



ciberehd

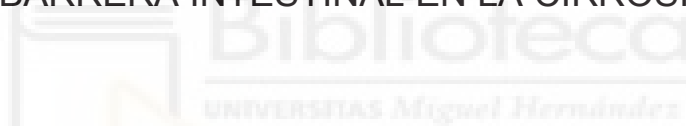


Universidad Miguel Hernández de Elche

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche

CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas

**FUNCIONES DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN EL
CONTROL INFLAMATORIO E INTEGRIDAD DE LA
BARRERA INTESTINAL EN LA CIRROSIS**



**“REGULATORY T CELL FUNCTIONS IN INFLAMMATORY
CONTROL AND GUT BARRIER INTEGRITY IN CIRRHOSIS”**

TESIS DOCTORAL

Oriol Juanola Juárez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Rubén Francés Guarinos

CODIRECTOR DE TESIS

Dra. Esther Caparrós Cayuela

Alicante, 2019



ciberehd



La presente tesis doctoral se presenta bajo la modalidad de compendio de publicaciones junto con los artículos:

Autores: Oriol Juanola, Isabel Gómez-Hurtado, Pedro Zapater, Alba Moratalla, Esther Caparrós, Paula Piñero, José Manuel González-Navajas, Paula Giménez, José Such, Rubén Francés.

Título: Selective intestinal decontamination with norfloxacin enhances a regulatory T cell-mediated inflammatory control mechanism in cirrhosis.

REF. REVISTA/LIBRO: Liver Int. 2016 Dec;36(12):1811-1820. IF: 5,542 Q1

Juanola O, Piñero P, Gómez-Hurtado I, Caparrós E, García-Villalba R, Marín A, Zapater P, Tarín F, González-Navajas JM, Tomás-Barberán FA, Francés R.

Autores: Oriol Juanola, Paula Piñero, Isabel Gómez-Hurtado, Esther Caparrós, Rocío García-Villalba, Alicia Marín, Pedro Zapater, Fabián Tarín, José Manuel González-Navajas, Francisco A. Tomás-Barberán, Rubén Francés.

Título: Regulatory T Cells Restrict Permeability to Bacterial Antigen Translocation and Preserve Short-Chain Fatty Acids in Experimental Cirrhosis.

REF. REVISTA/LIBRO: Hepatol Commun. 2018 Oct 22;2(12):1610-1623. IF: -

Empleados como indicio de calidad para la presentación de la tesis doctoral y cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y con la normativa vigente en la Universidad Miguel Hernández.



ciberehd



El **Dr. Rubén Francés Guarinos**, Profesor Titular de Inmunología de la Universidad Miguel Hernández y la **Dra. Esther Caparrós Cayuela**, Profesora Contratada Doctor de la Universidad Miguel Hernández

Certifican que el trabajo de investigación titulado ***“Funciones de las células T reguladoras en el control inflamatorio e integridad de la barrera intestinal en la cirrosis”***, que conduce a la obtención del grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección por D. **Oriol Juanola Juárez** en el laboratorio del Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Hospital General Universitario de Alicante y la Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante.

Para que conste y surta a los efectos oportunos firman el presente certificado en Alicante a 2 de Septiembre de 2019.

Director de la Tesis

Codirector de la Tesis

Fdo. Dr. Rubén Francés Guarinos

Fdo. Dra. Esther Caparrós Cayuela

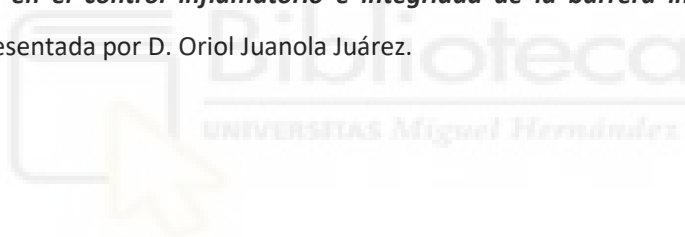


ciberehd



Dr. Ricardo Mallavia Marin, Catedrático y Coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche de Universidad Miguel Hernández de Elche

Da su conformidad a la lectura de la tesis doctoral titulada: “***Funciones de las células T reguladoras en el control inflamatorio e integridad de la barrera intestinal en la cirrosis***”, presentada por D. Oriol Juanola Juárez.



Para que conste y surta a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Alicante, a 2 de Septiembre de 2019.

Fdo. Dr. Ricardo Mallavia Marin



"If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants."

Isaac Newton, 1675.



A mis padres y a mis abuelos.

A mi familia.

Por vuestro apoyo y cariño incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la contribución de todas las personas que habéis participado en la realización de esta tesis doctoral y que habéis conseguido que me sienta afortunado de haber recorrido este camino a vuestro lado. Han pasado ya 6 años desde que empecé esta aventura siendo estudiante de grado y me pasaría otros 6 aprendiendo junto a vosotros, gracias por formar parte de esta etapa tan importante en mi vida. ¡Gracias!

A mis directores. Rubén, fue curioso cómo nos conocimos por primera vez: tus primeras prácticas en la UMH, ratones y un alumno desmayado. Sé que nunca olvidaremos esta anécdota que ahora recuerdo con alegría. Gracias por la oportunidad para unirme a este proyecto, por enseñarme lo bonita que es la ciencia y, en concreto, la hepatología, a ser crítico, la “regla del número 3”, por demostrarme que con esfuerzo y trabajo todo se consigue, por tus consejos y por todas esas partidas de pádel. Esther, gracias por tu cariño, por estar siempre ahí, por tu preocupación tanto a nivel profesional como personal. Recuerdo todas las veces que hemos comido juntos, las conversaciones y los desahogos. Gracias por compartir conmigo tu pasión no sólo por la investigación, sino que también por la educación, lo importante que es enseñar. Gracias a ambos por enseñarme tanto, por vuestra confianza desde el primer momento, por vuestra atención, paciencia y amistad, todas esas cervezas y los buenos momentos, por el futuro.

A mis compañeros del CIBERehd. Todos vosotros, tanto los que estáis como los que ya os habéis ido, habéis sido un pilar fundamental durante todo este tiempo. José Manuel, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar, por tu buena fe, por la compañía durante las tardes en el laboratorio. Pedro, gracias por amenizar con tus historias cualquier almuerzo, comida o cena que hemos tenido, por la aportación clínica, por tus conocimientos de estadística. Al Dr. Such por ser partícipe del origen de este grupo de investigación, gracias por formar esta familia. Isabel, ambos sabemos lo que me costó empezar con los animales, gracias por tu paciencia, por enseñarme todo lo que sabes,

por los cafés y los buenos momentos que hemos pasado juntos. Bea, por estar siempre dispuesta a ayudar y enseñar. Paula P, mi compañera de batalla, por todos los momentos que hemos vivido juntos, porque no hacía falta hablar para entendernos, te deseo todo lo mejor en tu nueva aventura hematológica. Claudia, mi compi FPU, por ser tan alegre y aportar tanta positividad al grupo, espero que todo te esté yendo genial en tus nuevos proyectos culinarios. Susana, gracias por los momentos que hemos vivido juntos durante este último año, por acogerme en tu piso durante 2 meses, te deseo todo lo mejor por Madrid con Javi. Rebeca, mil gracias por tu ayuda durante este último año, espero que hayas disfrutado de tu estancia en España tanto como nosotros de tu presencia, mucha suerte por México. Raquel y Paula 3, las nuevas generaciones, muchas gracias por el apoyo y la ayuda, os deseo todo lo mejor y que podáis conseguir vuestros objetivos. Paula G, pese a que te fuiste, has sido la persona que me enseñó casi todo lo que sé, no me puedo olvidar de ti, gracias por esa energía y, al mismo tiempo, paciencia que tuviste conmigo. Alba, por enseñarme y ayudarme tanto cuando empecé, ojalá hubiésemos coincidido durante más tiempo, espero que todo te vaya súper bien. Fran y Vicky, gracias por vuestra ayuda en el inicio de todo esto, espero que todos vuestros planes se hagan realidad. A todos los estudiantes de grado y de técnico de laboratorio que habéis realizado las prácticas en nuestro grupo durante mi estancia en el laboratorio.

A todo el servicio de Digestivo y, en concreto, a la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante, por tratar a los pacientes incluidos en el estudio y colaborar con la adquisición de muestras y los aspectos clínicos. Gracias a Pablo y a Ana, por vuestra ayuda siempre que lo hemos necesitado. A los propios pacientes por su predisposición a participar de forma desinteresada.

A las personas de la Unidad de Investigación. Gracias a todos y, en especial, a Jessy por vuestra ayuda siempre que os la he pedido. Óscar, te deseo lo mejor con la defensa de la tesis, mucha suerte con tu aventura granadina.

Al servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Alicante, por proporcionarnos las cepas de *E. coli*.

A todas las personas del departamento de medicina clínica de la UMH. Al exdirector, Javier, por estar siempre dispuesto a ayudar para que pudiera presentar los papeles que he necesitado para las becas que he pedido. A las secretarias, M^a José, Marisun y Vero, por ayudarme siempre que lo he necesitado. A Mariavi, Laura y María, gracias por compartir vuestro espacio y tiempo conmigo mientras estuvimos juntos en San Juan. A Dolores, por tu cariño desde el primer día, no hay mejor bienvenida que ese abrazo que me das cada vez que nos vemos.

A Diego y Eduardo de Puelles de Neurociencias y a las personas de su laboratorio. Paqui, Verónica y Abraham, gracias por vuestra predisposición a ayudar en todos los protocolos relacionados con el procesado de tejidos siempre que os lo hemos pedido.

A las personas que forman parte del animalario de San Juan. A José Antonio, Emilio, Paco, Mónica, Eva y Darío, gracias por cuidar de los animales y por ayudarme en todo lo que he necesitado cuando estaba allí con vosotros.

A todas las personas que conocí durante mi estancia doctoral de 3 meses en la universidad de Berna, Suiza. Mi más profundo agradecimiento al Dr. Andrea de Gottardi por acogerme en su laboratorio e integrarme en sus proyectos, por enseñarme tanto, darme la oportunidad de aprender de los suyos y por esas cenas en los congresos internacionales del hígado. Gracias a los doctores que conocí durante la estancia: Dr. Jaume Bosch, Dr. Reiner Wiest, Dr. Siegfried Hapfelmeier-Balmer, Dra. Annalisa Berzigotti y el Dr. Jordi Gràcia-Sancho, por recibirme con tanta amabilidad y por lo que aprendí estando con vosotros durante los *lab meeting* o las cenas en congresos. A Sheida y a Mohsin, por integrarme desde el primer día en vuestro grupo, gracias por dejarme formar parte de vuestra familia. A la gente que conocí en el departamento, Maria,

Olivier, Susana, Gabi, Marcel, Marta, Ravi por lo que vivimos tanto en el departamento como fuera de él, gracias por esa última excursión. A Andrina y a Mirjam por alojarme en su piso durante esa temporada, presentarme a todos vuestros amigos y familia y hacerme sentir uno más desde el primer día que llegué ¡Qué bien lo pasé y cuánto aprendí con todos vosotros!

A todas las personas del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche. Al coordinador del Programa de Doctorado, Ricardo, y a la Comisión Académica por permitirme participar en el Programa de Doctorado de vuestro instituto, por vuestra paciencia con los doctorandos y por vuestro ímpetu en que no dejemos de aprender y formarnos como científicos. A mis compañeros de doctorado, en especial a Emma, Sara e Iván, con los que he compartido tanto en lo profesional y en lo personal, amistades que me llevo durante esta etapa, nos veremos pronto amigos.

A mis amigos, los que estuvisteis desde el principio y los que conocí durante el camino. Gracias por cada momento que he vivido junto a vosotros tanto en España como en el extranjero, por vuestra amistad, apoyo y por venir a visitarme allá donde haya estado. Todo esto no hubiera sido lo mismo sin vosotros.

A ti, por cruzarte en mi camino durante la etapa final de esta tesis doctoral. Por todo lo que hemos vivido juntos, por todas esas cosas que no hace falta decir aquí. Gracias por acogerme en tu casa para escribir este manuscrito, por ser tú.

A mi familia, a los que están y a los que se fueron, a todos y cada uno de vosotros. A mis abuelas, por ese cariño y afecto cada vez que os voy a visitar. Y, en especial, a mis padres, por apoyarme en todas y cada una de las decisiones que he tomado desde que tengo uso de razón, por ese amor que está por encima de todo. Os lo debía, esto es vuestro.

ABREVIATURAS

- ADNbact:** ADN bacteriano.
- AGCCs:** Ácidos grasos de cadena corta.
- BSA:** Albúmina de suero bovino.
- CCl₄:** Tetracloruro de carbono.
- CDs:** Células dendríticas.
- DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daño.
- DIS:** Descontaminación intestinal selectiva.
- E. coli:* *Escherichia coli*.
- FITC:** Fluoresceína-5-isotiocianato.
- FFAR:** Receptor de ácidos grasos libres.
- GALT:** Tejido linfoide asociado al intestino.
- GLMs:** Ganglios linfáticos mesentéricos.
- GPR:** Receptor acoplado a proteína G.
- HBSS:** Solución de sales equilibrada de Hank.
- HO-1:** Hemooxigenasa 1.
- IELs:** Linfocitos intraepiteliales.
- IFN- γ :** Interferón γ .
- IL:** Interleucina.
- LA:** Líquido ascítico.
- LBP:** Proteína transportadora de LPS.
- LPLs:** Linfocitos de lámina propia.
- LPS:** Lipopolisacárido.
- NF- κ B:** *Nuclear Factor- κ B*.
- Nflx:** Norfloxacin.
- NLRs:** Receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos.
- PAMPs:** Patrones moleculares asociados a microorganismos.
- PBE:** Peritonitis bacteriana espontánea.
- PBS:** *Phosphate-buffered saline*.
- PMNs:** Células polimorfonucleares.
- PRRs:** Receptores de reconocimiento de patrón.
- Rag1:** *Recombination activating gene 1*.
- SBI:** Sobrecrecimiento bacteriano intestinal.
- TB:** Traslocación bacteriana.
- TGF- β :** *Transforming growth factor beta*.
- TGI:** Tracto gastrointestinal.
- TJ:** Proteínas *tight junction*.
- TJP-1:** *Tight junction protein 1*.
- TLRs:** Receptores de tipo *Toll*.
- TNF:** *Tumor Necrosis Factor*.
- Treg:** Células T reguladoras.
- UFCs:** Unidades formadoras de colonias.
- WT:** *Wild type*.
- ZO:** *Zonula occludens*.



ÍNDICE

INDEX



■ RESUMEN / SUMMARY	25
■ INTRODUCCIÓN / INTRODUCTION.....	33
1.- INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA	35
1.1.- Traslocación Bacteriana	37
1.1.1.- Concepto de Traslocación bacteriana.....	37
1.1.2.- Respuesta inmune en mucosas asociada a una TB fisiológica.....	38
1.1.3.- Patogenia de la TB.....	42
1.2.- Peritonitis bacteriana espontánea	47
1.2.1.- Etiología de la PBE.....	49
1.2.2.- Profilaxis de la PBE	50
1.2.2.1.- <i>Norfloxacino</i>	50
1.2.2.1.1- <i>Mecanismo de acción</i>	51
1.2.2.2.- <i>Uso del norfloxacino en pacientes con cirrosis</i>	52
1.2.2.3.- <i>Desarrollo de resistencias</i>	54
2.- MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	55
2.1.- Microbiota intestinal en homeostasis.....	55
2.2.- Microbiota intestinal en la cirrosis.....	56
2.3.- Ácidos grasos de cadena corta.....	58
3.- INFLAMACIÓN DURANTE LA CIRROSIS HEPÁTICA	61
3.1.- Origen y consecuencias de la inflamación sistémica durante la cirrosis.....	62
3.2.- Células T reguladoras	64
■ HIPÓTESIS Y OBJETIVOS / HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	67
■ MÉTODOS / METHODS	73
1. PACIENTES	75
2. MODELOS EXPERIMENTALES	76
2.1. Animales.	76
2.1.1. Ratones Rag1 ^{-/-}	77
2.2. Intervenciones en animales.	77
2.2.1. Protocolo de inducción de cirrosis experimental por administración de CCl ₄ intragástrico.....	77
2.2.2. Transferencia de células T.....	78

2.2.3. Administración de Norfloxacinó.....	78
2.2.4. Administración de <i>E.coli</i>	80
2.3. Laparotomías y toma de muestras.	80
3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS REALIZADAS	81
3.1. Detección de norfloxacinó en suero.	81
3.2. Evaluación de traslocación bacteriana.	81
3.2.1. Evaluación de los niveles de endotoxina.....	81
3.2.2. Detección e identificación de ADN bacteriano.	82
3.3. Aislamiento y/o caracterización de poblaciones celulares.	83
3.3.1. Purificación de células dendríticas de sangre periférica de muestras humanas. .	83
3.3.2. Análisis de células T reguladoras de sangre periférica de muestras humanas.	84
3.3.3. Purificación de células dendríticas de sangre periférica de muestras de ratón. ..	85
3.3.4. Aislamiento de linfocitos intestinales de ratón y caracterización de respuesta Th.	86
3.4. Análisis de la expresión proteica.	87
3.4.1. Western Blot.	87
3.4.2. Inmunohistoquímica.	88
3.4.3. ELISA.	89
3.5. Análisis de la expresión génica.	89
3.6. Administración de LPS:FITC y dextrano:FITC.	90
3.7. Detección de ácidos grasos de cadena corta en contenido intestinal.	92
3.8. Análisis estadístico.	93
RESULTADOS / RESULTS	95
ARTÍCULO 1: Juanola, O., <i>et al.</i> , “Selective intestinal decontamination with norfloxacin enhances a regulatory T cell-mediated inflammatory control mechanism in cirrhosis”. <i>Liver Int.</i> 2016. 36(12): p. 1811-1820.	97
ARTÍCULO 2: Juanola, O., <i>et al.</i> , “Regulatory T Cells Restrict Permeability to Bacterial Antigen Translocation and Preserve Short-Chain Fatty Acids in Experimental Cirrhosis”. <i>Hepatol Commun.</i> 2018. 2(12): p. 1610-1623.	121
DISCUSIÓN / DISCUSSION	137
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	145
BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES	151



RESUMEN

SUMMARY



Antecedentes

Las infecciones bacterianas suponen una complicación frecuente en la cirrosis avanzada siendo la más recurrente la peritonitis bacteriana espontánea (PBE). El mecanismo patogénico que explica su desarrollo es la traslocación bacteriana (TB), que se produce por una disbiosis de la microbiota intestinal, un incremento en la permeabilidad intestinal a antígenos bacterianos y una alteración en la respuesta inmune del huésped. La inflamación inducida por la TB de bacterias o de sus productos durante la cirrosis contribuye a su progresión y facilita el desarrollo de complicaciones. El uso de estrategias enfocadas a disminuir los episodios de TB es deseable en estos pacientes. El tratamiento con quinolonas poco absorbibles, norfloxacino (Nflx), como medida profiláctica para reducir la carga entérica de bacterias ha demostrado reducir la incidencia de la PBE, pero se ha relacionado con el desarrollo de resistencias. El estudio de los mecanismos por los que el Nflx ejerce un efecto inmunomodulador puede ayudar a la comprensión de la interacción entre la microbiota y su huésped. En nuestro grupo hemos descrito la implicación de la interleucina (IL)-10 en este efecto. Las células T reguladoras (Treg) son una población de células T CD4⁺ productoras de IL-10, que resulta clave en la inducción de homeostasis intestinal al restringir las respuestas proinflamatorias.

Objetivos

Identificar si la población Treg está involucrada en el mecanismo por el que el Nflx compensa el ambiente inflamatorio durante la cirrosis, así como evaluar el efecto que ejerce la homeostasis intestinal inducida por esta población celular en la prevención de episodios de TB durante la cirrosis experimental.

