a tejidos inflamados (monocitos inflamatorios) y diferenciarse en macrófagos (**Steiniger et al., 2001; Yrlid et al., 2006; Geissmann et al., 2003**). Poseen receptores tipo "toll" (TLR), componentes que reconocen PAMPs. Existen 10 tipos diferentes de TLRs cuya activación desencadena una respuesta efectora dentro de la inmunidad innata. Así el TLR4 reconoce el lipido A del lipopolisacárido (LPS) de membrana de las bacterias Gram-negativas, el TLR2 reconoce el ácido lipoteicoico (LTA) y el TLR9 reconoce secuencias específicas de ADN no metilado (motivos CpG) (**Sweet et al., 1998; Chow et al., 1999; Medzhitov et al., 2000; Hemmi et al., 2000; Wagner et al., 2002**). En la respuesta inmune adquirida (también llamada adaptativa o específica), los monocitos/macrófagos son APCs profesionales con efectividad media en la presentación de antígenos a los linfocitos T. Además, actúan como células efectoras que secretan una amplia variedad de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), y la interleuquina 1 beta (IL-1 β). También secretan quimioquinas tras la activación recíproca con los linfocitos T reclutando y activando nuevos linfocitos y otras células del sistema inmune para generar un proceso de amplificación muy importante en la respuesta inmune específica (**Janeway, 2004**).

Las DCs son las APCs más especializadas, captan antígenos y los procesan para presentarlos a los linfocitos T induciendo su activación y proliferación. Su recirculación está regulada por citoquinas y quimioquinas expresadas por células

endoteliales linfáticas y linfocitos T (Caux *et al.*, 2000). Durante este proceso, las DCs expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), receptores implicados en la activación de los linfocitos y quimiorreceptores que posibilitan su recirculación al ganglio linfático una vez que han captado el antígeno. La expresión de TLRs por las DCs en tejido se encuentra muy relacionada con la inmunidad innata frente a los patógenos y, dependiendo del TLR señalizado, las DCs producirán un determinado patrón de quimioquinas que, a su vez, inducirá el reclutamiento de poblaciones concretas de linfocitos activados, células NK o neutrófilos (Sallusto *et al.*, 2000a).

En la superficie de todas estas células se expresan moléculas de diferente estructura y función que pueden ser empleadas para su caracterización fenotípica por medio de marcajes con anticuerpos monoclonales. Estos antígenos de superficie son moléculas que pueden tener una amplia distribución y ser expresadas en otras estirpes celulares, o bien, limitadas a los linfocitos T o incluso a determinadas subpoblaciones linfocitarias. A cada conjunto de anticuerpos que reconocen una proteína o “marcador” y que identifican, un subconjunto particular, una determinada función o un estadio de diferenciación, se le aplica una designación “CD” (*Cluster of Differentiation*), a la que se llega por consenso en las conferencias internacionales realizadas al efecto.

2.2 Componentes moleculares del sistema inmune

La comunicación entre los diferentes componentes del sistema inmune se establece mediante contactos intercelulares y moléculas solubles secretadas tanto por las células efectoras como por las APCs. Este componente molecular lo forman las citoquinas, las quimioquinas y el SC (Nössal, 1987).

Las citoquinas son mediadores solubles inespecíficos de antígeno que son liberados principalmente por los leucocitos y que constituyen una vía esencial de interacción entre el sistema inmune y el resto del organismo. Participan virtualmente en todas las facetas de la inmunidad, incluyendo presentación antigénica, reclutamiento, diferenciación, activación e inducción de la expresión de moléculas de adhesión celular. Durante la respuesta inmune innata, la activación celular en la superficie de mucosas y epitelios en respuesta a un antígeno, involucra la producción de citoquinas, lo que permite la activación y amplificación de la respuesta inmunológica de las células fagocíticas como las APCs, las cuales generan nuevas citoquinas efectivas en favorecer la infiltración celular y el daño en los tejidos

característicos de la inflamación como el TNF α e IL-6 (**Parkin et al., 2001; Janeway, 2004**).

Dentro de los linfocitos T, los principales productores de citoquinas son los linfocitos Th, que se clasifican en función de las citoquinas secretadas. En los procesos patológicos, la IL-12 (producida fundamentalmente por las APCs) y el IFN γ , son imprescindibles en la polarización hacia Th1 y la activación de los macrófagos durante la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares (virus y bacterias intracelulares). Así mismo, la señalización mediada por contacto entre linfocitos T estimulados y monocitos durante la presentación antigénica induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF α . Estos mecanismos proinflamatorios tienen gran relevancia en la patogénesis de desórdenes inflamatorios crónicos. Uno de los mecanismos más importantes es la inducción de citoquinas proinflamatorias como consecuencia de la interacción célula a célula entre linfocitos T estimulados y monocitos/macrófagos (**Delves et al., 2000 a y b; Kidd, 2003; Janeway, 2004**).

El IFN γ es esencial para la activación de la capacidad bactericida de los macrófagos, estimula la producción de IL-1 y TNF α e induce la expresión de moléculas MHC-I y MHC-II. Tiene un importante papel en la regulación de los procesos inflamatorios y más ampliamente en la respuesta inmune. Regula la extravasación leucocitaria induciendo la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas en leucocitos y células endoteliales, y estimula la producción de óxido nítrico por los macrófagos (**Parkin et al., 2001; Janeway, 2004**).

El TNF α por su parte, es esencial en los procesos inflamatorios, induce cambios proinflamatorios en células endoteliales, incluyendo producción de otras citoquinas, expresión de moléculas de adhesión, liberación de sustancias procoagulantes e inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (**Eigler et al., 1997**). El más potente inductor en la producción de esta citoquina es el LPS, a través de la activación de TLR4 en los macrófagos (**Chow et al., 1999**).

Las quimioquinas constituyen una amplia familia de moléculas con capacidad quimiotáctica implicadas en el tráfico linfocitario y en el reclutamiento de linfocitos a los focos inflamatorios e infecciosos. La migración de una célula a su lugar de destino requiere la expresión secuencial de varios quimiorreceptores en respuesta a diferentes gradientes de quimioquinas. Durante la respuesta inmune, tanto las APCs (monocitos, DCs y células B) como los linfocitos T expresan un patrón secuencial de

quimiorreceptores que dirigen su extravasación a los órganos linfoides, controlando su maduración y posterior activación (**Sallusto *et al.*, 2000b; Parkin *et al.*, 2001**)

El sistema del complemento (SC) está constituido por más de 30 proteínas plasmáticas, muchas de ellas proteasas, que interaccionan con los anticuerpos unidos a antígenos y reaccionan en cascada, y por receptores de superficie, que colaboran en la eliminación de los agentes patógenos. Algunos componentes del SC tienen actividad quimiotáctica y provocan una respuesta inflamatoria local que favorece el reclutamiento y recirculación de APCs, contribuyendo así al inicio de la respuesta inmune adaptativa. Los componentes finales de la cascada del SC se caracterizan por formar poros en la membrana del agente patógeno y provocar su lisis directa (**Parkin *et al.*, 2001; Janeway, 2004**).

2.3 Funcionamiento del sistema inmune. Integración de la inmunidad innata y adquirida

Como ya hemos dicho anteriormente, el funcionamiento del sistema inmune se basa en dos sistemas de reconocimiento diferentes y estrechamente relacionados que son responsables de la eliminación de las sustancias derivadas de los patógenos y sustancias no patógenas. Se trata de la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Tras la activación de las células del sistema inmune innato se producen y liberan mediadores inflamatorios y se incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión que mediarán en la activación del sistema inmune adquirido (Figura 3) (**Ciraci *et al.*, 2012**). El funcionamiento del sistema inmune, en su conjunto, resulta en la inflamación, local y/o sistémica, que en última instancia tiene como objetivo restaurar la homeostasis. Así, mientras que ambos tipos de respuesta son fundamentalmente diferentes en sus mecanismos de acción, la sinergia entre ellos es esencial para una respuesta inmune plenamente eficaz (**Chaplin, 2010**).

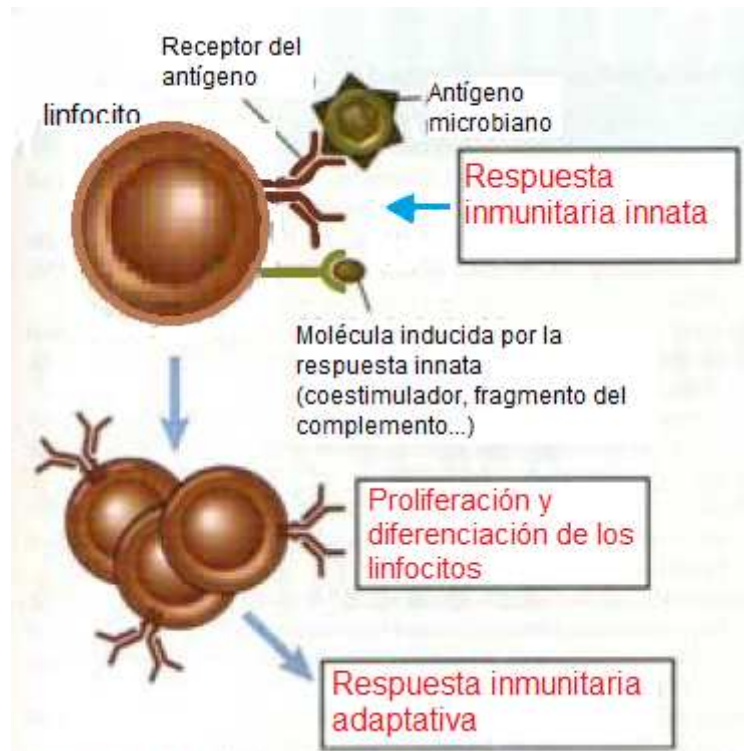


Figura 3. Estimulación de la inmunidad adaptativa por la respuesta inmunitaria innata (Abbas 6ª edición).

3. EL HÍGADO COMO ÓRGANO INMUNE

La organización estructural del hígado tiene profundas implicaciones para su función inmune. La función fisiológica del hígado, ya sea la síntesis de proteínas, el metabolismo o la eliminación de patógenos y de antígenos de la sangre, requiere una respuesta inmune que se adapte a estas tareas y se regule a nivel local. Por ello el hígado tiene importantes funciones en la respuesta inmune innata y adquirida. La contribución hepática a la respuesta innata del sistema inmune incluye la producción de proteínas de fase aguda o la eliminación de patógenos y/o antígenos de la sangre. La participación hepática en la respuesta inmune adquirida incluye la eliminación de las células T activadas por apoptosis o la inducción de tolerancia frente a antígenos, ya sean propios o de la dieta. Por tanto, mientras que los microorganismos patógenos y los antígenos de la circulación sistémica que entran en el hígado con la sangre arterial deben ser eliminados de manera eficiente, el gran número de antígenos derivados del tracto gastrointestinal que entran en el hígado con la sangre venosa, deben ser tolerizados. Pero los mecanismos que determinan el balance entre tolerancia e inmunidad todavía no están claros (Knolle *et al.*, 2000; Bowen *et al.*, 2004).

Un hígado sano contiene un importante número de células fagocíticas, de APCs y de linfocitos, además de ser un sitio donde se producen citoquinas, componentes del complemento y proteínas de fase aguda (**Doherty et al., 2000**). Las proteínas de fase aguda son proteínas producidas por el hígado en respuesta a una estimulación por citoquinas. La circulación sistémica de estas proteínas es la responsable de muchos de los efectos sistémicos de la respuesta inflamatoria. Brevemente, un daño local extrahepático promueve la liberación por parte de los macrófagos locales de una primera oleada de citoquinas como IL-1, TNF α e IL-6. El efecto de estas citoquinas sobre las células adyacentes provoca la liberación, por parte de estas células, de una segunda oleada de IL-6, que provoca la producción masiva de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos (**Parker et al., 2005**).

Las células de Kupffer, situadas sobre todo en sitios donde la sangre entra en el hígado, es decir, en la zona periportal, limpian la sangre de antígenos, microorganismos patógenos o endotoxina, por fagocitosis, y secretan como respuesta varias citoquinas, incluyendo TNF α , IL-10 y grandes cantidades de IL-6 (**Knolle et al., 1995**). Como resultado de este proceso eficiente, el hígado raramente se infecta con bacterias y contribuye a la eliminación de infecciones bacterianas sistémicas. Los mecanismos de eliminación de patógenos son rápidos y se complementan entre sí, requisito previo importante para luchar contra los patógenos y evitar la infección (**Knolle et al., 2000; Kita et al., 2001**).

Pero hay muchos patógenos que se replican dentro de los hepatocitos y una vez que han infectado a estos no pueden ser controlados por las células de Kupffer, las células NK o los leucocitos circulantes. Por lo tanto, al infectar los hepatocitos, los patógenos son protegidos de la respuesta inmune. En esta situación, las células endoteliales del sinusoides hepático y demás APCs deberán captar los antígenos liberados por el hepatocito dañado y presentarlos a las células T. Sólo cuando las células T se activen tendrá lugar una respuesta inmunitaria específica contra los hepatocitos con infiltración de células T y el desarrollo de una hepatitis (**Knolle et al., 2000**).

Investigaciones recientes en ratones parecen demostrar que el sitio donde se produce la activación de las células T es determinante para el balance entre inmunidad y tolerancia intrahepática. Así, las células T CD8 novatas que se activen en los ganglios linfáticos desarrollarán una respuesta citotóxica eficiente, mientras que aquellas células que se activen dentro del hígado presentarán una respuesta citotóxica

incapaz de mediar el daño celular, con lo que se eliminarán por apoptosis dentro del propio hígado (**Bowen et al., 2004**).

Una característica importante de los linfocitos T hepáticos es que la mayoría expresan marcadores de activación. Este estado crónicamente activado de muchos de los linfocitos T hepáticos podría apoyar la hipótesis de que estas células están continuamente actuando como centinelas, mediando el mantenimiento de la homeostasis inmune induciendo respuestas inmunogénicas y tolerogénicas. (**Doherty et al., 2000; Bowen et al., 2004**).

A pesar de la respuesta inmune frente a patógenos, el hígado favorece la inducción de la tolerancia más que la inmunidad. La tolerancia se define como el estado normal esencial o la ausencia de respuesta inmune a los componentes nocivos del propio cuerpo (**Kita et al., 2001**). Los fenómenos de tolerización hepáticos se producen en varias situaciones y están mediados por distintos mecanismos, ya sea i) ignorar o prevenir el contacto entre el linfocito y el antígeno, por ejemplo, mediante la eliminación clonal por apoptosis de células T efectoras específicas, ii) la anergia y/o supresión mediante la privación de las señales coestimuladoras necesarias para que se induzca la respuesta inmune, y iii) la regulación de la función efectora de los linfocitos gracias a la capacidad que poseen los denominados linfocitos supresores de cortar o inhibir la inducción de la respuesta efectora (**Knolle et al., 2000; Kita et al., 2001**).

Respecto a los fenómenos de tolerización frente a antígenos de la dieta, el LPS parece ser uno de los factores más importantes. De hecho, estudios en ratones que no responden al LPS han demostrado que se pierde la tolerancia (**Kiyono et al., 1982**). El LPS parece ser un factor importante en el microambiente local de hígado e intestino dado que los antígenos derivados del tracto gastrointestinal están acompañados generalmente de LPS. Estudios recientes han demostrado cómo la estimulación repetida a células de Kupffer y células endoteliales del sinusoides con bajas dosis de LPS provocan un estado refractario caracterizado por la disminución de moléculas de adhesión, esenciales para los leucocitos, en la membrana de dichas células endoteliales, lo que contribuye al control hepático de la inflamación. No obstante, un incremento de la concentración de LPS rompe dicha tolerancia activando los mecanismos de respuesta al estímulo inflamatorio (**Uhrig et al., 2005**).

Por todo ello, las alteraciones en la estructura o la función hepática pueden dar lugar a alteraciones significativas, tanto en el sistema inmune innato como en el adaptativo (**Parker *et al.*, 2005**).

4. DISFUNCIÓN INMUNOLÓGICA ASOCIADA A LA CIRROSIS

4.1 Estado de inmunodeficiencia

La cirrosis hepática es un proceso dinámico en el que el sistema inmune se encuentra sometido a una estimulación anormal que pudiera favorecer su participación en la elevada predisposición a infecciones bacterianas, en las alteraciones hemodinámicas o en la respuesta inflamatoria del hígado y de otros órganos (**López-Talavera *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; Wiest *et al.*, 1999; Albillos *et al.*, 2003**).

La incrementada tasa de TB en pacientes cirróticos es mayoritariamente debida a un estado inmunocomprometido asociado (**Tandon *et al.*, 2008**). La disfunción inmunológica asociada a la cirrosis es de carácter multifactorial (**García-Tsao *et al.*, 2004b; Christou *et al.*, 2007**), y es principalmente debido a una disminución en la actividad bactericida de las células fagocíticas (**Fierer *et al.*, 1979; Hassner *et al.*, 1981; Akalin *et al.*, 1985; García González *et al.*, 1993**). Además, los niveles del complemento, críticos en la fagocitosis bacteriana, están disminuidos en la cirrosis (**Finlayson *et al.*, 1972; Mellencamp *et al.*, 1991; Homann *et al.*, 1997**), principalmente en la cirrosis con ascitis (**Mellencamp *et al.*, 1991**) y en pacientes con insuficiencia hepática (**Finlayson *et al.*, 1972; Homann *et al.*, 1997**).

4.1.1 Sistema retículo-endotelial

El SRE participa en la eliminación de microorganismos circulantes de la sangre y constituye un factor de defensa importante contra las infecciones, especialmente las bacteriemias (**Rimola *et al.*, 1984**). La mayor parte de la actividad del SRE está localizada en el hígado donde las células de Kupffer (macrófagos tisulares) son los componentes mayoritarios. Las células de Kupffer juegan un importante papel en la respuesta inmune innata de la enfermedad hepática ya que detectan productos bacterianos desde la circulación portal. Estas células activadas producen grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias y radicales libres que agravan el daño hepático y contribuyen a la progresión de la fibrosis hepática (**Jeong *et al.*, 2008**). En la cirrosis, la actividad del SRE se encuentra reducida lo que da lugar a la presencia de *shunts* extra- e intra-hepáticos y a una disminución en el número y función de las

células de Kupffer (Thalheimer *et al.*, 2005; Tandon *et al.*, 2008). Se ha demostrado que pacientes cirróticos con una actividad disminuida del SRE tienen una mayor frecuencia de desarrollo de bacteriemia espontánea y PBE que aquellos pacientes con una actividad del SRE normal (Rimola *et al.*, 1984). El *bypass* al SRE a través de *shunts* portosistémicos no es únicamente un mecanismo importante que podría explicar la falta de aclaramiento bacteriano portal o sistémico en la cirrosis, sino que también explicaría el fracaso en la eliminación de otros productos bacterianos como la endotoxina y citoquinas (Tandon *et al.*, 2008).

4.1.2 Sistema del complemento

El SC es fundamental en la defensa contra infecciones bacterianas y su participación puede involucrar tres mecanismos diferentes: i) la muerte celular directa por el complejo de ataque de membrana (C5b-9); ii) el reclutamiento de células fagocíticas hacia los sitios de infección por mediadores de la inflamación y iii) la generación de opsoninas que contribuyen al reconocimiento inmune de microorganismos (Homann *et al.*, 1997). Las concentraciones séricas de los componente 3 y 4 del SC (C3 y C4) se encuentran disminuidas en pacientes con cirrosis hepática descompensada, al igual que la actividad hemolítica del complemento por la vía alternativa (Homann *et al.*, 1997). Esta disminución está relacionada con otros parámetros de la función hepática. La concentración disminuida de C3 se explica por una síntesis disminuida y un aumento del consumo de C3, lo que probablemente se relaciona con la circulación habitual de endotoxinas en la sangre de estos pacientes. Las bajas concentraciones de C3 en el suero de pacientes con cirrosis se han asociado significativamente con una mayor frecuencia de infecciones como la PBE (Homann *et al.*, 1997) lo que podría explicarse por un déficit en la capacidad de opsonización.

4.1.3 Receptores de reconocimiento patrón

La inmunidad innata puede detectar la infección específicamente a través de receptores de reconocimiento patrón (PRRs) que pueden ser expresados en la superficie celular, en compartimentos intracelulares o secretados en la sangre y fluidos tisulares (Medzhitov *et al.*, 1997a). Las funciones principales de los PRRs incluyen la opsonización, activación del complemento, fagocitosis, activación de caminos de señalización proinflamatorios e inducción de apoptosis (Janeway *et al.*, 2002). Los PRRs reconocen estructuras específicas, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y que son expresados por los patógenos invasores

(**Janeway et al., 2002**). Los hepatocitos son la mayor fuente de producción de PRRs (**Gao et al., 2008**). Existen cuatro clases principales de PRRs según su composición: colectinas, pentraxinas, transferasas lipídicas y proteínas de reconocimiento a peptidoglicano. Muchas de esas proteínas son sintetizadas principalmente en los hepatocitos y liberadas al torrente sanguíneo jugando así un importante papel en la inmunidad innata contra infecciones locales y sistémicas. El hígado, además, es una de las mayores fuentes de producción de otras muchas proteínas de fase aguda que tienen un papel clave en la defensa innata contra infecciones y en la reducción del daño tisular mediante la inactivación de proteasas liberadas por los patógenos y células muertas o dañadas (**Gao et al., 2008**).

Los TLRs, una familia de PRRs de membrana no clonal, se consideran como el principal sistema de alarma del sistema inmune. Se localizan en la superficie y en el citoplasma de numerosos tipos celulares del sistema inmune innato (neutrófilos, monocitos/macrófagos, DCs y mastocitos), del sistema inmune adaptativo (células T y B), así como en otros tipos celulares dotados de cierta inmunocompetencia y proporcionan al sistema inmune una especificidad considerable para un amplio rango de patógenos lo que ofrece un sistema de respuesta inmediata frente a los patógenos (**Medzhitov et al., 1997b**). La familia de los TLR reconocen PAMPs y promueven la activación de los leucocitos. Los TLRs mayoritariamente estudiados en la cirrosis hepática son los TLR 2, 4 y 9, debido a que responden a productos bacterianos y se creen importantes en la patogénesis de la disfunción inmune asociada a la cirrosis (**Leber et al., 2009**). El TLR4 es el receptor de la endotoxina (lipopolisacárido mayoritario de la pared bacteriana de Gram-negativas), mientras que el TLR2 reconoce peptidoglicanos (productos de bacterias Gram-positivas). El TLR9 es una molécula intracelular y es activada mediante ADN bacteriano (**Broad et al., 2006**). Los TLRs activados permiten el reclutamiento de los neutrófilos y conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno, regulación de la fagocitosis, y secreción de citoquinas, quimioquinas y productos antimicrobianos (**Leber et al., 2009**).

En la hepatitis alcohólica, hay una disfunción de los neutrófilos que está asociada con endotoxemia y un aumento en la incidencia de infección (**Mookerjee et al., 2007**). Estos pacientes también tienen sobreexpresión de TLR2, 4 y 9, probablemente debido a la presencia de endotoxina y otros productos bacterianos (**Stadlbauer et al., 2009**). La estimulación constante de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con endotoxina conduce a un desarrollo de tolerancia frente a ella, lo cual está caracterizado por una reducida capacidad de producción de

citoquinas proinflamatorias (**Granowitz et al., 1993**). Sin embargo, en pacientes con cirrosis se ha encontrado una sobreexpresión de TLR2 pero no de TLR4 en PBMCs que se correlaciona con los niveles circulantes de TNF α y de receptor soluble de TNF (**Riordan et al., 2003**). Estos encuentros llevan a pensar que no solo la endotoxina si no también otros productos bacterianos pueden jugar un importante papel en la disfunción inmunológica asociada a la cirrosis. Estudios recientes demuestran que en el 34% de pacientes con cirrosis y ascitis no infectada, existen niveles detectables de ADN bacteriano que se correlacionan con el nivel de respuesta inflamatoria, lo que lleva a pensar que la presencia de productos bacterianos (endotoxina, ADN bacteriano y posiblemente otras sustancias) está relacionado con la respuesta inflamatoria en estos pacientes (**Francés et al., 2008**).

4.1.4 Alteraciones celulares

Diversas investigaciones tanto en humanos como en modelos animales han sido realizadas con objetivo de conocer el funcionamiento del sistema inmunológico en la cirrosis. Entre los componentes celulares se han descrito alteraciones en los linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos y neutrófilos de la sangre circulante, así como variaciones en su producción de los componentes moleculares, lo que afecta a sus características fenotípicas y funcionales originales.

A continuación, se resumen las principales alteraciones descritas en las células del compartimento de la sangre periférica en pacientes con cirrosis hepática.

Linfocitos T

En la cirrosis humana los linfocitos T de la sangre periférica se encuentran disminuídos tanto en cifras absolutas como en términos de porcentaje. Comparado con los estadios de hepatitis aguda o crónica, e independientemente de la etiología, la cirrosis cursa con una reducción significativa del número absoluto de linfocitos T circulantes (**Perrin et al., 1984; Vetter et al., 1987; Morita et al., 2005; McGovern et al., 2007**).

Esta reducción afecta a los linfocitos T CD4⁺ y, especialmente, a los linfocitos T CD8⁺, lo que conlleva a un aumento del ratio CD4⁺:CD8⁺ (**Perrin et al., 1984; Vetter et al., 1987; Luna-Casado et al., 1997; Albillos et al., 2004 b; Morita et al., 2005; McGovern et al., 2007; Li et al., 2010**).

Junto a ello, se ha descrito una importante disminución de las células T novatas (Luna-Casado *et al.*, 1997; Albillos *et al.*, 2004 b), que alcanza su nivel máximo en los pacientes en la fase descompensada de la cirrosis y con signos de hiperactivación inmunitaria asociada a la TB (Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b). Un hecho interesante es que esta reducción ya es evidente en los estadios previos a la aparición de la cirrosis (Yonkers *et al.*, 2011), lo que sugiere que la linfopenia de las células T novatas circulantes podría ser considerada como una característica inherente y proporcional a la gravedad de la enfermedad hepática.

Las células T memoria también se encuentran disminuidas en la cirrosis, aunque, debido a la mayor disminución de las células T novatas, se produce un proporcional aumento de su frecuencia (Albillos *et al.*, 2004b). Sin embargo, todavía no ha sido descrita de forma específica la distribución de las distintas subpoblaciones de linfocitos T memoria circulantes, las cuales pueden ser caracterizadas fenotípica y funcionalmente gracias a su expresión diferencial de marcadores específicos.

Además, se ha descrito un aumento de los linfocitos T productores de citoquinas tipo 1 (Th1 y Tc1), el cual altera el equilibrio T tipo 1 / tipo 2 y contribuye a la patogénesis del daño hepático. Así, en la cirrosis se produce un aumento de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN γ e IL-2 comparado con individuos controles sanos (Laso *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2002; Lemmers *et al.*, 2009).

Los linfocitos Treg también se encuentran aumentados en la sangre periférica de los pacientes con cirrosis, alcanzando sus mayores frecuencias cuando hay presencia de ascitis, elevada concentración de LBP en suero y en el desarrollo de hepatocarcinoma, independientemente de la etiología (Fu *et al.*, 2007; Márquez *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

Funcionalmente, los linfocitos T circulantes en la cirrosis muestran una disminución de su capacidad de proliferación (Devière *et al.*, 1988; Girón-González *et al.*, 1994; Morishima *et al.*, 2012) y de la actividad citotóxica (Morita *et al.*, 2005; Laso *et al.*, 2010) que, en el caso concreto de la etiología alcohólica, se incrementa si existe un consumo activo poniendo de manifiesto el efecto supresor del alcohol sobre los linfocitos T en la cirrosis. Junto a ello, la expresión de moléculas relacionadas con la activación celular aumenta en la superficie de los linfocitos T (Santos-Pérez *et al.*, 1996; Luna-Casado *et al.*, 1997; Laso *et al.*, 2000; Márquez *et al.*, 2009), mientras que la molécula coestimuladora CD28 disminuye (Manfras *et al.*, 2004; Márquez *et al.*, 2009;

Laso et al., 2010). Estos cambios se han asociado a un estado de hiperactivación inmune debido a estimulación crónica en la cirrosis, la cual se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad y con la expansión oligoclonal de células T memoria con características de envejecimiento celular (**Song et al., 2001; Manfras et al., 2004; Márquez et al., 2009; Hoare et al., 2010; O`Bryan et al., 2011**).