Métodos

En la tesis doctoral se han realizado experimentos utilizando muestras de pacientes cirróticos y ratones con cirrosis inducida por administración de CCl₄ por vía intragástrica durante 12 semanas. De esta forma, se incluyeron pacientes ingresados de forma

consecutiva con cirrosis y líquido ascítico (LA) que presentasen: PBE, LA no infectado y en tratamiento con Nflx como profilaxis secundaria de PBE (grupo DIS). Las células Treg de sangre periférica de pacientes se definieron mediante citometría de flujo como células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Se evaluó la señalización coestimuladora de células dendríticas (CDs) humanas y se midieron los niveles séricos de Nflx e IL-10. Para conocer la contribución específica de las Treg, los protocolos de daño hepático fueron realizados sobre ratones *wild type* (WT) y *Recombination activating gene* (Rag)-1 *knockout* (Rag1^{-/-}). Así, se realizaron experimentos de transferencia de células T CD4⁺ vírgenes y Treg procedentes de ratones WT no cirróticos a ratones inmunodeficientes Rag1^{-/-} con cirrosis. Subgrupos de animales fueron tratados con Nflx, así como estimulados con *Escherichia coli* (*E. coli*) por vía oral. En estos animales se evaluó: 1) la señalización coestimuladora en CDs, 2) los niveles sistémicos de interferón (IFN)- γ , IL-2 e IL-10, 3) la TB de ADN bacteriano (ADNbact), lipopolisacárido (LPS) y dextrano, 4) los niveles de expresión génica y proteica de proteínas *tight-junction* (TJ) en muestras de colon, 5) el perfil Th y producción génica de IL-10 de linfocitos intestinales en respuesta a *E. coli* y 6) los niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCCs) antes y después de la administración de *E. coli*.

Resultados

En el primer estudio se incluyeron 84 pacientes. El porcentaje de Treg aumentó significativamente en pacientes del grupo DIS en comparación con pacientes con PBE o con LA no infectado. Se observó una correlación positiva entre Treg y los niveles séricos de Nflx e IL-10. Las CDs de pacientes con DIS mostraron una disminución significativa en la expresión de CD80 y CD86 en comparación con pacientes con PBE y con LA no infectado y se correlacionó con los niveles de Nflx. La modulación de la señalización coestimuladora por Nflx no se detectó en ratones Rag1^{-/-} ni en ratones Rag1^{-/-} reconstituidos con células T vírgenes. Sin embargo, la administración de células T vírgenes y Treg se asoció con una expresión significativamente disminuida de CD80 y CD86 en presencia de Nflx. Por último, el efecto inmunomodulador del Nflx sobre la reducción de IL-2 e IFN- γ y sobre el aumento de IL-10 se logró significativamente sólo cuando se restauró la población Treg en ratones Rag1^{-/-}.

En el segundo estudio se observó que los ratones Rag1^{-/-} cotransferidos con células T vírgenes y Treg mostraron una reducción significativa en la permeabilidad intestinal a la TB de antígenos bacterianos y se recuperó la expresión de las proteínas TJ en el colon de ratones Rag1^{-/-}. La administración de células T vírgenes y Treg en ratones Rag1^{-/-} restringió la diferenciación proinflamatoria Th1/Th17 de los linfocitos intestinales en respuesta a *E. coli*. La concentración de los principales AGCCs resultó en una reducción significativa en ratones Rag1^{-/-} después de la administración oral de *E. coli*, pero permaneció inalterada en ratones Rag1^{-/-} cotransferidos con células T vírgenes y Treg. De la misma forma, la expresión de los receptores de AGCCs se redujo por el tratamiento con *E. coli* pero sus niveles fueron restablecidos en ratones reconstituidos con linfocitos T vírgenes y Treg en ratones Rag1^{-/-}.

Conclusiones

Estos resultados muestran la implicación de las Treg en el mecanismo por el cual el Nflx ejerce efectos inmunomoduladores más allá de su efecto bactericida en la cirrosis. Además, la mejora en la homeostasis intestinal inducida por este tipo celular al restringir la permeabilidad intestinal, limitar la diferenciación inflamatoria local de los linfocitos intestinales y disminuir la pérdida de AGCCs refuerzan el valor de esta población celular en la prevención de la TB en la cirrosis.

Background

Bacterial infections are a frequent complication in advanced cirrhosis, spontaneous bacterial peritonitis (SBP) being the most recurrent. The pathogenic mechanism that explains its development is bacterial translocation (BT), which is caused by a dysbiosis of the intestinal microbiota, an increased intestinal permeability to bacterial antigens and an alteration in the host's immune response. The inflammation induced by the BT of bacteria or their products contributes to the progression of cirrhosis and facilitates the development of complications. The use of strategies aimed at reducing the episodes of TB is desirable in these patients. Treatment with poorly absorbable quinolones as a prophylactic measure, norfloxacin (Nflx), to reduce the enteric load of bacteria has been shown to reduce the incidence of SBP, but it has been linked to the development of resistances. The study of the mechanisms by which Nflx exerts an immunomodulatory effect can help to understand the interaction between the microbiota and its host. In our group we have described the implication of interleukin (IL)-10 on this effect. Regulatory T cells (Treg) are a population of IL-10-producing T CD4⁺ cells, which are key in the induction of intestinal homeostasis by restricting proinflammatory responses.

Objectives

We aimed at identifying whether the Treg population is involved in the mechanism by which Nflx compensates the inflammatory environment during cirrhosis, as well as assessing the effect of intestinal homeostasis induced by this cell population in preventing episodes of BT during experimental cirrhosis.

Methods

Experiments have been performed using samples of cirrhotic patients and mice with cirrhosis induced by intragastric administration of CCl₄ for 12 weeks. Consecutively admitted patients with cirrhosis and ascitic fluid (AF) with: spontaneous bacterial peritonitis (SBP), non-infected AF, and Nflx as secondary SBP prophylaxis (SID group). Tregs from patients were defined by flow-cytometry as CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells. Human dendritic cells (DCs) were purified for co-stimulatory signalling evaluation and Nflx and

IL-10 levels were measured in serum. To know the specific contribution of Treg, liver damage protocols were performed on wild type (WT) and Recombination activating gene (Rag)-1 knockout (Rag1^{-/-}) mice. Thus, adoptive transfer experiments of naive CD4⁺ T cells and Tregs from non-cirrhotic WT to Rag1^{-/-} immunodeficient cirrhotic mice were performed. Subgroups of animals were treated with Nflx, as well as stimulated with *Escherichia coli* (*E. coli*) orally. In these animals we evaluated: 1) costimulatory signalling in DCs, 2) systemic levels of interferon (IFN)- γ , IL-2 and IL-10, 3) BT to bacterial DNA (DNA_{bact}), lipopolysaccharide (LPS) and dextran, 4) colonic gene and protein expression levels of tight-junction (TJ) proteins, 5) Th profile and IL-10 gene production of intestinal lymphocytes in response to *E. coli* and 6) short chain fatty acid (SCFAs) levels before and after administration of *E. coli*.

Results

In the first study, 84 patients were included. Treg percentage was significantly increased in the group of SID patients compared with SBP or non-infected AF patients. A positive correlation was observed between Tregs and serum Nflx and IL-10 levels. DCs from SID patients showed a significantly decreased expression of CD80 and CD86 compared with SBP and non-infected AF patients and correlated with Nflx levels. Modulation of costimulatory signalling by Nflx was not detected in Rag1^{-/-} mice and Rag1^{-/-} mice reconstituted with naive T cells. However, reconstitution with naive T cells and Tregs was associated with significantly downregulated CD80 and CD86 expression in the presence of Nflx. Finally, the Nflx immunomodulatory effect on IL-2 and IFN- γ reduction and on the increase of IL-10 was significantly achieved only when the Tregs were restored in Rag1^{-/-} mice.

In the second study, it was observed that naive T and Treg cotransfer significantly reduced gut permeability to bacterial antigen translocation and restored colonic TJ protein expression in Rag1^{-/-} mice. Naive T and Treg replenishment in Rag1^{-/-} mice restrained proinflammatory Th1/Th17 differentiation of intestinal lymphocytes in response to *E. coli*. The main SCFAs concentration resulted in significant reduction in Rag1^{-/-} mice after *E. coli* administration but remained unaltered after naive T and Tregs

Summary

cotransfer. Similarly, the reduced expression of SCFAs receptors induced by *E. coli* was reestablished following naive T and Treg reconstitution in Rag1^{-/-} mice.

Conclusions

These results provide a plausible mechanism for the immunomodulatory effects of Nflx in cirrhosis beyond its bactericidal effect through the Treg cell population. In addition, the improvement in intestinal homeostasis induced by this cell type by restricting intestinal permeability, limiting local inflammatory differentiation of intestinal lymphocytes and decreasing the loss of SCFAs foster the value of this cell population in preventing BT in cirrhosis.





INTRODUCCIÓN
INTRODUCTION



1.- INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA.

Los pacientes con cirrosis avanzada presentan un elevado riesgo de sufrir infecciones bacterianas (1). Por este motivo, se trata de una complicación frecuente durante la evolución del paciente cirrótico y una de las causas más comunes de ingreso. La incidencia de las infecciones bacterianas en el momento del ingreso o durante la hospitalización de estos pacientes es del 25-35%, siendo más elevada que en la población general que se sitúa en torno al 10% (2). Además, la severidad de la infección es también mayor en pacientes con cirrosis, ya que presentan un mayor riesgo de morir por sepsis que individuos sin cirrosis, siendo 4 veces superior en pacientes con cirrosis descompensada (3). Así, el desarrollo de infecciones bacterianas agrava el pronóstico del paciente con cirrosis y es una causa común de hospitalizaciones repetidas, deterioro en su calidad de vida y aumento en los costes de atención médica (4).

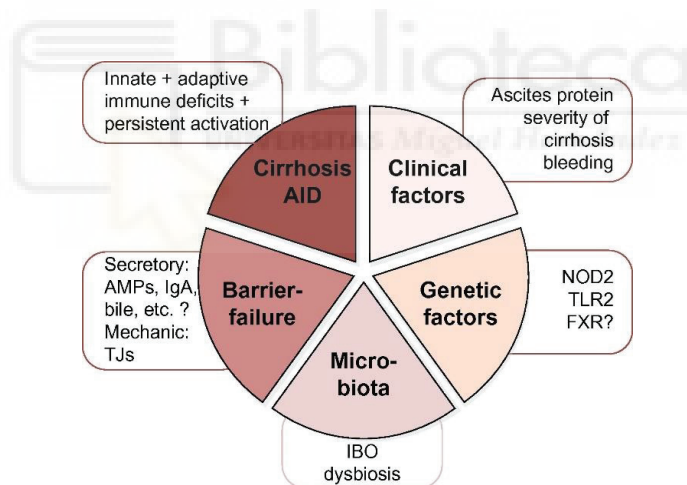


Figura 1. Factores de riesgo en la patogénesis de las infecciones bacterianas en la cirrosis. Jalan R, *et al.* J Hepatol. 2014 Jun;60(6):1310-24 (4).

Aunque se trata de pacientes que tienen facilidad para desarrollar cualquier tipo de infección como consecuencia de su disfunción inmune, las más habituales son la infección urinaria, la infección del líquido ascítico (LA) o peritonitis bacteriana, las infecciones respiratorias y la infección de la sangre, también conocida como bacteriemia

(5). Los factores de riesgo clínicos asociados con el desarrollo de infecciones bacterianas en pacientes con cirrosis son la puntuación del Child-Pugh, el sangrado varicoso, nivel bajo de proteínas en LA y episodio previo de peritonitis bacteriana espontánea (PBE) (1, 6).

La mayor parte de las infecciones bacterianas que presentan los pacientes con cirrosis están causadas por enterobacterias, bacterias Gram negativas que forman parte de la microbiota del huésped, siendo *Escherichia coli* (*E. coli*) el germen más frecuentemente aislado (5, 7). Esto apoya la teoría de que la mayor parte de las infecciones durante la cirrosis son espontáneas o primarias, produciéndose por bacterias entéricas del propio paciente que han escapado la pared del intestino y el filtro del hígado (8) .

Sin embargo, estos pacientes suelen ingresar en el hospital como consecuencia de las complicaciones de su enfermedad hepática, siendo la hospitalización en sí misma un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones bacterianas, ya que al paciente con cirrosis se le realizan pruebas invasivas con maniobras instrumentales para el control de sus complicaciones clínicas que facilitan la aparición de infecciones secundarias (9-11). Esta situación, junto con el uso prolongado de antibióticos ha influido en la epidemiología de las infecciones bacterianas en la cirrosis y se ha descrito un incremento en las infecciones bacterianas por patógenos no clásicos, como cocos Gram-positivos o bacterias multirresistentes (2).

El desarrollo de medidas profilácticas que eviten la aparición de infecciones bacterianas en grupos de pacientes de alto riesgo, junto con un rápido diagnóstico y manejo adecuado de las mismas, puede ayudar a reducir el ratio de mortalidad asociados a esta complicación de la cirrosis (4, 12). Así, profundizar en el conocimiento de los cambios en la microbiota asociados a la cirrosis, la alteración en la permeabilidad intestinal y la disfunción inmune del huésped, objetos de estudio en esta tesis doctoral, ayuda a comprender los mecanismos de interacción entre microbiota comensal e inmunidad, y

cómo sus alteraciones facilitan la traslocación patológica de antígenos bacterianos en los pacientes con cirrosis, complicando su enfermedad.

1.1.- Traslocación Bacteriana

1.1.1.- Concepto de Traslocación bacteriana

El tracto gastrointestinal (TGI) del ser humano ejerce funciones de digestión y absorción de nutrientes, secreción de moléculas, actúa como barrera intestinal y desarrolla acciones asociadas al sistema inmune. Para llevar a cabo su función principal, la absorción de nutrientes, su superficie está incrementada por la presencia de vellosidades, microvellosidades y pliegues suponiendo unos 200m² de área superficial intestinal en humanos (13). A su vez, el TGI del ser humano representa un amplio ecosistema microbiano formado por bacterias, arqueas, virus y hongos que suponen, en cantidad, más células microbianas que eucarióticas en nuestro organismo (14). La coevolución entre la microbiota y el ser humano durante miles de años, así como la ausencia de respuestas proinflamatorias frente a las bacterias comensales ponen de manifiesto la relación de interdependencia huésped-microbiota y la existencia de vías de comunicación entre ambos (15, 16).

Se sabe que en condiciones fisiológicas existe un paso de pequeñas cantidades de bacterias comensales que se encuentran en el lumen intestinal y de sus productos, ADN bacteriano (ADNbact) y componentes de su pared como lipopolisacárido (LPS) o peptidoglicano entre otros, a través de la barrera intestinal hacia ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs). Este proceso, conocido como **traslocación bacteriana** (TB), es necesario para la maduración del sistema inmune a nivel local y el reconocimiento de la microbiota intestinal (16-18).

La TB se define como la presencia de cultivo positivo de bacterias en GLMs. Por este motivo, el conocimiento que hemos adquirido sobre la TB proviene de estudios con modelos animales de enfermedad hepática, ya que no se puede estudiar adecuadamente en humanos por la incapacidad de acceder a los GLMs de pacientes con cirrosis con métodos no invasivos (19). Así, se han propuesto marcadores indirectos de TB (ADNbact, LPS o proteína transportadora de LPS [LBP]) como indicadores de TB en humanos, ya que estos productos bacterianos pueden originar las consecuencias de la TB de bacterias viables estimulando de forma sostenida el sistema inmune en pacientes con cirrosis (20, 21). Por tanto, la detección de estos antígenos en suero o LA se asocia a un mal pronóstico del paciente cirrótico, aunque no supongan un riesgo en el desarrollo de infecciones (22).

Este proceso fisiológico conocido como traslocación bacteriana está presente en hasta un 10% de los animales sanos, pero su incidencia se ve incrementada hasta en un 40% de los casos en modelos de cirrosis experimental por administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) y presencia de ascitis y 80% en ratas cirróticas con PBE (23-27). Se estima que la tasa de TB en pacientes con cirrosis avanzada se sitúa entre 30%-40% (28), por lo que es evidente que los mecanismos que evitan la diseminación de bacterias intestinales y de sus productos sufren alteraciones durante la enfermedad hepática.

1.1.2.- Respuesta inmune en mucosas asociada a una TB fisiológica

La interacción microbiota-huésped en el TGI está limitada por la presencia de moco intestinal formado principalmente por mucinas que generan una capa de glicoproteínas que previenen el contacto de bacterias con la superficie intestinal (29). Las mucinas son generadas por células de Goblet que están presentes a lo largo de la superficie intestinal en respuesta a bacterias o sus productos y a citocinas proinflamatorias (30, 31). En el lumen intestinal también se van a liberar ácidos biliares que, además de ser útiles en la digestión de grasas de la dieta, van a limitar el crecimiento de bacterias y el daño asociado a mucosas (32-34). Además, las células de Paneth, neutrófilos y las células

epiteliales van a liberar péptidos antimicrobianos, como defensinas- α y β y lectinas del tipo RegIII β y RegIII γ , frente a bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, virus y hongos (35-38). Estos péptidos antimicrobianos van a ayudar a evitar la unión e infiltración de microorganismos en el huésped, así como van a regular la composición de su microbiota intestinal.

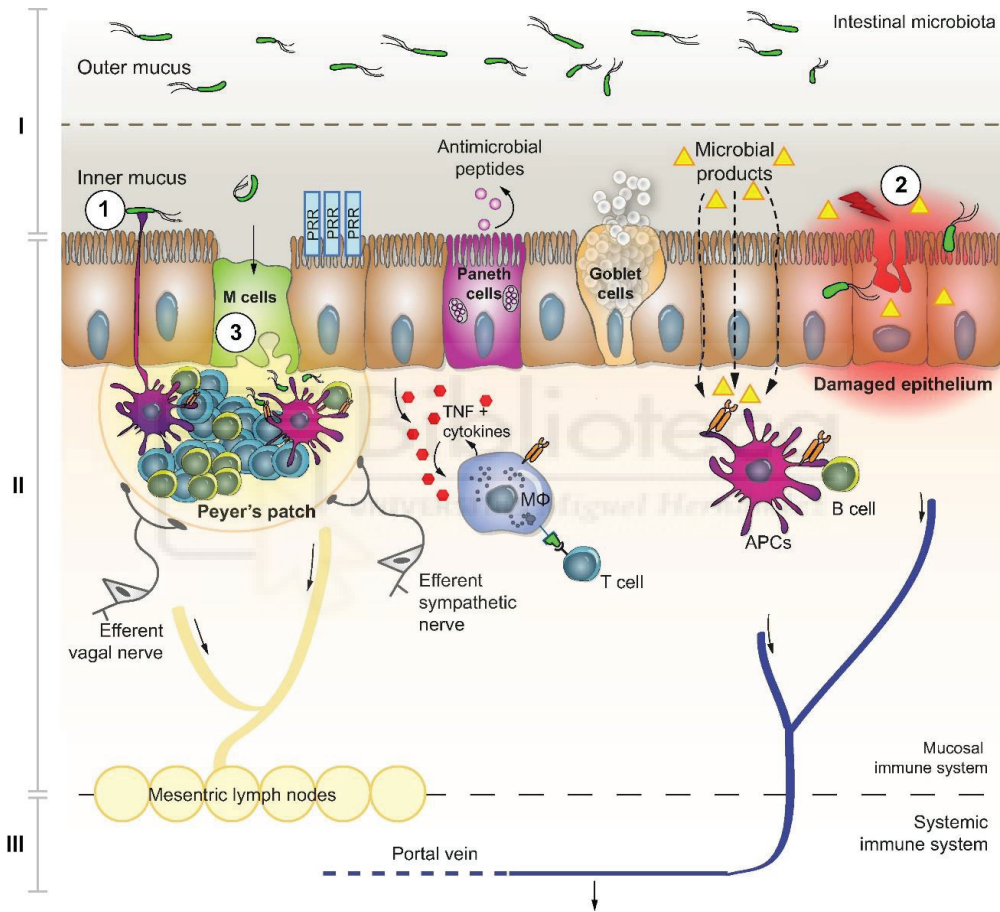


Figura 2. Respuesta inmune intestinal asociada a una TB fisiológica. Wiest, R, *et al.* J Hepatol. 2014 Jan;60(1):197-209 (16).

La superficie del TGI está formada por una capa de células epiteliales que, junto con células presentadoras de antígeno y linfocitos intraepiteliales suponen una barrera física cuya integridad es indispensable para evitar el paso de bacterias de la microbiota o de

sus productos al interior del huésped (16, 39). Así, adquieren especial importancia las proteínas *tight-junction* (TJ) que son una familia de proteínas transmembrana que juegan un papel importante en prevenir cualquier ruptura paracelular de la barrera intestinal por la que puedan entrar estos antígenos bacterianos en el área estéril intraepitelial (40). Entre las TJ que adquieren mayor relevancia en este contexto se sitúan las pertenecientes a la familia de las claudinas, ocludina y *zonula occludens* (ZO), también conocida como *tight junction protein* (TJP)-1 (41).

De esta forma, el tubo digestivo ejerce un *rol* activo secretando moléculas que evitan el crecimiento bacteriano y, al mismo tiempo, ejerce un papel pasivo como barrera que impide el paso de la microbiota intestinal al interior del huésped. El fallo en alguna o ambas funciones facilitaría el proceso de TB, por lo que se pondrían en marcha los mecanismos inmunes intestinales para resolver o eliminar las bacterias que han traslocado a nivel local.

El intestino es un órgano activo desde el punto de vista inmunológico ya que está formado por componentes del sistema inmune innato y adaptativo, así como por un compartimento especializado conocido como tejido linfoide asociado al intestino (GALT) que está integrado por células dendríticas, linfocitos intraepiteliales (IELs) y de lámina propia (LPLs), GLMs y placas de Peyer (42, 43). A su vez, el GALT se divide en tejido linfoide organizado, formado por GLMs y placas de Peyer, y en tejido linfoide difuso formado por IELs y LPLs. Mientras que el tejido linfoide organizado es el lugar en la mucosa donde se producen los procesos de presentación antigénica y activación de linfocitos, el tejido linfoide difuso se asocia a una respuesta efectora del sistema inmune (44, 45).

El sistema inmune innato presente en la mucosa del huésped, así como los enterocitos que forman la barrera intestinal y células dendríticas presentes en la mucosa expresan receptores de reconocimiento de patrón (RRPs), como receptores de tipo toll (TLRs) y receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs), que

reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (46). La detección de antígenos bacterianos por células del sistema inmune puede ocurrir por 3 vías: 1) células dendríticas con prolongaciones situadas entre los enterocitos de la barrera intestinal que permite un contacto directo con bacterias situadas en el lumen intestinal (47); 2) entrada de bacterias o de sus productos por lugares del epitelio intestinal que están dañados o inflamados de manera crónica o temporal y 3) a través de las células M que permiten una entrada directa de antígenos bacterianos hacia las placas de Peyer(16, 48).

Las células que hayan procesado los antígenos procedentes de bacterias de la microbiota intestinal, los presentarán a linfocitos B y T induciendo su activación y maduración en placas de Peyer o GLMs (49, 50). En condiciones normales, estos linfocitos preactivados se alojarán en lámina propia y en GLMs formando parte del sistema inmune adaptativo asociado a mucosas cuya función es evitar el paso de PAMPs a circulación sanguínea y evitar el desarrollo de una activación inmune sistémica (51). En este contexto, es importante resaltar que la activación de los linfocitos B por bacterias comensales inducirá una respuesta IgA específica, de modo que estos anticuerpos serán liberados al lumen intestinal previniendo la adherencia de estas bacterias a la superficie de la mucosa del intestino (52).

Sin embargo, es posible, aunque poco probable, que algún PAMP consiga acceder a circulación portal desde GLMs. En este caso, un individuo sano dispone de un hígado plenamente funcional donde la presencia células con capacidad de reconocimiento de PAMPs (células de *Kupffer*, células endoteliales del sinusoides hepático, células NK y hepatocitos) y células del sistema inmune adaptativo garantizan un aclaramiento del componente bacteriano presente en la sangre procedente de vena porta y de la arteria hepática (53).

1.1.3.- Patogenia de la TB

Una TB descontrolada o patogénica que permite el acceso de bacterias luminales o de sus productos a GLMs, circulación sanguínea y otros órganos extraintestinales es la hipótesis actual que explica la alta recurrencia de infecciones en pacientes con cirrosis, como la PBE. Se han descrito tres mecanismos que están alterados durante la enfermedad hepática y que contribuyen a que la TB pase de ser fisiológica a considerarse una situación patológica que contribuye al desarrollo de infecciones bacterianas: 1) cambios cuantitativos y cualitativos de la microbiota intestinal, 2) disfunción de la barrera intestinal y 3) una respuesta inmune alterada a nivel local y sistémico (16).

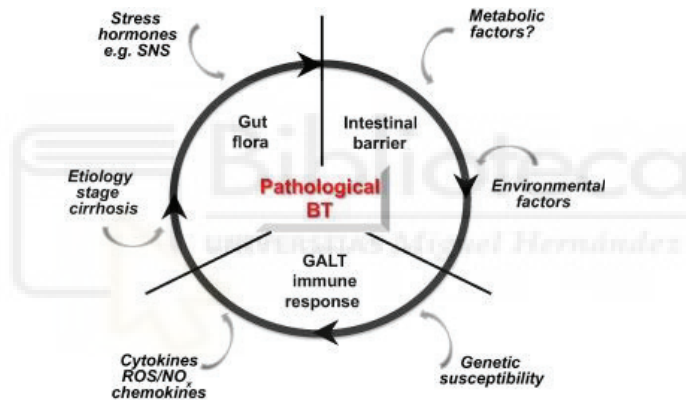


Figura 3. Mecanismos asociados al desarrollo de una TB patológica durante la cirrosis. Wiest, R, et al. J Hepatol. 2014 Jan;60(1):197-209 (16).

1) *Cambios en la microbiota intestinal*

La composición de la microbiota intestinal es única en cada individuo a nivel de género y de especie, pero está más conservada a nivel de filo siendo *Bacteroidetes* y *Firmicutes* las más predominantes (54). Sin embargo, factores asociados a la dieta, al huésped o al ambiente, como la ingesta de antibióticos, alteran la composición de la microbiota entre individuos (55-57), lo que puede suponer a variaciones interindividuales en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (58), donde la microbiota puede promover resistencia (59) o susceptibilidad (60) a la colonización por bacterias patógenas.

Así, la existencia de alteraciones como la ingesta de alcohol, antibióticos o algunas enfermedades pueden inducir cambios drásticos en la composición (cambios cualitativos) o en la cantidad (cambios cuantitativos) de especies bacterianas presentes en el TGI. En la cirrosis, se ha descrito un cambio en la microbiota intestinal, o disbiosis, con un enriquecimiento de las cepas bacterianas consideradas como patógenas, mientras que las especies comensales tienden a disminuir. Además, la alteración de factores que controlan el crecimiento de bacterias en el TGI durante la cirrosis conduce a un sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) excesivo que favorece los episodios de TB patógena observados en esta enfermedad. En el apartado 2 se desarrollan los aspectos relacionados con la microbiota en mayor profundidad.

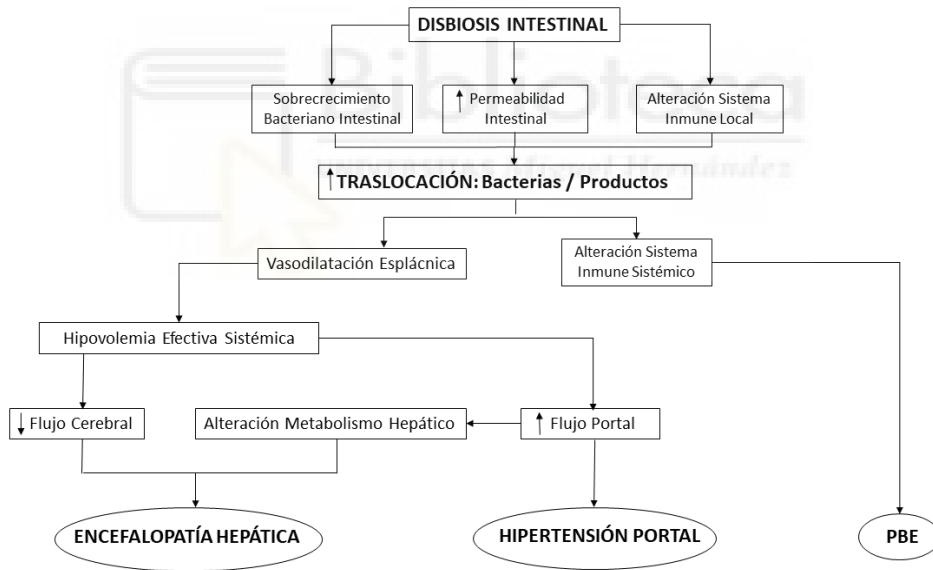


Figura 4. Consecuencias de la disbiosis intestinal y una TB patógena a nivel sistémico. Gómez-Hurtado I, *et al.* Gastroenterol Hepatol. 2016 Dec;39(10):687-696 (61).

2) Disfunción de la barrera intestinal

Durante la cirrosis existe una disminución en la integridad de la barrera intestinal que contribuye al aumento en la TB de bacterias y sus productos (62). De esta forma, se ha observado un aumento en la permeabilidad intestinal de pacientes con cirrosis avanzada en comparación con individuos sanos o con cirrosis compensada utilizando el test de la lactulosa/manitol (63); así como una reducción en la expresión de proteínas TJ (claudina-1 y ocludina) en biopsias de duodeno de estos pacientes (63). Además, se han visto alteraciones en la estructura del duodeno distal en pacientes cirróticos, observando una dilatación en el espacio intercelular de enterocitos junto con microvellosidades más cortas y anchas que en los sujetos control (64), así como la aparición de edema e inflamación en la estructura de la mucosa en el intestino de pacientes con cirrosis (65) y en modelos experimentales (66).

También se ha podido observar un daño oxidativo asociado a la mucosa que se relaciona con una alteración en la permeabilidad intestinal, lo que favorece la TB en modelos de rata con hipertensión portal y cirrosis (67, 68). Este incremento en la permeabilidad intestinal durante la cirrosis y el consecuente aumento del paso de bacterias o de sus productos a través de la barrera (TB), se asocia con el inicio de un proceso inflamatorio en el que participan células dendríticas, monocitos y neutrófilos (69). El incremento de la inflamación mediada por la citocina proinflamatoria *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α en pacientes con cirrosis (70) ha demostrado influir negativamente en la expresión de TJs (71, 72). En pacientes con cirrosis avanzada y ascitis se describió la presencia de endotoxemia, o presencia de LPS en sangre periférica, que se relaciona con el aumento en la tasa de TB descrita en estos pacientes y su disfunción hemodinámica (73).

Por todo ello, en un intento de reducir la inflamación asociada a la citocina TNF- α en un modelo de cirrosis en ratas se observó una reducción significativa en los episodios de TB cuando fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α (74). En este sentido, en nuestro grupo hemos podido observar como la administración de probióticos (75),

así como el tratamiento con norfloxacin (Nflx) en modelos animales de cirrosis experimental suponen un incremento en la expresión de las proteínas TJ, ocludina y ZO-1 (76). Por este motivo, el desarrollo de estrategias enfocadas a la inducción de homeostasis a nivel intestinal en la cirrosis parecen ser prometedoras en la profilaxis de los episodios de TB.

3) Respuesta inmune alterada

Si el desarrollo de un SBI se asocia con un fallo en la función del tubo digestivo, será nuestro sistema inmune quien determine si la TB será un proceso relevante a nivel clínico. Se sabe que los pacientes cirróticos presentan un incremento en los niveles de ADNbact (77) y LPS (78) en circulación portal, por lo que existe un aumento en la tasa de TB de PAMPs luminales a GLMs y localizaciones extraintestinales. Este incremento en la tasa de TB observada en la cirrosis parece estar acompañada de una disfunción del sistema inmune a nivel local y sistémico durante esta enfermedad (79).

Así, en la cirrosis se ha observado una reducción en la producción de péptidos antimicrobianos, como defensinas- α y proteínas RegIII (80, 81), así como en la presencia de células B plasmáticas productoras de IgA en mucosa intestinal (82). De esta forma, la capacidad de la mucosa para matar bacterias, prevenir SBI y la adherencia de estas bacterias a la mucosa se encuentra disminuida.

Como ya hemos visto, durante la respuesta inmune a los episodios incrementados de traslocación antigénica que ocurre durante la cirrosis se desencadena una descompensación hacia un perfil de respuesta proinflamatoria donde las DCs, los monocitos y los neutrófilos son reclutados a la zona dañada (69). La presencia de PAMPs será detectada por TLRs que inducirán la activación de *Nuclear Factor* (NF)- κ B (46) y, con ello, la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y óxido nítrico (83, 84). Esta respuesta inflamatoria se encuentra disminuida en pacientes con cirrosis y un

genotipo de TLR mutado dando relevancia a la función de estas moléculas en el aclaramiento bacteriano (85).

Además, el daño hepático asociado a la enfermedad induce la necrosis de hepatocitos con la consecuente liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que perpetúa el estado inflamatorio descrito en estos pacientes (86) y la disminuida capacidad hepática para eliminar las bacterias o antígenos procedentes del aporte sanguíneo. Puesto que el hígado es un órgano involucrado en la síntesis de proteínas del huésped, durante la cirrosis se produce un fallo en su funcionalidad lo que explica la reducción en sangre periférica de proteínas del complemento (87), de proteínas con capacidad de unir LPS (88) y una capacidad quimiotáctica reducida (89). Esta situación sumada a una disminución en la capacidad funcional del sistema fagocítico nuclear observado durante la cirrosis supone un riesgo incrementado de sufrir bacteriemia y PBE (90-92).

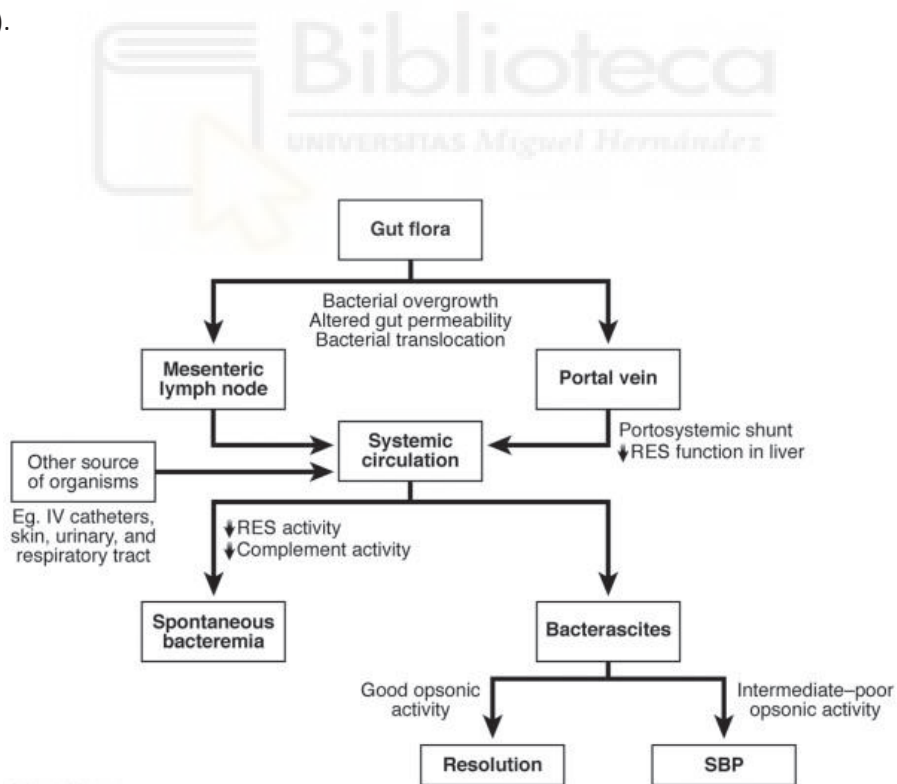


Figura 5. Patogénesis asociada al desarrollo de PBE. Bonnel AR, *et al.* Clin Gastroenterol Hepatol. 2011 Sep;9(9):727-38 (93).

Como consecuencia de esta polarización proinflamatoria, la respuesta tolerogénica que equilibra la inflamación está comprometida (94). De hecho, la homeostasis inmune se pierde durante la progresión de la cirrosis. La conocida disfunción inmune asociada a la cirrosis ayuda a inducir inflamación intestinal (79), sugiriendo un papel plausible para las células T reguladoras (Tregs) y para las citocinas antiinflamatorias en este contexto. El estado inflamatorio inducido de forma sostenida en el tiempo conduce a un fallo en la capacidad de la respuesta inmune lo que conlleva a una situación similar a una inmunodeficiencia durante la cirrosis, motivo por el que el aclaramiento de las bacterias o de sus productos es ineficiente al mismo tiempo que se produce una situación de inflamación crónica.

1.2.- Peritonitis bacteriana espontánea

La PBE es la infección bacteriana más frecuente en pacientes cirróticos, suponiendo un 10-30% de todas las infecciones bacterianas en la cirrosis. Esta complicación se define por la infección bacteriana por presencia de >250 células polimorfonucleares (PMN)/mm³ en LA en ausencia de otro foco de infección intraabdominal o proceso inflamatorio (95, 96). Se distinguen varios tipos de ascitis infectada en función del recuento de PMNs, el cultivo del LA y del número de bacterias diferentes responsables de la infección que se pueden seguir en la Tabla 1 (7, 97).

	PMN/mm ³	Cultivo microbiológico
Peritonitis bacteriana espontánea	≥ 250	Positivo - Monomicrobiano
Bacteriascitis	< 250	Positivo - Monomicrobiano
Ascitis neutrocítica	≥ 250	Negativo
Peritonitis bacteriana secundaria	≥ 250	Positivo – Polimicrobiano
Bacteriascitis polimicrobiana	< 250	Positivo - Polimicrobiano

Tabla 1. PBE y otros tipos de infección del LA.

De entre ellas, la ascitis neutrocítica es la única que cursa con cultivo microbiológico negativo pero, según los criterios del Club Internacional de Ascitis (98), debe ser considerada también como una infección de LA pues presenta una clínica compatible con la PBE y hasta un 50% de los pacientes pueden fallecer durante la hospitalización (99, 100).

Con una tasa de mortalidad asociada a la hospitalización de hasta el 90%, la PBE fue inicialmente considerada como una complicación de estadio final en la cirrosis (7). Sin embargo, en la actualidad se considera como una complicación de la cirrosis tratable con una elevada supervivencia a corto plazo en ausencia de otras complicaciones siendo la insuficiencia renal el principal predictor de mortalidad (101). La tasa de mortalidad intrahospitalaria para el primer episodio de PBE varía del 10% al 50% situándose entre el 30% y el 90% tras el primer año (12). La probabilidad de recurrencia de PBE a 1 año en estos pacientes se sitúa en torno al 70% que disminuye al 20% en los pacientes con cirrosis tratados con Nflx (102). Esta alta tasa de recidiva indica la existencia de una enfermedad hepática avanzada en estos pacientes indicándose, en algunos casos, la posibilidad de trasplante hepático.

Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de PBE se clasifican en factores bioquímicos (niveles proteicos en LA y de bilirrubina en suero), clínicos (varices hemorrágicas), genéticos (mutaciones en TLR2 y NOD2) y farmacológicos (uso de inhibidores de bomba de protones y de antagonistas de receptores β -adrenérgicos) (97). La mejora del pronóstico en pacientes con PBE recae en un diagnóstico temprano y un tratamiento efectivo, siendo de especial interés actuar de forma profiláctica sobre aquellos pacientes que presentan un elevado riesgo de sufrir infecciones bacterianas (103).

1.2.1.- Etiología de la PBE

La infección de la cavidad peritoneal genera una reacción inflamatoria que resulta en un incremento en el recuento de neutrófilos en LA. Sin embargo, el cultivo de LA es negativo en hasta el 60% de pacientes que presentan manifestaciones clínicas compatibles con la PBE y un recuento elevado de neutrófilos en LA. Así, sólo es posible obtener un cultivo positivo de LA en el 40% de los pacientes (104).

Se ha podido observar que la mayor parte de casos (70%) de los cultivos positivos de LA en pacientes con PBE están originados por bacterias de la microbiota intestinal, principalmente microorganismos aerobios Gram-negativos, siendo *E. coli* el más frecuente, con aparición en casi la mitad de los casos, y seguido por *Klebsiella pneumoniae* (2, 97, 105). Esta evidencia da valor a que la mayor parte de las bacterias proceden del lumen del intestino.