Además, los linfocitos T de sangre periférica parecen ser más susceptibles a la muerte celular por apoptosis, tanto de forma espontánea como tras inducción por diferentes estímulos, independientemente de la etiología (**Toubi et al., 2001; Szuster-Ciesielska et al., 2005; Marquez et al., 2009**). Sin embargo, queda por esclarecer el papel de la apoptosis sobre las distintas poblaciones y subpoblaciones T CD4⁺ y T CD8⁺ circulantes en la cirrosis.

Linfocitos B

Los linfocitos B presentan una reducción en su número y frecuencia en la sangre periférica de los pacientes con cirrosis, un hecho que es evidente en el caso de la cirrosis alcohólica (**Cook et al., 1996; Laso et al., 1996; Massonnet et al., 2009**) y, algo menos claro, en pacientes con cirrosis por el virus de la hepatitis C (VHC) (**Doi et al., 2012**).

Recientemente, se ha demostrado que en pacientes con cirrosis, se da una disminución del número y frecuencia de los linfocitos B memoria, un hecho que se correlaciona con la disfunción hepática y la hipertensión portal, y que se asocia a un posible aumento de su diferenciación a plasmablastos. Además, esta disminución de linfocitos B memoria se ha asociado específicamente a la reducción de la subpoblación CD27⁺ IgM⁺, la cual parece estar implicada en la respuesta de los linfocitos T independiente de antígenos (**Doi et al., 2012**).

Además, los linfocitos B memoria en la cirrosis muestran una disminución de la respuesta celular tras activación a través del TLR-9 y del CD40 junto con una débil expresión de molécula de coestimulación CD70, reducción de la producción de TNFβ e IgG y de la capacidad de estimular a los linfocitos T CD4⁺ (**Massonnet et al., 2009; Doi et al., 2012**).

A través del reconocimiento de PAMPs, los linfocitos B producen Igs contribuyendo así a la hipergammaglobulinemia característica de los pacientes con cirrosis (**Massonnet et al., 2009**). Recientemente, se ha demostrado la presencia de

elevados niveles séricos de Igs específicas de patógenos en pacientes con cirrosis como, por ejemplo, anticuerpos anti-galactosamina, el componente fosfopeptidomano de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), glicanos o lisados de complejos de proteínas bacterianas intestinales (OMP) (Mehta *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2010), lo que se ha asociado a la gravedad de la enfermedad hepática y a la expansión clonal de los linfocitos B productores de Igs en respuesta a estimulación antigénica crónica (Vallat *et al.*, 2004; Fazi *et al.*, 2010).

Finalmente, cabe señalar que en pacientes con hepatitis C crónica se ha descrito que los linfocitos B memoria circulantes maduros muestran una reducción de su capacidad de proliferación (Sugalski *et al.*, 2010; Oliviero *et al.*, 2011), junto con una mayor resistencia a la apoptosis y una posible mayor migración al hígado (Sugalski *et al.*, 2010; Mizuochi *et al.*, 2010; Mizuochi *et al.*, 2011). Sin embargo, en la actualidad no existen datos relacionados con estas alteraciones en la cirrosis.

Células NK

Las células NK se encuentran disminuídas en la sangre circulante de los pacientes con cirrosis de etiología alcohólica y por infección por el VHC (Nakajima *et al.*, 1986; Bonorino *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2010; Laso *et al.*, 2010). Junto a ello, se da una redistribución de sus subpoblaciones, que cursa con un incremento de las células CD56^{brigh}, con función inmunorreguladora, y una disminución de las células CD56^{dim}, con función citotóxica (Lin *et al.*, 2004; Bonorino *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2010).

Sin embargo, hay que indicar la existencia de algunas diferencias en función de la etiología. De este modo, en pacientes alcohólicos sin enfermedad hepática la depleción de las células NK es mucho más profunda que en los pacientes con cirrosis (Laso *et al.*, 2010). Por otro lado, en pacientes con hepatitis C crónica sin y con cirrosis se da la misma reducción y redistribución descrita anteriormente (Lin *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2005; Bonorino *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2010). Y, en el caso de hepatitis B crónica no se han encontrado diferencias ni en el número ni en la distribución de las células NK respecto a individuos controles sanos (Bonorino *et al.*, 2009; Tjwa *et al.*, 2011).

Además, el equilibrio entre los receptores activadores e inhibidores que regulan la activación de las células NK (NKR) se altera en la cirrosis, donde se ha observado una disminución de los receptores activadores NKp30, NKp46 y NKG2D (Bonorino *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2010; Laso *et al.*, 2010; Tjwa *et al.*, 2011). Y, en el caso de los

receptores inhibidores como, por ejemplo, NKG2A o CD158a, los resultados difieren en función de las diferentes etiologías (**Nattermann et al., 2006; Bonorino et al., 2009; Laso et al., 2010**).

Junto a ello, las células NK presentan una disminución de la activación y la capacidad citotóxica en la cirrosis por el VHC y también en el alcoholismo crónico (**Lin et al., 2004; Laso et al., 2010**). En la hepatitis crónica por VHC y por el virus de la hepatitis B (VHB) también se da una disminución de la activación, que afecta sobre todo a la subpoblación citotóxica CD56^{dim}, y que se asocia a una reducción de la citotoxicidad (**Corado et al., 1997; Par et al., 2002; Lin et al., 2004; Laso et al., 2010; Tjwa et al., 2011**). Sin embargo, parece que las células NK que son activadas muestran una mayor susceptibilidad a la muerte celular por apoptosis, como ha sido descrito en pacientes con cirrosis y en hepatitis C crónica (**Lin et al., 2004; Panasiuk et al., 2010**).

Por último, se ha descrito una reducción de la producción de IFN γ por las células NK en la hepatitis crónica B y C (**Bonorino et al., 2009; Tjwa et al., 2011**), mientras que en la cirrosis alcohólica se da un ligero aumento acompañado de una mayor producción de TNF α (**Laso et al., 2010**).

Monocitos

En la cirrosis los monocitos circulantes se encuentran significativamente expandidos, independientemente de la etiología (**Girón-González et al., 1994; Zimmermann et al., 2010; Zhang et al., 2011**). Además, su número y frecuencia aumentan en presencia de ascitis y elevadas concentraciones de LBP en suero (**Albillos et al., 2004 b; Marquez et al., 2009**) y con la gravedad de la cirrosis (Child C > B > A) (**Seidler et al., 2012**).

Junto a ello, se ha observado una redistribución de las subpoblaciones de monocitos, con un aumento de los denominados monocitos clásicos (CD14⁺ CD16⁻) y con la consecuente disminución de los monocitos proinflamatorios (CD14⁺ CD16⁺), la cual es especialmente evidente en pacientes en estadios avanzados de la enfermedad y con signos de activación inmune (**Zimmermann et al., 2010; Zhang et al., 2011; Seidler et al., 2012**).

Fenotípicamente, los monocitos presentan un aumento de la expresión de las moléculas de coestimulación CD80, CD86 y CD40 y de los marcadores de activación HLA-DR y CD25, sobre todo en la subpoblación clásica (CD14⁺ CD16⁻) (**Zimmermann**

et al., 2010; Zhang *et al.*, 2011; Seidler *et al.*, 2012) y en pacientes con LBP elevado y ascitis (Albillos *et al.*, 2004b; Marquez *et al.*, 2009). Por el contrario, algunos estudios han mostrado una disminución de la expresión de HLA-DR y CD86 en los monocitos de pacientes cirróticos con fallo hepático agudo y crónico, un fenómeno conocido como parálisis inmune que se relaciona con la disfunción del sistema inmune y con las severas complicaciones de las infecciones bacterianas secundarias (Lin *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2007).

También, se han descrito alteraciones en la expresión de los TLRs en los monocitos circulantes en la cirrosis, concretamente de los TLR2 y TLR4, aunque con variaciones entre los diferentes estudios. Así, algunas investigaciones muestran un incremento de la expresión del TLR4 en los monocitos periféricos en pacientes con cirrosis descompensada y en fallo hepático agudo y crónico (Xing *et al.*, 2007; Montes-de-Oca *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios muestran que la expresión del TLR4 disminuye y no hay cambios en la expresión del TLR2 (Testro *et al.*, 2010) o, por el contrario, que la expresión del TLR2 aumenta sin variación en la expresión del TLR4 (Riordan *et al.*, 2003).

Finalmente, asociado a la expresión de los TLRs se halla la producción de citoquinas proinflamatorias. Así, los monocitos activados en la cirrosis, producen elevadas cantidades de TNF α , IL-6 e IL-1 β (Riordan *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b; Zimmermann *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

Neutrófilos

Durante más de 30 años se ha intentado identificar la disfunción inmune que acompaña a la cirrosis. Muchos estudios lo han focalizado en la inmunidad innata, de la que los neutrófilos son un componente esencial. Los datos encontrados sobre los neutrófilos en cirrosis son paradójicos. Por un lado, algunos estudios sugieren una activación de los neutrófilos lo que indica una buena disposición para eliminar las bacterias (Condliffe *et al.*, 1998), debido a la sobreproducción de peróxido de hidrógeno, una disminución en la expresión de L-selectina (Taieb *et al.*, 2000) y altos niveles de elastasa (Stanley *et al.*, 1996), sin embargo, por otro lado, también se ha demostrado una actividad fagocítica disminuída en estas células que correlaciona con la severidad de la enfermedad hepática (Rajkovic *et al.*, 1985; Fiuza *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 2000; Parlesak *et al.*, 2003). Esta paradoja ha sido resuelta mediante la observación de que los neutrófilos en la cirrosis hepática están totalmente activados en sangre periférica, donde normalmente deberían encontrarse en estado de reposo,

pero con una gran disminución en su capacidad fagocítica (Leber *et al.*, 2009). Esto tiene dos consecuencias importantes: primero, la producción de radicales libres de oxígeno en la sangre periférica podría ser perjudicial para otros tipos celulares y, segundo, debido al gran estallido oxidativo, los neutrófilos agotarían toda su energía siendo incapaces de responder a los estímulos bacterianos mediante la fagocitosis (Leber *et al.*, 2009) (Figura 4).

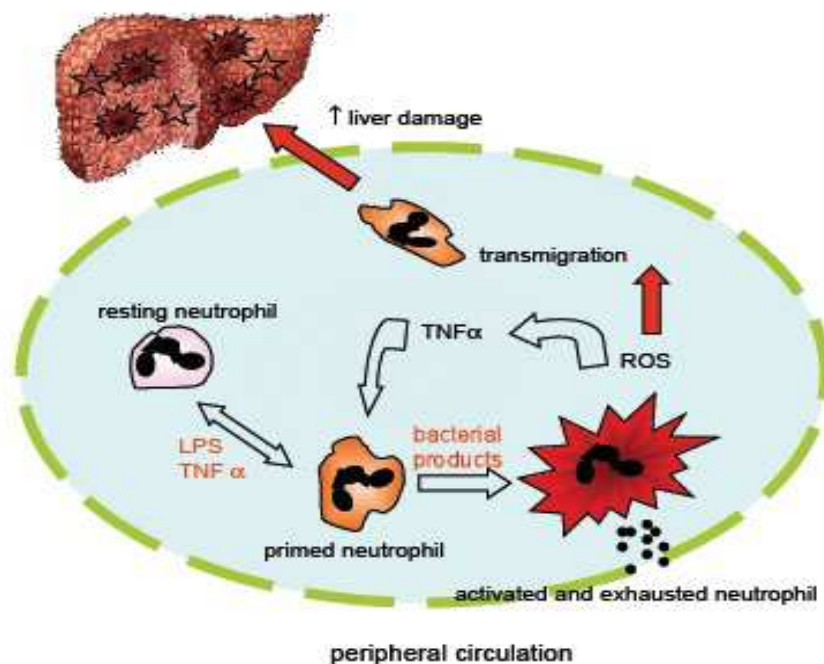


Figura 4. Disfunción neutrofílica en la cirrosis hepática. Los neutrófilos son totalmente activados con productos como la endotoxina lo que conduce a la aparición de estrés oxidativo y pérdida de su capacidad fagocítica. Los neutrófilos activados migran al hígado donde, junto con las células de Kupffer, causarán un mayor daño hepático (Leber *et al.*, 2009)

4.2 Activación del sistema inmune inflamatorio

Las citoquinas liberadas por las células del sistema inmune son clave en la regulación de esta respuesta inflamatoria frente a la lesión que modula la fibrogénesis hepática, y esta respuesta inflamatoria se extiende a nivel sistémico. Así, la inflamación precede y promueve la progresión de la fibrosis hepática. (Bataller *et al.*, 2005).

Por ejemplo, la proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1) y RANTES estimulan la fibrogénesis mientras que la IL-10 y el IFN γ ejercen el efecto

contrario, (Tilg *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1997; Von Baehr *et al.*, 2000; Schwabe *et al.*, 2003). El TGF β , producido masivamente por las células de Kupffer, parece ser un mediador de la fibrogénesis, favoreciendo la transformación de las células estrelladas a miofibroblastos, así como estimulando la síntesis y deposición de proteínas de la matriz extracelular, al tiempo que inhibe su degradación (Castilla *et al.*, 1991). Las citoquinas con propiedades vasoactivas también regulan la fibrogénesis hepática, así, las sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico, poseen propiedades antifibróticas, mientras que los vasoconstrictores, como la norepinefrina, poseen el efecto contrario (Chu *et al.*, 1997; Oben *et al.*, 2004). Por su parte, el TNF α desempeña un papel fundamental en el deterioro hemodinámico característico de la cirrosis (Chu *et al.*, 1997; López-Talavera *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; Wiest *et al.*, 1999b; Albillos *et al.*, 2003).

Diversos estudios en pacientes y en modelos experimentales han constatado la existencia en la cirrosis de un marcado estado proinflamatorio sistémico, manifestado por un aumento de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y un incremento en la expresión de antígenos de activación en las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune (Tilg *et al.*, 1992; López-Talavera *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; Wiest *et al.*, 1999a; Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b; Muñoz *et al.*, 2005; Albillos *et al.*, 2010). De hecho, las elevadas concentraciones séricas de citoquinas son un hallazgo propio de la cirrosis e independiente de su etiología, aunque dependiente del estadio de la enfermedad (Girón *et al.*, 1992; Tilg *et al.*, 1992; Tilg *et al.*, 1993; Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b).

Así pues, las fases descompensadas de la enfermedad se caracterizan por un aumento en el nivel sérico de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-6 (Tilg *et al.*, 1992; Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b), de mediadores antiinflamatorios como IL-10, y de los receptores solubles de IL-1 β y de TNF α (sTNFR1 y sTNFR2) (Tilg *et al.*, 1993; Von Baehr *et al.*, 2000). Es más, nuestro grupo de investigación ha demostrado en un modelo murino de cirrosis descompensada por CCl $_4$ que la activación sistémica del sistema inmune se caracteriza por un patrón proinflamatorio consistente en una polarización Th1 con elevada producción de IFN γ (Muñoz *et al.*, 2005).

La cirrosis descompensada se relaciona también con un aumento en la liberación de TNF α y se han identificado los monocitos como las células del sistema inmune responsables del aumento en el nivel circulante de esta citoquina. Los

monocitos circulantes de pacientes y modelos animales de cirrosis con ascitis presentan un aumento en la producción espontánea de TNF α (Albillos *et al.*, 2004b; Muñoz *et al.*, 2005). Además, en los pacientes cirróticos se da una correlación directa entre la producción monocitaria y el nivel sérico de esta citoquina (Albillos *et al.*, 2004b) con una sensibilidad aumentada al estímulo con LPS (Deviere *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1995; Albillos *et al.*, 2004b), lo que se traduce en un aumento aún mayor de la producción de TNF α tras este estímulo.

Estos hallazgos han conducido a proponer el TNF α como la diana molecular sobre la que desarrollar estrategias terapéuticas en cirrosis. Diversos estudios han tratado de reducir los efectos de esta citoquina a nivel sistémico en modelos experimentales de cirrosis e hipertensión portal, inhibiendo su síntesis (López-Talavera *et al.*, 1996; López-Talavera *et al.*, 1997), o mediante el bloqueo de esta citoquina utilizando anticuerpos monoclonales anti-TNF α (Iimuro *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999). No obstante, estudios más recientes desarrollados por nuestro grupo de investigación, han demostrado en un modelo experimental de cirrosis por ligadura y sección del conducto biliar (BDL), que el tratamiento con AM3, un inmunomodulador biológico que inhibe específicamente el TNF α producido por los monocitos activados por LPS (Brieva *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2004; De la Hera *et al.*, 2004), no sólo atenúa el estado proinflamatorio sistémico y hepático de las ratas con cirrosis descompensada, sino que disminuye la fibrosis hepática y revierte parcialmente el estado circulatorio hiperdinámico sin aumentar la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Albillos *et al.*, 2010).

5. SISTEMA INMUNE EN LAS INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

Hay numerosos indicios de que los productos bacterianos podrían promover la activación del sistema inmunitario en la cirrosis. En este sentido se ha demostrado la relación entre la activación del sistema inmune y la TB a los GLM, la reducción de este estado de activación tras la decontaminación intestinal con antibióticos y su asociación con un elevado riesgo de infecciones bacterianas espontáneas en los pacientes con elevada concentración plasmática de proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) (Wiest *et al.*, 1999a; Albillos *et al.*, 2003; Genescà *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004a; Muñoz *et al.*, 2005)

La TB a los GLMs ha sido descrita en pacientes y modelos experimentales de cirrosis con ascitis (Runyon *et al.*, 1994; García-Tsao *et al.*, 1995; Perez-Paramo *et al.*,

2000; Genescà *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2005; Guarner *et al.*, 2006). Estudios recientes realizados por nuestro grupo en un modelo experimental de cirrosis con ascitis han demostrado que la activación de las células del sistema inmune en las ratas cirróticas se inicia en los GLMs en respuesta al paso de bacterias y, posteriormente, impacta a nivel sistémico por la recirculación de estas células (Muñoz *et al.*, 2005); además, en la fase compensada de la cirrosis experimental ya se observa TB a los GLMs, en los cuales se genera una respuesta inflamatoria de ámbito local, y una expansión de las células activadas del sistema inmune en la sangre periférica junto con un aumento del nivel de citoquinas proinflamatorias circulantes (Úbeda *et al.*, 2010).

Una vez que las bacterias atraviesan la pared intestinal, son detectadas por las células de la estirpe monocito/dendrítica localizadas en la lámina propia de la mucosa del intestino, que se activan y fagocitan los microorganismos (Turnbull *et al.*, 2001). Pero no sólo las bacterias son capaces de provocar la activación de las células fagocíticas, también los productos bacterianos son capaces de provocar una respuesta innata local (Akira *et al.*, 2001). Esta activación de la respuesta innata depende del reconocimiento específico de moléculas altamente conservadas en la superficie de los patógenos, los PAMPs, entre los que se encuentra, por ejemplo el LPS bacteriano, que la mayor parte de las células mononucleares reconocen por medio de PRRs (Dobrovolskaia *et al.*, 2002) y entre los que se encuentran los TLR más relevantes en cirrosis que, como ya hemos dicho anteriormente, son TLR2, 4 y 9. El LPS se une al receptor CD14 que expresan los monocitos, lo que, a su vez, facilita la posterior interacción de ambas moléculas por el TLR4 en la superficie de estas células. La señalización por esta vía induce en los monocitos la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que desemboca en la liberación de citoquinas proinflamatorias, como el TNF α , la IL-1 β y la IL-6, y de quimioquinas, la liberación del dominio extracelular del receptor CD14 y la expresión de moléculas coestimuladoras como el CD80 y el CD86 y de moléculas de MHC-I y II.

Tras la activación y fagocitosis de las bacterias por células de la estirpe monocito-dendrítica, éstas migran al GLM local, donde presentan péptidos proteicos de las enterobacterias ya procesados a las células T novatas, que se encuentran continuamente recirculando por los órganos linfoides secundarios (Albillos *et al.*, 2006). Si las células Th reconocen su antígeno específico, se activan. También las células B dejan de recircular por los ganglios linfáticos cuando encuentran su antígeno específico, y quedan allí retenidas. La interacción con las células Th activadas favorece la activación de las células B, y se establece así lo que se conoce como un

foco primario de expansión clonal, en el que ambos tipos de linfocitos proliferan. Parte de las células Th activadas quedan retenidas en el GLM, mientras que otras salen a la circulación para desde allí, guiadas por quimioquinas y moléculas de adhesión recién expresadas, alcanzar el tejido periférico inflamado de donde procedía el antígeno que las activó (Young, 1999). Una de las citoquinas liberadas como consecuencia de la presentación antigénica en el GLM es el TNF α . El TNF α posee una función reguladora en la superficie de las células accesorias, los linfocitos T, B y NK, y las células polimorfonucleares (PMN) (Albillos *et al.*, 2006). Esta citoquina, además, es capaz de producir estrés y daño en las células parenquimatosas que causan la generación de reactantes inflamatorios. El TNF α también ejerce una acción morfogénica en los ganglios linfáticos, que favorece la cooperación entre las células accesorias, macrófagos y linfocitos. Por lo tanto, la liberación local de esta citoquina participa en la defensa del tejido infectado. Sin embargo, si las bacterias consiguen burlar los sistemas de defensa y alcanzan la circulación sanguínea, los mismos mecanismos por los que el TNF α contiene la infección local de forma tan eficaz pueden ser letales a nivel sistémico. La sepsis se acompaña de la liberación masiva de TNF α y otras citoquinas proinflamatorias en el bazo, el hígado y otras localizaciones, lo que ocasiona vasodilatación y la pérdida de volumen plasmático por aumento de la permeabilidad vascular que conducen, en última instancia, al shock (Albillos *et al.*, 2006).

En la PBE (una de las infecciones más frecuentes de la cirrosis hepática), la cavidad peritoneal es probablemente el compartimento con la peor defensa en la cirrosis descompensada. De hecho, el LA puede ser considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de peritonitis. En condiciones normales, los mecanismos de defensa de la cavidad peritoneal son muy eficientes y la inyección intraperitoneal de organismos individuales no causa peritonitis a no ser que haya presencia de LA o sustancias adyuvantes (Dunn *et al.* 1984). En la cirrosis, la deficiencia de mecanismos de defensa locales frente a las bacterias, incluyendo la disfunción inmunológica celular y humoral, limita el aclaramiento bacteriano peritoneal. (Wiest *et al.* 2012). La capacidad fagocítica de monocitos/macrófagos residentes es la primera línea de defensa ya que atraen PMN mediante la liberación de factores quimiotácticos y activación del complemento. El MCP-1 es una de las quimioquinas más potentes, y un polimorfismo funcional ha sido propuesto como factor de riesgo para la PBE en cirrosis alcohólica (Gäbele *et al.* 2009). Además, es necesario un gradiente quimiotáctico para reclutar de manera apropiada los neutrófilos a la cavidad peritoneal. Quimioatrayentes de PMN como Zymosan son muy efectivos a la hora de la prevención de la muerte de

animales con peritonitis inducida con *E.coli* cuando se administra localmente aunque no sistémicamente (**Joyce et al. 1978**). Desafortunadamente, poco se conoce sobre la afluencia, flujo de salida y la cinética de los neutrófilos de LA en la cirrosis y de su dependencia al tipo, alcance y duración del estímulo bacteriano.

5.1 Uso de medicamentos en las infecciones bacterianas en la cirrosis

La profilaxis antimicrobiana es una de las opciones para prevenir el riesgo de infecciones bacterianas en la cirrosis. Así, por ejemplo, en estudios realizados por nuestro grupo se ha observado una reducción del estado de activación inmune tras la decontaminación intestinal con norfloxacino (**Albillos et al., 2003; Albillos et al., 2004b; Muñoz et al., 2005**). También se ha demostrado que el uso de fluoroquinolonas o sulfametoxazol/trimetoprim en pacientes con PBE previa disminuye los episodios de PBE (**Rimola et al., 2000**). Por el contrario, esta profilaxis de la PBE se ha asociado con el desarrollo de la bacteria *Clostridium difficile* (**Bajaj et al., 2010**). Una opción alternativa y actualmente en emergencia en la modulación de las infecciones en la cirrosis es el uso de antibióticos no absorbibles como la rifaximina que parece desempeñar un papel protector en la endotoxemia y la PBE (**Bass et al., 2010; Kalambokis et al., 2012**). Por otro lado, en un estudio comparativo en pacientes cirróticos con PBE se observó que la administración adyuvante de altas dosis de albúmina (1,5g/Kg en el día 1 y 1g/Kg en el día 3) junto con tratamiento antibiótico previene el empeoramiento de la función renal (**Singh et al. 2003**). Sin embargo, este régimen es principalmente efectivo en pacientes de alto riesgo caracterizados por un nivel de bilirrubina sérica mayor a 4mg/dl. Además, en pacientes no seleccionados con PBE, incluso a dosis bajas de albúmina (10g/día en los días 1-3), se ha demostrado una reducción de los niveles séricos y ascíticos de TNF α e IL-6 y una prevención del incremento en suero de NOx inducida por PBE (**Heo et al. 2009**).

Los inhibidores de la bomba de protones (IBPs) se encuentran entre los medicamentos más prescritos en la cirrosis (**Chavez-Tapia et al., 2008**). Sin embargo, los IBPs predisponen al SBI, afectan negativamente a la función inmune y contribuyen a la TB (**Kedika et al., 2009**). Así, varios estudios retrospectivos han revelado una fuerte asociación entre el uso de IBPs y el desarrollo de PBE y de *Clostridium difficile* (**Bajaj et al., 2009; Bajaj et al., 2010; Trikudanathan et al., 2011**).

Otra asociación aparentemente contradictoria sobre el resultado negativo de las infecciones en la cirrosis es el efecto de los β -bloqueantes no selectivos (BBNSs).

Algunos estudios han mostrado su beneficio a través de una reducción en el desarrollo de PBE (**Senzolo et al., 2009; Krag et al., 2011**). A la inversa, un estudio reciente muestra que el uso de BBNSs parece disminuir la supervivencia en el caso concreto de pacientes con ascitis refractaria (**Serste et al., 2010**). Tales resultados anteriores han dado lugar a la denominada "hipótesis de ventana", la cual sugiere que los BBNSs solamente mejoran el resultado en un estrecho margen o ventana de la historia natural de la cirrosis, concretamente entre los pacientes que presentan varices esofágicas de tamaño mediano a grandes antes del desarrollo de la enfermedad hepática en fase avanzada (**Krag et al., 2012**).

Por lo tanto, son necesarios estudios adicionales en este ámbito para precisar el papel y uso clínico de antibióticos, IBPs y BBNSs en la aparición de cepas bacterianas multirresistentes, y para reducir las infecciones y la mortalidad en la cirrosis.

6. JUSTIFICACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

El modelo experimental de cirrosis por BDL que se ha elegido para este estudio ha sido utilizado en un gran número de trabajos de cirrosis experimental (**Bosch et al., 1992**) y se caracteriza hemodinámicamente por el desarrollo de hipertensión portal y de síndrome de circulación hiperdinámica (**Sikuler et al., 1991; Fernandez et al., 1993; Braillon et al., 1993**). Este síndrome cursa con disminución de las resistencias vasculares sistémicas, disminución de la presión arterial media y aumento del gasto cardíaco (**Colombato et al., 1992**).

Alrededor de la sexta semana tras la inducción del modelo, aparecen lesiones histológicas compatibles con cirrosis biliar que incluyen necrosis marcada de los hepatocitos, inflamación, proliferación de los conductos biliares y fibrosis (**Corbin et al., 2003**).

Es un modelo fiable, en que la cirrosis y sus complicaciones como las alteraciones hemodinámicas o la ascitis se desarrollan de forma rápida, homogénea y altamente reproducible. Esto permite diseñar un estudio en el que se controlen la aparición de signos como la ascitis que se observa en torno a la tercera semana tras la inducción del modelo y que los experimentos se lleven a cabo en un estadio avanzado de la enfermedad. La heterogeneidad y longitud en el tiempo de otros modelos experimentales de cirrosis habrían hecho más complejo y menos reproducible el estudio.