Los siguientes microorganismos aislados con mayor frecuencia (20%) en la PBE son cocos Gram-positivos (7), principalmente especies de *Streptococcus* y *Enterococcus*. Esta población de gérmenes no se asocia a un origen entérico de los microorganismos que causan la PBE, sino más bien a un origen nosocomial de la infección por tratamientos prolongados con antibióticos o procedimientos invasivos realizados sobre el paciente cirrótico durante su ingreso en el hospital. Infecciones secundarias como la infección de los tejidos blandos o la neumonía también se han postulado como fuente de bacterias responsables de PBE (106).

1.2.2.- Profilaxis de la PBE

Como hemos visto, las infecciones bacterianas suponen una complicación frecuente y grave en el transcurso de la cirrosis, motivo por el que no sólo se ha profundizado en el tratamiento, sino también en la búsqueda de métodos de prevención eficaces.

La mayoría de los episodios de PBE son el resultado de la traslocación de bacilos Gram-negativos de origen entérico que consiguen acceder a LA (107). Por ello, la profilaxis de la PBE se ha basado en la administración oral de antibióticos que eliminen o reduzcan la cantidad de microorganismos intestinales Gram-negativos sin afectar a bacterias Gram-positivas o anaerobias de la microbiota, concepto conocido como descontaminación intestinal selectiva (DIS). En este sentido, el uso de antibióticos como profilaxis secundaria para inducir DIS previene con éxito la recurrencia de PBE en pacientes con cirrosis y ha tenido una gran aceptación en la clínica (102, 108-115).

Pese a que se han probado distintos antibióticos como medida profiláctica, el uso de Nflx, administrado sólo o en combinación con otros antibióticos, ha sido ampliamente aceptado en la profilaxis primaria de grupos de elevado riesgo; o bien como profilaxis secundaria en aquellos pacientes que han presentado episodios previos de PBE en la historia de su enfermedad hepática (104).

1.2.2.1.- Norfloxacino

Las quinolonas son grupos químicos con capacidad bactericida que son derivados del ácido nalixídico, descubiertos en 1962 por síntesis orgánica (116). Estos primeros miembros de la familia de las quinolonas se caracterizaban por ser propensos a acumularse en la orina por excreción renal, por lo que eran utilizados en el tratamiento de infecciones urinarias. Además, su capacidad bactericida era excelente frente a

bacterias aeróbicas Gram-negativas, pero poco activas frente a bacterias Gram-positivas o anaerobias (117).

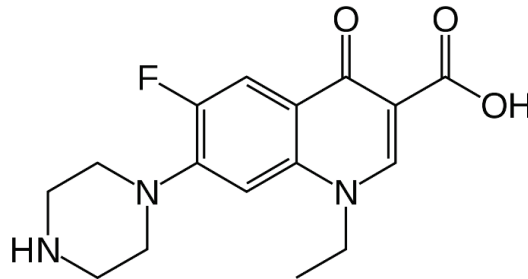


Figura 6. Estructura química del Nflx.

Fue en 1980 cuando se introdujeron las quinolonas de segunda generación al añadir un grupo flúor en posición 6 y un anillo de piperazina en posición 7 dio lugar a las conocidas fluoroquinolonas, entre las que se encuentra el Nflx. Este cambio garantizó una capacidad antimicrobiana mejorada frente a bacterias Gram-negativas y un cambio en sus propiedades farmacológicas (117, 118).

De esta forma, el Nflx es una quinolona fluoroderivada de absorción gastrointestinal relativamente baja, con actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas pero no frente a cocos Gram-positivos o bacterias anaeróbicas y, además, no suele ocasionar reacciones adversas en tratamientos sostenidos, motivo por el que presenta las características idóneas para ser utilizado como tratamiento profiláctico (104).

1.2.2.1.1- Mecanismo de acción

Se sabe que el Nflx inhibe la síntesis bacteriana de ADN y, de ahí, su efecto bactericida. Para ello, tiene la capacidad de acceder al interior celular de las bacterias por las porinas presentes en la superficie bacteriana y ejerce su efecto al unirse a dos miembros de las

enzimas topoisomerasas, que son la ADN girasa o topoisomerasa II y la topoisomerasa IV (119, 120).

El Nflx puede unirse a ambas enzimas porque compuestas por subunidades de genes que son homólogos: mientras que la ADN girasa está formada por subunidades codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, las de la topoisomerasa IV están codificadas por *parC* y *parE*. Pese a que tienen una estructura similar, su acción es diferente ya que la topoisomerasa II requiere de la hidrólisis del ATP para condensar o descondensar los cromosomas durante el ciclo celular, y la topoisomerasa IV se encarga de separar los cromosomas replicados en las dos células que se generan. Estas enzimas son dianas interesantes no sólo por el proceso sobre el que ejercen su efecto, siendo indispensables en la replicación bacteriana de ADN, sino que también porque difieren de las que están presentes en eucariotas, y por tanto, no afectan a la estructura de cromosomas en células humanas (121-124).

1.2.2.2.- Uso del norfloxacinó en pacientes con cirrosis.

Como hemos visto, el tratamiento prolongado con Nflx previene eficazmente la recurrencia de episodios de PBE, pero aumenta el riesgo de sufrir infecciones por bacterias resistentes a antibióticos, por lo que se deben seleccionar adecuadamente los pacientes que van a ser sometidos a profilaxis de PBE. En la actualidad, el uso de Nflx como profilaxis primaria se utiliza en pacientes con hemorragias gastrointestinales o en algunos grupos de riesgo; o como profilaxis secundaria en pacientes que hayan sufrido un episodio anterior de PBE demostrando que previene con éxito la recurrencia de episodios de infección bacteriana en estos pacientes (104, 108, 125).

Indicación	Antibiótico y dosis	Duración
Hemorragia gastrointestinal	-Norfloxacin 400 mg / 12 h -IV ceftriaxona 1g/d pacientes con cirrosis avanzada (al menos 2 de los siguientes: ascitis, ictericia, encefalopatía hepática y desnutrición)	Siete días
Profilaxis primaria en pacientes con ascitis y baja concentración de proteínas en LA (<15g/L)	-Norfloxacin 400 mg / día en pacientes con cirrosis avanzada: -Child-Pugh score ≥ 9 puntos con bilirrubina sérica ≥ 3 mg/dl y/o -Función renal deteriorada (creatinina sérica ≥ 1.2 mg/dl, BUN ≥ 25 mg/dl o sodio sérico ≤ 130 mEq/L)	Hasta el trasplante de hígado o la muerte
Profilaxis secundaria	-Norfloxacin 400 mg/d	Hasta el trasplante de hígado o la muerte

Tabla 2. Indicaciones actuales de profilaxis antibiótica en la cirrosis. Extraída de Fernández J and Gustot, T. 2012;56 Suppl 1:S1-12 (1).

En nuestro grupo se ha demostrado que el uso de Nflx en pacientes con cirrosis se asocia con numerosos efectos inmunológicos a nivel celular, disminuyendo citocinas proinflamatorias mediadas por NF-kB, controlando el estallido oxidativo y reestableciendo el ratio de apoptosis comprometido en PMNs (126). Además, el uso de Nflx en pacientes con cirrosis, ascitis y concentraciones de proteína en LA bajas se relacionó con un incremento de C3, incrementando la capacidad bactericida mediada por el complemento en LA (127).

El mecanismo molecular por el que el Nflx modula la respuesta proinflamatoria ha demostrado implicar la inducción de la Hemooxigenasa (HO)-1 mediado por la secreción de interleucina (IL)-10 (128). Se han correlacionado niveles elevados de IL-10 con recuentos bajos de leucocitos y con una elevada presión arterial media en estos pacientes, sugiriendo la implicación de la IL-10 en la mejora de la disfunción circulatoria y proporcionando una explicación a la mejora del estado hemodinámico en pacientes

con cirrosis por el uso de Nflx (21, 128). Sin embargo, todavía no se conoce la relación entre el uso de Nflx y la inducción de IL-10 en pacientes con cirrosis.

1.2.2.3.- Desarrollo de resistencias

Uno de los principales problemas en la administración prolongada de antibióticos durante la DIS es la selección de bacterias resistentes y su uso a largo plazo se asocia con un incremento en el riesgo de sufrir infecciones bacterianas por microorganismos resistentes a las quinolonas, a trimetoprima/sulfametoxazol y cepas productoras de β -lactamasa (2, 129, 130). El lugar de adquisición de la infección determina el riesgo de adquisición de bacterias resistentes, siendo más elevado en infecciones nosocomiales y en episodios asociados a los cuidados de la salud del paciente con cirrosis que en infecciones adquiridas en la comunidad (4, 129, 131).

Se trata de clones de bacterias capaces de adquirir mecanismos de resistencia y que tienen capacidad de colonizar los diferentes nichos humanos como el tracto gastrointestinal (132). Los mecanismos por los que estas bacterias resisten el efecto bactericida de las quinolonas incluyen mutaciones en genes relacionados con su mecanismo de acción: mutaciones en el gen que codifica la ADN girasa y topoisomerasa IV, modificaciones que impiden la entrada del antibiótico en la bacteria, así como transportadores endógenos que expulsan los antibióticos al exterior de la célula (133-135).

2.- MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

2.1.- Microbiota intestinal en homeostasis

Las superficies del organismo humano adulto están recubiertas de forma natural por microorganismos que forman parte de la microbiota y tienen una implicación activa en la salud del huésped. Sin embargo, el TGI del neonato se considera estéril durante el embarazo (136), iniciándose la colonización de las superficies en el nacimiento del recién nacido a partir de los microorganismos presentes en vagina, intestino y piel maternas, así como en el ambiente (137, 138). La colonización temprana del recién nacido depende del tipo de nacimiento (vía vaginal o cesárea), del estilo de vida o ambiente materno, tipo de alimentación del bebé o del uso de antibióticos (139), y esto puede tener un impacto en la prevención (140) y/o desarrollo (141, 142) de complicaciones clínicas en el recién nacido a largo plazo.

Una vez las bacterias alcanzan el TGI comienzan a desarrollarse y sobrevivir, pero factores como el pH, la disponibilidad de oxígeno, ácidos biliares, péptidos antimicrobianos, los movimientos peristálticos o la dieta determinarán su composición en los distintos tramos. El desarrollo de técnicas cultivo-independientes nos ha permitido conocer con precisión la comunidad de microorganismos que componen nuestra microbiota (143, 144). De esta forma, el cuerpo humano alberga cerca de 100 trillones de microorganismos, principalmente bacterias en el TGI, que superan en número a las células eucariotas y su complejidad y cantidad aumenta al avanzar por el TGI (14). En la composición de la microbiota intestinal de sujetos sanos predominan bacterias Gram-positivas (*Firmicutes* y *Actinobacterias*) y Gram-negativas (*Bacteroidetes*, *Proteobacterias* y *Verrucomicrobios*) (145), aunque también se han descrito poblaciones de hongos, arqueas y virus (146, 147).

Se sabe que en condiciones de homeostasis intestinal (eubiosis) las poblaciones bacterianas más representadas son *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y se asocian con una

microbiota que mantiene un estado saludable en el huésped. Entre las funciones principales que se asignan a esta población de microorganismos se incluye la digestión de polisacáridos complejos no digeribles de la dieta, fermentación de azúcares simples, síntesis de vitamina K, maduración y desarrollo del sistema inmune, síntesis de mucus, influencia en proliferación de células del epitelio intestinal e inhibición de patógenos (148-150).

Sin embargo, durante la cirrosis se altera el equilibrio en la composición de la microbiota intestinal (disbiosis) (151) lo que ejerce un efecto perjudicial en el hospedador, bien por establecimiento de una especie en un lugar donde no es residente habitual o por SBI. Esta situación favorece la TB de bacterias o de sus productos en un huésped inmunológicamente incompetente, promoviendo la aparición de complicaciones en la patogénesis de la cirrosis, incluyendo encefalopatía hepática, PBE y otras infecciones (43).

2.2.- Microbiota intestinal en la cirrosis

Se ha descrito una relación entre disbiosis intestinal y enfermedad hepática por diferentes orígenes (80, 152-157), lo que se sugiere que la microbiota ejerce un papel en la patogénesis y progresión de esta enfermedad. La secuenciación del ARNr 16S de la comunidad microbiana fecal en pacientes con cirrosis reveló una prevalencia de familias de bacterias potencialmente patógenas, como *Enterobacteriaceae* y *Streptococcaceae*, así como una reducción en las poblaciones beneficiosas como *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, bacterias del ácido láctico o Bifidobacterias (151, 158-162). La disbiosis de la microbiota intestinal también se ve alterada por una aparición masiva de bacterias asociadas a la microbiota oral durante la cirrosis confirmando el mal funcionamiento del TGI en estos pacientes (163). Además, esta alteración de la microbiota intestinal en la cirrosis no sólo afecta a la composición bacteriana sino que también a la micobiota, observándose una menor diversidad fúngica y un sobrecrecimiento de *Candida* en pacientes cirróticos por alcohol, así como un

incremento en los anticuerpos séricos anti-*Saccharomyces cerevisiae* que se relacionan con un incremento en la mortalidad de estos pacientes (164).

Durante la cirrosis no sólo se puede observar una alteración en la tasa de bacterias consideradas beneficiosas y perjudiciales para la salud del huésped, sino que también se ha descrito un incremento en la cantidad de bacterias presentes en el tubo digestivo, principalmente en el intestino delgado. El SBI se define como la presencia de $>10^5$ unidades formadoras de colonias (UFCs)/mL y/o aparición de bacterias colónicas en el aspirado de yeyuno superior (165) y tiene una prevalencia de hasta el 70% en pacientes con cirrosis (166-169), siendo más frecuente en pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad, pacientes con ascitis y Child-Pugh C (16, 90, 108, 170, 171). El SBI observado en pacientes con cirrosis se atribuye a una disminución en la motilidad intestinal, el tiempo de tránsito intestinal y a una disfunción intestinal (172-175).

En modelos experimentales se ha podido observar que el SBI se ha asociado con TB en GLMs, presencia de ADNbact en sangre periférica e inflamación del hígado (23, 176-178). La implicación del SBI en la aparición de TB se apoya en la menor incidencia de episodios de PBE en pacientes con DIS (179). Sin embargo, el SBI no es el único factor que explica el desarrollo de TB, pues no se observa TB en hasta el 50% de los animales con SBI, por lo que otros factores como la inmunidad local participan en la patogénesis de la TB durante la cirrosis (16).

La alteración en la composición de la microbiota de pacientes con cirrosis se ha asociado con disfunción cognitiva, un empeoramiento de la función hepática, hospitalizaciones a 90 días y muerte (180-183) sugiriendo su utilidad como factor pronóstico. Pese a que el tratamiento de la cirrosis está enfocado a eliminar la causa que origina la enfermedad o el desarrollo de complicaciones, la modulación terapéutica de la microbiota mediante el uso de antibióticos, prebióticos, probióticos, simbióticos, trasplante fecal de microbiota o el uso de matrices adsorbentes es un campo de creciente interés debido a las implicaciones de la microbiota intestinal en la patogénesis de la cirrosis (184).

2.3.- Ácidos grasos de cadena corta

Está bien establecido que la colonización bacteriana normal es necesaria para el desarrollo de la barrera intestinal (185, 186). De esta forma, los ácidos grasos de cadena corta (AGCCs), principalmente el acético, el butírico y el propiónico, son productos del metabolismo de la microbiota intestinal que se originan en el colon durante la fermentación anaeróbica de los carbohidratos no digeridos de la dieta (187).

La producción de estos productos bacterianos se asocia a bacterias que pertenecen al filo de *Firmicutes*, una de las poblaciones bacterianas más representadas en la microbiota intestinal en condiciones de eubiosis. Especialmente a los clústeres de *Clostridium* IV y XIVa de *Firmicutes*, que incluyen especies de *Faecalibacterium* y *Eubacterium* / *Roseburia* respectivamente (188).

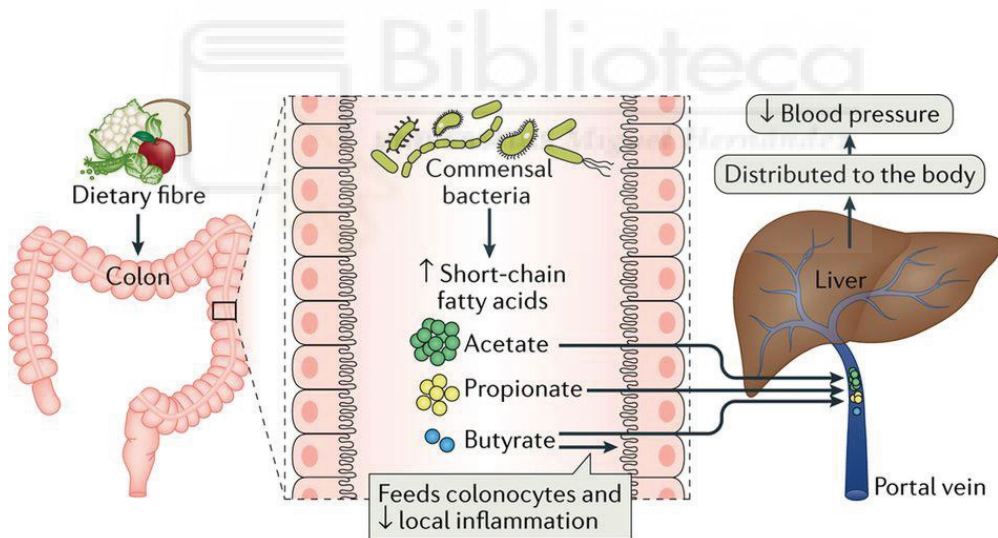


Figura 7. Producción de AGCCs en nuestro organismo. Marques FZ, et al. Nat Rev Cardiol. 2018 Jan;15(1):20-32 (189).

Los AGCCs actúan como moléculas de interacción entre la microbiota y el huésped, de modo que contribuyen a procesos fisiológicos como fuente de energía para los enterocitos intestinales, influyen en el mantenimiento de la barrera intestinal, regulan

la respuesta inmune, incrementan la saciedad y modifican el estado hemodinámico del huésped (190-194).

De esta forma, los AGCCs juegan un papel importante en el mantenimiento de la barrera intestinal. Los AGCCs disminuyen la permeabilidad de las TJs a través de la activación de la lipooxigenasa en estudios *in vitro* realizados en una monocapa de células intestinales Caco-2 y en células endoteliales de la vena umbilical humana (195, 196). En concreto, el butirato es un regulador considerable de las TJ debido a su capacidad de incrementar la expresión de ZO-1 y de claudina-1 (197). Además, los AGCCs estimulan la producción epitelial de MUC-2 mediada por prostaglandinas lo que contribuye al efecto mucoprotector de la barrera (198).

Una de las vías de interacción entre la microbiota y el huésped se produce a través de los receptores de AGCCs, el receptor acoplado a proteína G (GPR)43 o receptor de ácidos grasos libres 2 (FFAR2), y el GPR42/FFAR3. Estos receptores están expresados por células del sistema inmune y participan en la regulación de la respuesta inflamatoria (199) e influyen en la actividad de macrófagos (200, 201), promueven la diferenciación extratímica de las Tregs (202) e inducen la expansión de Tregs productoras de IL-10 (191). Además, los AGCCs participan en la regulación de la presión sanguínea a través de una red de receptores que contribuyen a evitar cambios drásticos en la presión sanguínea y facilitar la absorción de nutrientes desde el intestino (203).

Por tanto, los AGCCs producidos por la microbiota intestinal ejercen un efecto beneficioso y contribuyen a la homeostasis del huésped. Sin embargo, la disbiosis asociada a la cirrosis, especialmente en estadios más avanzados de la enfermedad, se asocia con una disminución de bacterias productoras de AGCCs y con una menor capacidad de producción de AGCCs, especialmente de butirato (204). La reducción en los niveles de AGCCs, especialmente del ácido butírico, en sangre de pacientes con cirrosis se ha asociado con una enfermedad hepática más avanzada, por la relación inversa existente entre los niveles de AGCCs y la severidad en la hipertensión portal,

endotoxemia, inflamación sistémica y la prevalencia de eventos de descompensación (205).