Otra ventaja de la utilización de animales con ligadura del conducto biliar es que no hay un tóxico externo que actúe directamente sobre el hígado, como sucede en el caso de modelos clásicos de cirrosis experimental tales como la administración de tetracloruro de carbono o dimetilnitrosamina (**Bosch et al., 1992**). Este efecto tóxico podría interferir en los resultados de nuestro estudio.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Un hecho característico de la cirrosis hepática es la susceptibilidad incrementada a la infección por bacterias de origen entérico. Las bases patogénicas de esta alteración pudieran ser diversas anomalías del funcionamiento del sistema inmune que se han descrito en la cirrosis, que incluyen defectos en la función fagocítica de los neutrófilos, supresión de la actividad de las células NK, alteraciones en la función de las células dendríticas intestinales, expansión de los monocitos de sangre periférica productores de TNF α , respuesta disminuida a la activación y a la proliferación de los linfocitos B, así como activación de las células T circulantes con aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo, son escasos los estudios que han caracterizado los cambios inmunológicos a nivel peritoneal en la cirrosis, así como las alteraciones producidas, tanto a nivel peritoneal como sistémico, tras la inducción de la infección, y que podrían explicar la incapacidad del sistema inmune para contener la diseminación de las bacterias.

Nuestro grupo ha demostrado que las células dendríticas de la mucosa intestinal de las ratas cirróticas con traslocación bacteriana sufren la transición de un estado de maduración y activación adecuado a un estado de tolerancia, con reducida capacidad fagocítica y de presentación de antígenos. Este proceso se cree que es consecuencia de la elevada presión antigénica a la que están sometidas las células del sistema inmune en la cirrosis. Se ha prestado escasa atención a la caracterización y comportamiento funcional de células del sistema inmune a nivel peritoneal, a pesar que la peritonitis bacteriana espontánea es la infección más frecuente y característica de la cirrosis. Sin embargo, de forma similar a lo observado a nivel intestinal y sistémico, un ambiente inflamatorio como consecuencia de la exposición continua a bacterias pudiera causar la activación crónica de las células del sistema inmune del líquido ascítico, y el posterior deterioro de su función, lo que contribuiría a la diseminación de la infección.

Con el objeto de responder a estos interrogantes, analizamos la TB y la diseminación bacteriana en un modelo experimental de cirrosis biliar, caracterizamos las alteraciones de las células del sistema inmune a nivel peritoneal y sistémico, y evaluamos el efecto de la inducción de peritonitis bacteriana en los parámetros anteriormente mencionados.

Nuestra hipótesis establece que la cirrosis se asocia a un estado crónico de inflamación del sistema inmune, tanto a nivel peritoneal como sistémico, que es consecuencia del estímulo bacteriano persistente, que podría dar lugar a una

incapacidad de las células inmunitarias de responder a la infección, y que favorecería la diseminación bacteriana.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es investigar si existe un mal funcionamiento del sistema inmune que facilite la diseminación de las infecciones bacterianas en la cirrosis experimental.

Para alcanzar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar si la traslocación y la diseminación bacteriana tras una una peritonitis inducida son mayores en ratas con cirrosis experimental.
2. Evaluar si existen diferencias en las alteraciones de las células del sistema inmune en la circulación sistémica y en la cavidad peritoneal entre ratas con cirrosis experimental y controles, basalmente y tras la inducción de peritonitis bacteriana.
3. Analizar el perfil de producción de citoquinas por las células del sistema inmune en la circulación sistémica y en la cavidad peritoneal entre ratas con cirrosis experimental y controles, basalmente y tras la inducción de peritonitis bacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS EXPERIMENTALES

1.1 Cirrosis por ligadura y sección del conducto biliar.

El desarrollo de cirrosis por BDL comienza dos semanas después de la inducción del modelo (**Kountouras et al., 1984**) y a las cuatro semanas todos los animales intervenidos presentan la enfermedad (**Poo et al., 1997**). Tres semanas después de la inducción de cirrosis, algunos animales comienzan a desarrollar ascitis, y a las seis semanas la ascitis se detecta en todos los animales. Este modelo de inducción de cirrosis es de desarrollo rápido, reproducible y homogéneo, y el porcentaje de colaterales portosistémicas que desarrollan estos animales es intermedio (en torno al 40%) en comparación con los otros dos modelos clásicos de hipertensión portal, la estenosis parcial de la vena porta (90-95%) y la cirrosis por administración de tetracloruro de carbono, modelo en que el grado de colateralización es bajo y muy variable (en torno al 30%) (**Vorobioff et al., 1984; Colombato et al., 1990; Bosch et al., 1992**). La mortalidad referida del modelo es de un 20-35% (**Colombato et al., 1990; Fernández et al., 1993**). La duración del modelo en nuestro caso fue de 5 semanas, con objeto de que los animales tuvieran ascitis y se encontraran en un momento evolutivo tardío de la enfermedad.

Se utilizaron 49 ratas Wistar macho de 140±13 gramos de peso suministradas por el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá. Fueron estabuladas en jaulas individuales y sometidas a un ambiente controlado con temperatura constante de 21°C y 12 horas de ciclo luz/oscuridad. Los animales tuvieron libre acceso al agua y a dieta estándar de rata, y todos los experimentos se llevaron a cabo según la normativa vigente sobre Experimentación y Protección de los Animales utilizados en Experimentación y otros Fines Científicos reflejada en el Real Decreto R.D. 1201/2005, de 10 de octubre de 2005.

Tras ayuno nocturno, los animales fueron anestesiados con sevoflurano (Sevorane; Abbott Laboratorios, Madrid, España) por vía inhalatoria. Una vez preparado el campo operatorio y en condiciones de esterilidad, se practicó una laparotomía sagital a nivel de la línea alba, extrayendo el paquete intestinal y envolviéndolo cuidadosamente en gasas estériles empapadas con suero salino estéril (SSE) a 37°C, permitiéndose así el acceso al hilio hepático. A continuación, se disecó el conducto biliar y se pasaron dos ligaduras de hilo de seda de 5/0. Una de ellas se colocó en posición distal, inmediatamente por debajo de la bifurcación de los

conductos biliares hepáticos, y la otra con disposición proximal, por encima de la unión con el conducto pancreático. Tras cerrar con un nudo doble la ligadura proximal, se instiló formaldehído al 10% (**Colombato et al., 1994**) en el conducto biliar de manera retrógrada, y a dosis de 120µl/100g de peso del animal, e inmediatamente se procedió a cerrar la ligadura distal de igual forma que la anterior. Seguidamente, se cortó el conducto biliar entre las dos ligaduras, para evitar una posible recanalización y se instilaron en la zona 2 ml de SSE a 37°C, empapando también con él el paquete intestinal antes de reintroducirlo en la cavidad abdominal. Posteriormente, se cerró la pared del abdomen en dos planos, el profundo con sutura continua (con hilo de seda de 5/0) y el más superficial con sutura discontinua (con hilo de seda de 3/0). Al término de la operación, se administraron 50µg de vitamina K por vía subcutánea (**Beck et al., 1995**), inyección que se repitió semanalmente hasta finalizar el tiempo correspondiente al desarrollo del modelo. Tras desinfectar la zona y marcar a los animales, se les dejó recuperarse en una jaula individual con calor. La eficacia del modelo se constató observando la orina colúrica a las 48 horas de la intervención.

Con los animales a los que se practicó cirugía simulada, que en este estudio los denominaremos ratas control, se realizó una laparotomía y únicamente se disecó el conducto biliar, sin hacer ninguna otra manipulación a ese nivel.

1.2 Peritonitis bacteriana Inducida por inyección intraperitoneal de *Escherichia coli*

1.2.1 Transfección de *Escherichia coli* con el plásmido resistente a ampicilina

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, circular y generalmente de pequeño tamaño que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del ADN cromosómico. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibiótico.

En nuestro caso se utilizó un plásmido con resistencia al antibiótico ampicilina (Figura 1), cuya presencia permite seleccionar las bacterias que portan estos plásmidos, gracias a su capacidad para crecer en presencia de dicho antibiótico (el gen de resistencia codifica una beta lactamasa, enzima que degrada la ampicilina).

Para llevar a cabo la transfección se utilizaron 2 cepas diferentes de *E.coli*, la cepa DH5 α , en la cual se propagó el plásmido con resistencia a ampicilina mediante choque térmico, y la cepa BL21, donde se llevó a cabo la multiplicación del mismo. Esta cepa BL21 posee una deficiencia de proteasas lo que evita degradar los productos recombinantes y permite una alta eficiencia de transformación con un plásmido modificado. Por ello se seleccionó esta cepa de *E.coli* para la replicación del plásmido con resistencia a ampicilina y su posterior inyección en los animales objeto de estudio.

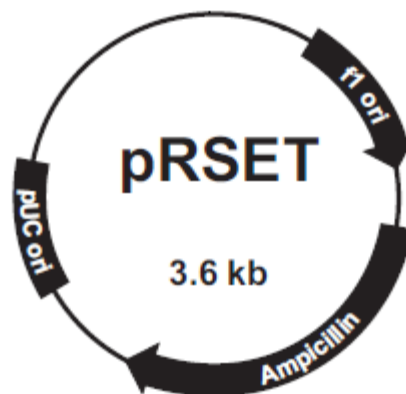


Figura 1. Plásmido con el gen de resistencia a ampicilina.

1.2.2 Inducción de peritonitis bacteriana

Las bacterias *E.coli* fueron previamente transfectadas con el plásmido que llevaba incorporada la resistencia al antibiótico ampicilina. A continuación, se cultivaron en medio de cultivo Luria Bertani suplementado con ampicilina (LB/amp) toda la noche, se midió su concentración mediante nefelometría y se verificó posteriormente por recuento en placa LB/amp.

El modelo de peritonitis bacteriana inducida (PBI) con *E.coli*-ampicilina⁺ se realizó tanto en ratas a las que se les había practicado la cirugía BDL (ratas cirróticas), como en ratas control (cirugía simulada). Cada experimento de inducción se realizó de forma pareada (en una rata cirrótica y en una rata control), para tener exactamente las mismas condiciones.

Tras ayuno nocturno, los animales se anestesiaron con Sevoflurano por vía inhalatoria. Una vez preparado el campo operatorio, y en condiciones de esterilidad, se llevó a cabo la PBI mediante inyección intraperitoneal de *E.coli*-ampicilina⁺, con aguja

de 18G, y a una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (cfu)/ml en 3 ml de SSE.

Transcurridas 2 horas tras la PBI, se sacrificaron a los animales.

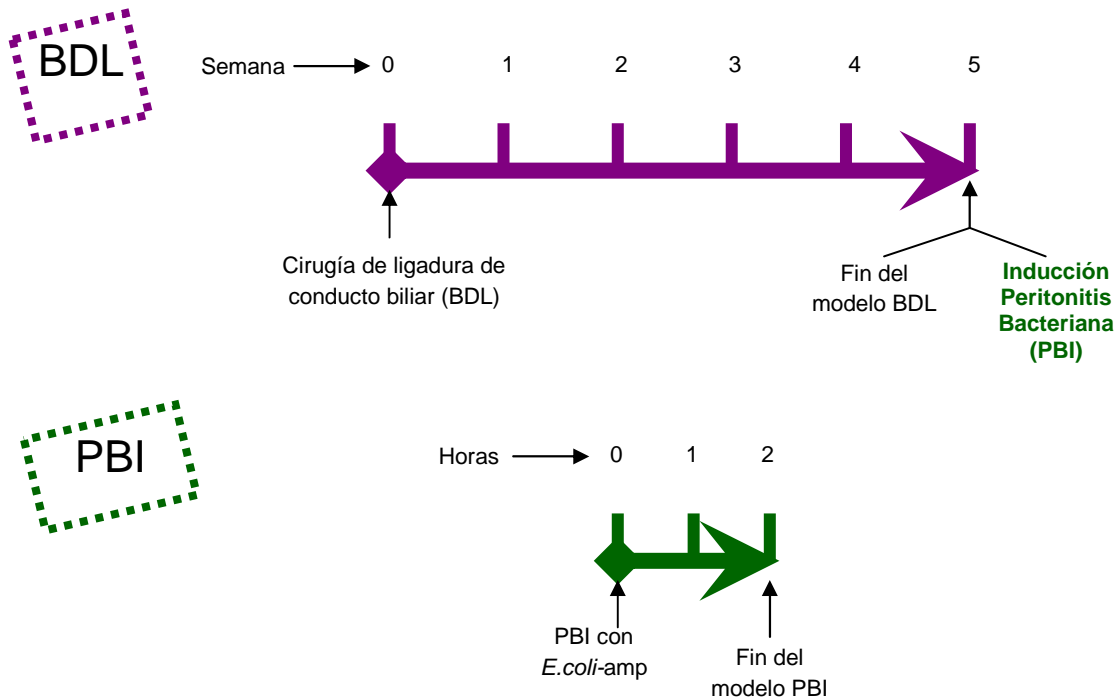


Figura 1. Diseño experimental

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio fue determinar las alteraciones inmunológicas en LA/peritoneal y en sangre periférica en ratas cirróticas y en ratas control tras la PBI. También se evaluó la diseminación bacteriana a los distintos tejidos incluidos en el estudio que fueron GLM, hígado, bazo y pulmón en los modelos experimentales anteriormente descritos, que son:

- Ratas cirróticas PBI (n=9)
- Ratas control PBI (n=12)
- Ratas cirróticas con inyección intraperitoneal de SSE (n=11)
- Ratas control con inyección intraperitoneal de SSE (n=17)

Los experimentos se llevaron a cabo 5 semanas después de inducir el desarrollo de cirrosis mediante BDL o de la cirugía simulada y 2 horas después de la PBI o de la inyección de SSE.

Una vez transcurrido ese tiempo, se anestesió de nuevo al animal con Sevoflurano por vía inhalatoria para así comenzar el estudio.

Posteriormente en las ratas control se inyectaron intraperitonealmente 20 ml de SSE a 4°C con aguja de 18G. Se realizó un masaje abdominal durante un minuto, para promover la separación de las células adheridas al peritoneo, y posteriormente una laparotomía sagital a nivel de la línea alba, para recoger el líquido peritoneal inyectado. En las ratas cirróticas se procedió a recoger directamente el LA.

Del LA/líquido peritoneal obtenido se recogió una alícuota de 1 ml, que se congeló para análisis posteriores, y 2 alícuotas más para cultivar en medio con y sin ampicilina. El volumen de líquido peritoneal/ascítico restante se llevó hasta 50 ml de solución salina equilibrada de Hank sin Ca^{++} ni Mg^{++} (HBSS sin Ca^{++} ni Mg^{++} ; BioWhittaker, Verviers, Belgica), se centrifugó a 1350 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, y se resuspendió en Medio Modificado de Eagle Dulbecco's (DMEM; BioWhittaker, Verviers, Bélgica) suplementado con glucosa (4.5 g/l), L-Glutamina, 10% de suero fetal de carnero (FCS; Gibco, Grand Island, NY, USA), 25 mM de HEPES (BioWittaker) y 1% de penicilina-estreptomicina (Whitaker Bioproducts), para llevar a cabo el conteo celular en cámara de Neubauer.

Se ajustaron las células a $1 \times 10^6/\text{ml}$ para realizar el estudio inmunofenotípico de las diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares.

Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de sangre a través de la aorta con equipo alado 21G (Vacutainer®) y los PBMCs se separaron por el método de centrifugación por gradiente de densidad (Ficoll-Paque. Amersham Biosciences, Sweden). Dos alícuotas de 1ml de plasma se congelaron a -80°C para posteriores determinaciones.

Recogida de muestras:

Una vez realizada la laparotomía sagital y recolectado el fluido peritoneal/ascítico y la sangre, se llevó a cabo la toma de muestras tisulares (utilizando material estéril en la toma de cada muestra, para evitar contaminación de un tejido a otro):

- Se aisló toda la cadena de GLM y se pesaron en una balanza de precisión.
- Se aisló una muestra de hígado, bazo, pulmón y se pesaron en una balanza de precisión.

Se llevó a cabo la homogeneización de cada tejido con una relación 1:2 (mg peso:µl SSE) en potter o ultra turrax T10 IKA (este último en el caso del hígado y pulmón cirróticos) y posteriormente se cultivaron 100 µl del homogenado en medio Luria Bertani sin y con ampicilina (LB y LB/amp).

3. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Los homogenados de GLM, hígado, bazo y pulmón se sembraron en placas de LB y LB/amp, se incubaron a 37°C durante 48 horas y se evaluó la presencia de bacterias, así como el recuento de cfu para el posterior cálculo de las cfu/g de tejido. La TB se definió como la presencia de microorganismos viables en los GLM.

4. ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE DE LÍQUIDO PERITONEAL/ASCÍTICO Y SANGRE

Las PBMCs se separaron por el método de centrifugación por gradiente de densidad, mientras que las células mononucleares del LA y peritoneal se lavaron en medio HBSS. Después de contarlas con una cámara de Neubauer, las células se resuspendieron en medio completo DMEM a una concentración de 1×10^6 células/ml.

4.1 Expresión de antígenos de superficie

La distribución de monocitos, células B, T y NK de sangre periférica y LA/líquido peritoneal se determinaron por inmunofluorescencia de cuatro colores y citometría de flujo cuantitativa en un citómetro FACScalibur, usando el programa Cell Quest (Becton-Dickinson, San José, CA) para el análisis de datos. Las suspensiones celulares se incubaron con anticuerpos monoclonales marcados con combinaciones de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína peridín clorofila (PerCP) y alofocianina (APC). Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón específicos frente a los diferentes antígenos de rata objeto de estudio (Tabla 1).

Los anticuerpos monoclonales anti- CD3-APC (1F4), anti- CD4-PE y PerCP (OX 38), anti- CD8α-PerCP (OX 8), anti- CD134-FITC (OX 40), anti- CD45RC-FITC (OX 22), anti- CD62L-PE (HRL1), anti- CD45RA-FITC y PerCP (OX 33), anti- RT1B-

PerCP (OX 6), anti- CD86-FITC y PE (24F) y anti- NK-RP1A-PE (10/78) se obtuvieron de Pharmingen (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Los anticuerpos monoclonales anti- CD11b-AlexaFluor647 (OX 42) y anti- CD43-FITC (W3/13) se obtuvieron de Serotec (Kidlington, Oxford, UK).

Tabla 1. Criterios de definición para las poblaciones del sistema inmune examinadas.

| Subpoblación de células del sistema inmune | Función asociada con los receptores de superficie indicados |
|---|---|
| Células T | |
| CD3 | Módulo de transducción de señal del receptor de células T para antígenos (complejo TCR/CD3). Expresado por todos los subgrupos de células T. |
| CD4 | Co-receptor del complejo TCR/CD3 que reconoce antígenos presentados en moléculas de MHC de clase II. Identifica células Th. También lo expresan determinadas subpoblaciones de monocitos, macrófagos y DCs. |
| CD8 | Co-receptor del complejo TCR/CD3 que reconoce antígenos presentados en moléculas de MHC de clase I. Identifica células Tc. También lo expresan la mayoría de células NK. |
| CD45RC | Isoforma del antígeno leucocitario común que identifica células T que no han tenido experiencia antigénica y que se internaliza tras la activación con su antígeno específico (Spickett et al., 1983; Ramírez et al., 2000; Subra et al., 2001). |
| CD62L | Miembro de la familia de las selectinas definido como receptor de recirculación a órganos linfoides por los linfocitos T. Rápidamente eliminado tras la activación celular, sus niveles en la membrana celular permiten diferenciar los linfocitos vírgenes de los efectores/memoria (Sallusto et al., 1999; Von Andrian et al., 2000; Sallusto et al., 2004). |
| CD134 | Miembro de la familia del receptor de TNF α . Se expresa por células Th recientemente activadas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Participa en la coestimulación entre los linfocitos T y B (Paterson et al., 1987; Weinberg et al., 1994; Roos et al., 1998; Broker et al., 1999). |
| NK-RP1A débil | Receptor de reconocimiento de moléculas de MHC de clase I no clásicas expresado con intensidad intermedia por un subgrupo de |

linfocitos T denominados NK-T.

Células B

- CD45RA Isoforma de alto peso molecular del CD45 presente en los linfocitos B de rata (**Woollett et al., 1985**)
- CD86 Ig de membrana que se expresa en las APCs. Molécula coestimuladora que media en la adhesión y activación de las células T, así como en la producción de citoquinas por parte de la propia APC.

Células NK

- NK-RP1A brillante Receptor de reconocimiento de moléculas de MHC de clase I no clásicas expresado en alta intensidad por las células NK. Pertenece a la familia de las lectinas dependientes de calcio y actúa como una proteína transmembrana receptora en las células NK, con especificidad para carbohidratos y con propiedad de transmitir señales vía proteinkinasa p56lck (**Yokoyama et al., 1993; Scriba et al., 1998**)

Monocitos

- CD11b brillante Cadena α M de la integrina CR3 (también llamada Mac-1), presente en células de linaje mieloide, y cuya expresión aumenta en la superficie de estas células tras su activación (**Tamatani et al., 1991**).
- RT1B MHC de clase II. Responsable de la presentación de antígenos a las células Th. Su expresión se induce en la superficie de los monocitos tras su activación.
- NKR-P1A medio Receptor de reconocimiento de moléculas de MHC de clase I no clásicas expresado con intensidad intermedia por los monocitos activados.
- CD43 débil También conocido como leucosialina y sialoforina, es una glicoproteína glicosilada que se expresa en la superficie de todos los leucocitos excepto las células B. Los monocitos se dividen en inflamatorios y residentes en base a su distinta capacidad migratoria y al nivel de expresión de este marcador. (**Yrlid et al., 2006**).

Una vez alicuotadas las suspensiones celulares de cada tejido objeto de estudio en los correspondientes tubos de citometría, se añadieron 10µl/pocillo de un anticuerpo específico para el CD32 (CD32-Puro), que es el receptor y de la región Fc de tipo II de baja afinidad expresado en la superficie de los monocitos, los granulocitos, las células B y los eosinófilos (**Simmons et al., 1988**). El objetivo de la incubación con este anticuerpo monoclonal fue bloquear estos receptores, evitando así la posible unión inespecífica de los anticuerpos monoclonales objeto de estudio que se incubaron posteriormente.

Tras 10 minutos de incubación a 4°C en oscuridad, se añadieron 10µl de cada anticuerpo de acuerdo al panel inmunofenotípico indicado (Tabla 2), y se incubaron 20 minutos, a 4°C y en oscuridad.

Tabla 2. Panel inmunofenotípico

| FITC | PE | PerCP | APC |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|
| Control - IgG | Control - IgG2β | Control - IgG | Control - IgM |
| CD134 | CD4 | CD8α | CD3 |
| CD45RC | CD62L | CD4 | CD3 |
| CD45RC | CD62L | CD8α | CD3 |
| CD43 | NKRP1A | RT1b | CD11b |
| CD3+CD45RA | CD86 | CD4 | CD11b |
| CD86 | NKRP1A | CD45RA | CD3 |
| Anexina V | CD45 | 7AAD | CD3 |

Posteriormente, se lavaron las células con 2ml/tubo de HBSS al 10% de FCS y se centrifugaron a 1300rpm durante 5 minutos a 4°C. Después se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células de cada tubo en 200µl de tampón fosfato salino (PBS) para su adquisición en el citómetro.

Para la determinación de la autofluorescencia o control negativo de las células, se incluyó un tubo de inmunofenotipo al que no se le añadió ningún anticuerpo monoclonal. El control de la unión inespecífica de los anticuerpos monoclonales se estableció incubando las células con una mezcla de Ig con fluorocromos que emiten luz en los 4 colores y del mismo isotipo que los anticuerpos utilizados en el resto del fenotipo, pero específicos de células de ratón (Tabla 2).

Los valores de números absolutos de las diferentes subpoblaciones celulares estudiadas se calcularon multiplicando el número total de células obtenidas en cada compartimento por el porcentaje de cada una de estas subpoblaciones determinado por citometría de flujo.

4.2 Expresión de marcadores intracelulares

A continuación, se realizó un marcaje de superficie de las células cultivadas, para identificar las poblaciones objeto de estudio.

Posteriormente, las células fueron fijadas con formaldehído (PanReac Química SLU, Barcelona, España) al 4% y permeabilizadas con saponina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 5% en HBSS para facilitar la entrada de anticuerpos marcados con PE dirigidos contra las citoquinas TNF α e IFN γ del interior de la célula (BD Pharmingen) (Palmlad *et al.*, 2000). La producción intracitoplasmática espontánea de citoquinas se ensayó en suspensiones de células mononucleares incubadas 2,5 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (CO₂) y en medio completo DMEM. Para evitar la secreción de las citoquinas, se añadió monensina (2 μ M; Sigma-Aldrich) al medio de cultivo.

Se sabe que las células Th cesan de producir citoquinas rápidamente después de la disociación de su interacción *in vivo* con las APC, como los monocitos (Sojka *et al.*, 2004). El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), promueve *ex vivo* la producción de citoquinas de manera selectiva en la subpoblación de células T que han estado produciéndolas recientemente *in vivo* (Palmlad *et al.*, 2000). Así pues, la producción intracitoplasmática de citoquinas se determinó tras cultivar las células 2,5 horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y con PMA (0,05 μ g/ml; Sigma Chemical Co.) e ionomicina (1 μ g/ml; Calbiochem-Novabiochem Corp., California, USA). Además, el cultivo se realizó en presencia de monensina, que, al inhibir el transporte de vesículas del aparato de Golgi, impide la secreción de las citoquinas al medio de cultivo. También se usó LPS para estimular la producción de citoquinas por monocitos.

4.3 Determinación de mediadores inflamatorios solubles en líquido peritoneal/ascítico y plasma

Una alícuota de la sangre obtenida por punción de la aorta se empleó para las determinaciones plasmáticas. Para ello se centrifugó la sangre a 2000 rpm durante 20

minutos, se recogió el sobrenadante, se alicuotó, y la muestra de plasma se conservó a -80 °C hasta el momento del análisis.

Se utilizaron kits comerciales de ensayo inmunoabsorbente conjugado a enzimas (ELISA), para determinar los niveles de TNF α (ELISA Kit Rat TNF- α , Invitrogen Corporation, Camarillo, CA) e IFN γ (ELISA Kit Rat IFN- γ , Invitrogen Corporation, Camarillo, CA), de acuerdo con las instrucciones indicadas en los kits. Los umbrales de sensibilidad de los kits fueron de 4 pg/mL para el TNF α y 13 pg/mL para el IFN γ . Las densidades ópticas se determinaron en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories, S.A., Madrid, España) con un filtro de 450 nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se consideró el valor de la media.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SPSS 19.0 para el análisis estadístico y Sigma Plot 12.0 para la representación gráfica de los datos. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las variables cuantitativas se analizaron mediante U de Mann Whitney, y las variables cualitativas se analizaron mediante el test exacto de Fisher. En el caso de comparaciones pareadas, se usó el test de Wilcoxon. El nivel de significación estadística se acordó en $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. TRASLOCACIÓN Y/O DISEMINACIÓN BACTERIANA TISULAR

Utilizamos un modelo experimental de cirrosis hepática por BDL y estudiamos la TB y/o diseminación bacteriana a diferentes compartimentos anatómicos después de administrarles intraperitonealmente SSE o una concentración conocida de *E. coli* resistente a ampicilina, en este último caso con el fin de inducirles peritonitis bacteriana.

Como grupo control utilizamos ratas con cirugía simulada (sham) a las que aleatorizamos para recibir la inyección intraperitoneal de *E.coli* o SSE.

Para determinar el crecimiento de las bacterias inyectadas en el peritoneo (diseminación bacteriana), se utilizó el medio de cultivo LB/amp, para asegurar el crecimiento único de dicha bacteria.