3.- INFLAMACIÓN DURANTE LA CIRROSIS HEPÁTICA

El hígado es un órgano inmunológicamente activo que procesa la sangre que recibe de la arteria hepática y de vena porta, garantizando el metabolismo de nutrientes, la eliminación de toxinas y la detección y respuesta frente a agentes infecciosos procedentes del intestino o de circulación sistémica. La sangre que procede de circulación portal está enriquecida en nutrientes y PAMPs, como LPS, así como patógenos en caso de daño o disfunción del intestino (206-208). Por este motivo, la ausencia de inflamación crónica y de infecciones recurrentes en individuos sanos pone de manifiesto la importancia del hígado en la eliminación de los componentes microbianos del torrente sanguíneo, evitando episodios de inflamación sistémica y garantizando la homeostasis. De esta forma, la inmunovigilancia ejercida por el hígado se debe a la presencia hepática de células competentes del sistema inmune (53, 209, 210) y a la capacidad para generar moléculas que se liberan a torrente sanguíneo que favorecen el aclaramiento bacteriano (79, 211).

Sin embargo, el daño hepático asociado al desarrollo de la cirrosis y el incremento en la TB favorecida por SBI, un incremento en la permeabilidad intestinal y una respuesta inmune alterada, comprometen la capacidad para eliminar antígenos patógenos induciendo o perpetuando un ambiente inflamatorio sostenido que caracteriza a los pacientes con cirrosis. Esta inflamación sistémica se caracteriza por liberación de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de activación celular que van a influir en el desarrollo de la enfermedad hepática.

3.1.- Origen y consecuencias de la inflamación sistémica durante la cirrosis

Como hemos visto anteriormente, el GALT constituye la primera línea de defensa frente a los antígenos y bacterias de origen intestinal actuando como mecanismo de defensa a nivel local para evitar la diseminación sistémica de componentes bacterianos. Como consecuencia la TB patológica que ocurre durante la cirrosis, se produce una estimulación local constante de las células del sistema inmune intestinal que precede a una respuesta inmune a nivel sistémico (71, 212). La inflamación local mediada por macrófagos intestinales productores de IL-6 y óxido nítrico altera la integridad de la barrera intestinal en pacientes con cirrosis debilitando, aún más, los mecanismos que evitan la TB (213). Así, la capacidad del GALT y de los GLMs para eliminar las bacterias traslocadas y PAMPs es insuficiente permitiendo que alcancen circulación portal y lleguen al hígado donde se activarán vías de señalización proinflamatorias mediadas por PRRs, como TLRs y receptores de tipo NOD, que inducen la producción de citocinas y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos presentes en circulación sanguínea (83, 214, 215). Recientemente se ha establecido la relación entre la abundancia de la microbiota en distintos compartimentos de circulación sanguínea y la inflamación sistémica por producción de citocinas proinflamatorias en pacientes con cirrosis, dando valor a la TB patogénica en el desarrollo de respuestas proinflamatorias sistémicas en estos pacientes (216). Además, la liberación de DAMPs por células del hígado dañadas o muertas como consecuencia del daño hepático originado en pacientes con cirrosis serán también reconocidos por PRRs contribuyendo al ambiente inflamatorio característico de los pacientes con cirrosis (217).

El incremento en la exposición hepática a antígenos de origen bacteriano, junto con una pérdida de funcionalidad del sistema fagocítico nuclear (90) y una disminución en la capacidad de opsonización por el sistema del complemento (87) disminuyen la capacidad del hígado del paciente con cirrosis para eliminar los antígenos bacterianos, contribuyendo a su diseminación y favoreciendo la aparición de infecciones y estimulación permanente del sistema inmune en los pacientes con cirrosis.

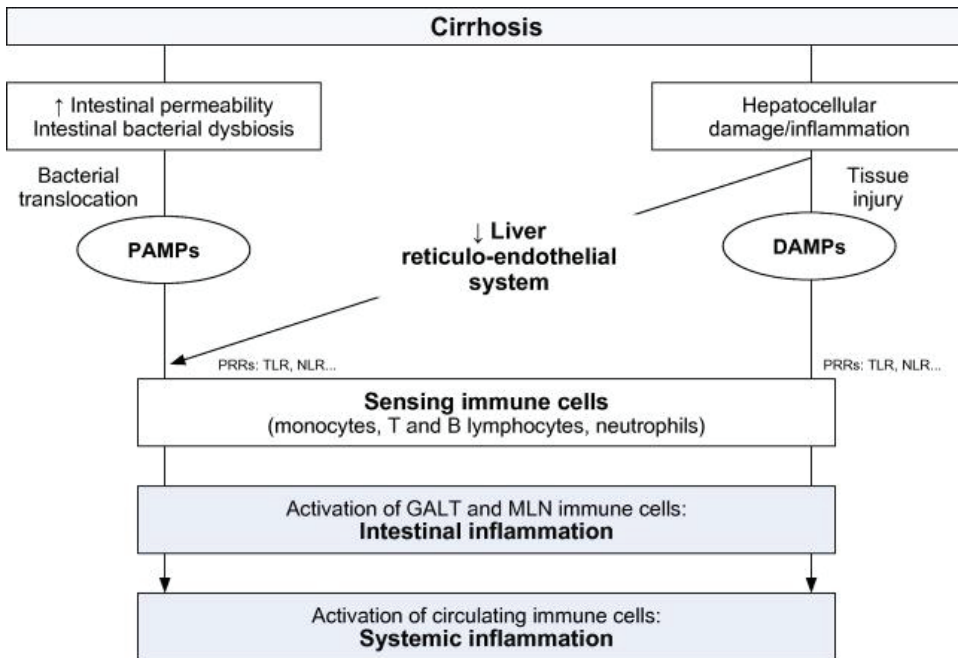


Figura 8. Desarrollo de la inflamación sistémica en la cirrosis. Albillos A, et al. J Hepatol. 2014 Dec;61(6):1385-96 (79).

De esta forma, se va a producir una activación de los distintos componentes celulares del sistema inmune donde neutrófilos, monocitos, linfocitos T y B actuarán para eliminar los componentes patógenos presentes en circulación sanguínea (79). Durante la cirrosis, los neutrófilos presentan una mayor expresión de la molécula de adhesión CD11b y de la citocina proinflamatoria IL-6 (215, 218); la activación de los monocitos induce la producción de citocinas proinflamatorias y aumenta la expresión de moléculas asociadas a la expresión antigénica (HLA-DR, CD80 y CD86) (71, 212, 219); los linfocitos T muestran un incremento en la polarización hacia las vías Th1/Th17 (71, 220, 221); mientras que los linfocitos B se activan en respuesta a IL-6 induciendo la producción de IgG e IgA, así como participan en el desarrollo de fibrosis en modelos de cirrosis experimental modulando la infiltración de CD4 y monocitos Ly6C^{hi} (222-225). Como consecuencia de la activación persistente del sistema inmune que ocurre durante la cirrosis, se ha detectado un incremento sistémico de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α , etc.) y moléculas asociadas a la activación endotelial (nitros óxido, ICAM-1, VEGF y VCAM-1) (79). La inflamación sistémica es mayor en pacientes

con enfermedad hepática más avanzada (226-228) y aumenta en presencia de complicaciones, como la ascitis (212). Las células del sistema inmune activadas que se encuentran en circulación sanguínea pueden ser reclutadas a los focos de daño o de infección perpetuando el estado inflamatorio y contribuyendo a la generación de daño tisular. Entre las manifestaciones clínicas asociadas a la inflamación sistémica, se ha descrito una alteración en el estado hemodinámico asociado a la producción de óxido nítrico (77, 229), modificación de la función cerebral durante la encefalopatía hepática (230-232), daño renal asociado a estrés oxidativo (233-235) y disfunción inmune en los estadios tardíos de la enfermedad hepática, como en el *Acute-on-Chronic Liver Failure* (79, 236).

3.2.- Células T reguladoras

Las células T reguladoras (Tregs) son una subpoblación heterogénea de linfocitos T CD4⁺ clave en la homeostasis intestinal al interferir con los linfocitos T efectoras y con CD8 proporcionando una contrapartida inmunosupresora en la respuesta a antígenos propios, antígenos procedentes de la microbiota comensal y alérgenos ambientales (237-240). Los linfocitos Treg se caracterizan por la expresión del receptor de IL-2 (CD25) y del factor de transcripción FoxP3, adquiriendo un fenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Mutaciones en FoxP3 se han asociado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes y de base inflamatoria (241). Esta población celular produce IL-10 y *Transforming growth factor* beta (TGF-β) y puede ser sintetizadas de forma natural por selección tímica o bien ser inducidas por estimulación antigénica fuera del timo (242, 243).

Se han propuesto cinco mecanismos de supresión inmune ejercidos por las Treg: 1) producción de las citocinas antiinflamatorias IL-10 y TGF-β, 2) supresión mediada por *cytotoxic T lymphocyte antigen* (CTL)-4, molécula que se une a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, 3) inhibición de la proliferación de linfocitos efectoras al consumir IL-2 (244, 245), 4) induciendo apoptosis en células T efectoras mediante la

liberación de granzimas A y B (246), y 5) inhibiendo la función de la célula T activada mediante la liberación de adenosina generada por la expresión de CD39 y CD73 (247).

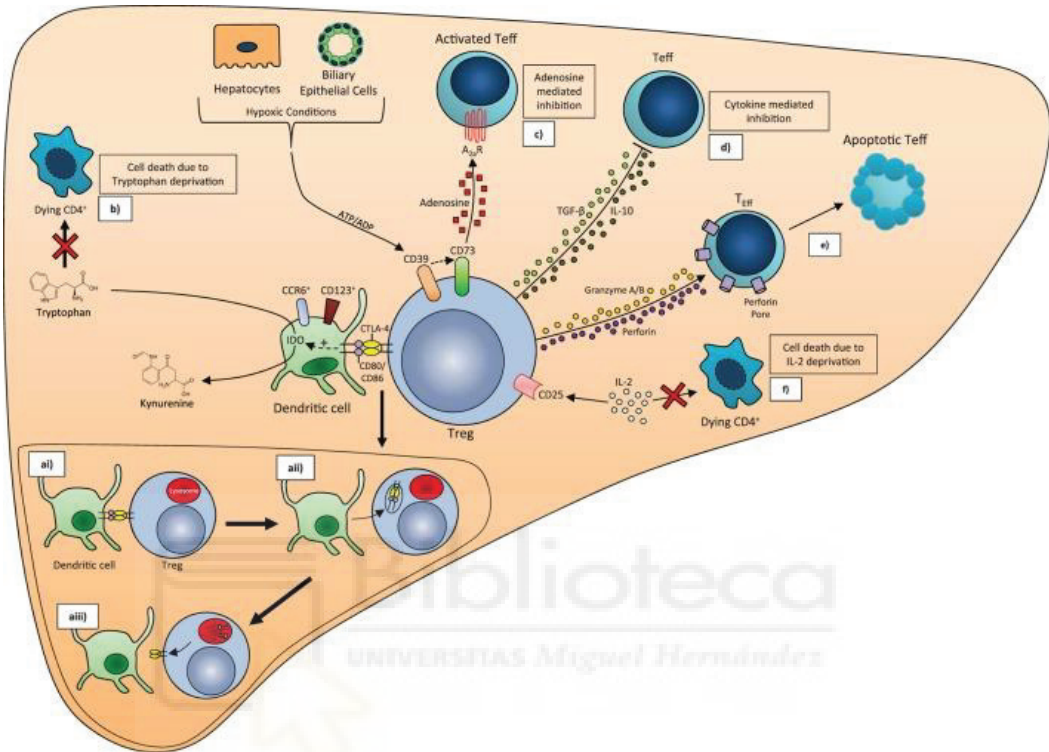


Figura 9. Mecanismos de inhibición de respuestas inflamatorias ejercidos por las células Treg. Jeffery, HC, *et al.* Front Immunol. 2016 Sep 6;7:334 (248).

Las células Treg adquieren relevancia en el campo de las enfermedades hepáticas. Se ha descrito una reducción en el recuento de Tregs en sangre periférica de pacientes con hepatitis alcohólica (249) y esta disminución se ha asociado con la progresión de hígado graso no alcohólico a esteatohepatitis no alcohólica (250). También se ha estudiado su asociación con enfermedades del hígado de base autoinmunitaria, como la colangitis biliar primaria (251-253), así como en la hepatitis de origen viral por virus A, B y C (254-256) y en hepatocarcinoma (257). La interacción entre las CDs y las bacterias traslocadas del intestino ha sido descrita en ratas con cirrosis (258), así como se ha observado que las CDs pueden ser activadas por ciertos probióticos y mejorar la homeostasis

induciendo la expresión de Tregs en mucosa intestinal (259). Además, las Tregs inducidas por bacterias comensales son capaces de proteger frente a la activación por LPS de la ruta proinflamatoria del NF- κ B (260).

Por todo ello, se trata de una población celular cuyo estudio resulta de interés en el campo de las enfermedades donde las reacciones inflamatorias adquieren un papel en su patofisiología como, por ejemplo, en los mecanismos que inducen la aparición de una TB patológica durante la cirrosis.





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES



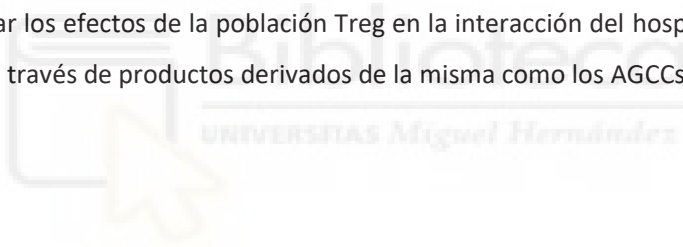
HIPÓTESIS

La homeostasis inflamatoria inducida por norfloxacin en la cirrosis activa la población de linfocitos T reguladores y previene los episodios de traslocación bacteriana al reducir la permeabilidad de la barrera intestinal, restringir la respuesta inflamatoria y promover una interacción balanceada entre el hospedador y su microbiota.



OBJETIVOS

1. Identificar el papel de las células Treg en el mecanismo por el que el norfloxacino ejerce un efecto inmunomodulador y compensa el ambiente inflamatorio en la cirrosis.
2. Discriminar la capacidad de las células Treg para reducir la permeabilidad de la barrera intestinal en un modelo de cirrosis experimental.
3. Evaluar si las células Treg pueden mediar la respuesta inflamatoria a *E. coli* mediada por linfocitos intestinales en un modelo de cirrosis experimental.
4. Determinar los efectos de la población Treg en la interacción del hospedador con su microbiota a través de productos derivados de la misma como los AGCCs.





MÉTODOS
METHODS



1. PACIENTES

El primer artículo de la tesis doctoral es un estudio prospectivo donde fueron incluidos pacientes cirróticos con LA diagnosticados y seguidos en la Unidad Hepática del servicio de Digestivo del Hospital General Universitario de Alicante durante los años 2013-2015. La cirrosis fue diagnosticada por histología o por hallazgos clínicos, de laboratorio y/o ultrasonográficos. Los pacientes fueron distribuidos en 3 grupos:

- 1) Non-infected AE: Pacientes cirróticos con LA no infectado (N=30).
- 2) SBP: Pacientes cirróticos con PBE (N=30).
- 3) SID: Pacientes cirróticos en DIS con Nflx como profilaxis secundaria (N=24).

Los criterios de exclusión de este estudio fueron:

- Carcinoma hepatocelular multinodular.
- Trombosis portal.
- Hepatitis alcohólica.
- Trasplante de hígado previo.
- Derivación portosistémica, percutánea e intrahepática (TIPS) anterior.

Se tomaron muestras de sangre y LA de los pacientes en el momento de su inclusión para hacer un estudio de parámetros bioquímicos y hematológicos de rutina. Las muestras de pacientes con PBE fueron tomadas en el momento del diagnóstico de PBE por la presencia de >250 PMNs/mm³ en LA.

La toma de muestras se hizo en condiciones asépticas en tubos estériles sellados BD Vacutainer SST II Advance (BD Diagnostics, Erembodegem, Bélgica) para evaluar la presencia de bacterias o de sus antígenos o BD Vacutainer® EDTA (BD Diagnostics) para la obtención y caracterización de poblaciones celulares.

El comité de ética del Hospital General Universitario de Alicante aprobó el protocolo de este estudio y todos los pacientes incluidos firmaron un consentimiento informado para poder participar.

2. MODELOS EXPERIMENTALES

2.1. Animales.

Se emplearon ratones hembra y macho C57Bl/6J *wild type* (WT) (Harlan, Barcelona, España) y ratones *Recombination activating gene (Rag)-1 knockout (Rag1^{-/-})* (Jackson Laboratories, Bar Harbor MN, Estados Unidos) con fondo genético C57Bl/6J. Los animales contaban con un peso inicial de 20-25 gramos y fueron alimentados con comida estándar para roedores y agua, estéril en el caso de los ratones *Rag1^{-/-}* por el elevado riesgo de infecciones que supone carecer de sistema inmune adaptativo. Todos los animales permanecieron en condiciones ambientales controladas durante todos los experimentos manteniendo temperatura constante de 21°C, una humedad relativa de 60±10 % y ciclos de luz/oscuridad 12:12.

Los animales recibieron cuidado de acuerdo a los criterios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y se siguieron las normas éticas establecidas por la legislación española (RD 53/2013 de 1 de febrero, BOE núm. 34 de 8 de febrero de 2013) y la Comunidad Europea (REAL DECRETO 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, BOE núm. 252 de 21 de octubre 2005).

Los estudios con animales fueron aprobados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández (Elche, España).

2.1.1. Ratones *Rag1*^{-/-}.

El gen *Rag1* produce una proteína que forma parte del complejo RAG, involucrado en la recombinación VDJ de las inmunoglobulinas de células B y T. De esta forma, los ratones inmunodeficientes *Rag1*^{-/-} carecen de respuesta inmune adaptativa funcional y se caracterizan por la ausencia de células B y T maduras. Decidimos utilizar este modelo para conocer la contribución específica de células T vírgenes y T reguladoras funcionales aisladas del bazo de otros ratones WT sin cirrosis e inyectadas en ratones inmunodeficientes *Rag1*^{-/-} con daño hepático (transferencia de células T).

2.2. Intervenciones en animales.

2.2.1. Protocolo de inducción de cirrosis experimental por administración de CCl₄ intragástrico.

Los ratones WT y *Rag1*^{-/-} fueron sometidos a protocolos de daño hepático progresivo durante 16 semanas comenzando con la administración de fenobarbital (0,25 mmol/L) (Luminal, Kern Pharma, Barcelona, España) en el agua de los animales, condiciones mantenidas hasta el sacrificio de los mismos. Tras 4 semanas los ratones recibieron 2 dosis semanales de CCl₄ administrado por vía intragástrica con una jeringa estéril y una guía de alimentación animal. La primera dosis de CCl₄ fue de 100 µL/kg en aceite de oliva en un volumen final de 200 µL. Las siguientes dosis se ajustaron en función de la variación del peso del animal registrada 48 horas después de la última dosis siguiendo el modelo descrito por *Runyon et al.* (261) adaptado al peso 10 veces menor del ratón. La dosis máxima para evitar una tasa elevada de mortalidad fue de 100 µL CCl₄/ratón y se mantuvo hasta las laparotomías de los animales. Se incluyó un grupo de ratones WT no sujetos a este protocolo a los que se administró aceite de oliva para utilizarlos como control negativo en la evaluación de fibrosis.

2.2.2. Transferencia de células T.

Todos los ratones *Rag1*^{-/-} con daño hepático fueron sujetos a experimentos de transferencia adoptiva de células T 48 horas antes de las laparotomías que se pueden seguir en la Figura 10. Para ello, se aislaron células del bazo de ratones WT sin daño hepático que fueron marcadas con CD4, CD25 y CD45RB (Becton Dickinson, New Jersey, Estados Unidos) y separadas por *sorting* usando un FACS Aria II (Becton Dickinson). La población de células CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high} fue definida como células T vírgenes mientras que la población CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} como células T reguladoras, siendo la pureza tras la separación >98%. Una vez se aislaron las células fueron inyectadas por vía intraperitoneal en ratones *Rag1*^{-/-} con daño hepático estableciéndose los siguientes grupos:

- 1) Ratones *Rag1*^{-/-} con daño hepático a los que no se inyectaron células separadas.
- 2) Ratones *Rag1*^{-/-} con daño hepático a los que se inyectaron 2x10⁵ células T vírgenes.
- 3) Ratones *Rag1*^{-/-} con daño hepático a los que se inyectaron 1x10⁵ células T vírgenes y 1x10⁵ células T reguladoras (ratio 1:1).

2.2.3. Administración de Norfloxacin.

Un subgrupo de animales WT y *Rag1*^{-/-} con daño hepático recibió Nflx (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos) por vía intragástrica a razón de 5 mg/kg/día durante una semana. En el caso de los ratones *Rag1*^{-/-} el sondaje oral se realizó tras los protocolos de transferencia adoptiva de células T. Tras este período los animales fueron sacrificados y se realizaron las laparotomías.

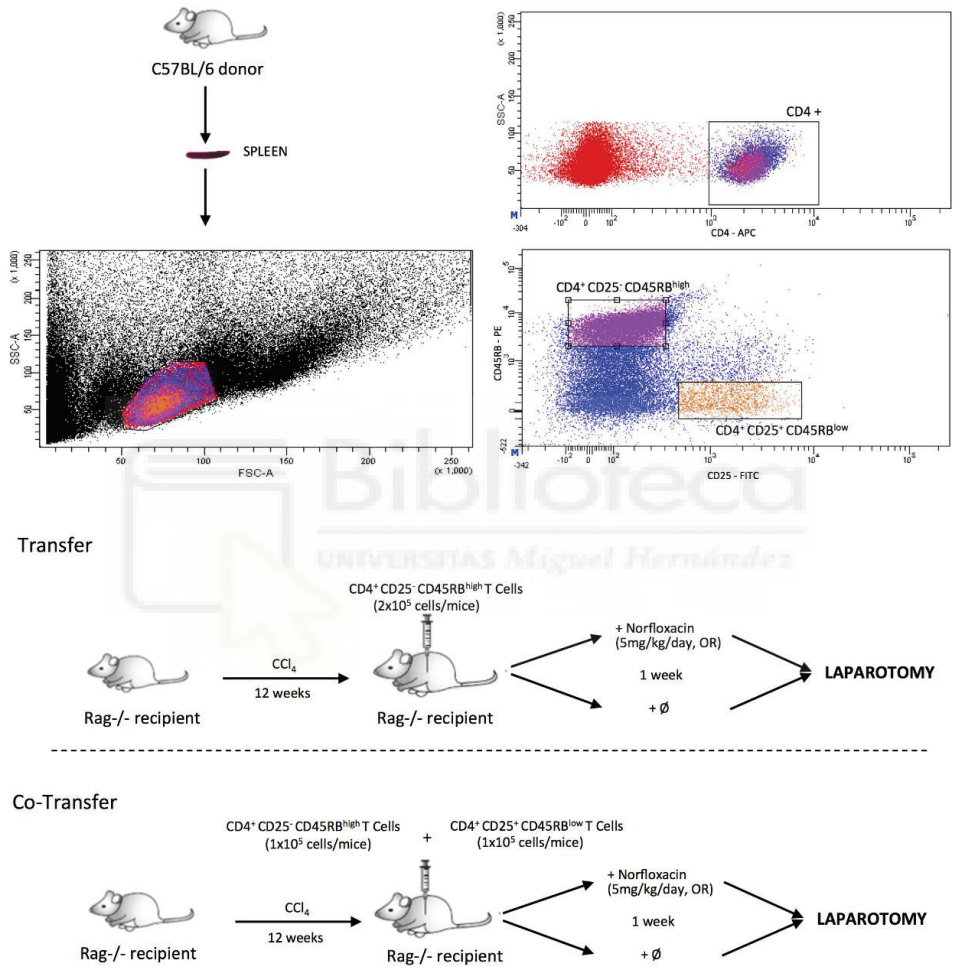


Figura 10. Experimentos de transferencia de células T vírgenes y Treg.

2.2.4. Administración de *E.coli*.

Un subgrupo de animales *Rag1*^{-/-} con daño hepático recibió una dosis de 10⁶ UFCs/ratón de *E. coli* (CECT45) por vía intragástrica. Las bacterias fueron crecidas en tubos estériles que contienen 9 mL de tioglicolato con resazurina (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) e incubadas a 37°C, 5% CO₂. Se incubaron 100 µL de la suspensión de *E. coli* (CECT45) en placas de MacConkey agar (Biomérieux) y se contaron las UFCs para preparar dosis de 10⁶ UFCs de bacterias en un volumen de 200 µL en *phosphate-buffered saline* (PBS) (Sigma) estéril por ratón.

2.3. **Laparotomías y toma de muestras.**

Todos los ratones fueron anestesiados utilizando el anestésico líquido volátil isofluorano (ISOFLO®, Esteve Veterinaria, Barcelona) en una cámara de inducción para roedores. La anestesia se mantuvo durante las laparotomías utilizando una mascarilla conectada al circuito anestésico y la monitorización se basó en comprobar la ausencia o presencia de respuesta refleja.

Se retiró el pelo de los animales y se esterilizó la piel con yodo. Se abrió longitudinalmente la cavidad abdominal utilizando material quirúrgico estéril y se recogieron los GLMs detectables en un tubo eppendorf con PBS en condiciones asépticas. Se obtuvo sangre total de la vena cava en tubos con heparina o EDTA, según el protocolo a realizar. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con 6 mL de solución de sales equilibrada de Hank (HBSS) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ atemperado a 37°C a un ritmo de 1,5 mL/min.

Se tomaron muestras de hígado, bazo, intestino delgado completo, colon y contenido de ciego que fueron conservadas en PBS, formol o RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) para las distintas técnicas experimentales realizadas posteriormente. Las muestras fueron almacenadas y conservadas en diferentes condiciones hasta el momento de su uso.

3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS REALIZADAS

3.1. Detección de norfloxacin en suero.

Se midieron los niveles de Nflx en muestras de plasma de pacientes por cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de fase reversa Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). La fase móvil era un *buffer* de acetonitrilotetrabutil amonio hidroxifosfato eluido a un flujo de 1 mL/min. El efluente fue monitorizado a las longitudes de onda de excitación y emisión de 278 y 456 nm siendo el límite de detección 0,06 µg/mL.

3.2. Evaluación de traslocación bacteriana.

Se detectó la presencia de productos bacterianos (ADN y endotoxina) en muestras humanas de sangre periférica y LA, así como en GLMs de los ratones incluidos en los protocolos de la tesis doctoral.

3.2.1. Evaluación de los niveles de endotoxina.

Se evaluaron los niveles de endotoxina en muestras de sangre y LA de los pacientes incluidos con el test cromogénico *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (BioWhittaker, Nottingham, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. El test se basa en una reacción enzimática que permite detectar y cuantificar la presencia de endotoxina de bacterias Gram-negativas midiendo la absorbancia a 405 nm. La correlación entre absorbancia y concentración de endotoxina es lineal en un rango de 0,1 – 1,0 EU/mL.

3.2.2. Detección e identificación de ADN bacteriano.

Se tomaron muestras de sangre y LA de los pacientes con cirrosis incluidos en condiciones asépticas en tubos estériles BD Vacutainer SST II Advance (BD Diagnostics) para evaluar la presencia de antígenos bacterianos. También se recogieron GLMS en PBS estéril de ratones WT y *Rag1*^{-/-} con daño hepático en condiciones de esterilidad, éstos fueron homogeneizados en ATL *buffer* (Qiagen) utilizando el equipo TissueLyserLT (QIAGEN) a 40 m/s durante 2 minutos hasta que los tejidos fueron completamente disgregados. Se incubaron 200 µL de suero, LA o GLMs en presencia de 200 µL de lisozima a 37°C durante 30 minutos para romper el peptidoglicano presente en la pared bacteriana.

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen). Se amplificó por PCR una secuencia de 541 pares de bases del gen 16S ARNr bacteriano en un termociclador *MyCycler Thermal Cycler* (BioRad) utilizando la metodología previamente descrita por nuestro grupo (20). Los amplicones de ADN fueron resueltos en geles de agarosa 2% (p/v) en TBE 0,5X (BioRad) con *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Life Technologies) mediante electroforesis. Se utilizó un *Gel Doc XR* (BioRad) acoplado a una cámara para visualizar con luz ultravioleta y registrar los fragmentos de ADN. Los productos de PCR fueron purificados utilizando *QIAquick Spin Columns* (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) y se emplearon en las reacciones de secuenciación con *Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) que tuvieron lugar en un secuenciador automático *ABI Prism 377* (Applied Biosystems, Fosters City, CA, Estados Unidos). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras secuencias del gen 16S ARNr disponibles en bases de datos internacionales (Ribosomal Database Project, GeneBank) usando el *software* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3. Aislamiento y/o caracterización de poblaciones celulares.

Se obtuvieron diferentes tipos celulares a partir de muestras de origen humano y murino. Para ello, se trabajó con sangre periférica de ambas especies e intestino delgado completo de ratón.

3.3.1. Purificación de células dendríticas de sangre periférica de muestras humanas.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica en tubos *BD Vacutainer con EDTA K2* (Becton Dickinson) de pacientes con cirrosis. Las muestras se procesaron en una cabina de flujo laminar vertical (BV- 100, Telstar, Terrassa, España) en condiciones de asepsia para obtener la población de células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación diferencial usando Biocoll (Merck Millipore, Burlington, MA, Estados Unidos) en proporción 1:1. Se recogieron las células mononucleares de sangre periférica utilizando una pipeta Pasteur estéril en un nuevo tubo de 20 mL al que se añadió PBS para realizar un lavado.

Se realizó un protocolo de separación magnética de CDs en dos pasos (Blood dendritic cell isolation kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para ello, las células fueron resuspendidas en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} 0,5% albúmina de suero bovino (BSA) 2 mM EDTA (MACS Buffer, Miltenyi Biotec) y marcadas para bloquear los receptores de las fracciones constantes (FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec) y evitar marcaje inespecífico. Las células fueron lavadas con MACS Buffer y filtradas usando mallas de nylon de 30 μM (Pre-Separation Filters, Miltenyi Biotec). Se utilizó el *cocktail Non-DC Depletion Cocktail* (Miltenyi Biotec) para marcar células no dendríticas utilizando MicroBeads conjugadas a anticuerpos frente a CD14 y CD19, que reconocen monocitos y células B, y un anticuerpo conjugado a biotina frente a CD1c. Tras hacer un lavado con MACS Buffer, las células fueron cargadas en una columna MACS, la cual se ubica un separador MACS que tiene en un campo magnético. La fracción negativa, enriquecida en CDs, fue marcada utilizando el *cocktail DC Enrichment Cocktail* (Miltenyi Biotec) que contiene MicroBeads conjugadas a anti-Biotina y a anticuerpos frente a CD141 y CD304.

De esta manera conseguimos aislar las 3 poblaciones de CDs presentes en sangre periférica de humanos: CDs plasmocitoides que expresan CD304 y dos poblaciones de DCs mieloides que expresan CD1c y CD141. Los linfocitos B y los monocitos circulantes en sangre periférica expresan CD1c y CD141 respectivamente, motivo por el que son eliminados antes de la selección positiva de CDs plasmocitoides y mieloides. Las CDs purificadas fueron resuspendidas en FBS (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), marcadas con anticuerpos que reconocen CD11:APC (B-ly6), CD123:PE (9F5), HLA-DR:PerCP-Cy5.5 (L243) (BD Biosciences) y analizadas utilizando el citómetro de flujo FACS Canto II operado por el software FACS Diva (BD Biosciences). La pureza obtenida de las células obtenidas fue >90% en todos los casos. Se hicieron alícuotas de 5×10^5 CDs y se congelaron a -80°C para extracción y cuantificación de proteínas.

3.3.2. Análisis de células T reguladoras de sangre periférica de muestras humanas.

Se tomaron $100\mu\text{L}$ de sangre periférica contenida en tubos estériles *BD Vacutainer con EDTA K2* (Becton Dickinson) para ser incubada con los marcadores de superficie CD3:PerCP-Cy5.5 (UCHT1), CD4:FITC (RPA-T4) y CD25:APC (M-A251) (BD Biosciences) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un lisado de hematíes con 2mL de *Lysing Solution 10X Concentrate* (BD Biosciences) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando *Human FoxP3 Buffer Set* (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones de los fabricantes para poder realizar un marcaje intracelular con FoxP3:PE (259D/C7) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con FBS a lo largo de todo el protocolo tras realizar cada uno de los pasos mencionados. La adquisición de datos y el análisis de la población de células $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ (Treg) se realizó utilizando citómetro de flujo FACS Canto II operado por el software FACS Diva (BD Biosciences). Los valores de porcentaje de Tregs representados se referencian a 100.000 eventos de adquisición de sangre periférica total. Se puede observar un ejemplo de gateo y conteo de la población Treg en la figura 11.

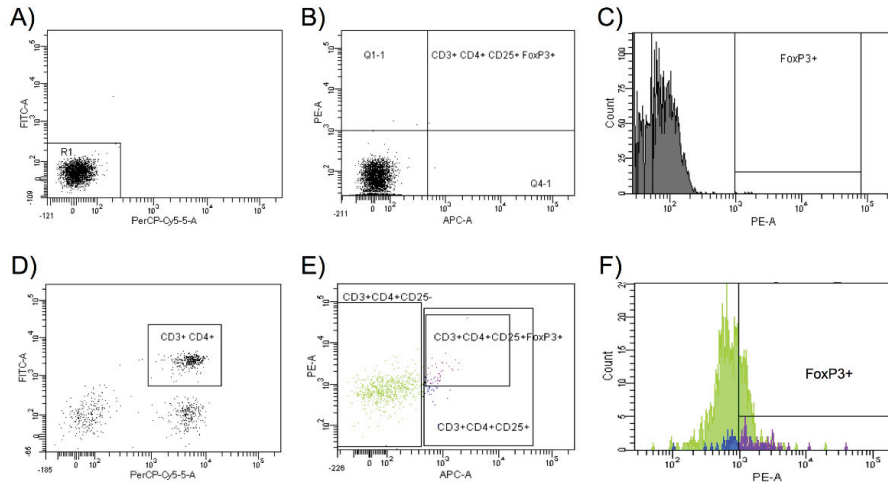


Figura 11. Identificación de las células Treg FoxP3⁺ de sangre periférica de pacientes con cirrosis. A) Control isotipo para PerCP-Cy5.5:CD3 y FITC:CD4. B) Control isotipo para APC:CD25 y PE:FoxP3⁺. C) Selección de la población FoxP3⁺ basada en los controles isotipos. D) Población CD3⁺CD4⁺. E) Estrategia de selección para la diferenciación de CD25⁺ y selección de la población CD25⁺FoxP3⁺. F) Histograma donde se observa el solapamiento de poblaciones para el perfil de expresión de FoxP3⁺.

3.3.3. Purificación de células dendríticas de sangre periférica de muestras de ratón.

Se utilizaron las muestras de sangre total recogidas en tubos de EDTA (BD Diagnostics) de los ratones WT y *Rag1*^{-/-} con daño hepático incluidos en el estudio para la separación de CDs. A diferencia de lo que ocurre en humanos, todas las poblaciones de CDs en ratones expresan CD11c motivo por el que se utilizó el protocolo de *beads* magnéticas *CD11c MicroBeads UltraPure* (Miltenyi Biotec). Se realizó un lisado de hematíes utilizando *Lysing Solution 10X Concentrate* (BD Biosciences) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra de células de sangre periférica fue filtrada usando filtros de nylon de 30µM e incubada utilizando un anticuerpo anti-CD11c marcado magnéticamente con MicroBeads. Tras hacer un lavado con MACS Buffer, las células fueron cargadas en la columna MACS ubicada en el separador MACS con el campo magnético. La fracción negativa se descarta, mientras que la población CD11c⁺ adherida a la columna se eluye utilizando MACS Buffer obteniendo así una población de células

purificada. Las células obtenidas fueron marcadas con CD3e:FITC (145-2C11), CD83:APC (Michel-19), CD11b:PE-Cy7 (M1-70), I-A/I-E:PE (M5/114.15.2) (BD Biosciences) y analizadas utilizando el citómetro de flujo FACS Canto II operado por el software FACS Diva (BD Biosciences). La pureza obtenida de las células obtenidas fue >90% en todos los casos. Se hicieron alícuotas de 5×10^5 CDs y se congelaron a -80°C para análisis de expresión génica.

3.3.4. Aislamiento de linfocitos intestinales de ratón y caracterización de respuesta Th.

Se recogió el intestino delgado completo en PBS frío de ratones *Rag1*^{-/-} con daño hepático tratados con *E. coli* oral para estimular la población de linfocitos intestinales. Se quitaron los restos de mesenterio y tejido graso, así como las placas de Peyer visibles. Además, se lavaron los intestinos para quitar el contenido intestinal remanente utilizando PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} 2% FBS y, con el objetivo de facilitar el aislamiento celular, se abrieron longitudinalmente y fueron cortados en trozos de 1-2 centímetros. Las piezas de tejido fueron incubadas dos veces en HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} suplementado con 5mM EDTA, 1mM DTT y 1% penicilina-estreptomicina en un agitador horizontal *Incubating Orbital Shake* (VWR, Radnor, PA, Estados Unidos) durante 30 minutos a 37°C . Los sobrenadantes resultantes de estas dos incubaciones contienen los IELs y fueron almacenados a 4°C hasta el momento de ser usados. Los tejidos resultantes fueron entonces lavados con PBS para eliminar los restos de EDTA y se comenzó con la digestión enzimática. Para ello, los restos de intestino se incubaron tres veces con HBSS suplementado con 0,5mg/mL colagenasa D (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 3mg/mL dispasa II (Sigma-Aldrich), DNasa I (Roche Diagnostics GmbH) y 1% penicilina-estreptomicina en agitación horizontal durante 30 minutos a 37°C . Durante las incubaciones con enzimas se liberan LPLs, por lo que los sobrenadantes fueron guardados a 4°C . Los sobrenadantes de IELs y LPLs fueron filtrados utilizando filtros de nylon de $70\mu\text{M}$ y lavados con PBS 3% FBS. Las poblaciones celulares de IELs y LPLs se juntaron para obtener el conjunto de linfocitos intestinales y se realizó un gradiente de densidad con Percoll 40% y 80% mediante centrifugación. La población de linfocitos intestinales recogida se resuspendió en RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, 1% L-

glutamina y 1% penicilina-estreptomicina (RP10). A continuación, se procedió a evaluar el perfil Th de los linfocitos intestinales aislados siguiendo las instrucciones del fabricante de *Mouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit* (BD Biosciences). Los linfocitos fueron estimulados *in vitro* utilizando PMA/Ionomicina y se bloqueó el transporte del aparato de Golgi utilizando monensina incluida en el kit. Se evaluó la producción intracelular de IFN- γ , IL-4 e IL-17 como medidas de la diferenciación Th1/Th2/Th17. La adquisición de datos y el análisis de los linfocitos marcados se realizó utilizando el citómetro de flujo FACS Canto II operado por el software FACS Diva (BD Biosciences).

3.4. Análisis de la expresión proteica.

3.4.1. Western Blot.

Se tomaron muestras de CDs humanas y homogeneizados de colon de ratones WT y *Rag1*^{-/-} con daño hepático para realizar un lisado de proteínas utilizando *RIPA buffer* e inhibidores de proteasas al 1% (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich). Las proteínas fueron cuantificadas utilizando un ensayo Bradford (Merck Group, Darmstadt, Alemania) en placas de 96 pocillos. Se resolvieron 20 μ g de los extractos de proteína obtenidos bajo condiciones desnaturalizantes en geles de SDS-poliacrilamida, de 6% a 15% según el peso molecular de la proteína de interés, y se transfirieron a membranas de PVDF (*Immobilon-P*, Merck Group), previamente activadas con metanol durante 1 minuto. Las membranas fueron bloqueadas con 5% leche desnatada en TBST (0,1% Tween-20) en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-CD80 y anti-CD86 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), anti-Claudina-1, anti-Claudina-2 y anti-Ocludina (Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-TJP-1 (Thermo Fisher Scientific) y anti- β -actina (Merck Group). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche y, al día siguiente, con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) (Cell Signaling Technology, Leiden, Danvers, MA, Estados Unidos). Las bandas fueron incubadas con luminol como sustrato cromogénico y peróxido de hidrógeno (*Immobilon Western Chemilum HRP Substrate*,

Merck Group) para detectar la actividad de la peroxidasa adherida a la membrana mediante quimioluminiscencia utilizando un ChemiDOC XRS+ operado por el *software* Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Las bandas proteicas fueron cuantificadas por densitometría utilizando el *software* Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD). Las densidades de las bandas obtenidas fueron normalizadas con respecto a la densidad de su correspondiente β -actina.