1.1 Ratas control y cirróticas

Tras realizar el estudio de TB y diseminación bacteriana tisular mediante crecimiento bacteriano positivo en placas LB, se observó que en aquellas ratas cirróticas a las que se les había inyectado SSE intraperitoneal, había una mayor incidencia de TB GLM, así como diseminación a pulmón, hígado y bazo, que en las ratas control, estadísticamente significativa en el caso de las muestras de GLM con una $p < 0,05$ (Figura 1).

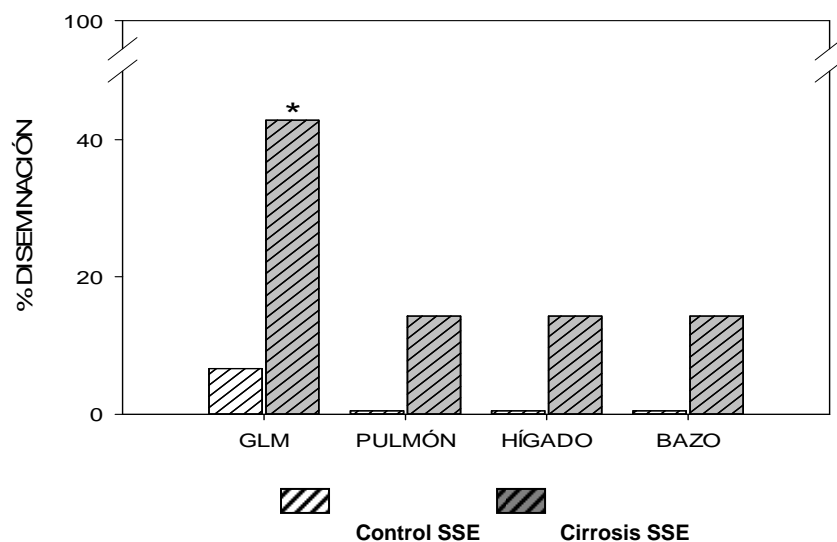


Figura 1. Diseminación bacteriana a GLM, pulmón, hígado y bazo de ratas control y cirrosis. * $p < 0,05$ vs. control. La diseminación bacteriana a GLM y a los demás tejidos está aumentada en ratas con cirrosis.

1.2 Ratas control y cirróticas tras la inducción de peritonitis bacteriana

La PBI dio lugar a una intensificación de la diseminación de las bacterias en todos los tejidos, tanto en ratas con cirrosis como en ratas control (Figura 2).

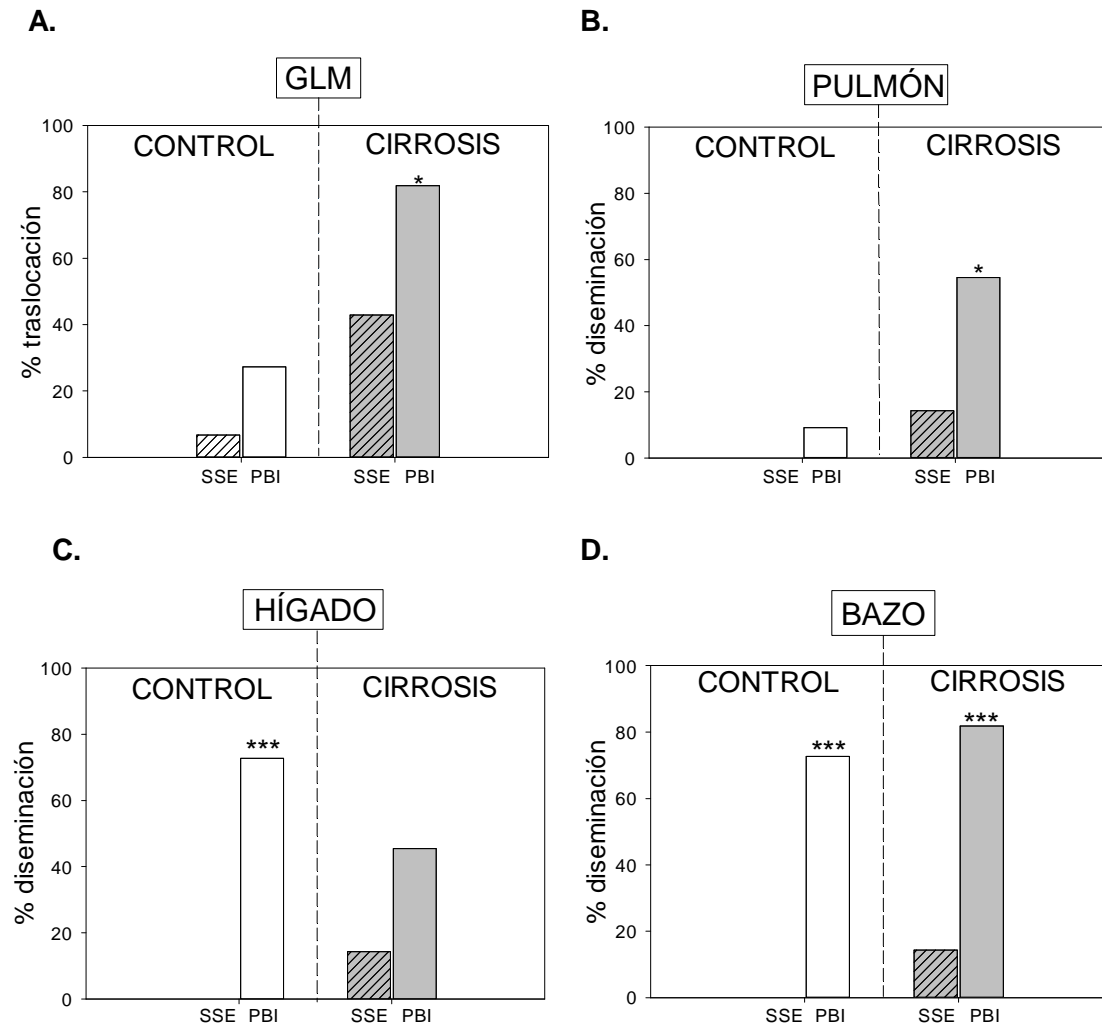


Figura 2. Diseminación bacteriana en GLM (A.), pulmón (B.), hígado (C.) y bazo (D.) de ratas control (SSE), control PBI (PBI), cirrosis (SSE) y cirrosis PBI (PBI). * $p < 0,05$ vs. SSE, *** $p < 0,01$ vs. SSE. La inducción de peritonitis bacteriana causó un aumento en la diseminación de bacterias a todos los tejidos. Esto ocurre tanto en ratas con cirrosis como en ratas control.

En las ratas PBI (tanto en el grupo control como en el cirrótico) también se pudo observar la frecuencia de crecimientos positivos de *E.coli*-ampicilina⁺ mediante cultivo en medio LB/amp, es decir, frecuencia de crecimiento de los microorganismos que se inyectaron intraperitonealmente para la inducción de dicha peritonitis. Esta

diseminación fue superior en ratas cirróticas que en controles en GLM y tejido pulmonar, igual en tejido esplénico e inferior en tejido hepático (Figura 3).

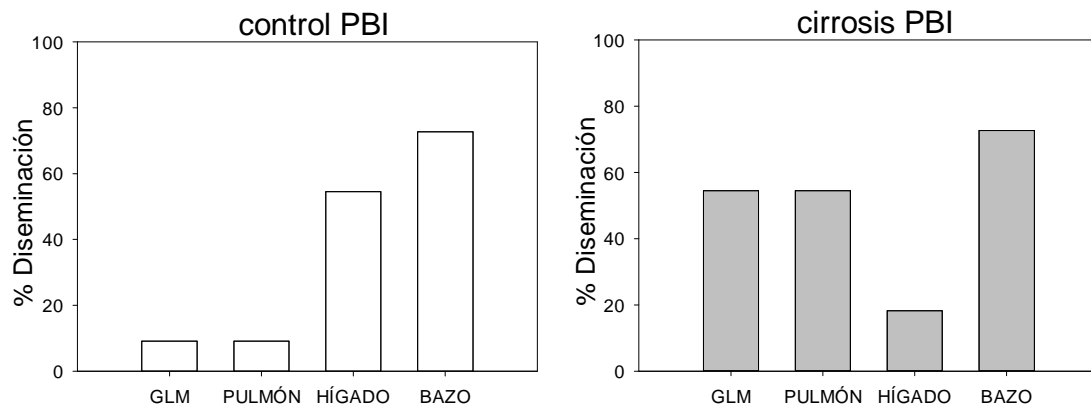


Figura 3. Diseminación bacteriana positiva en GLM, pulmón, hígado y bazo de ratas control PBI (□) y cirrosis PBI (■). Hay una mayor diseminación de bacterias inyectadas intraperitonealmente en las ratas cirróticas excepto en hígado en el que el porcentaje de diseminación se invierte.

En ratas PBI, las diferencias entre TB y/o diseminación medida en placas LB (en las cuales crecen todos los microorganismos presentes en el tejido) y placas LB/amp (en las que únicamente crecen las bacterias *E.coli*-ampicilina⁺ inyectadas en el peritoneo), permite diferenciar el porcentaje de diseminación de bacterias endógenas de las inyectadas en el peritoneo en las ratas objeto de estudio. Según esto, en el 33% de las ratas cirróticas con TB ésta fue debida al paso de bacterias endógenas a los GLM. De forma similar, el 60% de las ratas con bacterias presentes en hígado y el 11% de las que diseminaron a bazo fueron las propias del animal. Sin embargo, de todas las ratas cirróticas que tuvieron diseminación positiva a pulmón, ninguna de ellas lo hizo mediante paso de bacterias endógenas. A diferencia de lo observado en ratas cirróticas, en las ratas control, el porcentaje de TB endógena a GLM fue del 66% y la diseminación a hígado del 25%, mientras que no se observó diseminación endógena en el pulmón ni en el bazo (Figura 4).

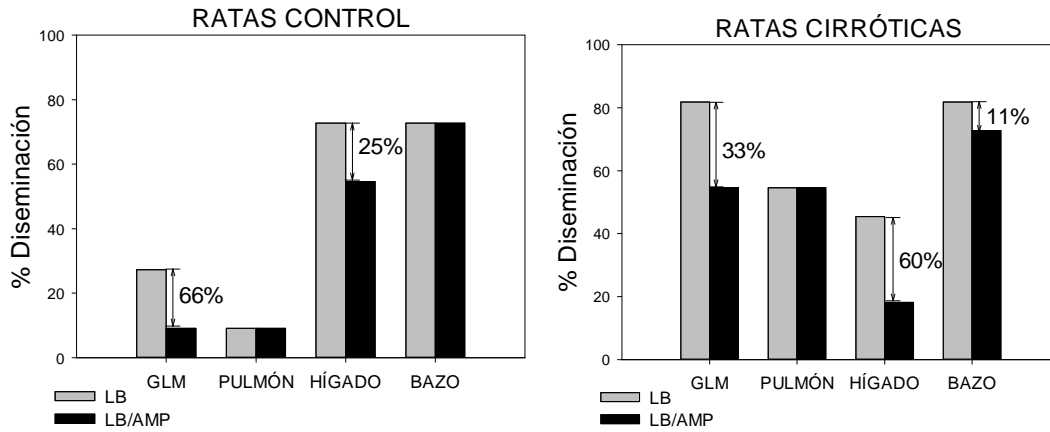


Figura 4. Diseminación endógena a GLM, pulmón, hígado y bazo de ratas control y cirróticas con peritonitis inducida. Tras la inducción de peritonitis bacteriana se observó un aumento en la diseminación de bacterias endógenas en hígado y bazo de ratas cirróticas.

También pudimos observar que según la carga bacteriana medida por cfu/g de tejido, hay una mayor cantidad de bacterias capaces de colonizar los tejidos en las ratas cirróticas que en los controles (*media±DS*) ($37±6$ vs. $0±3$ cfu/g), que se intensifica cuando realizamos la PBI ($1897±991$ vs. $689±467$ cfu/g). Por tanto, la diseminación bacteriana fue superior en las ratas con PBI, y especialmente en aquellas que sufrían cirrosis (Figura 5).

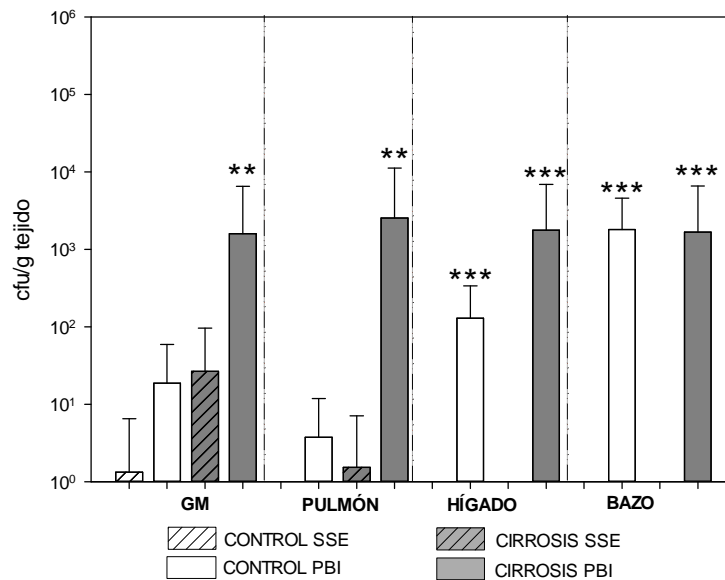


Figura 5. Carga bacteriana tisular medida como cfu presentes en cada tejido de las ratas control, control PBI, cirrosis y cirrosis PBI. $**p<0,01$ vs. SSE, $***p<0,001$ vs. SSE. La carga bacteriana tisular fue superior en los grupos con inducción de peritonitis, especialmente en el grupo de ratas cirróticas.

2. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LÍQUIDO PERITONEAL/ASCÍTICO Y SANGRE

2.1 Distribución de poblaciones y subpoblaciones del sistema inmune

Para conocer la distribución, el estado de activación y el patrón de producción de citoquinas de las poblaciones del sistema inmune en diferentes compartimentos anatómicos de las ratas que se incluyeron en el estudio de diseminación, analizamos por citometría de flujo cuantitativa de 4 colores las diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares del sistema inmunológico de ratas control SSE, control PBI, cirróticas SSE y cirróticas PBI.

Iniciamos nuestro estudio caracterizando el perfil inmunofenotípico de las células T, B, NK y monocitos presentes en el líquido peritoneal y la sangre.

2.1.1 Ratas control y cirróticas

-Líquido peritoneal/ascítico (control vs. cirrosis)

El número absoluto de células en el líquido peritoneal disminuye ligeramente en las ratas cirróticas con respecto a las ratas control, aunque esta disminución no alcanzó significación estadística (4.042 ± 1.510 vs. 3.417 ± 1.063 células $\times 10^2$ /ml, NS)

Según esto, y aunque disminuya ligeramente el número de células totales observadas en el peritoneo de estas ratas, se observa una expansión significativa en el número de células T y células B en las ratas con cirrosis a las que se les administró SSE con respecto a las ratas control SSE de 2,5 y 3 veces respectivamente (Tabla 1).

De acuerdo con el modelo ampliamente aceptado de respuesta inmune adquirida, la activación de las células T requiere de la presentación de antígenos por APCs profesionales, como son los monocitos (**Mackay et al., 1992**). En caso de que el linfocito T encuentre su antígeno específico en el MHC de las APCs, va a activarse y a sufrir una expansión clonal.

Sin embargo, en líquido peritoneal encontramos una disminución del número absoluto de monocitos, que se debe principalmente a la subpoblación de monocitos residentes, es decir, aquellos monocitos capaces de extravasarse a los tejidos dando lugar a células especializadas, que están caracterizados por la expresión del marcador

CD43 y la falta del NKRP1A^{LOW} (CD43⁺NKRP1A^{LOW-}), y que pasa a ser la mitad que la observada en los controles SSE. Por el contrario, se observó un ligero aumento en la subpoblación de monocitos inflamatorios, caracterizados por la internalización del receptor CD43 y la expresión del NKR-P1A^{LOW} (CD43⁻NKRP1A^{LOW+}), lo que según diversos autores les confiere mayor capacidad fagocítica y la habilidad de migrar e infiltrar tejidos inflamados (Yrlid *et al.*, 2006; Steiniger *et al.*, 2001) (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil inmunofenotípico de los linfocitos T y B, células NK y monocitos en el líquido peritoneal de ratas cirróticas y ratas control.

| | LÍQUIDO PERITONEAL/ASCÍTICO (célulasx10 ² /ml) | |
|--|--|--------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| Células T totales (CD3 ⁺) | 254±186 | 709±419*** |
| Células Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻) | 114±67 | 278±102*** |
| Células Tc (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻) | 98±18 | 183±157* |
| Monocitos totales (CD11b ⁺ CD3 ⁻ CD45RA ⁻ NKRP1A ^{HIGH+}) | 2.892±1.425 | 1.318±940** |
| Monocitos inflamatorios (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW+} CD43 ⁻) | 97±38 | 131±114 |
| Monocitos residentes (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW-} CD43 ⁺) | 2.770±1.350 | 1.182±652*** |
| Células B (CD45RA ⁺ CD3 ⁻) | 53±31 | 154±85*** |
| Células NK (NKRP1A ^{HIGH+} CD3 ⁻) | 117±80 | 162±94 |
| Células NKT (CD3 ⁺ NKRP1A ^{medio+}) | 59±34 | 84±59 |

*p<0,05 vs. control
 **p<0,01 vs. control
 ***p<0,001 vs. control

Tabla 2. Estado de activación de los linfocitos T, B y monocitos en el líquido peritoneal de ratas cirróticas y ratas control.

| | LÍQUIDO PERITONEAL (célulasx10 ² /ml) | |
|---|---|--------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| Células Th recientemente activadas (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD134 ⁺) | 14±15 | 23±17* |
| Células Th memoria efectora terminada (MET) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁻) | 1±1 | 29±15*** |
| Células Th novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 3±3 | 71±32*** |
| Células Th memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 9±7 | 60±52*** |
| Células Th memoria efectora no terminada (MENT) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁻) | 101±62 | 117±87 |
| Células Tc memoria efectora terminada (MET) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁻) | 8±7 | 35±19*** |
| Células Tc novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 24±15 | 91±52*** |
| Células Tc memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 11±7 | 15±11 |
| Células Tc memoria efectora no terminada (MENT) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁻) | 56±35 | 42±21 |
| Monocitos inflamatorios RT1B⁺ (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW+} CD43 ⁻ RT1B ⁺) | 51±33 | 51±34 |
| Monocitos residentes RT1B⁺ (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW-} CD43 ⁺ RT1B ⁺) | 333±191 | 297±183 |
| Células B activadas (CD45RA ⁺ CD3 ⁺ CD86 ⁺) | 9±7 | 10±8 |

*p<0,05 vs. control

**p<0,01 vs. control

***p<0,001 vs. control

El estudio de la expresión de antígenos de superficie nos permitió determinar que la expansión del compartimento de células T observada en las ratas cirróticas, ocurrió principalmente a expensas de las células Th. Al analizar el estado de activación de estas células, se observó un aumento en el número de células Th

recientemente activadas, medidas por la expresión en superficie del marcador CD134, receptor de superficie celular miembro de la familia del receptor de TNF α e implicado en la coestimulación (Roos *et al.*, 1998, Weinberg *et al.*, 1994; Broker *et al.*, 1999), al igual que aumentan las diferentes subpoblaciones de células Th como memoria efectora terminada (MET: CD45RC⁺CD62L⁻), novatas (CD45RC⁺CD62L⁺) y memoria central (MC: CD45RC⁻CD62L⁺). Sin embargo, la expansión del compartimento T no se restringe únicamente a las células Th, ya que las células Tc también sufrieron expansión y signos de activación (Tabla 2).

Estos cambios en el número absoluto de las poblaciones celulares anteriormente mencionadas se tradujeron en una modificación en la distribución relativa de poblaciones de células inmunitarias residentes en el líquido peritoneal de las ratas cirróticas SSE. Así, mientras que en las ratas control SSE, las poblaciones mayoritarias analizadas se distribuían en un 5,97 \pm 3,28% para células T; 1,28 \pm 0,84% para células B; 2,56 \pm 2,15% para células NK y 15,75 \pm 9,52% para monocitos; con el desarrollo de la enfermedad se produce un marcado aumento del porcentaje de células T (5,97 \pm 3,28% vs. 23,95 \pm 14,46%; $p < 0,001$), y células B (1,28 \pm 0,84% vs. 6,13 \pm 3,42%; $p < 0,001$), con una drástica disminución en el porcentaje de monocitos (15,75 \pm 9,52% vs. 3,48 \pm 2,52%; $p < 0,01$) mientras que el porcentaje de células NK no sufre ninguna modificación estadísticamente significativa (2,56 \pm 2,15% vs. 2,87 \pm 2,03%; NS).

- Sangre (control vs. cirrosis)

El número absoluto de PBMCs aumentó considerablemente en las ratas cirróticas con respecto a las ratas control (17.633 \pm 10.310 vs. 76.837 \pm 40.597 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,001$), a diferencia de lo descrito previamente para el líquido peritoneal.

Este aumento en la celularidad se debe a la gran expansión que sufrieron las distintas poblaciones celulares del sistema inmune: células T y B, monocitos, células NK y NK-T. El aumento más significativo se observó en el número de monocitos, que aumentaron 44 veces en las ratas cirróticas con respecto a las ratas control (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil inmunofenotípico de los linfocitos T y B, células NK y monocitos en la sangre de ratas cirróticas y ratas control.

| | SANGRE (célulasx10 ² /ml) | |
|--|--------------------------------------|--------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| Células T totales (CD3 ⁺) | 8.400±4.510 | 26.542±18.893*** |
| Células Th (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻) | 4.225±1.951 | 14.872±9.995*** |
| Células Tc (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻) | 1.820±930 | 5.741±3.765*** |
| Monocitos totales (CD11b ⁺ CD3 ⁻ CD45RA ⁻ NKRP1A ^{HIGH+}) | 798±737 | 35.401±19.060*** |
| Monocitos inflamatorios (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW+} CD43 ⁻) | 206±199 | 6.215±4.344*** |
| Monocitos residentes (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW-} CD43 ⁺) | 567±544 | 28.571±14.632*** |
| Células B (CD45RA ⁺ CD3 ⁻) | 2.617±952 | 7.215±5.699** |
| Células NK (NKRP1A ^{HIGH+} CD3 ⁻) | 355±253 | 3.217±2.710*** |
| Células NKT (CD3 ⁺ NKRP1A ^{medio+}) | 773±578 | 2.853±2.620** |

**p*<0,05 vs. control

***p*<0,01 vs. control

****p*<0,001 vs. control

La expansión de las células T en la sangre de ratas con cirrosis ocurrió tanto por el aumento de células Th como por el de células Tc. Se observó un mayor número de células Th con activación reciente además de expandirse el número absoluto de las cuatro subpoblaciones principales de células Th y Tc (MET, MENT, Naive y MC). También se observó un gran aumento en el número absoluto de monocitos con mayor capacidad de presentación antigénica medido por la expresión en superficie de la molécula MHC de clase II que en ratas viene dado por el marcador RT1B⁺ y en el número absoluto de células B activadas medido por la expresión en superficie del marcador CD86 (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil inmunofenotípico de activación de los linfocitos T, B y monocitos en la sangre de ratas cirróticas y ratas control.

| | SANGRE (célulasx10 ² /ml) | |
|---|--------------------------------------|--------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| Células Th recientemente activadas (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD134 ⁺) | 63±46 | 310±239*** |
| Células Th memoria efectora terminada (MET) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁻) | 171±84 | 4.626±3.771*** |
| Células Th novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 1.419±1.200 | 4.792±3.560*** |
| Células Th memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 1.805±1.647 | 2.267±1.777 |
| Células Th memoria efectora no terminada (MENT) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁻) | 830±316 | 3.185±2.963** |
| Células Tc memoria efectora terminada (MET) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁻) | 84±79 | 1.567±915*** |
| Células Tc novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 904±639 | 3.004±2.304*** |
| Células Tc memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 354±192 | 438±327 |
| Células Tc memoria efectora no terminada (MENT) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁻) | 478±249 | 732±310* |
| Monocitos inflamatorios RT1B+ (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW+} CD43 ⁻ RT1B ⁺) | 64±39 | 1.027±810*** |
| Monocitos residentes RT1B+ (CD11b ⁺ NKRP1A ^{LOW-} CD43 ⁺ RT1B ⁺) | 44±33 | 2.027±910*** |
| Células B activadas (CD45RA ⁺ CD3 ⁺ CD86 ⁺) | 116±87 | 596±303*** |

*p<0,05 vs. control
 **p<0,01 vs. control
 ***p<0,001 vs. control

Al analizar la distribución de las poblaciones celulares del sistema inmune en la sangre de las ratas cirróticas SSE, observamos una drástica disminución en el porcentaje de células B (20,45±9,70% vs. 9,15±5,63%; p<0,01), y un aumento en el porcentaje de monocitos circulantes (2,97±2,28% vs. 20,33±13,46%; p<0,001) con

respecto al grupo de ratas control SSE. Sin embargo, los porcentajes de células T y NK no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos objeto de estudio [células T ($42,01 \pm 13,84\%$ vs. $35,43 \pm 15,15\%$; NS) y células NK ($3,03 \pm 1,80\%$ vs. $4,07 \pm 1,27\%$; NS)].

2.1.2 Ratas control tras la inducción de peritonitis bacteriana

Para comprobar cómo se comportaban las células inmunológicas de líquido peritoneal y sangre en controles sanos tras la inducción de peritonitis bacteriana, llevamos a cabo la comparación entre el grupo control SSE (al cual se le inyectó SSE intraperitoneal) y el grupo control PBI (al que se le había inyectado una concentración conocida de bacterias por vía intraperitoneal).

- Líquido peritoneal (control vs. control PBI)

El número absoluto de células mononucleares en líquido peritoneal de ratas control PBI, aumentó de manera significativa con respecto a los controles SSE ($4.042 \pm 1.510 \text{ cél} \times 10^2/\text{ml}$ vs. $13.951 \pm 6.293 \text{ cél} \times 10^2/\text{ml}$; $p < 0,001$). Este gran aumento en el número absoluto de células mononucleares se debió a la población total de monocitos, que sufrió una gran expansión tras la PBI, mientras que el número de células T y NK disminuyeron, y las células B no sufrieron ningún cambio (Figura 6).

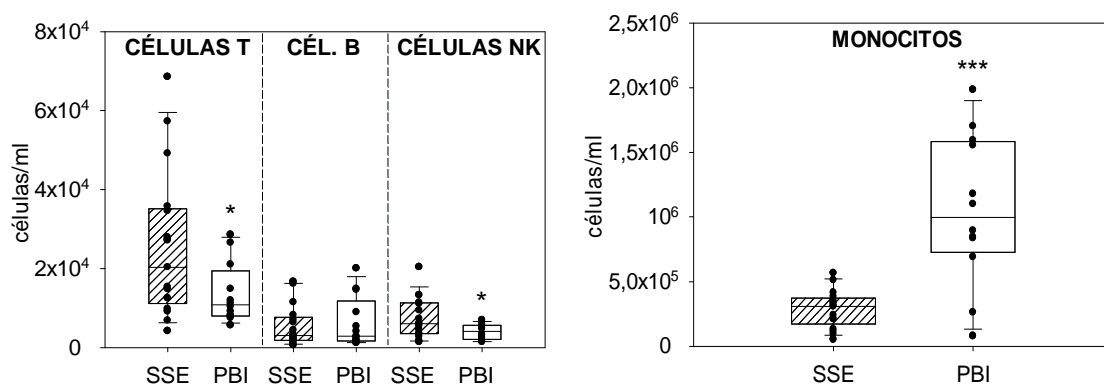


Figura 6. Número absoluto de células T, B, NK y monocitos en el líquido peritoneal de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). *** $p < 0,001$ vs. SSE; * $p < 0,05$ vs. SSE. La peritonitis en las ratas control causó una disminución en el número de células T y NK y un drástico aumento de monocitos en el peritoneo.

La disminución de células T en el líquido peritoneal de las ratas control PBI fue a expensas de las células Tc totales ($98 \pm 18 \text{ cél} \times 10^2/\text{ml}$ vs. $17 \pm 13 \text{ cél} \times 10^2/\text{ml}$; $p < 0,001$),

y de subpoblaciones de células T MENT, mientras que las células Th MET, mostraron aumento significativo (Figura 7).