3.4.2. Inmunohistoquímica.

Se tomaron muestras de colon de ratones WT y *Rag1*^{-/-} con daño hepático en formol 10% durante las laparotomías y, posteriormente, fueron embebidas en bloques de parafina. Se cortaron secciones de 4 μ m que fueron adheridas a portas Superfrost Plus™ (Thermo Fisher Scientific) e incubadas a 37°C durante toda la noche. Los protocolos de inmunohistoquímica comenzaron con la eliminación de la parafina incubando las portas a 60°C durante 20 minutos y fueron rehidratados con una batería de incubaciones en concentraciones decrecientes de etanol. Para realizar la recuperación antigénica, los portaobjetos fueron hervidos en citrato de sodio (0,1 M, pH 6) durante 20 minutos. La peroxidasa endógena de los tejidos fue inactivada al incubar las muestras con 3% H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente. Además, los portaobjetos fueron incubados en solución de bloqueo PBS-T (Triton 0,1%) con BSA 1%, Lisina 0,1 M y azida 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar la unión inespecífica de anticuerpo primario. Se utilizaron anti-Claudina 1, anti-Claudina 2, anti-Ocludina y anti-TJP-1 (Abcam) como anticuerpos primarios y fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se utilizaron los correspondientes anticuerpos secundarios a dilución 1:200 durante una hora a temperatura ambiente (Palex Medical SA, Sant Cugat del Vallés). Entonces, los tejidos fueron incubados con el complejo de avidina-biotina unida a peroxidasa (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, Estados Unidos) durante una hora a temperatura ambiente y revelados con el sustrato de la peroxidasa 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Vector Laboratories Inc) que genera un producto de color marrón oscuro. Las secciones fueron incubadas en hematoxilina Harris (Leica Biosystems Richmond Inc, Richmond, Estados Unidos) durante 1 minuto

para teñir los núcleos y, finalmente, fueron deshidratadas. Se utilizó el tampón de lavado PBS-T (Triton 0,1 %) entre los diferentes pasos y, como control negativo, la tinción se realizó en ausencia de anticuerpo primario. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio óptico con cámara (LEICA DM2000 LED, Leica Biosystems Richmond Inc) y se muestran en los paneles a un aumento de 20X. Se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión proteica usando el *software* ImageJ (<https://rsbweb.nih.gov>).

3.4.3. ELISA.

Se utilizaron muestras de suero de ratones WT y *Rag1*^{-/-} con daño hepático conservadas a -80°C para la medición cuantitativa de los niveles séricos de IFN- γ , IL-2 e IL-10 e utilizando *Mouse Quantikine ELISA Kits* (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron ensayadas por duplicado y se midió la absorbancia resultante a 450 nm utilizando un lector de placas *Sunrise* (Tecan, Männedorf, Switzerland). Al procesar los datos obtenidos se realizaron medias de los dobletes, se generaron curvas estándar para cada placa y se normalizaron las absorbancias obtenidas en base al valor “cero”.

3.5. Análisis de la expresión génica.

Se aisló ARN total de 5×10^5 CD4⁺ o linfocitos intestinales murinos y de 20-30 mg de tejido hepático o de colon utilizando el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de tejido fueron previamente homogeneizadas utilizando el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen). El ARN total extraído se cuantificó por absorción a 260 nm con un espectrofotómetro *NanoDropR ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para preparar alícuotas de 5 ng/ μ L, y las muestras se conservaron a -80°C. Las mediciones de expresión génica fueron realizadas en 10 ng de muestra usando el kit *qScript One-Step SYBR Green RT-qPCR* (Quanta BioScience, Gaithersburg, MD) en un termociclador a tiempo real *IQ5 RT-PCR* (BioRad, Hercules, Estados Unidos). Todas las mediciones se hicieron por triplicado y los valores obtenidos fueron normalizados de acuerdo a los valores de expresión del gen de

referencia β 2-microglobulina y expresados utilizando el método de cuantificación $\Delta\Delta CT$. Todos los cebadores utilizados fueron diseñados usando la herramienta *Primer-BLAST* de NCBI (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos). En la Tabla 3 se pueden observar los cebadores utilizados para cada gen analizado.

3.6. Administración de LPS:FITC y dextrano:FITC.

Se realizó un ensayo para evaluar la permeabilidad de la barrera intestinal a antígenos bacterianos *in vivo* de ratones WT y *Rag1*^{-/-} con daño hepático. Los animales recibieron 100 μ g de LPS o dextrano conjugado a fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), como macromolécula de control (Sigma Aldrich) por sondaje intragástrico 2 horas antes de sacrificarlos. Se tomaron muestras de sangre de la vena cava y se separó el suero. Además, se utilizaron diluciones seriadas de LPS:FITC o dextrano:FITC en PBS para realizar una curva estándar. Se tomaron 100 μ L de suero o de curva patrón y se realizaron las mediciones en un fluorímetro a 488 nm. Los valores se representan como porcentajes de recuperación del LPS:FITC o dextrano:FITC en el suero de los animales.

16S rRNA	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
	ACCGCGACTGCTGCTGGCAC
B2-microglobulin	ATGGCTCGCTCGGTGACCCT
	TTCTCCGGTGGGTGGCGTGA
CD80	TTCACCTGGGAAAAACCCCC
	ACAACGATGACGACGACTGT
CD86	CAGCACGGACTTGAACAACC
	CTCCACGGAAACAGCATCTGA
Claudin1	ACTCCTTGCTGAAGAACAGT
	GGACACAAAGATTGCGATCAG
Claudin2	ACGGCTCCGTTTTCTAGATGC
	TCACAGTGTCTCTGGCAAGC
FFAR2	TTGGTTGGACCGTGAAGACA
	CTGCCAGAACTCCTTGGGCA
FFAR3	GAGCAGGTCCGAAATGGTCA
	TGTCCAATACTCTGCATCTGTG
IL-10	ACTACCAAAGCCACAAGGCA
	TGGCAACCCAAGTAACCCCTTA
MMP2	CCGAGGACTATGACCGGGATAA
	CTTGTTGCCAGGAAAGTGAAG
Procollagen alpha1	GTGTTCCCTACTCAGCCGTC
	ACTCGAACGGGAATCCATCG
TGF-b	AGAGGTCACCCGCGTGCTAA
	TCCCGAATGTCTGACGTATTGA
TIMP1	CCAGAACCGCAGTGAAGAGT
	GAAACACTGTGCACACCCCA
ZO-1	GGCCGCTAAGAGCACAGCA
	ATGGAGGTTTCCCACTCTGA

Tabla 3. Listado de cebadores utilizados durante la tesis doctoral.

3.7. Detección de ácidos grasos de cadena corta en contenido intestinal.

Los niveles de AGCCs se midieron en muestras de contenido intestinal de ratones WT y Rag1^{-/-} con daño hepático conservadas a -80°C. Para ello, se acidificaron 300 µL de plasma con 30 µL de ácido o-fosfórico 5% (concentración final 0,5%) y, tras mezclar el contenido, se mezcló con 300 µL de metil tert-butil éter. Las muestras fueron homogeneizadas durante 2 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 17,000g a 4°C. Se recogió la fase orgánica y se transfirieron 50 µL a un vial para la inyección en un sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Se tomaron 5 µL de ácido 4-metil valérico (concentración final 500 µM) como patrón interno. El resto de la muestra se almacenó a -20°C.

El sistema analítico de detección consistió en un equipo Agilent 7890A (Agilent Technologies) equipado con un muestreador automático de líquidos (MPS2) (Gerstel, Mülheim, Alemania) y acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5975C (Agilent Technologies). La adquisición fue realizada usando el software *Chemstation* (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, Estados Unidos). La cromatografía de gases se equipó con una columna capilar de sílice de polietilenglicol DB-WAXetr (30 m, 0,25 mm id, 0,25 µm de espesor) y se utilizó helio como gas transportador a 1 mL/min. La inyección fue realizada en modo *splitless* utilizando un volumen de 1 µL a una temperatura del inyector de 250°C. Se utilizó un revestimiento de vidrio con un tapón de lana de vidrio en el extremo inferior para evitar la contaminación de la columna de cromatografía de gases con material no volátil. Cada diez muestras inyectadas se añadió un blanco con hexano. La temperatura de la columna fue inicialmente de 90°C, entonces incrementó a 150°C a 15°C/min, a 170°C a 5°C/min y, finalmente, a 250°C a 20°C/min manteniéndose a esta temperatura durante 2 minutos (tiempo total 14 minutos). El retraso del disolvente fue de 3,5 minutos. El detector fue operado en modo de ionización por impacto electrónico (energía de electrones 70 eV), escaneando el rango de 30-250 *m/z*. La temperatura de la fuente de iones, cuadrupolo e interfaz fue de 230°C, 150°C y 280°C, respectivamente. La identificación de los AGCCs se basó en el tiempo de retención de los compuestos estándar y con la asistencia de las bibliotecas NIST 08 y Wiley7N. Se seleccionó un ion único característico para la cuantificación de cada compuesto: ácido acético 60, ácido

propiónico 74, ácido isobutírico 88, ácido butírico 73, ácido isovalérico 87 y ácido valérico 73.

3.8. Análisis estadístico.

Las variables categóricas fueron expresadas como porcentajes o frecuencias, mientras que las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar si se ajustaban a una distribución normal, o bien, como medianas y cuartiles si no se distribuían normalmente. Se utilizó el test de *Kolmogorov-Smirnov* para asegurar la normalidad de la distribución de variables continuas ($p < 0.05$). Las diferencias estadísticas entre grupos fueron analizadas usando el test de la T de *Student* o el análisis de la varianza (ANOVA) con la corrección de *Bonferroni* para comparaciones múltiples para datos cuantitativos que muestran una distribución normal. Para datos cuantitativos que no muestran una distribución normal las comparaciones fueron realizadas con el test de la U de *Mann-Whitney* para comparaciones simples o el test de *Kruskal-Wallis* seguido de comparaciones por pares usando el test de la U de *Mann-Whitney* con la corrección *post-hoc* de *Bonferroni* para comparaciones múltiples. Las diferencias en las variables cualitativas fueron analizadas usando el test del Chi cuadrado. Las correlaciones bivariadas entre variables continuas fueron calculadas usando el test de *Pearson* o el test de *Spearman* para datos paramétricos y no paramétricos respectivamente. Todos los valores *P* fueron de doble cola y se consideraron significativos cuando fueron inferiores a 0,05. Todos los cálculos fueron realizados utilizando en *software* SPSS Statistics (IBM, Chicago, IL, Estados Unidos).



RESULTADOS
RESULTS



ARTÍCULO 1

Juanola, O., *et al.*, "Selective intestinal decontamination with norfloxacin enhances a regulatory T cell-mediated inflammatory control mechanism in cirrhosis". *Liver Int.* 2016. 36(12): p. 1811-1820.

OBJETIVO

El Nflx ejerce efectos inmunomoduladores en la cirrosis más allá de su actividad bactericida. Nuestro objetivo fue identificar el papel de las Treg en el mecanismo por el que el Nflx compensa el ambiente inflamatorio en la cirrosis.

RESUMEN

Se incluyeron pacientes ingresados de forma consecutiva con cirrosis y LA que presentasen: PBE, LA no infectado y en tratamiento con Nflx como profilaxis secundaria de PBE (grupo DIS). Las células Treg se definieron mediante citometría de flujo como células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Las CDs se purificaron para la evaluación de la señalización coestimuladora y se midieron los niveles séricos de Nflx e IL-10. Se usaron ratones WT y Rag1^{-/-} con cirrosis inducida por CCl₄ para realizar experimentos de transferencia de células T CD4⁺ vírgenes y Treg.

Se incluyeron 84 pacientes. El porcentaje de Treg aumentó significativamente en pacientes con DIS en comparación con pacientes con PBE o con LA no infectado. Se observó una correlación positiva entre Treg y los niveles séricos de Nflx e IL-10. Las CDs de pacientes con DIS mostraron una disminución significativa en la expresión de CD80 y CD86 en comparación con pacientes con PBE y con LA no infectado y se correlacionó con los niveles de Nflx. La modulación de la señalización coestimuladora por Nflx no se detectó en ratones Rag1^{-/-} ni en ratones Rag1^{-/-} reconstituidos con células T vírgenes. Sin embargo, la administración de células T vírgenes y Treg se asoció con una expresión significativamente disminuida de CD80 y CD86 en presencia de Nflx. El efecto inmunomodulador del Nflx sobre la reducción de IL-2 e IFN- γ y sobre el aumento de IL-10 se logró significativamente sólo cuando se restauró la población Treg en ratones Rag1^{-/-}.

CONCLUSIÓN

Estos resultados proporcionan un mecanismo plausible por el que el Nflx ejerce efectos inmunomoduladores en la cirrosis a través de las células Treg.

Selective intestinal decontamination with norfloxacin enhances a regulatory T cell-mediated inflammatory control mechanism in cirrhosis.

Key points:

- Norfloxacin leads to an immune modulation in cirrhosis by influencing Treg anti-inflammatory function.
- Increasing concentration of norfloxacin correlates with Treg cell number and IL-10 production in peripheral blood of patients with non-infected ascitic fluid.
- Treg cells compensate the inflammatory microenvironment in cirrhosis through interfering in DC costimulatory signaling.
- Treg cells collaborate in norfloxacin-associated reduction of bacterial DNA translocation.

Introduction

Bacterial infections represent a common complication in the evolution of patients with cirrhosis [1]. The passage of bacteria or their products from the intestinal lumen towards mesenteric lymph nodes (MLNs) is defined as bacterial translocation (TB) [2], which is favored in these patients by intestinal bacterial overgrowth, increased intestinal permeability and an altered immunological response [3]. Selective intestinal decontamination (SID) with norfloxacin as secondary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP) successfully prevents the recurrence of bacterial infection episodes in these patients [4, 5].

We have previously demonstrated that the use of norfloxacin in cirrhotic patients is associated with several immunological effects at the cellular level, decreasing

proinflammatory cytokines, controlling oxidative burst, and restoring the apoptotic rate in compromised polymorphonuclear (PMN) cells [6]. The molecular mechanism for norfloxacin's modulation of the pro-inflammatory response has shown to implicate the induction of Hemeoxygenase (HO)-1 mediated by Interleukin (IL)-10 secretion [7]. Increased serum IL-10 levels have been correlated with low white blood cell counts and high mean arterial pressure in these patients, suggesting the implication of this molecule in ameliorating circulatory dysfunction and providing an explanation for the improvement of the hemodynamic status in patients with cirrhosis by the use of norfloxacin [8].

However, the linking steps between the use of norfloxacin and IL-10 induction in patients with cirrhosis remain to be elucidated. Regulatory T cells (Tregs) are a heterogeneous CD4+ T-cell subpopulation that is key in gut homeostasis [9]. Tregs can be naturally synthesized by thymic selection and also induced outside the thymus by antigenic stimulation, producing IL-10 and TGF-beta [10]. The interaction between dendritic cells (DCs) and translocated bacteria from the intestine has been described in rats with cirrhosis [11] and it has been reported that DCs can be activated by certain probiotics and improve homeostasis by inducing Treg expression in intestinal mucosa [12]. Also, commensal bacteria-induced Tregs are able to protect against the activation of the nuclear factor (NF)-kappa B proinflammatory route by lipopolysaccharide (LPS) [13].

Due to modification of the intestinal microbiota in SID patients, we hypothesize that the Treg cell subpopulation is stimulated to interfere the co-stimulatory signaling on DCs, therefore reducing T cell activation and compensating the inflammatory environment in cirrhosis.

Patients and Methods

Patients

Between 2013 and 2015, consecutively admitted patients with cirrhosis and ascitic fluid (AF) were considered in this prospective study and grouped according to the presence

of SBP (SBP group), patients without bacterial infections, as determined by negative microbiological culture and absence of bacterial antigens in blood and AF, who were not receiving longterm SID with norfloxacin as secondary prophylaxis of SBP (non-infected AF group), and patients undergoing SID with norfloxacin as secondary prophylaxis of SBP (SID group). Exclusion criteria were multinodular hepatocellular carcinoma, portal thrombosis, alcoholic hepatitis, previous liver transplantation, or previous transjugular intrahepatic portosystemic shunt. SBP was defined as the presence of >250 PMN cells/mm³ in AF. First 30 patients in each subgroup (24 in the SBP group) were finally included in the study. The Ethics Committee of Hospital General Universitario de Alicante approved the study protocol, and all patients gave informed consent to participate in the study. Blood and AF were obtained from all patients at admission and were analyzed for routine biochemical and cytological studies. In patients with SBP, samples were obtained at the time of SBP diagnosis. Blood and AF cultures were performed in all cases, as previously described [14].

Aliquots of blood and AF were inoculated under aseptic conditions in sterile, rubber-sealed Vacutainer SST II tubes (BD Diagnostics, Belgium) for bacterial antigen evaluation. Bacterial DNA fragments in blood and AF were detected by a broad-range polymerase chain reaction (PCR) and partial nucleotide sequencing as previously described [15]. To evaluate endotoxin levels in blood and AF samples, the quantitative chromogenic limulus amoebocyte lysate test (BioWhittaker, Nottingham, UK) was used.

Treg analysis by flow cytometry and DC purification in cirrhotic patients

Fresh peripheral whole blood was surface-stained after collection with PerCP- CD3-Cy5.5 (UCHT1), CD4-FITC (RPA-T4) and CD25-APC (M-A251) from BD Pharmingen, San Diego, CA. An intracellular Foxp3 staining was performed with FoxP3-PE (259D/C7) or its respective isotype control (BD Pharmingen). Data acquisition and analysis of CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells was performed using a FACSCanto II flow cytometer operated by DiVa software (BD, San Jose, CA, USA). An example of FoxP3+ population gating and count can be followed in Supplementary Figure 1. Treg values expressed in

the text correspond to the percentage of 100,000-event acquisition from whole blood samples.

DCs from cirrhotic patients were selected by using magnetic microbeads (Blood dendritic cell isolation kit II, Milteny Biotec, Madrid, Spain). Isolated DCs were evaluated by flow cytometry using the following panel: CD11c-APC (B-ly6), CD123-PE (9F5), HLA-DR-PerCP-Cy5.5 (L243) (BD). Purity was higher than 90% in all cases. Aliquots of 5×10^5 DCs were frozen and stored for protein quantification.

Measurement of serum norfloxacin

Norfloxacin in plasma samples was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a reverse-phase Eclipse XDB-C18 column (5 μm pore size; 4.6 mm x 150 mm) [6]. The mobile phase was an acetonitrile tetrabutyl ammonium hydroxyphosphate buffer eluted at a flow rate of 1 mL/minute. Effluent was monitored at excitation and emission wavelengths of 278 and 456nm, respectively. The detection limit was 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (signal-to-noise ratio, 3:1). Norfloxacin was obtained from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain).

Western Blot analysis.

Cells were lysed with RIPA buffer as previously described [7]. The primary antibodies used against cluster differentiation (CD) 80, CD86 and b-actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Protein bands were scanned and quantified by densitometry using Scion Image software (Scion Corp; Frederick, MD). Band densities were expressed relative to total β -actin protein.

Mice.

Female C57Bl/6 wildtype (WT) (Harlan, Barcelona, Spain) and recombination activating gene 1 (Rag) deficient mice (*Rag1*^{-/-}) (Jackson Laboratories, Bar Harbor MN) were included in a 16-week study protocol. Immunodeficient *Rag1*^{-/-} mice produce no mature

T cells or B cells. Mice were caged at a constant room temperature of 21°C and exposed to a 12:12 light/dark cycle. Adult mice were fed standard rodent chow and treated with 0.25mmol/L phenobarbital in tap water along study protocol. Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The study was approved by the Animal Research Committee of Universidad Miguel Hernandez (Alicante, Spain). After a week of quarantine, animals were subjected to experimental cirrhosis induction with two weekly weight-controlled doses of CCl₄ intragastrically administered for 12 weeks [16].