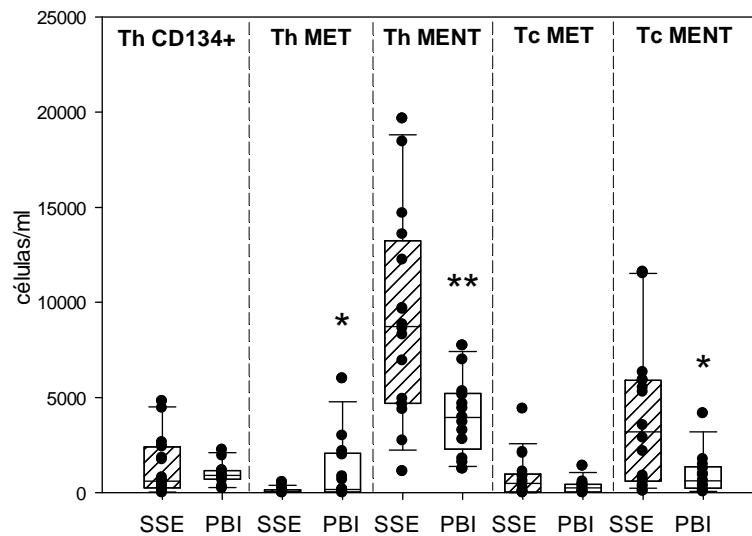


Figura 7. Número absoluto de células Th recientemente activadas (Th CD134+) y las distintas subpoblaciones Th y Tc memoria efectora en el líquido peritoneal de ratas control SSE (hachado) y control PBI (blanco). ** $p < 0,01$ vs. SSE; * $p < 0,05$ vs. SSE. La inducción de peritonitis en las ratas control causó una disminución significativa de las células Th y Tc MENT (mayor capacidad de producción de citoquinas) y un aumento en el número de células Th MET (mayor capacidad citotóxica y efectora).

La subpoblación de células Th novatas se encontró muy expandida en ratas control PBI, mientras que la subpoblación de Th MC no se vio modificada. En cuanto a las subpoblaciones de células Tc, las células Tc novatas se encontraron disminuídas, al igual que ocurrió con la subpoblación Tc MC (Tabla 5).

En cuanto a la población de monocitos, observamos un aumento muy llamativo en la subpoblación de monocitos inflamatorios, cuyo número absoluto aumentó 66 veces (Figura 8).

Tabla 5. Número absoluto de células Th y Tc novatas y memoria central en el líquido peritoneal de ratas control.

| | Líquido peritoneal (célulasx10 ² /ml) | |
|---|--|-----------------------|
| | Control SSE (n=17) | Control PBI (n=12) |
| Células Th novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 3±3 | 15±8 ^{***} |
| Células Th memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 9±7 | 9±7 |
| Células Tc novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 24±15 | 2±1 ^{**} |
| Células Tc memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 11±7 | 2±1 ^{***} |

****p<0,01 vs. control SSE**
*****p<0,001 vs. control SSE**

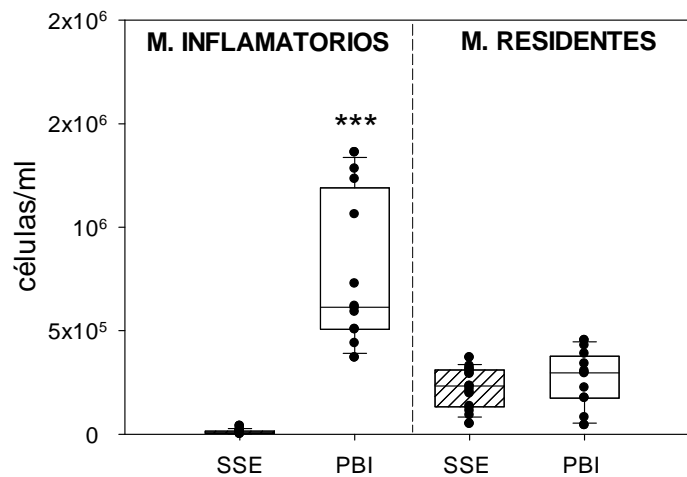


Figura 8. Número absoluto de monocitos inflamatorios y residentes en el líquido peritoneal de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). *** p<0,001 vs. SSE. Gran aumento de la subpoblación de monocitos inflamatorios en las ratas control tras la inducción de peritonitis bacteriana en líquido peritoneal.

Dentro de las subpoblaciones monocitarias, se observó que, según la expresión del marcador RT1B⁺, que proporciona una mayor capacidad de presentación antigénica a la célula, los monocitos inflamatorios aumentaron su

expresión en superficie tras la PBI, aunque no de manera significativa (51 ± 33 vs. 75 ± 67 células $\times 10^2$ /ml, NS), mientras que ocurrió todo lo contrario en los monocitos residentes, en los que la expresión del RT1B se encontró significativamente reducida (333 ± 191 vs. 74 ± 42 células $\times 10^2$ /ml, $p<0,001$).

Las células B activadas según la expresión en superficie del marcador CD86, no se encontraron modificadas en el líquido peritoneal de las ratas control (9 ± 7 vs. 11 ± 7 células $\times 10^2$ /ml, NS).

- Sangre (control vs. control PBI)

A diferencia de lo observado en el líquido peritoneal, la inyección intraperitoneal de bacterias en las ratas control provocó una drástica disminución en el número absoluto de PBMCs (17.633 ± 10.310 vs. 4.003 ± 1.483 células $\times 10^2$ /ml; $p<0,001$), que afectó a todas las poblaciones generales en estudio (linfocitos T y B, células NK y monocitos) (Figura 9).

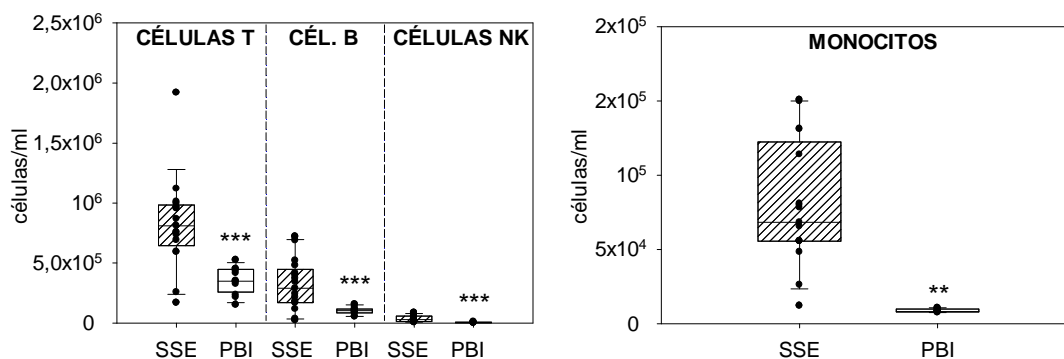


Figura 9. Número absoluto de células T, B, NK y monocitos en la sangre de ratas control SSE (hachado) y control PBI (blanco). *** $p<0,001$ vs. SSE; ** $p<0,01$ vs. SSE. La peritonitis inducida en las ratas control, provocó una drástica disminución en el número absoluto de células de las distintas poblaciones celulares del sistema inmune en la sangre.

Dentro de las células T, se observaron grandes disminuciones en las subpoblaciones de células Th (4.225 ± 1.951 células $\times 10^2$ /ml vs. 1.690 ± 721 células $\times 10^2$ /ml; $p<0,001$) y Tc (1.820 ± 930 células $\times 10^2$ /ml vs. 417 ± 249 células $\times 10^2$ /ml; $p<0,001$). También se observaron disminuciones significativas en el número absoluto de células Th recientemente activadas (CD134⁺), así como en el número de células efectoras de las dos subpoblaciones de células T (Figura 10).

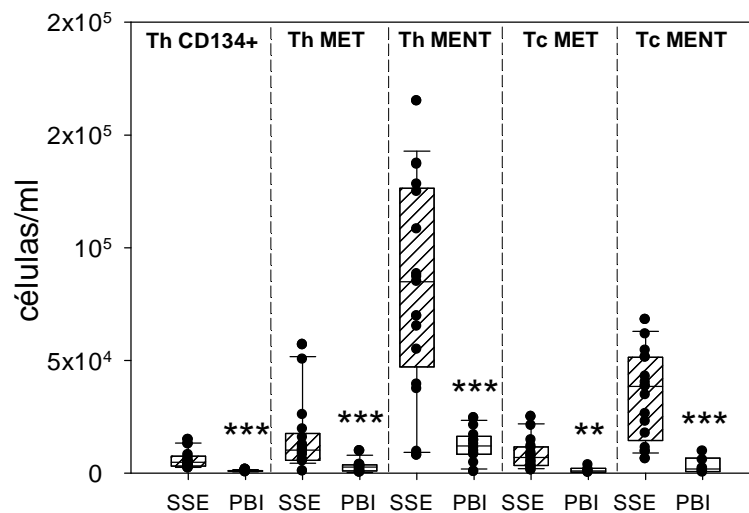


Figura 10. Número absoluto de células Th recientemente activadas (Th CD134+) y las distintas subpoblaciones Th y Tc memoria efectora en la sangre de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). * $p < 0,001$ vs. SSE; ** $p < 0,01$ vs. SSE. Disminución en sangre del número absoluto de subpoblaciones de células Th y Tc en el grupo de ratas control con inducción de peritonitis bacteriana.**

Las subpoblaciones novata y MC de células Tc, y las células Th novatas de sangre periférica de las ratas control también sufrieron disminuciones significativas tras la PBI. Sin embargo, de forma similar a lo descrito en el líquido peritoneal, la PBI no modificó la subpoblación de células Th MC de sangre periférica (Tabla 6).

La subpoblación de monocitos inflamatorios en el compartimento sanguíneo también sufrió una disminución significativa, al igual que la de monocitos residentes (Figura 11).

Dentro de ambas subpoblaciones monocitarias, el número absoluto de monocitos con mayor capacidad de presentación antigénica (RT1B⁺) también fue inferior en el grupo de ratas control PBI (monocitos inflamatorios RT1B⁺: 64 ± 39 células $\times 10^2$ /ml vs. 2 ± 1 células $\times 10^2$ /ml; $p < 0,001$ y monocitos residentes RT1B⁺: 44 ± 33 células $\times 10^2$ /ml vs. 2 ± 2 células $\times 10^2$ /ml; $p < 0,001$).

Las células B activadas (CD86⁺) sufrieron una ligera disminución, aunque no significativa, en las ratas control tras PBI (116 ± 87 vs. 70 ± 28 células $\times 10^2$ /ml, NS)

Tabla 6. Número absoluto de células Th y Tc novatas y memoria central en la sangre de ratas control

| | Sangre (célulasx10 ² /ml) | |
|---|--------------------------------------|-----------------------|
| | Control SSE (n=17) | Control PBI (n=12) |
| Células Th novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 1.419±1.200 | 376±164** |
| Células Th memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 1.805±1.647 | 1.119±573 |
| Células Tc novatas (NAIVE) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁺ CD62L ⁺) | 904±639 | 263±144** |
| Células Tc memoria central (MC) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RC ⁻ CD62L ⁺) | 354±192 | 107±88*** |

**p<0,01 vs. control SSE
***p<0,001 vs. control SSE

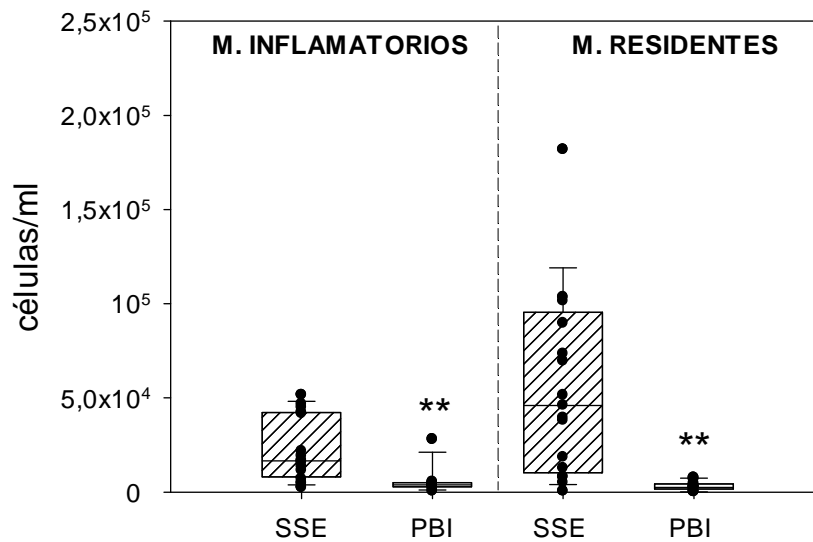


Figura 11. Número absoluto de monocitos inflamatorios y residentes en la sangre de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). ** p<0,01 vs. SSE. La inducción de peritonitis en las ratas control causó en la sangre una disminución de las distintas subpoblaciones de monocitos.

2.1.3 Ratas cirróticas tras la inducción de peritonitis bacteriana

Del mismo modo que con los grupos control, para comprobar cómo se comportaban las células inmunológicas de líquido peritoneal y sangre en ratas con cirrosis y ascitis tras la inducción de peritonitis bacteriana, llevamos a cabo la comparación entre el grupo cirrosis SSE y el grupo cirrosis PBI.

- LA (cirrosis vs. cirrosis PBI)

En el peritoneo de las ratas con cirrosis y PBI no se produjo ningún cambio en el número absoluto de células mononucleares con respecto a las ratas cirróticas SSE (3.417 ± 3.063 vs. 3.626 ± 2.310 células $\times 10^2/\text{ml}$, NS). Como consecuencia de ello, no se produjeron grandes cambios en el número absoluto de las distintas poblaciones y subpoblaciones del sistema inmune en este compartimento, excepto en el número de células NK que se redujo de manera notable tras PBI (Figura 12).

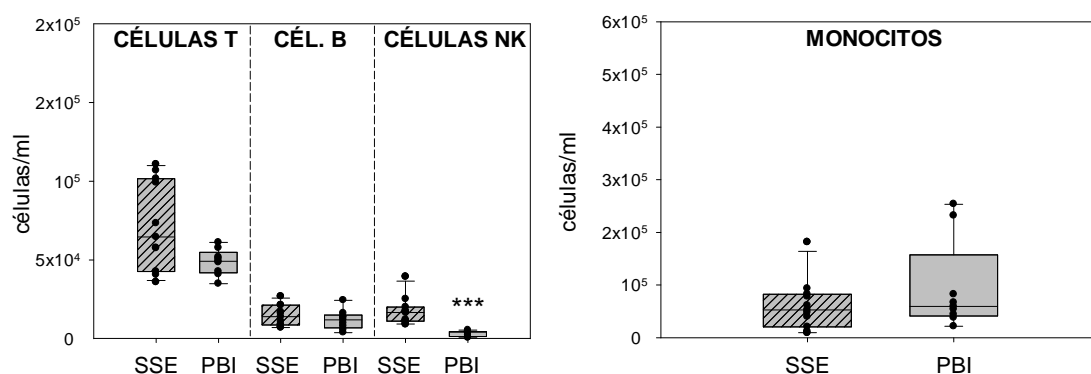


Figura 12. Número absoluto de células T, B, NK y monocitos en el líquido peritoneal de ratas cirróticas SSE (▨) y cirróticas PBI (□). *** $p < 0,001$ vs. SSE. La peritonitis inducida en las ratas con cirrosis, únicamente produjo una disminución en el número absoluto de células NK en el líquido peritoneal.

Dentro de las células T, tampoco se observaron diferencias en el número de Th (278 ± 102 vs. 248 ± 104 células $\times 10^2/\text{ml}$, NS), mientras que las células Tc se encontraron significativamente disminuidas (183 ± 157 vs. 69 ± 35 células $\times 10^2/\text{ml}$, $p < 0,05$).

En el estudio del estado de activación de las poblaciones celulares anteriormente mencionadas en líquido peritoneal, encontramos que no hubo diferencias en el número absoluto de células Th activadas recientemente. Sin

embargo, se observó una disminución del número de células MET, tanto Th como Tc, y del número de Tc MENT (Figura 13).

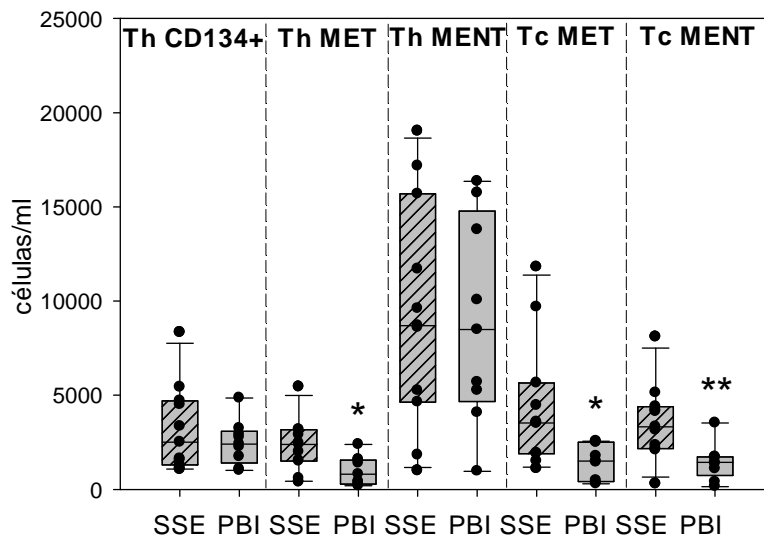


Figura 13. Número absoluto de células Th recientemente activadas (Th CD134+) y de las distintas subpoblaciones Th y Tc memoria efectora en el líquido peritoneal de ratas cirrosis SSE (▨) y cirrosis PBI (■). ** $p < 0,01$ vs. SSE, * $p < 0,05$ vs. SSE. La inducción de peritonitis en las ratas con cirrosis produjo una disminución en el número absoluto de subpoblaciones memoria efectora.

La subpoblación de células Th y Tc novatas también se encontraron significativamente reducidas en las ratas cirróticas PBI, mientras que las células T MC (tanto Th como Tc) no sufrieron ninguna modificación (Tabla 7).

A pesar de la ausencia de cambios en el número de monocitos peritoneales totales entre el grupo de ratas cirróticas SSE y las ratas cirróticas PBI, al analizar las subpoblaciones de monocitos, observamos que la PBI provocó un aumento muy significativo del número de monocitos inflamatorios en el LA de estos animales, mientras que los monocitos residentes disminuyeron sustancialmente (Figura 14).

Al estudiar el estado de activación de estos monocitos mediante su capacidad para expresar el MHC II (RT1B+) y así tener una mayor capacidad presentadora de antígenos, vimos que la expresión de esta molécula se encontró disminuída en la superficie de los monocitos residentes y no se modificó en la subpoblación de monocitos inflamatorios tras la PBI (297 ± 183 vs. 106 ± 19 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,01$; 51 ± 34 vs. 63 ± 58 células $\times 10^2$ /ml, NS; respectivamente).

El número de células B activadas medido por la expresión en superficie del marcador CD86, se encontró expandido en las ratas cirróticas tras PBI ($10 \pm 8,14$ vs. 27 ± 15 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,01$).

Tabla 7. Número absoluto de células Th y Tc novatas y memoria central en el líquido peritoneal de ratas con cirrosis

| | Líquido peritoneal (células $\times 10^2$ /ml) | |
|---|--|--------------------|
| | Cirrosis (n=11) | Cirrosis PBI (n=9) |
| Células Th novatas (NAIVE) ($CD3^+CD4^+CD45RC^+CD62L^+$) | 71 \pm 32 | 20 \pm 9*** |
| Células Th memoria central (MC) ($CD3^+CD4^+CD45RC^-CD62L^+$) | 60 \pm 52 | 76 \pm 29 |
| Células Tc novatas (NAIVE) ($CD3^+CD8^+CD45RC^+CD62L^+$) | 91 \pm 52 | 26 \pm 9** |
| Células Tc memoria central (MC) ($CD3^+CD8^+CD45RC^-CD62L^+$) | 15 \pm 11 | 11 \pm 8 |

** $p < 0,01$ vs. cirrosis SSE
 *** $p < 0,001$ vs. cirrosis SSE

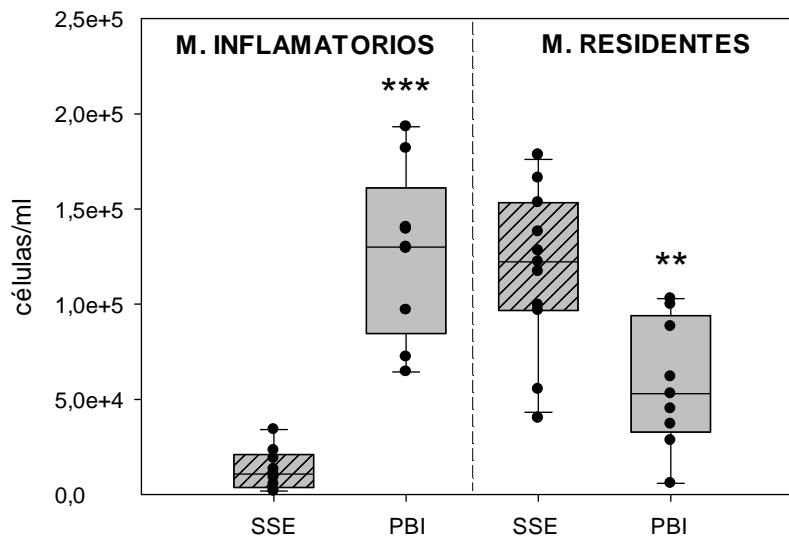


Figura 14. Número absoluto de monocitos inflamatorios y residentes en el líquido peritoneal de ratas cirrosis SSE (▨) y cirrosis PBI (■). * $p < 0,001$ vs. SSE; ** $p < 0,01$ vs. SSE. La inducción de peritonitis en las ratas cirróticas causó en el líquido peritoneal un aumento en la subpoblación de monocitos inflamatorios y una disminución en los monocitos residentes.**

- Sangre (cirrosis vs. cirrosis PBI)

La inyección intraperitoneal de bacterias en las ratas con cirrosis provocó una drástica disminución en el número absoluto de PBMCs (76.837 ± 40.597 vs. 17.884 ± 5.367 células $\times 10^2/\text{ml}$, $p < 0,01$) que afectó, en diferente grado a todas las poblaciones y subpoblaciones de células estudiadas (Figura 15).

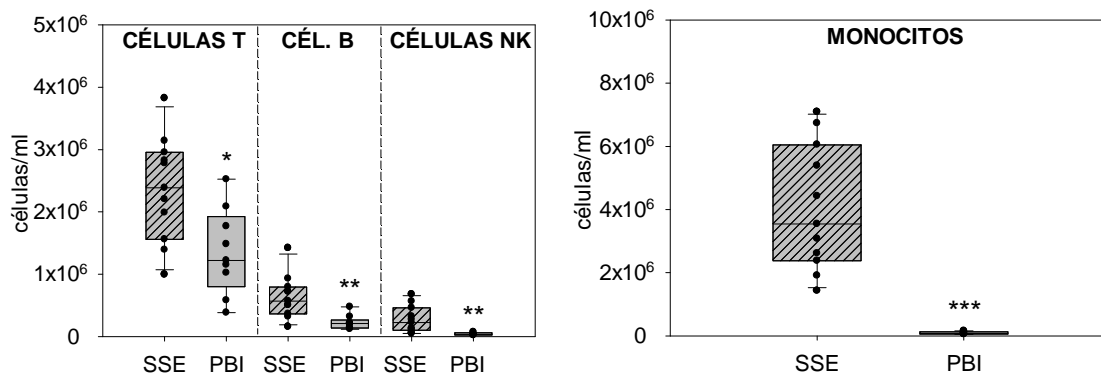


Figura 15. Número absoluto de células T, B, NK y monocitos en la sangre de ratas cirrosis SSE (▨) y cirrosis PBI (■). *** $p < 0,001$ vs. SSE, ** $p < 0,01$ vs. SSE, * $p < 0,05$ vs. SSE. La inducción de peritonitis causó una disminución significativa en todas las poblaciones de las ratas con cirrosis.

La disminución del número absoluto de células T en el compartimento sanguíneo se produjo tanto por la subpoblación de células Th (14.872 ± 9.995 vs. 6.244 ± 4.963 células $\times 10^2/\text{ml}$, $p < 0,05$) como Tc (5.741 ± 3.765 vs. 2.137 ± 1.254 células $\times 10^2/\text{ml}$, $p < 0,05$). Todo ello condujo también a una disminución en el número de células Th activadas recientemente y en el número de células efectoras tanto Th como de Tc (Figura 16).

Además, el número de células T novatas presentes en sangre periférica disminuyó significativamente en las ratas cirróticas PBI, mientras que las células T MC no sufrieron ninguna modificación debida a la PBI (Tabla 8).

Las dos subpoblaciones de monocitos (inflamatorios y residentes) sufrieron una gran disminución en la sangre de las ratas cirróticas PBI, lo que conllevó a la drástica disminución descrita anteriormente en la población total (Figura 17).

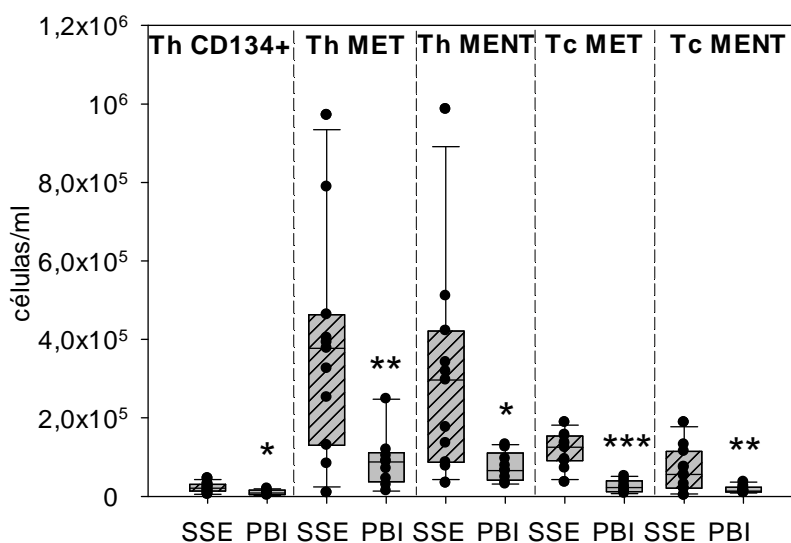


Figura 16. Número absoluto de células Th recientemente activadas y de las distintas subpoblaciones Th y Tc memoria efectora en la sangre de ratas cirrosis SSE (▨) y cirrosis PBI (■). *** $p < 0,001$ vs. SSE, ** $p < 0,01$ vs. SSE, * $p < 0,05$ vs. SSE. La inducción de peritonitis causó disminuciones en el estado de activación de las células Th y Tc en la sangre de las ratas cirróticas.

Tabla 8. Número absoluto de células Th y Tc novatas y memoria central en la sangre de ratas con cirrosis

| | Sangre (células $\times 10^2$ /ml) | |
|---|------------------------------------|--------------------|
| | Cirrosis (n=11) | Cirrosis PBI (n=9) |
| Células Th novatas (NAIVE) ($CD3^+CD4^+CD45RC^+CD62L^+$) | 4.792 \pm 1.960 | 2.870 \pm 1.760* |
| Células Th memoria central (MC) ($CD3^+CD4^+CD45RC^-CD62L^+$) | 2.267 \pm 1.777 | 1.566 \pm 990 |
| Células Tc novatas (NAIVE) ($CD3^+CD8^+CD45RC^+CD62L^+$) | 3.004 \pm 2.304 | 1.211 \pm 878* |
| Células Tc memoria central (MC) ($CD3^+CD8^+CD45RC^-CD62L^+$) | 438 \pm 327 | 286 \pm 191 |

** $p < 0,01$ vs. cirrosis SSE,
*** $p < 0,001$ vs. cirrosis SSE

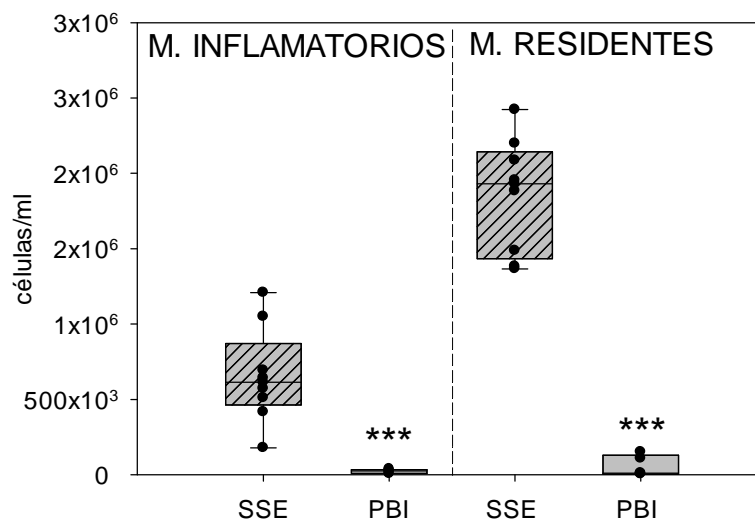


Figura 17. Número absoluto de monocitos inflamatorios y residentes en la sangre de ratas cirrosis SSE (▨) y cirrosis PBI (▭). *** $p < 0,01$ vs. SSE. Drástica disminución en el número absoluto de las dos subpoblaciones de monocitos en el grupo de ratas cirróticas con inducción de peritonitis.

La disminución en el número de las dos subpoblaciones de monocitos en las ratas cirróticas PBI, implica también una disminución en la capacidad de los mismos para presentar antígenos (monocitos inflamatorios RT1B⁺: 1.027 ± 1.110 vs. 16 ± 6 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,01$; monocitos residentes RT1B⁺: 2.027 ± 910 vs. 23 ± 14 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,001$). De la misma manera, las células B activadas en el grupo de ratas cirróticas PBI también sufrieron una drástica disminución (596 ± 303 vs. 75 ± 47 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,001$).

2.2 Expresión de citoquinas intracelulares y solubles en líquido peritoneal/ascítico y sangre

Diversos estudios han constatado que la cirrosis hepática se asocia con alteraciones hemodinámicas y con un estado proinflamatorio sistémico, caracterizado por un aumento en los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias como el TNF α y IFN γ (López-Talavera *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; García *et al.*, 2001; Ros *et al.*, 2002; Wiest *et al.*, 2002; Albillos *et al.*, 2004b; Muñoz *et al.*, 2005). Se han identificado a los monocitos circulantes como la fuente principal de producción de TNF α y a las células Th como las principales productoras de IFN γ , tanto en cirrosis humana y experimental (Albillos *et al.*, 2004b; Muñoz *et al.*, 2005). Por ello nos planteamos analizar, en nuestro modelo experimental de cirrosis, la

contribución relativa de los monocitos y de las células T a la producción de TNF α e IFN γ .

2.2.1 Ratas control y cirróticas

- Líquido peritoneal/ascítico (control vs. cirrosis)

Al realizar el estudio de diferentes marcadores intracelulares presentes en el líquido peritoneal o ascítico de las ratas control y cirrosis respectivamente, pudimos observar que las ratas con cirrosis tenían un menor número de células T capaces de producir IFN γ en el peritoneo, que se debió tanto a las células Th como a las células Tc.

Sin embargo, existió un aumento de 2 veces en el número absoluto de células T totales capaces de producir TNF α en el peritoneo de las ratas cirróticas con respecto a los controles, que se debió a la población de células Th.

Tabla 9. Número absoluto de células productoras de IFN γ y TNF α en el líquido peritoneal/ascítico de ratas control y cirróticas.

| | LÍQUIDO PERITONEAL/ASCÍTICO (células $\times 10^2$ /ml) | |
|--|--|--------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| Células T totales IFNγ^+ (CD3 $^+$ IFN γ^+) | 286 \pm 125 | 64 \pm 25*** |
| Células Th IFNγ^+ (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ IFN γ^+) | 175 \pm 117 | 30 \pm 14*** |
| Células Tc IFNγ^+ (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD4 $^-$ IFN γ^+) | 133 \pm 125 | 37 \pm 31* |
| Células T totales TNFα^+ (CD3 $^+$ TNF α^+) | 37 \pm 16 | 56 \pm 29* |
| Células Th TNFα^+ (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ TNF α^+) | 20 \pm 14 | 47 \pm 17*** |
| Células Tc TNFα^+ (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD4 $^-$ TNF α^+) | 13 \pm 2 | 13 \pm 8 |
| Monocitos totales TNFα^+ (CD11b $^+$ CD3 $^-$ TNF α^+) | 689 \pm 397 | 787 \pm 356 |

* $p < 0,05$ vs. control

** $p < 0,01$ vs. control

*** $p < 0,001$ vs. control

No hubo diferencias significativas en el número de monocitos capaces de producir TNF α entre ratas control y cirróticas (Tabla 9).

Al medir mediante ELISA la concentración de citoquinas solubles en el LA y peritoneal de ratas cirróticas y control, respectivamente, observamos que existió una mayor concentración de TNF α en las ratas cirróticas con respecto a los controles, lo que coincide con el gran aumento en el número de células que expresan TNF α en dicho compartimento determinado por citometría de flujo. Con respecto al IFN γ , también se observó una mayor concentración de dicha citoquina en el LA de las ratas cirróticas con respecto a los controles, a diferencia de lo observado en los datos obtenidos por citometría (Tablas 9 y 10).

Tabla 10. Concentración de citoquinas solubles en líquido peritoneal/ascítico de ratas control y cirrosis.

| | LÍQUIDO PERITONEAL/ASCÍTICO (pg/ml) | |
|---------------------------|--|--------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| IFN γ ⁺ | 9,03±3,14 | 32,98±19,09*** |
| TNF α ⁺ | 9,11±3,41 | 20,08±8,87*** |

***p<0,001 vs. control

- Sangre (control vs. cirrosis)

En la sangre de ratas cirróticas encontramos un aumento significativo de 6 veces en el número de células T totales que producen IFN γ , que se debe tanto a las células Th como a las células Tc. Ocurre lo mismo en el número de células productoras de TNF α , tanto por células T como por monocitos, en el que el aumento es de 83 veces (Tabla 11).

Al medir mediante ELISA la concentración de citoquinas solubles en el plasma de ratas cirróticas y control, también observamos un aumento significativo de ambas citoquinas en las ratas cirróticas con respecto a las ratas control (Tabla 12).

Tabla 11. Número absoluto de células productoras de IFN γ y TNF α en la sangre de ratas control y cirróticas.

| | SANGRE (células $\times 10^2$ /ml) | |
|--|---------------------------------------|----------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| Células T totales IFNγ^+ (CD3 $^+$ IFN γ^+) | 166 \pm 122 | 1.099 \pm 648*** |
| Células Th IFNγ^+ (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ IFN γ^+) | 92 \pm 74 | 602 \pm 209*** |
| Células Tc IFNγ^+ (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD4 $^-$ IFN γ^+) | 85 \pm 58 | 645 \pm 330*** |
| Células T totales TNFα^+ (CD3 $^+$ TNF α^+) | 109 \pm 50 | 833 \pm 488*** |
| Células Th TNFα^+ (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ TNF α^+) | 66 \pm 53 | 602 \pm 316*** |
| Células Tc TNFα^+ (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD4 $^-$ TNF α^+) | 27 \pm 9 | 161 \pm 98*** |
| Monocitos totales TNFα^+ (CD11b $^+$ CD3 $^-$ TNF α^+) | 40 \pm 28 | 3.324 \pm 1.054*** |

* $p < 0,05$ vs. control

** $p < 0,01$ vs. control

*** $p < 0,001$ vs. control

Tabla 12. Concentración de citoquinas plasmáticas solubles en ratas control y cirrosis.

| | PLASMA (pg/ml) | |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|
| | Control (n=17) | Cirrosis (n=11) |
| IFNγ^+ | 5,15 \pm 2,74 | 18,12 \pm 8,72*** |
| TNFα^+ | 1,01 \pm 0,81 | 8,41 \pm 5,27*** |

* $p < 0,05$ vs. control

** $p < 0,01$ vs. control

2.2.2 Ratas control tras la inducción de peritonitis bacteriana

- Líquido peritoneal (control vs. control PBI)

Al inducir peritonitis en las ratas control se observó una disminución en el número de células T peritoneales productoras de IFN γ , tanto en las células Th como en las células Tc (Figura 18). No existieron diferencias en el número de células T peritoneales productoras de TNF α , sin embargo se produjo una gran disminución en el número absoluto de monocitos productores de esta citoquina (689 ± 397 vs. 293 ± 183 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,01$)

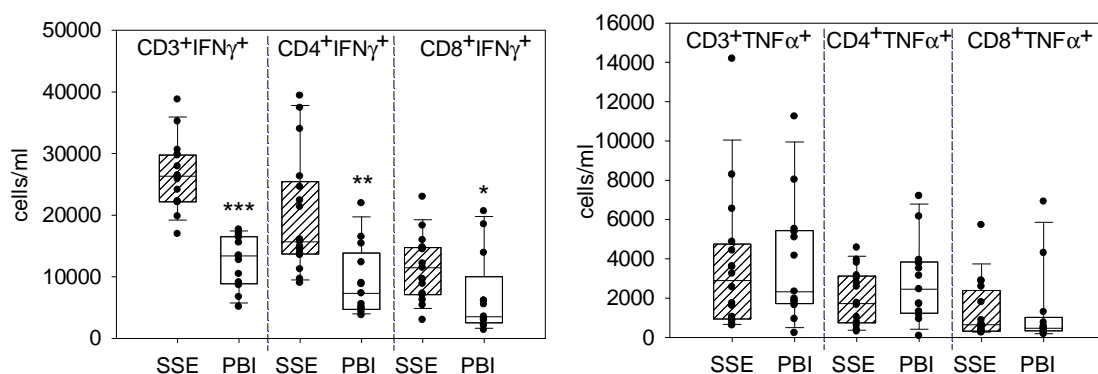


Figura 18. Número absoluto de células T, Th y Tc productoras de IFN γ y TNF α en líquido peritoneal de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). * $p < 0,05$ vs. SSE, $p < 0,01$ vs. SSE, * $p < 0,001$ vs. SSE. La peritonitis intraperitoneal inducida disminuyó el número absoluto de células T productoras de IFN γ en las ratas control.**

La concentración de IFN γ soluble medido por ELISA aumentó en aquellas ratas control PBI, al igual que ocurrió con el TNF α cuyo aumento fue de 19 veces con respecto al control (Figura 19).

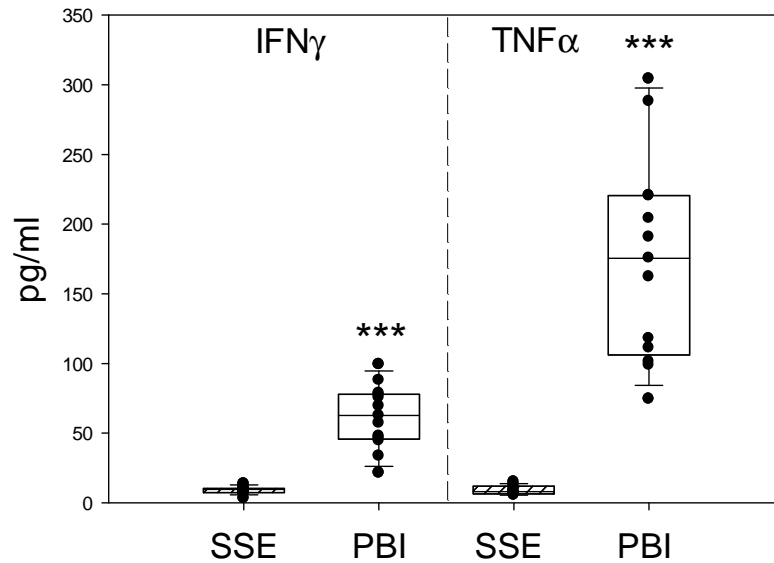


Figura 19. Concentración en pg/ml de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ en líquido peritoneal de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). *** $p < 0,001$ vs. SSE. Aumento significativo de ambas citoquinas en el grupo de ratas control con inducción de peritonitis bacteriana.

- Sangre (control vs. control PBI)

De forma similar a lo descrito previamente en las células peritoneales, la inducción de peritonitis provocó una disminución en las células de sangre periférica capaces de producir $\text{IFN}\gamma$, que afectó a todas las poblaciones objeto de estudio. Además, también observamos una disminución en el número de células T de sangre periférica productoras de $\text{TNF}\alpha$ tras la PBI en ratas control (Figura 20).

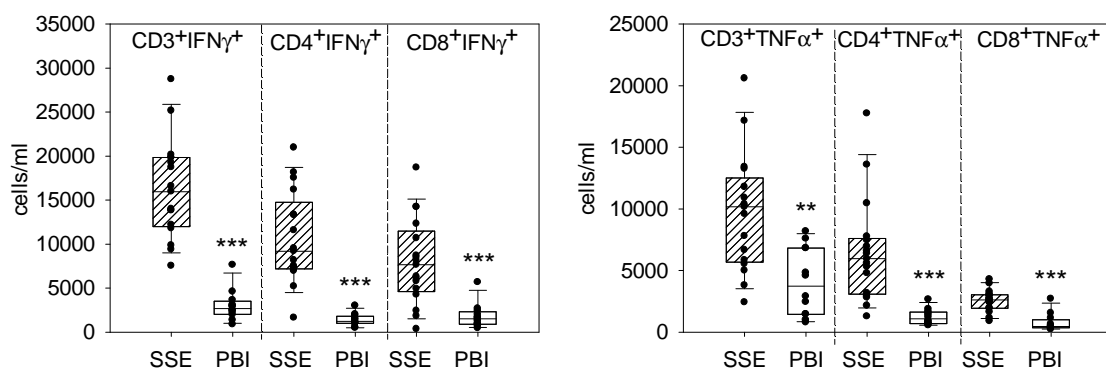


Figura 20. Número absoluto de células T, Th y Tc productoras de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ en sangre de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). ** $p < 0,01$ vs. SSE, *** $p < 0,001$ vs. SSE. La inducción de peritonitis produjo una disminución en el número de células T capaces de producir $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ en la sangre de ratas control.

También pudimos observar una disminución significativa en el número absoluto de monocitos capaces de producir TNF α en las ratas control PBI con respecto a los controles SSE (40 ± 28 vs. 4 ± 5 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,001$).

Sin embargo, y a pesar de las disminuciones observadas por citometría, la ratas control PBI mostraron un aumento muy significativo en la concentración de IFN γ y TNF α solubles en plasma, especialmente en el caso del TNF α , que fue del orden de 442 veces (Figura 21).

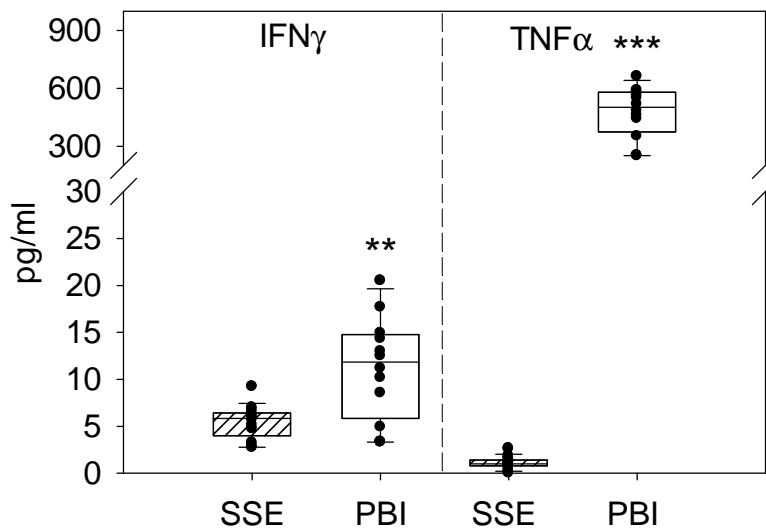


Figura 21. Concentración en pg/ml de IFN γ y TNF α en plasma de ratas control SSE (▨) y control PBI (□). * $p < 0,05$ vs. SSE, *** $p < 0,001$ vs. SSE. La concentración de ambas citoquinas se encontró aumentado en el grupo de ratas control tras inducción de peritonitis bacteriana principalmente evidente en el caso del TNF α .

2.2.3 Ratas cirróticas tras la inducción de peritonitis bacteriana

- LA (cirrosis vs. cirrosis PBI)

En las ratas cirróticas PBI no se produjeron cambios en el número absoluto de células T totales capaces de producir IFN γ con respecto a las ratas cirróticas SSE. Por el contrario, el número de células peritoneales capaces de producir TNF α aumentó en las ratas cirróticas PBI debido únicamente a producción de esta citoquina por las células Th (Figura 22).

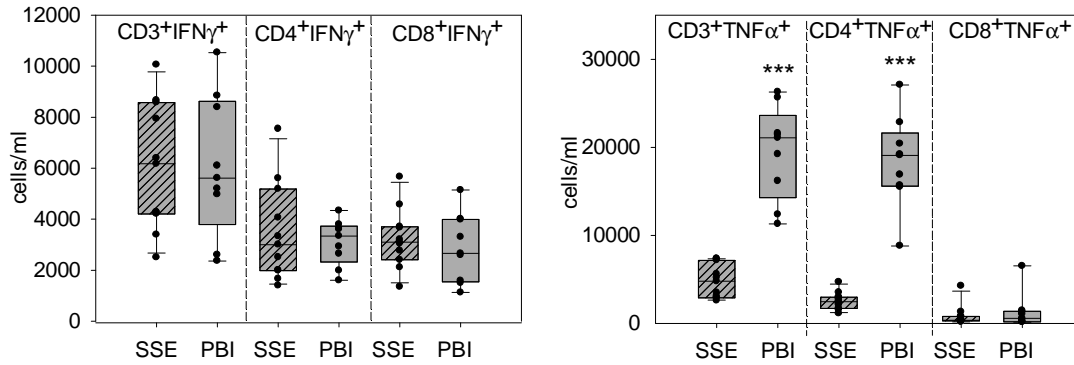




Figura 22. Número absoluto de células T, Th y Tc productoras de IFN γ y TNF α en LA de ratas con cirrosis SSE () y con cirrosis PBI (). * $p < 0,001$ vs. SSE. La inducción de peritonitis causó un aumento de células T (Th) productoras de TNF α mientras que no provocó ningún cambio en el número de células productoras de IFN γ .**

A diferencia de lo descrito anteriormente para las células Th productoras de TNF α , el número absoluto de monocitos peritoneales productores de TNF α disminuyó de forma muy significativa tras la PBI (787 ± 356 vs. 282 ± 140 células $\times 10^2$ /ml, $p < 0,001$).

En cuanto a la concentración de citoquinas solubles mediante la técnica de ELISA, se observó también que la concentración de IFN γ en el peritoneo de las ratas cirróticas tras PBI no sufrió ningún tipo de cambio con respecto a las ratas cirróticas SSE, mientras que la concentración de TNF α sufrió un gran aumento en las ratas con cirrosis tras PBI, del orden de 28 veces (Figura 23).

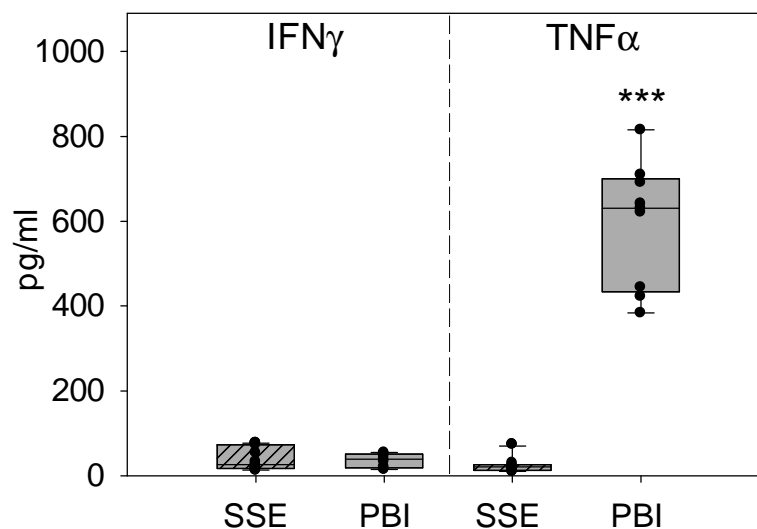




Figura 23. Concentración en pg/ml de IFN γ y TNF α medido por ELISA en LA de ratas cirrosis SSE () y cirrosis PBI (). * $p < 0,001$ vs. SSE. Gran aumento en la concentración de TNF α en el LA de ratas cirróticas PBI.**

- Sangre (cirrosis vs. cirrosis PBI)

En la sangre de ratas que habían sufrido PBI se observó una disminución del número de células capaces de producir citoquinas, tanto $\text{IFN}\gamma$ como $\text{TNF}\alpha$, aunque fue más evidente en el caso del $\text{IFN}\gamma$ (Figura 24). El número de monocitos capaces de producir $\text{TNF}\alpha$ también disminuyó (3.324 ± 1.054 vs. 144 ± 95 células $\times 10^2/\text{ml}$, $p < 0,001$).

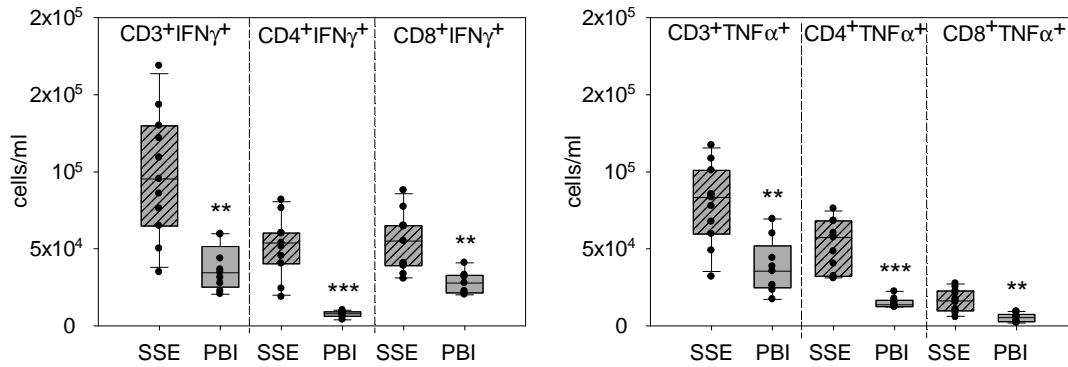


Figura 24. Número absoluto de células T, Th y Tc productoras de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ en sangre de ratas con cirrosis SSE (▨) y con cirrosis PBI (■). ** $p < 0,01$ vs. SSE. Disminución en la producción por células T de citoquinas en el grupo de ratas cirróticas con PBI.

La concentración de citoquinas solubles hallada en el plasma de las ratas cirróticas PBI fue superior a la encontrada en las ratas cirróticas SSE, a diferencia de las disminuciones encontradas en el número absoluto de células capaces de producirlas (Figuras 24 y 25).

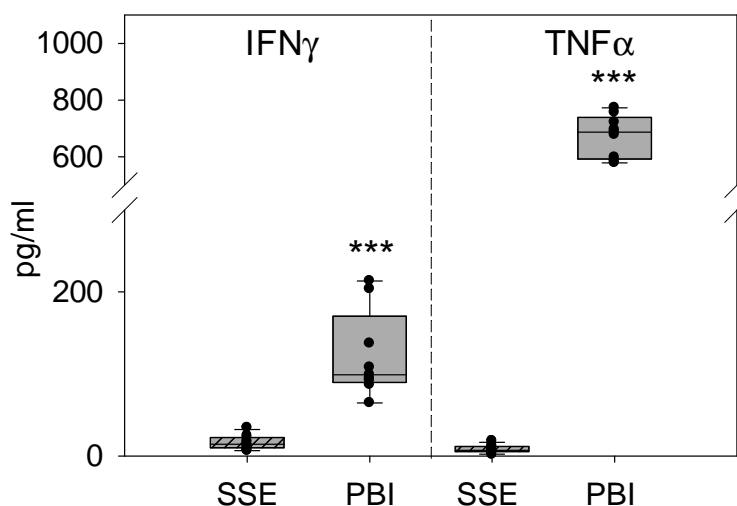


Figura 25. Concentración en pg/ml de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ en el plasma de ratas cirrosis SSE (▨) y cirrosis PBI (■). *** $p < 0,001$ vs. SSE. La peritonitis causó en las ratas cirróticas un aumento en la concentración plasmática de citoquinas solubles.

Los resultados del presente estudio realizado en ratas con cirrosis biliar a las que se induce peritonitis bacteriana se resumen del siguiente modo:

1. La cirrosis biliar experimental se asocia a una mayor tasa de traslocación bacteriana procedente del intestino y a una mayor facilidad para la diseminación de bacterias, tanto endógenas como exógenas, cuando se induce peritonitis bacteriana.
2. La cirrosis biliar se asocia a una alteración de los elementos celulares circulantes del sistema inmune, incluyendo un aumento del número de monocitos, linfocitos T, Th y Tc, linfocitos NK y NKT, y linfocitos B activados. Los monocitos se encuentran polarizados a la producción de $TNF\alpha$, siendo la principal fuente de esta citoquina en suero, mientras que los linfocitos T lo están especialmente a la de $IFN\gamma$, aunque también participan en la producción de $TNF\alpha$.
3. De forma similar, el líquido ascítico de las ratas cirróticas también se caracteriza por una marcada expansión de linfocitos T, tanto Th como Tc, y linfocitos B. Por el contrario, a diferencia de lo observado en sangre periférica, la población de monocitos peritoneales se encuentra marcadamente retraída, y esto es debido a la drástica disminución que sufre la subpoblación de monocitos residentes.
4. El líquido ascítico de las ratas con cirrosis muestra un estado de inflamación basal con un aumento en la concentración de $TNF\alpha$, producido principalmente por los linfocitos Th, y de $IFN\gamma$.
5. La inducción de peritonitis bacteriana en ratas controles causa una marcada expansión de monocitos, especialmente de los inflamatorios, en el líquido peritoneal de estos animales. Paralelamente se retraen los compartimentos de linfocitos T y NK peritoneales. La retracción de linfocitos T peritoneales ocurre a expensas de las subpoblaciones T MENT, Tc naive y Tc MC. Sin embargo, los linfocitos Th MET y Th naive aumentan de forma significativa. A diferencia de lo observado en el grupo de ratas control, la inducción de peritonitis a ratas cirróticas no provoca cambios en la población de monocitos en el líquido ascítico. Esto es debido a que los monocitos residentes sufren una marcada retracción. Sin embargo, la población de monocitos inflamatorios si que aumenta de forma significativa. Los linfocitos NK y diversas subpoblaciones de

linfocitos T (T MET, T naive y Tc MENT) de líquido ascítico también se retraen tras la inducción de peritonitis.

6. La inducción de peritonitis da lugar a la retracción de todas las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica analizadas, tanto en ratas control como en ratas con cirrosis biliar.
7. La inducción de peritonitis a ratas control provoca un marcado aumento en los niveles de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$, tanto en el peritoneo como en el suero, lo que contrasta con la reducción del número de linfocitos T productores de $IFN\gamma$, tanto peritoneales como circulantes, de monocitos circulantes $TNF\alpha+$, así como de linfocitos T circulantes productores de $TNF\alpha$.
8. La inducción de peritonitis provoca en las ratas con cirrosis un marcado aumento en la concentración de $TNF\alpha$ peritoneal, así como de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ séricos, junto con expansión en el líquido ascítico de los linfocitos Th productores de $TNF\alpha$. Sin embargo, los monocitos $TNF\alpha+$ de líquido ascítico y de sangre periférica, y los linfocitos T circulantes productores de $IFN\gamma$ y de $TNF\alpha$, se encuentran significativamente retraídos.

DISCUSIÓN

El presente estudio corrobora los hallazgos previos sobre la existencia de estado crónico de inflamación sistémica del sistema inmune en la cirrosis hepática, y que es consecuencia del estímulo bacteriano persistente observado en la cirrosis humana y experimental. Además, establece que esta activación del sistema inmune también se da en la cavidad peritoneal, y se debe fundamentalmente a la extravasación al líquido ascítico de linfocitos B y linfocitos T activados, mientras que la población de monocitos sufre una significativa retracción. La PBI causa la retracción de todas las poblaciones de linfocitos de sangre periférica estudiados, aunque los niveles de citoquinas pro-inflamatorias permanecen elevados en suero. Los niveles de TNF α en el líquido ascítico también aumentan en las ratas con cirrosis biliar tras la PBI, y a su producción contribuyen los linfocitos Th, pero no los monocitos. Todos estos hallazgos se relacionan con una mayor frecuencia de TB y diseminación de la infección en la cirrosis biliar, tanto basalmente como tras la inducción de peritonitis.

Nuestro objetivo fue investigar los posibles mecanismos patogénicos funcionales implicados en la susceptibilidad incrementada a la infección por bacterias de origen entérico en la cirrosis. Para ello, utilizamos un modelo experimental de cirrosis biliar, en el que evaluamos la TB y la diseminación bacteriana, caracterizamos las alteraciones de las células del sistema inmune a nivel peritoneal y sistémico, y evaluamos el efecto de la inducción de peritonitis bacteriana, mediante la inyección intraperitoneal de *E. coli*, en los parámetros anteriormente mencionados.

Mayor tasa de traslocación y diseminación bacteriana en cirrosis biliar experimental

Nuestros resultados revelan que la cirrosis biliar experimental se asocia a una mayor tasa de TB procedente del intestino y a una mayor facilidad para la diseminación de bacterias, tanto basalmente, como tras la inducción de peritonitis bacteriana. Esto es consecuencia del estímulo bacteriano persistente al que se encuentran sometidas las células del sistema inmune, que provoca un estado de inflamación crónico, sumado a la incapacidad de los monocitos productores de TNF α de expandirse y responder a la infección, tanto en el líquido peritoneal, como en la sangre periférica. Esto sugiere que el aumento de los niveles de TNF α en el líquido ascítico de las ratas con cirrosis tras la inducción de la infección se debe a la producción de esta citoquina por los linfocitos Th TNF α +, que sí se encuentran expandidos en el peritoneo de estos animales. Sin embargo, esto parece ser un mecanismo insuficiente para contener la infección en la cirrosis.

La TB al GLM es un proceso ampliamente conocido y estudiado en la cirrosis (Runyon *et al.*, 1994; García-Tsao *et al.*, 1995; Pérez-Páramo *et al.*, 2000; Genescá *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2005; Guarner *et al.*, 2006; Úbeda *et al.*, 2010). Los pacientes y los modelos experimentales de cirrosis sufren un elevado paso de bacterias y productos bacterianos de origen entérico a los GLM, y finalmente a la circulación sistémica, proceso conocido como TB (Albillos *et al.*, 2003; Such *et al.*, 2002; García-Tsao *et al.*, 1995). La frecuencia de estos eventos aumenta cuando la enfermedad progresa, y su consecuencia inmediata es un elevado riesgo de sufrir infecciones bacterianas espontáneas en la cirrosis (Albillos *et al.*, 2004a; Zapater *et al.*, 2006). La TB juega un papel fundamental en el daño hepático agudo, así como en la progresión a una enfermedad hepática crónica (Lin *et al.*, 1995; Cirera *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2007), y su aparición se debe a la concurrencia de tres factores: i) el sobrecrecimiento bacteriano intestinal y la disbiosis de la microbiota, ii) el aumento de la permeabilidad intestinal, y iii) alteraciones del sistema inmune (Perez-Paramo *et al.*, 2000; Albillos *et al.*, 2002).

Este estudio aporta nuevas evidencias de la reducida capacidad del sistema inmune de contener la infección en la cirrosis. Tras realizar el estudio de TB y diseminación bacteriana tisular en nuestro modelo experimental de cirrosis biliar, pudimos corroborar que las ratas con cirrosis mostraron un aumento significativo de TB a los GLM, así como un mayor porcentaje de bacterias en el pulmón, el hígado y el bazo de las ratas con cirrosis, aunque estos no alcanzaron significación estadística. La PBI dio lugar a un mayor incremento en la tasa de TB a los GLM en las ratas con cirrosis, que se debió fundamentalmente a las bacterias exógenas, inyectadas, junto con un mayor porcentaje de bacterias en el pulmón, todas ellas exógenas. El aumento en la frecuencia de bacterias en el bazo tras la PBI se observó tanto en las ratas con cirrosis como en las ratas control, y fue debido fundamentalmente a las bacterias inyectadas. Sin embargo, al analizar el porcentaje de bacterias en el hígado tras la PBI, observamos que éste aumentó en las ratas control, pero no en las ratas con cirrosis biliar. Esto podría ser debido a que la cirrosis causa cambios estructurales en el hígado que producen una alteración de la circulación intrahepática con formación de colaterales portosistémicas que eluden la circulación intrahepática, que podrían explicar la ausencia de bacterias inyectadas en el hígado de las ratas con cirrosis biliar tras la PBI.

Además, tras la PBI, las ratas con cirrosis presentaron una mayor carga de bacterias por gramo de tejido que las ratas control en todos los órganos estudiados, a

excepción del bazo, lo que pone de manifiesto una vez más la respuesta deficitaria a la PBI en nuestro modelo experimental de cirrosis.

Todos estos hallazgos evidencian la elevada tasa de TB y diseminación bacteriana, tanto basalmente como tras la PBI, en las ratas con cirrosis, y podrían ayudar a explicar el hecho de que la PBE sea la infección más frecuente y característica de la cirrosis.

La cirrosis biliar se asocia a una alteración de los elementos circulantes del sistema inmune

Diversos estudios han demostrado que el sistema inmune se encuentra anormalmente activado a nivel sistémico en pacientes y modelos experimentales de cirrosis con y sin ascitis (**Albillos et al., 2003; Albillos et al., 2004 b; Muñoz et al., 2005; Ubeda et al., 2010**). Esta alteración se caracteriza por la expansión de los linfocitos activados y los monocitos en la sangre periférica, acompañada del aumento de los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-6 en las fases descompensadas de la enfermedad (**Wiest et al., 1999a; Genescá et al., 2003; Tilg et al., 1992; Albillos et al., 2003; Albillos et al., 2004b**).

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto la universalidad del estado pro-inflamatorio sistémico en la cirrosis y la relevante contribución del estímulo bacteriano persistente a esta excesiva respuesta del sistema inmune. En la circulación sistémica de ratas con cirrosis biliar existe un aumento del número de monocitos, linfocitos T, Th y Tc, linfocitos NK y NKT, y linfocitos B activados. Los monocitos se encuentran polarizados a la producción de TNF α , siendo la principal fuente de esta citoquina en suero, mientras que los linfocitos T lo están especialmente a la de IFN γ , aunque también participan en la producción de TNF α . Esto da lugar a un aumento muy significativo de los niveles de IFN γ y TNF α en el suero de las ratas con cirrosis biliar en comparación con las ratas control. Eso indicaría que en sangre de ratas con cirrosis existe una gran activación de células T que van a activar a monocitos para intentar frenar la infección.

La marcada expansión y activación de las poblaciones de monocitos y células NK, así como de linfocitos T, NKT y B encontrada en la sangre en este modelo de cirrosis experimental, indica que estos animales presentan un estado de inflamación sistémica que afecta tanto al sistema inmune innato como al adquirido. Nuestro grupo ha demostrado previamente que el origen de esta inflamación en los estadios iniciales

de la cirrosis, es decir, en cirrosis compensada, se debe a la recirculación de las células del sistema inmune activadas en el hígado (Úbeda *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando la cirrosis evoluciona a la fase descompensada, el origen de estas células activadas circulantes es el mesenterio, como consecuencia del paso de bacterias desde la luz del intestino a los GLM (Muñoz *et al.*, 2005).

El líquido ascítico de las ratas con cirrosis biliar también muestra signos de activación

Se ha prestado escasa atención a la caracterización y comportamiento funcional de células del sistema inmune a nivel peritoneal, a pesar que la PBE es la infección más frecuente y característica de la cirrosis.

Nuestra hipótesis establece que, de forma similar a lo observado a nivel intestinal y sistémico, un ambiente inflamatorio como consecuencia de la exposición continua a bacterias pudiera causar la activación crónica de las células del sistema inmune del líquido ascítico, y el posterior deterioro de su función, lo que contribuiría a la diseminación de la infección.

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto que el líquido ascítico de las ratas con cirrosis biliar también se caracteriza por una marcada expansión de linfocitos T, tanto Th como Tc, y linfocitos B. Por el contrario, a diferencia de lo observado en sangre periférica, la población de monocitos peritoneales se encuentra marcadamente retraída, y esto es debido a la subpoblación de monocitos residentes. Además, el líquido ascítico de las ratas con cirrosis muestra un estado de inflamación basal con un aumento en la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , producida principalmente por los linfocitos Th, y de IFN γ . Sin embargo, el número de linfocitos T productores de IFN γ disminuyó significativamente en el líquido ascítico de las ratas con cirrosis, lo que sugiere que la producción de esta citoquina pro-inflamatoria se esté llevando a cabo por otras células del sistema inmune, como podrían ser los linfocitos NK.

El aumento en el número de linfocitos T observado en la cavidad peritoneal de las ratas cirróticas acompañado de una expansión de los linfocitos B sugiere que la interacción de estos con las células Th activadas va a favorecer la activación de las células B, estableciéndose lo que se conoce como un foco primario de expansión clonal, en el que ambos tipos de linfocitos proliferan (Janeway *et al.*, 2004). La retracción de la población de monocitos en el líquido ascítico de las ratas con cirrosis,

junto con la ausencia de cambios en el número de monocitos productores de $\text{TNF}\alpha$ en la cavidad peritoneal entre las ratas con cirrosis biliar y las ratas control, denota un defecto en la capacidad de respuesta de estas células en la cirrosis experimental que podría estar relacionado con elevada frecuencia de episodios de PBE presente en la cirrosis.

La inducción de peritonitis bacteriana provoca una hipersensibilidad del sistema inmune peritoneal y sistémico

La PBI en ratas controles causa una marcada expansión de monocitos, que es a expensas de la subpoblación de monocitos inflamatorios, en el líquido peritoneal de estos animales. Paralelamente se retraen los compartimentos de linfocitos T y NK peritoneales. La retracción de linfocitos T peritoneales ocurre a expensas de las subpoblaciones T MENT, Tc naive y Tc MC. Sin embargo, los linfocitos Th MET y Th naive aumentan de forma significativa. Estos cambios en las poblaciones del sistema inmune del peritoneo de las ratas control tras la PBI, se acompañan por un aumento muy significativo de las citoquinas pro-inflamatorias $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ en este compartimento, a pesar de la retracción de los linfocitos T productores de $\text{IFN}\gamma$ y de monocitos activados a la producción de $\text{TNF}\alpha$.

A diferencia de lo descrito en las ratas control, la PBI no provoca cambios en la población total de monocitos del líquido ascítico de las ratas cirróticas. Al analizar las subpoblaciones de monocitos, observamos que los monocitos inflamatorios del líquido ascítico sí se encuentran expandidos, mientras que los monocitos residentes sufren una marcada retracción. Los linfocitos NK y diversas subpoblaciones de linfocitos T (T MET, T naive y Tc MENT) de líquido ascítico también se retraen tras la PBI en nuestro modelo de cirrosis biliar. Los niveles de $\text{TNF}\alpha$ en el líquido ascítico de las ratas cirróticas también aumentan de forma significativa tras la PBI y a la producción de esta citoquina parecen contribuir los linfocitos Th $\text{TNF}\alpha+$, que aumentan significativamente, y no los monocitos $\text{TNF}\alpha+$, que disminuyen drásticamente. Esto podría indicar, una vez más, un defecto en la población de monocitos en respuesta a la infección en la cirrosis experimental.

En lo que se refiere al efecto a nivel sistémico de la inducción de peritonitis, nuestro estudio demuestra que ello da lugar a la retracción de todas las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica analizadas, tanto en ratas control como con cirrosis. Se desconoce la razón por la que se produce esta marcada

linfopenia tras la PBI. Una posible explicación sería que, estas células, una vez activadas en el territorio peritoneal, salieran a la circulación y se dirigieran, guiados por quimioquinas y por moléculas de adhesión expresadas tras su activación, a tejidos inflamados, como el bazo, el intestino o el propio hígado.

A pesar de la linfopenia resultante de la PBI tanto en ratas con cirrosis biliar como en ratas control, los niveles séricos de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ aumentan de forma significativa en ambos grupos de animales tras la inducción de la infección.

Todos estos hallazgos sugieren que en la cirrosis biliar experimental existe una hipersensibilidad del sistema inmune peritoneal y sistémico al estímulo bacteriano, que paradójicamente se asocia a una incapacidad del compartimento monocitario de responder a la infección, especialmente en el líquido ascítico, y que podría contribuir al elevado número de infecciones bacterianas espontáneas observadas en la cirrosis.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio realizado en ratas con cirrosis biliar a las que se induce peritonitis bacteriana permiten concluir que:

1. La traslocación y la diseminación sistémica de bacterias, intestinales y exógenas, tras la infección peritoneal inducida está aumentada en la cirrosis biliar experimental. Este defecto en la contención de las bacterias traduce un daño en la función del sistema inmune en la cirrosis experimental.
2. La cirrosis se asocia a un estado persistente de inflamación del sistema inmune, tanto peritoneal como sistémico, caracterizado por un aumento en la concentración de citoquinas proinflamatorias y una expansión de las células inmunitarias activadas.
3. En la cirrosis biliar experimental existe una hipersensibilidad del sistema inmune peritoneal y sistémico al estímulo bacteriano para producir citoquinas pro-inflamatorias. Paradójicamente, ello se asocia a una incapacidad para que se expanda el compartimento monocitario, especialmente a nivel peritoneal.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abdala E**, Baia CE, Mies S, Massarollo PC, de Paula Cavalheiro N, Baía VR, Inácio CA, Sef HC, Barone AA. Bacterial translocation during liver transplantation: A randomized trial comparing conventional with venovenous bypass vs. piggyback methods. *Liver transplantation*. 2007;13:488-496.
2. **Akalin HE**, Laleli Y, Telatar H. Serum bactericidal and opsonic activities in patients with non-alcoholic cirrhosis. *Q J Med* 1985;56:431-437.
3. **Akira S**, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675-8.
4. **Albillos A**, Cuervas-Mons V, Millánl, Cantón T, Montes J, Barrios C, Garrido A, Escartín P. Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 1990;98:134-40.
5. **Albillos A**, de la Hera A, Álvarez-Mon M. Consecuencias patogénicas de la traslocación bacteriana en la cirrosis hepática. *Gastroenterología y hepatología* 2001. Vol.24 núm.9.
6. **Albillos A**, de la Hera A. Multifactorial gut barrier failure in cirrosis and bacterial translocation: working out the role of probiotics and antioxidants. *J. hepatol* 2002; 37(4):523-6.
7. **Albillos A**, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, Alvarez-Mon M. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-17.
8. **a. Albillos A**, De la Hera A, Álvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004;363:1608-10.
9. **b. Albillos A**, de la Hera, Reyes E, Monserrat J, Muñoz L, Nieto M, Prieto A, Sanz E, Alvarez-Mon M. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-31.
10. **Albillos A**, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Experimental models of spontaneous bacterial peritonitis. In: Ginés P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005:411-21.
11. **Albillos A**, Muñoz L, Nieto M, Úbeda M, De la Hera A, Álvarez-Mon M. Sistema inmunitario inflamatorio en la cirrosis. Relevancia de la traslocación bacteriana. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29(Supl 1):1-4.

12. **Albillos A**, Nieto M, Ubeda M, Muñoz L, Fraile B, Reyes E, Lledó L, Blanco I, Pastor O, Salas C, Lario M, Monserrat J, Bataller R, Alvarez-Mon M. The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrhosis. *Gut* 2010;59:943-952.
13. **Anthony PP**, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol.* 1978;31:395-414.
14. **Auffray C**, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669-92
15. **Bajaj JS**, Zadornova Y, Heuman DM, Hafeezullah M, Hoffmann RG, Sanyal AJ, Saeian K. Association of proton pump inhibitor therapy with spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1130-4.
16. **Bajaj JS**, Ananthakrishnan AN, Hafeezullah M, Zadornova Y, Dye A, McGinley EL, Saeian K, Heuman D, Sanyal AJ, Hoffmann RG. *Clostridium difficile* is associated with poor outcomes in patients with cirrhosis: A national and tertiary center perspective. *Am J Gastroenterol* 2010;105:106-13.
17. **Barrat-Due A**, Pischke SE, Brekke OL, Thorgersen EB, Nielsen EW, Espevik T, Huberlang M, Mollnes TE. Bride and groom in systemic inflammation. The bells ring for complement and Toll in cooperation. *Immunobiology.* 2012;217(11):1047-56.
18. **Bass NM**, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, Sigal S, Sheikh MY, Beavers K, Frederick T, Teperman L, Hillebrand D, Huang S, Merchant K, Shaw A, Bortey E, Forbes WP. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 2010;362:1071-81.
19. **Bataller R**, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115:209-18.
20. **Beck PL**, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 1995;23:235
21. **Bellot P**, Francés R, Such J. Bacterial translocation in cirrhosis. *Gastroenterología y hepatología* 2008;31(8):508-14
22. **Bemelmans MH**, Gouma DJ, Greve JW, Burman WA. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. *Hepatology.* 1992;15:1132-6.

23. **Bendelac A**, Savage PB, Teyton L. The biology of the NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-36.
24. **Benvegnù L**, Gios M, Bocatto S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut*. 2004;53:744-9.
25. **Berg RD**, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*. 1979;23:403-11.
26. **Beutler B**. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 2004;40:845-859.
27. **Bonorino P**, Ramzan M, Camous X, Dufeu-Duchesne T, Thelu MA, Sturm N, Dariz A, Guillermet C, **Pernollet M**, Zarski JP, Marche PN, Leroy V, Jouvin-Marche E. Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. *J Hepatol* 2009;51:458-67.
28. **Bosch J**, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:1-14.
29. **Bosch J**. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Hipertensión portal. In: **Farreras. Medicina Interna** 14ª ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 38.
30. **Bowen DG**, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004;114:701–712.
31. **Braillon A**, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D. Reduced splanchnic vasoconstriction to angiotensin II in conscious rats with biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1993;17:86-90.
32. **Brieva A**, García -Villarubia V, Guerrero A, Pivel JP, Giménez-Gallego G, Matji JA. Glicoconjugados de polipéptidos farmacológicamente activos. *Spanish patent* P9900408 and PCT/ES99/00338, 1999.
33. **Broad A**, Jones DE, Kirby JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological “damage limitation” effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* 2006;13:2487-2502.
34. **Brockner T**, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Riedinger M, Raykundalia C, Lane P. CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles. *Eur J Immunol*. 1999;29:1610-6.

35. **Bruguera M**, Rodés J. Cirrosis hepática compensada. In *Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares*. Madrid: Elba 2001:99-104.
36. **Burdin N**, Rousset F, Banchereau J. B-cell-derived IL-10: production and function. *Methods*. 1997;11:98-111.
37. **Cao Q**, Batey R, Pang G, Clancy R. Ethanol-altered liver-associated T cells mediate liver injury in rats administered Concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS). *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23:1660-7.
38. **Cárdenas A**, Sánchez-Fueyo A. Disfunción circulatoria en la cirrosis. Fisiopatología y consecuencias clínicas. *Gastroenterol hepatol* 2003;26(7):447-55
39. **Castilla A**, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med*. 1991;324:933-40.
40. **Caux C**, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Semin Immunopathol*. 2000;22:345-69.
41. **Chang CS**, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestinal dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*. 1998;28:1187-90.
42. **Chaplin DD**, Ala B. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:S430-5.
43. **Chaplin DD**, Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010 February;125(2 Suppl 2):S3-23.
44. **Chavez-Tapia NC**, Tellez-Avila FI, Garcia-Leiva J, Valdovinos MA. Use and overuse of proton pump inhibitors in cirrhotic patients. *Med Sci Monit* 2008;14:CR468-72.
45. **Chedid A**, Mendenhall CL, Moritz TE, French SW, Chen TS, Morgan TR. Expression of the beta 1 chain (CD29) of integrins and CD45 in alcoholic liver disease. The VA Cooperative Study Group No. 275. *Am J Gastroenterol*. 1993;88:1920-7.
46. **Chow JC**, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:10682-10692.
47. **Christou L**, Pappas G, Falagas ME. Bacterial infection related morbidity and mortality in cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1510-1517.

48. **Chu CJ**, Lee FY, Wang SS, Lu RH, Tsai YT, Lin HC, Hou MC, Chan CC, Lee SD. Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats with ascites: role of endotoxin, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide. **Clin Sci (Lond)** 1997;93:219-25.
49. **Ciraci C**, Janczy JR, Sutterwala FS, Cassel L. Control of innate and adaptative immunity by the inflammosome. **Microbes Infect.** 2012;14(14):1263-70.
50. **Cirera I**, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC, Lacy A, Suarez MJ, Rimola A, Rodes J. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. **J Hepatol** 2001;34:32-7.
51. **Colombato, LA**. Hepatic Hemodynamic Lab. V.A.M.C.Yale University School of Medicine. New Haven, CT. Experimental models of portal hypertension. Systemic and regional hemodynamics in liver diseases. June 3-5, 1990. Bari, Italy.
52. **Colombato LA**, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats. **Hepatology** 1992;15:323-8.
53. **Colombato LA**, Rocheleu B, Huet PM. Intracholedochal formalin injection and bile duct ligation (FBDL) in the rat. A new model of biliary cirrhosis and portal hypertension, with a normal sized biliary tree. **Hepatology** (Conference) 1994;20:100A.
54. **Condliffe AM**, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. **Clin Sci (Lond)** 1998;94:461-471.
55. **Cook RT**, Waldschmidt TJ, Cook BL, Labrecque DR, McLatchie K. Loss of the CD5+ and CD45RAhi B cell subsets in alcoholics. **Clin Exp Immunol** 1996;103:304-10.
56. **Corado J**, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. **Clin Exp Immunol** 1997;109:451-7.
57. **Corbin IR**, Buist R, Peeling J, Zhang M, Uhanova J, Minuk GY. Hepatic 31P MRS in rat models of chronic liver disease: assessing the extent and progression of disease. **Gut** 2003;52:1046-53.
58. **D'Amico G**, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis. A systematic review of 118 studies. **J Hepatol** 2006;44:217-231.
59. **De la Hera A**, Albillos A, Reyes E, Nieto M, Muñoz L, Del Amo J, Escoll P, Revilla G, Ranz I, Mallo A, Sanz E, Alvarez Mon M. Novel immunotherapy strategies in cirrhosis: Benefit of selective modulation of monocyte TNF α production by the oral immune

- response modifier AM3. *Immunology and the liver: Immunotherapy* 2004. Acción Médica S.A.; 265-269.
60. a. **Delves PJ**, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
61. b. **Delves PJ**, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.
62. **Devrière J**, Denys C, Schandene L, Romasco F, Adler M, Wybran J, Dupont E. Decreased proliferative activity associated with activation markers in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1988;72:377-82.
63. **Devrière J**, Content J, Denys C, Vandebussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 1990;11:628-34.
64. **Díaz D**, Barcenilla H, Borrero MJ, Álvarez-Mon M. T lymphocyte effector functions. *Medicine* 2013;11(28):1742-51.
65. **Dickinson E**, Tuncer R, Nadler E, Boyle P, Alber S, Watkins S, Ford H. NOX, a novel nitric oxide scavenger, reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. *Am J Physiol*. 1999;277:1281G-7G.
66. **Dobrovolskaia MA**, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002;4:903-14.
67. **Doherty DG**, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev*. 2000;174:5-20.
68. **Doi H**, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang KM, Vonderheide RH, Kaplan DE. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology* 2012;55:709-19.
69. **Dun DL**, Barke RA, Ahrenholz DH, Humphrey EW, Simmons RL. The adjuvant effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis. Mechanism and clinical implications. *Ann Surg* 1984;199:37-43.
70. **Eigler A**, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today*. 1997;18:487-92.
71. **Fazi C**, Dagklis A, Cottini F, Scarfo L, Bertilaccio MT, Finazzi R, Memoli M, Ghia P. Monoclonal B cell lymphocytosis in hepatitis C virus infected individuals. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78 Suppl 1:S61-8.

72. **Fernández M**, Pizcueta P, Garcia-Pagan JC, Feu F, Cirera I, Bosch J, Rodes J. Effects of ritanserin, a selective and specific 5₂-serotonergic antagonist, on portal pressure and splanchnic hemodynamics in rats with long-term bile duct ligation. **Hepatology** 1993;18:389-93.
73. **Fierer J**, Finley F. Deficient serum bactericidal activity against *Escherichia coli* in patients with cirrhosis of the liver. **J Clin Invest** 1979;63:912-921.
74. **Finlayson ND**, Krohn K, Fauconnet MH, Anderson KE. Significance of serum complement levels in chronic liver disease. **Gastroenterology** 1972;63:653-659.
75. **Fiuza C**, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. **J Infect Dis** 2000;182:526-533.
76. **Francés R**, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreu R, Pascual S, Bellot P, Pérez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA in patients con cirrosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. **Hepatology** 2008;47:978-985.
77. **Fu J**, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. **Gastroenterology** 2007;132:2328-39.
78. **Gäbele E**, Mühlbaier M, Paulo H, Johann M, Meltzer C, Leidl F, Wodarz N, Wiest R, Scölmerich J, Hellerbrand C. Analysis of monocyte chemotactic protein-1 gene polymorphism in patients with spontaneous bacterial peritonitis. **World J Gastroenterol** 2009;15:5558-62.
79. **Gao B**, Jeong IW, Tian Z. Liver: an organ predominant innate immunity. **Hepatology** 2008;47:729-736.
80. **García González M**, Boixeda D, Herrero D, Burgaleta C. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrosis. **Gastroenterology**. 1993;105:527-31.
81. **García-Tsao G**. Spontaneous bacterial peritonitis. **Gastroenterol Clin North Am**. 1992;21:257-5.
82. **García-Tsao G**, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West B. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. **Gastroenterology** 1995;108:1835-1841

83. a. **García-Tsao G**. Bacterial infections in cirrhosis. *Can. J. Gastroenterol.* 2004;18(6):405-406
84. b. **García-Tsao G**, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:353-372.
85. **García Tsao G**. Bacterial infections in cirrhosis: treatment and prophylaxis. *Journal of Hepatology* 42 (2005) S85-S92
86. **García-Tsao G**, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51:1445-9.
87. **Geissmann F**, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.
88. **Genescà J**, Martí R, Rojo F, Campos F, Peribañez V, González A, Castells L, Ruiz-Marcellán C, Margarit C, Esteban R, Guardia J, Segura R. Increased tumour necrosis factor alpha production in mesenteric lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut* 2003;52:1054-9.
89. **Ginés P**, Arroyo V. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Cirrosis hepática. In: *Farreras: Medicina Interna* 14ª ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 44.
90. **Girón JA**, Alvarez-Mon M, Menéndez-Caro JL, Abreu L, Albillos A, Manzano L, Durantez A. Increased spontaneous and lymphokine-conditioned IgA and IgG synthesis by B cells from alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1992;16:664-70.
91. **Girón-González JA**, Alvarez-Mon M, Menéndez-Caro JL, Manzano L, Abreu L, Yebra M, Durantez-Martínez A. T lymphocytes from alcoholic cirrhotic patients show normal interleukin-2 production but a defective proliferative response to polyclonal mitogens. *Am J Gastroenterol* 1994;89:767-73.
92. **González R**, González M, Albillos A. Physiopathology of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2007;30(2):78-84.
93. **Guarner C**, González-Navajas JM, Sánchez E, Soriano G, Francés R, Chiva M, Zapater P, Benlloch S, Muñoz C, Pascual S, Balanzó J, Pérez-Mateo M, Such J. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006;44:633-639.
94. **Harrison RJ**, Ettore A, Little AM, Khakoo SI. Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2010;161:306-14.

95. **Haslett PA.** Anticytokine approaches to the treatment of anorexia and cachexia. *Semin Oncol.* 1998;25:53-7.
96. **Hassner A,** Kletter Y, Shlag D, Yedvab M, Aronson M, Shibolet S. Impaired monocyte function in liver cirrhosis. *BMJ* 1981;282:1262-1263.
97. **Hemmi H,** Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408:740-5.
98. **Henson PM.** Dampening inflammation. *Nat Immunol* 2005;6:1179-81.
99. **Heo J,** Seo YS, Yim HJ, HahnT, Park SH, Ahn AH, Park JY, Park JY, Kim MY, Park SK, Cho M, Um SH, Han KH, Kim HS, Baik SK, Kim BI, Cho H. Clinical features and prognosis of spontaneous bacterial peritonitis in korean patients with liver cirrhosis: a multicenter retrospective study. *Gut liver* 2009;3:197-24.
100. **Hoare M,** Gelson WT, Das A, Fletcher JM, Davies SE, Curran MD, Vowler SL, Maini MK, Akbar AN, Alexander GJ. CD4+ T-lymphocyte telomere length is related to fibrosis stage, clinical outcome and treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2010;53:252-60.
101. **Homann C,** Varning K, Hagasen K, Mollnes TE, Graudal N, Thomsen AC, Garred P. Acquired C3 deficiency in alcoholic cirrhosis predispose to infection and increased mortality. *Gut* 1997;40:544-9.
102. **Iimuro Y,** Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology.* 1997;26:1530-7.
103. **Isomäki P,** Panesar M, Annenkov A, Clark JM, Foxwell BM, Chernajovsky Y, Cope AP. Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. *J Immunol.* 2001;166:5495-507
104. **Janeway CA Jr,** Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
105. **Janeway CA,** Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease* 2004. Garland Publishing.
106. **Jeong WI,** Gao B. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23 [Suppl 1]:S112-S118.

107. **Joyce LD**, Hau T, Hoffman R, Simmons RL, Lillehei RC. Evaluation of the mechanism of zymosan-induced resistance to experimental peritonitis. ***Surgery*** 1978;83:717-25.
108. **Kalambokis GN**, Tsianos EV. Rifaximin reduces endotoxemia and improves liver function and disease severity in patients with decompensated cirrhosis. ***Hepatology*** 2012;55:655-6.
109. **Kasper DL**, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL. ***Harrison's Principles of Internal Medicine*** 16th Edition 2004. McGraw-Hill Professional.
110. **Kawakami Y**, Nabeshima S, Furusyo N, Sawayama Y, Hayashi J, Kashiwagi S. Increased frequency of interferon-gamma-producing peripheral blood CD4+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. ***Am J Gastroenterol*** 2000;95:227-32.
111. **Kedika RR**, Souza RF, Spechler SJ. Potential anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors: a review and discussion of the clinical implications. ***Dig Dis Sci*** 2009;54:2312-7.
112. **Kidd P**. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. ***Altern Med Rev***. 2003;8:223-46.
113. **Kirsch R**, Woodburne VE, Shephard EG, Kirsch RE. Patients with stable uncomplicated cirrhosis have normal neutrophil function. ***J Gastroenterol Hepatol*** 2000;15:1298-1306.
114. **Kita H**, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. ***Gastroenterology*** 2001;120:1485-501.
115. **Kiyici M**, Giray Nak S, Budak F, Gurel S, Oral B, Dolar E, Gulden M. Lymphocyte subsets and cytokines in ascitic fluid of decompensated cirrhotic patients with and without spontaneous ascites infection. ***Journal of gastroenterology and Hepatology*** 21 (2006) 963-969.
116. **Kiyono H**, McGhee JR, Wannemuehler MJ, Michalek SM. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. ***J Exp Med*** 1982;155(2):605-10.
117. **Knolle P**, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. ***J Hepatol*** 1995;22:226-229.
118. **Knolle PA**, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. ***Immunol Rev*** 2000;174:21-34.
119. **Kountouras J**, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. ***Br J Exp Pathol*** 1984;65:305-11.

120. **Krag A**, Wiest R, Gludd LL. Reduced mortality with nonselective betablockers (NSBB) compared to banding is not related to prevention of bleeding or bleeding related mortality: systematic review of randomized trials. *J Hepatol* 2011;54:S61-S208.
121. **Krag A**, Wiest R, Albillos A, Gluud LL. The window hypothesis: haemodynamic and non-haemodynamic effects of beta-blockers improve survival of patients with cirrhosis during a window in the disease. *Gut* 2012;61:967-9.
122. **Laso FJ**, Madruga JI, López A, Ciudad J, Alvarez-Mon M, San Miguel J, Orfao A. Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: influence of ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20:1564-8.
123. **Laso FJ**, Iglesias-Osma C, Ciudad J, Lopez A, Pastor I, Orfao A. Chronic alcoholism is associated with an imbalanced production of Th-1/Th-2 cytokines by peripheral blood T cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1306-11.
124. **Laso FJ**, Iglesias-Osma C, Ciudad J, Lopez A, Pastor I, Torres E, Orfao A. Alcoholic liver cirrhosis is associated with a decreased expression of the CD28 costimulatory molecule, a lower ability of T cells to bind exogenous IL-2, and increased soluble CD8 levels. *Cytometry* 2000;42:290-5
125. **Laso FJ**, Almeida J, Torres E, Vaquero JM, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:876-85.
126. **Leber B**, Mayrhauser U, Rybczynski M, Stadlbauer V. Innate immune dysfunction in acute and chronic liver disease. *Wien Klin Wochenschr* 2009;121:732-744.
127. **Lemmers A**, Moreno C, Gustot T, Marechal R, Degre D, Demetter P, de Nadai P, Geerts A, Quertinmont E, Vercruysse V, Le Moine O, Deviere J. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646-57.
128. **Le Moine O**, Marchant A, De Groote D, Azar C, Goldman M, Deviere J. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. *Hepatology* 1995;22:1436-9.
129. **Li WY**, Jiang YF, Jin QL, Zhang H, Feng XW, Niu JQ. Immunologic characterization of posthepatitis cirrhosis caused by HBV and HCV infection. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:138237.

130. **Lin AW**, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, Ha C, Jacobson IM, Talal AH. CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 2004;137:408-16.
131. **Lin CY**, Tsai IF, Ho YP, Huang CT, Lin YC, Lin CJ, Tseng SC, Lin WP, Chen WT, Sheen IS. Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2007;46:816-26.
132. **Lin RS**, Lee FY, Lee SD, Tsai YT, Lin HC, Lu RH, Hsu WC, Huang CC, Wang SS, Lo KJ. 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):165-72.
133. **Llovet JM**, Bartoli R, March F, Planas R, Vinado B, Cabre E, Arnal J, Coll P, Ausina V, Gassull MA. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998;28:307-13.
134. **López-Talavera JC**, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996;23:1616-21.
135. **López-Talavera JC**, Levitzki A, Martínez M, Gazit A, Esteban R, Guardia J. Tyrosine kinase inhibition ameliorates the hyperdynamic state and decreases nitric oxide production in cirrhotic rats with portal hypertension and ascites. *J Clin Invest* 1997;100:664-70.
136. **Luna-Casado L**, Diez-Ruiz A, Gutierrez-Gea F, Santos-Perez JL, Rico-Irles J, Wachter H, Fuchs D. Increased peripheral mononuclear cells expression of adhesion molecules in alcoholic cirrhosis: its relation to immune activation. *J Hepatol* 1997;27:477-83.
137. **MacKay CR**, Marston W, Dudler L. Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *Eur J Immunol*. 1992;22:2205-10.
138. **Manfras BJ**, Weidenbach H, Beckh KH, Kern P, Möller P, Adler G, Mertens T, Boehm BO. Oligoclonal CD8+ T-cell expansion in patients with chronic hepatitis C is associated with liver pathology and poor response to interferon-alpha therapy. *J Clin Immunol* 2004;24:258-71.
139. **Márquez M**, Fernandez-Gutierrez C, Montes-de-Oca M, Blanco MJ, Brun F, Rodriguez-Ramos C, Giron-Gonzalez JA. Chronic antigenic stimuli as a possible

- explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2009;158:219-29.
140. **Martín-Mateos R**, Mateos B, Lledó JL, Téllez L, Albillos A. Infecciones bacterianas en cirrosis. *Medicine* 2016;12(12):666-72.
141. **Massonnet B**, Delwail A, Ayrault JM, Chagneau-Derrode C, Lecron JC, Silvain C. Increased immunoglobulin A in alcoholic liver cirrhosis: exploring the response of B cells to Toll-like receptor 9 activation. *Clin Exp Immunol* 2009;158:115-24.
142. **McGovern BH**, Golan Y, Lopez M, Pratt D, Lawton A, Moore G, Epstein M, Knox TA. The impact of cirrhosis on CD4+ T cell counts in HIV-seronegative patients. *Clin Infect Dis* 2007;44:431-7.
143. **a. Medzhitov R**, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptative immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 1997;9:4-9.
144. **b. Medzhitov R**, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll proteins signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
145. **Medzhitov R**, Janeway CA. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-344.
146. **Mehta AS**, Long RE, Comunale MA, Wang M, Rodemich L, Krakover J, Philip R, Marrero JA, Dwek RA, Block TM. Increased levels of galactose-deficient anti-Gal immunoglobulin G in the sera of hepatitis C virus-infected individuals with fibrosis and cirrhosis. *J Virol* 2008;82:1259-70.
147. **Meier UC**, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, Tang K, Newton P, Pellegrino P, Williams I, Klenerman P, Borrow P. Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *J Virol* 2005;79:12365-74.
148. **Mellencamp MA**, Preheim LC. Pneumococcal pneumonia in a rat model of cirrhosis: effects of cirrhosis on pulmonary defense mechanisms against *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991;163:102-108.
149. **Mizuochi T**, Ito M, Takai K, Yamaguchi K. Peripheral blood memory B cells are resistant to apoptosis in chronic hepatitis C patients. *Virus Res* 2010;155:349-51.
150. **Mizuochi T**, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T, Momose H, Hamaguchi I, Takai K, Iino S, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, Yamaguchi K. Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+ CD27+ CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *J Interferon Cytokine Res* 2011;30:243-52.

151. **Montes-de-Oca M**, Blanco MJ, Márquez M, Soto MJ, Fernández-Gutiérrez C, Rodríguez-Ramos C, Girón-González JA. Haemodynamic derangement in human immunodeficiency virus-infected patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: the role of bacterial translocation. *Liver Int* 2011;31:850-8.
152. **Mookerjee R**, Stadlbauer V, Lidder S, Wright G, Hodges S, Davies N, Jalan R. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts outcome. *Hepatology* 2007;46:831-840.
153. **Morishima C**, Di Bisceglie AM, Rothman AL, Bonkovsky HL, Lindsay KL, Lee WM, Koziel MJ, Fontana RJ, Kim HY, Wright EC. Antigen-specific T lymphocyte proliferation decreases over time in advanced chronic hepatitis C. *J Viral Hepatol* 2012;19:404-13.
154. **Morita K**, Fukuda Y, Nakano I, Katano Y, Hayakawa T. Peripheral lymphocyte subsets vary with stage of hepatitis C virus-associated liver disease. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1803-8.
155. **Muñoz J**, Albillos A, Pérez-Páramo M, Rossi I, Alvarez-Mon M. Factors mediating the hemodynamic effects of tumor necrosis factor-alpha in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999;276:G687-93.
156. **Muñoz L**, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledó L, Monserrat J, Sanz E, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:411-419.
157. **Murata M**, Nabeshima S, Maeda N, Nakashima H, Kashiwagi S, Hayashi J. Increased frequency of IFN-gamma-producing peripheral CD8+ T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2002;67:162-70.
158. **Nakajima T**, Mizushima N, Nakamura J, Kanai K. Surface markers of NK cells in peripheral blood of patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Immunol Lett* 1986;13:7-10.
159. **Nattermann J**, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 2006;55:869-77.
160. **Nössal GJ**. Current concepts: immunology. The basic components of the immune system. *N Engl J Med*. 1987;316(21):1320-5
161. **Oben JA**, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*. 2004;53:438-445.

162. **O`Bryan JM**, Potts JA, Bonkovsky HL, Mathew A, Rothman AL. Extended interferon-alpha therapy accelerates telomere length loss in human peripheral blood T lymphocytes. *PLoS One* 2011;6:e20922.
163. **Olaso E**, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol*. 1998;29:836-47.
164. **Oliviero B**, Cerino A, Varchetta S, Paudice E, Pai S, Ludovisi S, Zaramella M, Michelone G, Pugnale P, Negro F, Barnaba V, Mondelli MU. Enhanced B-cell differentiation and reduced proliferative capacity in chronic hepatitis C and chronic hepatitis B virus infections. *J Hepatol* 2011;55:53-60.
165. **Ortaldo JR**, Herberman RB. Heterogeneity of Natural Killer cells. *Annu Rev Immunol* 1984;2:359-94.
166. **Palmlad K**, Andersson U. Identification of rat IL-1beta, IL-2, IFN-gamma and TNF-alpha in activated splenocytes by intracellular immunostaining. *Biotech Histochem* 2000;75:101-9.
167. **Panasiuk A**, Parfieniuk A, Zak J, Flisiak R. Association among Fas expression in leucocytes, serum Fas and Fas-ligand concentrations and hepatic inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2010;30:472-8.
168. **Papp M**, Norman GL, Vitalis Z, Tornai I, Altorjay I, Foldi I, Udvardy M, Shums Z, Dinya T, Orosz P, Lombay B, Jr., Par G, Par A, Veres G, Csak T, Osztoivits J, Szalay F, Lakatos PL. Presence of anti-microbial antibodies in liver cirrhosis--a tell-tale sign of compromised immunity? *PLoS One* 2010;5:e12957.
169. **Par G**, Rukavina D, Podack ER, Horanyi M, Szekeres-Bartho J, Hegedus G, Paal M, Szereday L, Mozsik G, Par A. Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2002;37:514-22.
170. **Pardo A**, Bartolí R, Lorenzo-Zúñiga V, Planas R, Viñado B, Riba J, Cabré E, Santos J, Luque T, Ausina V, Gassull MA. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology*. 2000;31:858-63.
171. **Parker G**, Picut C. Liver Immunobiology. *Toxicologic Pathology* 2005;33:52-62.
172. **Parkin J**, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357:1777-89.
173. **Parlesak A**, Schafer C, Paulus SB, Hammes S, Diedrich JP, Bode C. Phagocytosis and production of reactive oxygen species by peripheral blood phagocytes in patients

- with different stages of alcohol-induced liver disease: effect of acute exposure to low ethanol concentrations. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:503-508.
174. **Paterson DJ**, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Corthesy P, Puklavec M, Williams AF. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol* 1987;24:1281-90.
175. **Pérez-Páramo M**, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000;31:43-8.
176. **Perrin D**, Bignon JD, Beaujard E, Cheneau ML. Populations of circulating T lymphocytes in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterol Clin Biol* 1984;8:907-10.
177. **Poo JL**, Estanes A, Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Perez C, Huberman A, Uribe M. Chronology of portal hypertension, decreased sodium excretion, and activation of the renin-angiotensin system in experimental biliary cirrhosis. *Rev Invest Clin* 1997;49:15-23.
178. **Popper H**. Pathologic aspects of cirrhosis. A review. *Am J Pathol.* 1977;87:228-64.
179. **Rajkovic IA**, Williams. Mechanisms of abnormalities in host defences against bacterial infection in liver disease. *Clin Sci* (Lond) 1985;68:247-253.
180. **Rajkovic IA**, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986;6:252-262.
181. **Ramachandran A**, Prabhu R, Thomas S, Reddy JB, Pulimood A, Balasubramanian KA. Intestinal mucosal alterations in experimental cirrhosis in the rat: role of oxygen free radicals. *Hepatology.* 2002;35:622-9.
182. **Ramírez F**, Mason D. Recirculatory and sessile CD4+ T lymphocytes differ on CD45RC expression. *J Immunol.* 2000;165:1816-23.
183. **Rappaport AM**, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1983;402:107-37.
184. **Reyes E**, Alonso-Lebrero JL, Brieva A, Mallo AB, Valdes-Hevia MD, Pivel JP, Alvarez-Mon M. Alternative (Non-animal) Method For TNF α Production Test. **6th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis.** March 2-6, 2004. Munich, Germany.

185. **Reynaert H**, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002;50:571-81.
186. **Rieckmann P**, Tuscano JM, Kehrl JH. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) in B-lymphocyte function. *Methods*. 1997;11:128-32.
187. **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;4:53-8.
188. **Rimola A**, Navasa M. Infections in liver disease. En: Bircher J, Benhamou J-P, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J, editors. *Oxford textbook of clinical hepatology*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1999.p.1862-74.
189. **Rimola A**, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000;32:142-53.
190. **Riordan SM**, Skinner N, Nagree A, McCallum H, McIver CJ, Kurtovic J, Hamilton JA, Bengmark S, Williams R, Visvanathan K. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:1154-1164.
191. **Rockey DC**. New concepts in the pathogenesis of portal hypertension: hepatic wounding and stellate cell contractility. *Clin Liver Dis* 1997;1:13-29.
192. **Rockey DC**, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-51.
193. **Roos A**, Schilder-Tol EJ, Weening JJ, Aten J. Strong expression of CD134 (OX40), a member of the TNF receptor family, in a T helper 2-type cytokine environment. *J Leukoc Biol* 1998;64:503-10.
194. **Runyon BA**. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*. 1988;8:632-5.
195. **Runyon BA**, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792-6.
196. **Runyon BA**; AASLD Practice Guideline Committee. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology*. 2009;49:2087-107.

197. **Sallusto F**, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;14;401(6754):708-12.
198. **a. Sallusto F**, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev*. 2000;177:134-40.
199. **b. Sallusto F**, Mackay R, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:593-620.
200. **Sallusto F**, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22:745-63.
201. **Santos-Pérez JL**, Diez-Ruiz A, Luna-Casado L, Soto-Mas JA, Wachter H, Fuchs D, Gutierrez-Gea F. T-cell activation, expression of adhesion molecules and response to ethanol in alcoholic cirrhosis. *Immunol Lett*. 1996;50:179-83.
202. **Scaffner F**, Popper H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 1963;44-239-42
203. **Schwabe R**, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2003;285:G949–G958.
204. **Scriba A**, Grau V, Steiniger B. Phenotype of rat monocytes during acute kidney allograft rejection: increased expression of NKR-P1 and reduction of CD43. *Scand J Immunol* 1998;47:332-42.
205. **Seidler S**, Zimmermann HW, Weiskirchen R, Trautwein C, Tacke F. Elevated circulating soluble interleukin-2 receptor in patients with chronic liver diseases is associated with non-classical monocytes. *BMC Gastroenterol* 2012;12:38.
206. **Seki E**, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signalling and hepatic fibrosis. *Nat. Med*. 2007; 13(11):1324-32.
207. **Senzolo M**, Cholongitas E, Burra P, Leandro G, Thalheimer U, Patch D, Burroughs AK. Beta-Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Liver Int* 2009;29:1189-93.

208. **Serste T**, Melot C, Francoz C, Durand F, Rautou PE, Valla D, Moreau R, Lebrech D. Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology* 2010;52:1017-22.
209. **Shi Z.**, Wakil AE., Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:10663–10668.
210. **Sikuler E**, Buchs AE, Yaari A, Keynan A. Hemodynamic characterization of conscious and ketamine-anesthetized bile duct-ligated rats. *Am J Physiol* 1991;260:G161-6.
211. **Simmons D**, Seed B. The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature*. 1988;333:568-70.
212. **Singh N**, Wagener MM, Gayowski T. Changing epidemiology and predictors of mortality in patients with spontaneous bacterial peritonitis at liver transplant unit. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:531-7.
213. **Sojka DK**, Bruniquel D, Schwartz RH, Singh NJ. IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J Immunol* 2004;172:6136-43.
214. **Song K**, Coleman RA, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Mortari F, LaBrecque DR, Cook RT. TH1 cytokine response of CD57+ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2001;24:155-67.
215. **Spickett GP**, Brandon MR, Mason DW, Williams AF, Woollett GR. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J Exp Med* 1983;158(3):795-810.
216. **Stadlbauer V**, Mookerjee RP, Wright GA, Davies NA, Jürgens G, Hallström S, Jalan R. Role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in mediating neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G15-G22.
217. **Stanley AJ**, MacGregor IR, Dillon JF, Bouchier IA, Hayes PC. Neutrophil activation in chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:135-138.
218. **Steiniger B**, Stehling O, Scriba A, Grau V. Monocytes in the rat: Phenotype and function during acute allograft rejection. *Immunol Rev* 2001;184:38-44.
219. **Subra JF**, Cautain B, Xystrakis E, Mas M, Lagrange D, van der Heijden H, van de Gaar MJ, Druet P, Fournie GJ, Saoudi A, Damoiseaux J. The balance between

- CD45RC^{high} and CD45RC^{low} CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *J Immunol*. 2001;166:2944-52.
220. **Such J**, Guarner C, Enríquez J, Rodríguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol*. 1988;6:80-4.
221. **Such J**, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodríguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazón JM, Pérez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology*. 2002;36(1):135-41.
222. **Sugalski JM**, Rodriguez B, Moir S, Anthony DD. Peripheral blood B cell subset skewing is associated with altered cell cycling and intrinsic resistance to apoptosis and reflects a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2010;185:3019-27.
223. **Sweet MJ**, Stacey KJ, Kakuda DK, Markovich D, Hume DA. IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:263–71.
224. **Szuster-Ciesielska A**, Daniluk J, Bojarska-Junak A. Apoptosis of blood mononuclear cells in alcoholic liver cirrhosis. The influence of in vitro ethanol treatment and zinc supplementation. *Toxicology* 2005;212:124-34.
225. **Taïeb J**, Mathurin P, Elbim C, Cluzel P, Arce-Vicioso M, Bernard B, Opolon P, Gougerot-Pocidalo MA, Poynard T, Chollet-Martin S. Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis: effect of corticosteroids. *J Hepatol* 2000;32:579-586.
226. **Tamatani T**, Kotani M, Miyasaka M. Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1991;21:627-33.
227. **Tandon P**, García-Tsao. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 2008 Feb;28(1):26-42.
228. **Terés J**, Mas A. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Insuficiencia hepática aguda grave y encefalopatía hepática. In: **Farreras: Medicina Interna** 14^a ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 40.
229. **Testro AG**, Gow PJ, Angus PW, Wongseelashote S, Skinner N, Markovska V, Visvanathan K. Effects of antibiotics on expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 on mononuclear cells in patients with advanced cirrhosis. *J Hepatol* 2010;52:199-205.

230. **Thalheimer U**, Triantos CK, Samonakis DM, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. **Gut** 2005; 54:556-563.
231. **Tilg H**, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **Gastroenterology** 1992;103:264-74.
232. **Tilg H**, Vogel W, Wiedermann CJ, Shapiro L, Herold M, Judmaier G, Dinarello CA. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists in liver disease. **Hepatology** 1993;18:1132-8.
233. **Tilg H**, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol Today**. 1997;18:428-32.
234. **Tjwa ET**, van Oord GW, Hegmans JP, Janssen HL, Woltman AM. Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B. **J Hepatol** 2011;54:209-18.
235. **Toubi E**, Kessel A, Goldstein L, Slobodin G, Sabo E, Shmuel Z, Zuckerman E. Enhanced peripheral T-cell apoptosis in chronic hepatitis C virus infection: association with liver disease severity. **J Hepatol** 2001;35:774-80.
236. **Trikudanathan G**, Israel J, Cappa J, O'Sullivan DM. Association between proton pump inhibitors and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients - a systematic review and meta-analysis. **Int J Clin Pract** 2011;65:674-8.
237. **Turnbull E**, MacPherson G. Immunobiology of dendritic cells in the rat. **Immunol Rev** 2001;184:58-68.
238. **Úbeda M**, Muñoz L, Borrero MJ, Díaz D, Francés R, Monserrat J, Lario M, Lledo L, Such J, Álvarez-Mon M, Albillos A. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis. **Hepatology** 2010;52:2086-95.
239. **Uceda F**, Such J. Traslocación de AND bacteriano en la cirrhosis y sus consecuencias inmunes. **Implicaciones clínicas de la investigación básica. GH Continuada** Marzo-Abril, 2005. Vol.4 N°2.
240. **Ueno M**. Endotoxemia and its compensatory mechanisms in experimental liver cirrhosis. **Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi**. 1990;87:1692-1700.
241. **Uhrig A**, Banafsche R, Kremer M, Hegenbarth S, Hamann A, Neurath M, Gerken G, Limmer A, Knolle PA. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. **J Leukoc Biol** 2005;77:626-33.

242. **Vallat L**, Benhamou Y, Gutierrez M, Ghillani P, Hercher C, Thibault V, Charlotte F, Piette JC, Poynard T, Merle-Beral H, Davi F, Cacoub P. Clonal B cell populations in the blood and liver of patients with chronic hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum* 2004;50:3668-78.
243. **Vetter D**, Eichler F, Doffoel M, Krzisch C, Gut JP, Willemin B, Reville M, North ML, Keiling R, Bockel R. Determination of sub-populations of circulating T lymphocytes in alcoholic cirrhosis using monoclonal antibodies OKT3, 4, 5, Leu 2 and Leu 15. Effect of hepatitis B virus infection. *Gastroenterol Clin Biol* 1987;11:790-4.
244. **Von Andrian UH**, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-34.
245. **Von Baehr V**, Docke WD, Plauth M, Liebenthal C, Kupferling S, Lochs H, Baumgarten R, Volk HD. Mechanisms of endotoxin tolerance in patients with alcoholic liver cirrhosis: role of interleukin 10, interleukin 1 receptor antagonist, and soluble tumour necrosis factor receptors as well as effector cell desensitisation. *Gut* 2000;47:281-7.
246. **Von Frankenberg M**, Gollig M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW. Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int*. 2003;16:806-813.
247. **Vorobioff J**, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1984;87:1120-6.
248. **Wagner H**. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:62–9.
249. **Weinberg AD**, Wallin JJ, Jones RE, Sullivan TJ, Bourdette DN, Vandembark AA, Offner H. Target organ-specific up-regulation of the MRC OX-40 marker and selective production of Th1 lymphokine mRNA by encephalitogenic T helper cells isolated from the spinal cord of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1994;152:4712-21
250. **a. 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;104:1223-33.
251. **b. Wiest R**, Shah V, Sessa WC, Groszmann RJ. NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999;276:G1043-51.

252. **Wiest R**, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut* 2012;61:297-310.
253. **Woollett GR**, Barclay AN, Puklavec M, Williams AF. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985;15:168-73.
254. **Xing T**, Li L, Cao H, Huang J. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. *Clin Exp Immunol* 2007;147:184-8.
255. **Yokoyama WM**, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 1993;11:613-35.
256. **Yonkers NL**, Sieg S, Rodriguez B, Anthony DD. Reduced naive CD4 T cell numbers and impaired induction of CD27 in response to T cell receptor stimulation reflect a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2011;203:635-45.
257. **Young AJ**. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. *Semin Immunol*. 1999;11:73-83.
258. **Yrlid U**, Jenkins CD, MacPherson GG. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 2006;176:4155-4162.
259. **Zapater P**, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz M, Moreu R, Pascual S, et al. La presencia de ADN bacteriano en un predictor pronóstico a corto plazo en pacientes cirróticos con ascitis. Resultados de un estudio multicéntrico nacional. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29(Supl.1):117.
260. **Zhang JY**, Zou ZS, Huang A, Zhang Z, Fu JL, Xu XS, Chen LM, Li BS, Wang FS. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* 2011;6:e17484.
261. **Zhu J**, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;12:1557-69.
262. **Zimmermann HW**, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, Tischendorf JJ, Luedde T, Weiskirchen R, Trautwein C, Tacke F. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* 2010;5:e11049.