Adoptive transfer model.

Twelve weeks after initiation of CCl₄ administration, adoptive transfer experiments were performed in immunodeficient *Rag1*^{-/-} mice (Supplementary Figure 2). CD4⁺ T cells were purified from C57Bl/6 WT mice spleens by negative selection (DynaMouse CD4 Negative isolation kit) and further sorted by FACS Aria II (BD). Naïve CD4⁺T cells were defined as CD4⁺CD25⁻CD45RB^{hi} and Treg cells as CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low}. Post-sort purity was typically >98%. Recipient *Rag1*^{-/-} mice were injected i.p, either with splenic 2×10⁵ naïve T cells or with 1×10⁵ naïve T cells plus 1×10⁵ Treg cells, from donor WT mice at a 1:1 ratio with PBS.

Half of the wild-type animals and half of the *Rag1*^{-/-} recipient animals received oral norfloxacin (5mg/Kg) for one week after the adoptive transfer protocol. Laparotomies were performed after this period in all animals.

DC isolation and gene expression analysis.

Total blood was drained out during laparotomies. DCs were purified by positive selection using magnetic microbeads (CD11c mouse DC isolation kit, Milteny Biotec). Isolated DCs were evaluated by flow cytometry using the following panel: CD3e-FITC (145-2C11), CD83-APC (Michel-19), CD11b-PE-Cy7 (M1-70), I-A/I-E-PE (M5/114.15.2) (BD). Purity was higher than 90% in all cases. Aliquots of 5×10⁵ DCs were frozen and stored for gene expression analyses.

Total cellular RNA was isolated from 5x10⁵ purified DCs by handling QIAmp RNA Blood Minikit (Qiagen). Quantitec SYBR Green (QIAGEN) was used to perform gene expression in a IQ5 Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA). Primer-pairs used were 5'-TTCACCTGGGAAAAACCCC-3' as forward and 5'-ACAACGATGACGACGACTGT-3' as reverse for CD80, and 5'-CAGCACGGACTGAACAACC-3' as forward and 5'-TCCACGGAAACAGCATCTGA-3' as reverse for CD86 evaluation.

Serum cytokine levels

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for the quantitative measurement of mouse IL-2, IL-10 and IFN-gamma serum levels were carried out using Mouse Quantikine kits (R&D Systems, Minneapolis, MN). All samples were tested in triplicate and read in a microplate reader.

Evaluation of bacterial translocation in MLNs

MLNs were dissected at laparotomies and disrupted by sonication. Bacterial DNA and endotoxin was determined by broad-range PCR of 16SrRNA gene followed by partial-sequencing analysis and the chromogenic limulus amoebocyte lysate test (BioWhittaker, Nottingham, UK), respectively, as previously described [17, 18].

Statistical analysis.

Continuous variables are reported as mean \pm standard deviation or as median with ranges depending on the data distribution. Categorical variables are reported as frequency or percentages. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of the distribution of continuous variables. Statistical differences between groups were analyzed using the Student's t-test or the analysis of variance (ANOVA) test with Bonferroni's correction for multiple comparisons for quantitative data showing normal distribution. For quantitative data showing a non normal distribution, comparisons were made using the Mann-Whitney U test for simple comparisons or the

Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparisons using the Mann-Whitney U test with the post-hoc Bonferroni correction for multiple comparisons. Differences in qualitative variables were analyzed using the Chi-square test. Bivariate correlations between continuous variables were calculated using the Pearson test or the Spearman test for parametric and non-parametric data, respectively. All reported P values are 2-sided, and P values lower than 0.05 were considered to indicate significance. All calculations were performed using the IBM SPSS Statistics 19 software.

Results

Characteristics of patients.

Eighty-four patients were included in the study. The SBP group included 24 patients, 10 with positive and 14 with negative-culture. No clinical or analytical statistically significant differences were observed between culture-positive and culture-negative patients with SBP (Supplementary Table 1). All patients within this group showed bacterial DNA, irrespective of microbiological culture result. Identified species were *K. pneumoniae* (n=8), *E. coli* (n=8), *E. faecalis* (n=3), *S. pneumoniae* (n=2), *P. vulgaris* (n=1), *S. aureus* (n=1) and *B. fragilis* (n=1). Among the 10 patients with culture-positive SBP, the culture isolated microorganisms corresponded to those identified by nucleotide sequencing in 8 cases. Two cases of culture isolated *S. flexneri* were identified as *E. coli* and *K. Pneumoniae*, respectively, by sequencing analysis. Mean amplified bacterial DNA concentration was $30.6 \pm 9.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Mean serum endotoxin levels were 2.45 ± 0.88 endotoxin units (UE)/mL. The non-infected AF group included 30 patients. None of these patients showed bacterial DNA, and LPS levels were below limit of detection in all cases. The SID group included 30 patients. The period of norfloxacin administration was shorter than 14 months in all patients. Bacterial DNA was not detected in blood or AF of these patients, and serum LPS levels also remained below limit of detection (less than 0.5UE/mL). Supplementary Table 1 shows clinical and analytical characteristics of patients included in the SID group distributed according to serum norfloxacin concentration.

	Nflx (<250 pg/mL) (n=10)	Nflx (250-500 pg/mL) (n=12)	Nflx (>500 pg/mL) (n=8)
Age (years)	59 ± 11	60 ± 10	58 ± 11
Male sex, n(%)	6 (60%)	8 (66.6%)	5 (62.5%)
Etiology			
Alcohol	6	4	6
HCV	2	4	1
Alcohol + HCV	2	3	1
Others		1	
Previous episodes of ascites, n (%)	10 (100%)	12 (100%)	8 (100%)
Previous episodes of encephalopathy, n (%)	2 (20%)	1 (8.5%)	1 (12.5%)
Child-Pugh A/B/C (n)	0/5/5	0/7/5	0/5/3
Child-Pugh score	9.5 ± 1.7	9.4 ± 1.4	9.4 ± 1.5
MELD Mean score	14.4 ± 6.2	14.2 ± 6.5	14.8 ± 7.2
Mean arterial pressure (mm Hg)	81.6 ± 10.8	82.5 ± 12.4	82.2 ± 11.2
Bilirubin (mg/dL)	4.1 ± 4.2	4.2 ± 4.4	4.2 ± 4.4
Albumin (g/dL)	3.2 ± 0.5	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.5
Quick (%)	49.3 ± 10.6	50.5 ± 10.4	50.2 ± 11.4
INR	1.6 ± 0.7	1.6 ± 0.7	1.6 ± 0.5
CRP (mg/dL)	0.55 ± 1.0	0.50 ± 1.0	0.43 ± 1.1
Serum Creatinin (mg/dL)	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.5
Serum Sodium (mEq/L)	134.7 ± 4.7	130.3 ± 5.2	132.6 ± 3.8
Serum Potassium (mEq/L)	4.1 ± 0.8	4.1 ± 0.5	4.2 ± 0.4
AST (IU/L)	66.8 ± 50.2	65.8 ± 42.4	66.2 ± 50.6
ALT (IU/L)	36.4 ± 22.2	34.7 ± 18.5	35.7 ± 23.6
Platelets/mm ³	100144 ± 49954	116300 ± 53410	102458 ± 50036
Total Blood WBC/mm ³	4465 ± 2145	4705 ± 2280	4680 ± 2242
Total Blood PMN/mm ³	3362 ± 3018	3155 ± 2865	3415 ± 2945
Total AF protein (g/dL)	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.6	1.5 ± 0.5
Total AF WBC/mm ³	148 ± 108	155 ± 120	162 ± 135
Total AF PMN/mm ³	58 ± 16	55 ± 16	60 ± 17

Values are expressed as mean ± standard deviation. [§] p=0.01 compared with the rest of groups; * p=0.05 compared with SBP Group. MELD: model for end-stage liver disease; INR: International normalized ratio; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; WBC: white blood cells; PMN: polymorphnuclear cells; AF: ascitic fluid.

Supplementary Table 1. Clinical and analytical characteristics of SID patients.

Table 1 shows clinical and analytical characteristics of patients in different groups of study. Mean age of the overall series was 60 years, and 62% were male. Total white blood and PMN cells and PMN cells in AF were statistically increased in SBP versus the rest of the patients. No other clinical or analytical variables were statistically significant

between subgroups of patients. Patients were followed-up for six months. Three patients with SBP, one patient with non-infected AF and one patient on SID died during the follow-up. Causes of death were: renal failure (n=2) and liver insufficiency (n=1) in the SBP group; and liver insufficiency in the non-infected AF (n=1) and the SID (n=1) groups. Two patients in the non-infected AF subgroup developed an overt encephalopathy episode during the follow-up.

	SBP (n=24)	Non-infected AF (n=30)	SID (n=30)
Age (years)	59 ± 10	60 ± 11	59 ± 11
Male sex, n(%)	13 (54%)	20 (67%)	19 (63%)
Etiology			
Alcohol	12	17	16
HCV	5	7	7
Alcohol + HCV	5	3	6
Others	2	3	1
Previous episodes of ascites, n (%)	18 (75%)	6 (20%) [§]	30 (100%)
Previous episodes of encephalopathy, n (%)	4 (16.6%)	3 (10%)	4 (13.3%)
<u>Child-Pugh A/B/C (n)</u>	0/14/10	0/19/11	0/17/13
<u>Child-Pugh score</u>	9.4 ± 1.8	9.2 ± 1.5	9.5 ± 1.6
MELD Mean score	16.6 ± 9.2	13.0 ± 4.6	14.7 ± 6.8
Mean arterial pressure (mm Hg)	75.4 ± 10.2	83.8 ± 13.5	82 ± 11.1
<u>Bilirubin (mg/dL)</u>	3.8 ± 3.3	3.4 ± 2.1	4.2 ± 4.4
Albumin (g/dL)	3 ± 1.1	2.8 ± 0.8	3.2 ± 0.5
Quick (%)	52.5 ± 20.8	59.5 ± 14.8	49.2 ± 11.8
INR	1.8 ± 0.5	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.7
Serum Creatinin (mg/dL)	1.1 ± 1	0.9 ± 0.6	1 ± 0.5
Serum Sodium (mEq/L)	130.8 ± 7.7	134.9 ± 4.2	133.8 ± 4
Serum <u>Potassium</u> (mEq/L)	4.3 ± 0.8	4.5 ± 0.3	4.1 ± 0.6
AST (IU/L)	67.7 ± 45.8	64.6 ± 46.6	66.2 ± 52.5
ALT (IU/L)	37.8 ± 21.2	35.7 ± 26.8	35.6 ± 29.2
Platelets/mm ³	128800 ± 83220	123618 ± 60512	102446 ± 51025
Total Blood WBC/mm ³	7686 ± 4885	5295 ± 2580	4706 ± 2265
Total Blood PMN/mm ³	5914 ± 3754	4955 ± 2751	3385 ± 3100
Total AF protein (g/dL)	1.7 ± 1.3	1.7 ± 0.9	1.5 ± 0.6
Total AF WBC/mm ³	3794 ± 4896	215 ± 174 *	158 ± 133 *
Total AF PMN/mm ³	3406 ± 5035	50 ± 36 *	62 ± 18 *

Values are expressed as mean ± standard deviation. [§] p=0.01 compared with the rest of groups; * p=0.05 compared with SBP Group. MELD: model for end-stage liver disease; INR: International normalized ratio; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; WBC: white blood cells; PMN: polymorphnuclear cells; AF: ascitic fluid.

Table 1. Clinical and analytical characteristics of patients.

SID with norfloxacin is associated with an increased percentage of Treg cells and the modulation of proinflammatory signalling.

The percentage of CD4+CD25+FoxP3+ cells was evaluated in peripheral blood of all patients included in the study. As can be followed in Figure 1A, this population was significantly increased in SID patients compared with patients with SBP and non-infected AF. When SID patients were distributed according to serum norfloxacin levels, a positive correlation was observed between the CD4+CD25+FoxP3+ population and the serum levels of norfloxacin (Figure 1B). Similarly, serum levels of IL-10 showed a significant increase along with norfloxacin levels in SID patients compared with patients with SBP and non-infected AF (Figure 1C). This increment correlated with the percentage of CD25+FoxP3+ cells in peripheral blood of patients (Figure 1D).

Purified DCs from SID cirrhotic patients showed a significantly decreased protein expression of MHC class II co-stimulatory molecules CD80 and CD86 when compared with DCs from cirrhotic patients with SBP or non-infected AF. Among patients on SID, increasing serum levels of norfloxacin were associated with significantly decreased protein expression levels of both co-stimulatory molecules in DCs (Figures 1E and 1F), functionally required for T cell activation.

Treg cells participate in norfloxacin-mediated modulation of pro-inflammatory response in experimental cirrhosis.

To evaluate the mechanism of norfloxacin-mediated modulation of pro-inflammatory response, experimental cirrhosis was induced by CCl₄ administration in wild-type and Rag1^{-/-} mice. Figures 2A and 2B demonstrate that gene expression levels of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 in DCs from wild-type cirrhotic mice was significantly reduced in the presence of norfloxacin. However, the antibiotic was not able to modulate these molecules in Rag1^{-/-} mice, which lack the Treg cell population.

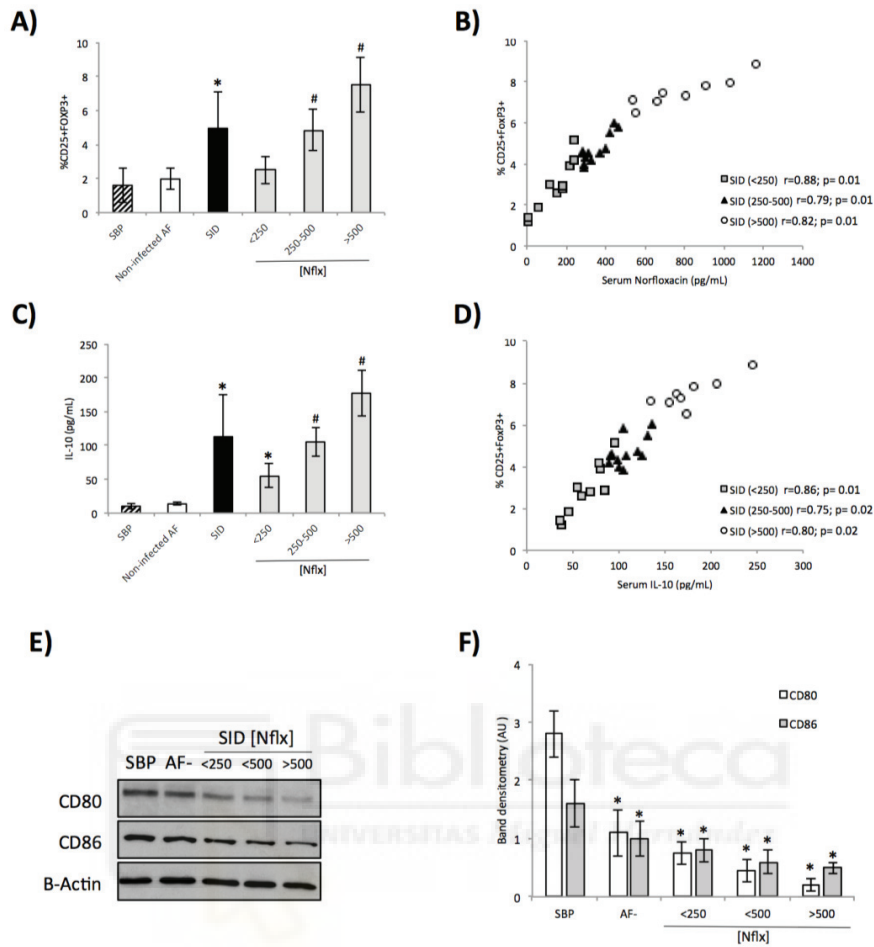


Figure 1. A) Percentage of CD25+FoxP3+ Treg cells from total CD4+ population in peripheral blood from included patients according to different study subgroups. Mean values \pm standard deviation are represented. B) Correlations between the percentage of CD25+FoxP3+ Treg cells and serum levels of norfloxacin in SID patients. C) Serum IL-10 levels in included patients according to different study subgroups. Mean values \pm standard deviations are represented. D) Correlations between the percentage of CD25+FoxP3+ Treg cells and serum levels of IL-10 in SID patients. E) Protein expression levels of costimulatory molecules CD80 and CD86 in purified dendritic cells from patients according to different study subgroups. A representative blot for each molecule is presented. F) Band densitometry analysis of western blots performed. Mean values \pm standard deviation are represented. *p=0.01 compared with SBP and with non-infected AF; #p=0.01 compared with SBP, non-infected AF and with previous Nflx concentration. SBP: spontaneous bacterial peritonitis; AF: ascitic fluid; SID: selective intestinal decontamination.

Through adoptive transfer experiments, we then partially reconstituted *Rag1*^{-/-} mice either with spleen-derived naïve CD4⁺T cells or co-transferred with naïve CD4⁺T cells and Tregs from control mice. The reconstitution alone with naïve CD4⁺ T cells was not associated with a reduction in the expression of co-stimulatory molecules in the presence of norfloxacin. However, the co-transfer of Treg cells significantly reduced CD80 and CD86 gene expression levels in mice treated with norfloxacin (Figures 2A and 2B).

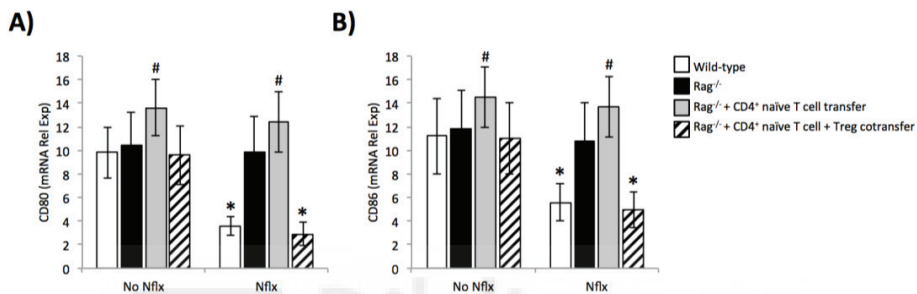


Figure 2. A, B) Gene expression levels of CD80 (A) and CD86 (B) in purified dendritic cells from mice with CCl₄-induced cirrhosis according to the administration of norfloxacin. Mean values ± standard deviation from three independent experiments with 12 mice per group in each panel are represented. *p=0.01 compared with the same condition on the Nflx untreated; #p=0.01 compared with *Rag1*^{-/-} mice and *Rag1*^{-/-} mice reconstituted with spleen derived CD4⁺ naïve T cells. Nflx: norfloxacin; *Rag1*^{-/-}: recombination activating gene 1 deficient mice; Naïve T transfer: *Rag1*^{-/-} mice reconstituted with spleen derived CD4⁺ naïve T cells from wild-type mice; CD4⁺ Naïve T / Treg cotransfer: *Rag1*^{-/-} mice reconstituted with spleen derived CD4⁺ naïve T and Treg cells from wild-type mice.

To confirm the enhanced Treg modulation of Th1 response by norfloxacin, serum Th1 cytokine levels were measured in cirrhotic mice. Figures 3A and 3B show first, as expected, no Th1 response in *Rag1*^{-/-} mice. Secondly, reconstitution of these mice with naïve CD4⁺T cells significantly induced IL-2 and IFN-gamma. The statistically significant modulation of IL-2 and IFN-gamma observed in wild-type mice with norfloxacin was not achieved in *Rag1*^{-/-} mice reconstituted only with naïve CD4⁺T cells. However, *Rag1*^{-/-} mice co-transfer with naïve CD4⁺ and Treg cells significantly reduced pro-inflammatory cytokine levels in the presence of norfloxacin.

On the other hand, the significantly increased IL-10 serum levels associated with the use of norfloxacin in wild-type mice were only recovered when both naïve CD4⁺ T cells and Treg cells were co-transferred in *Rag1*^{-/-} mice (Figure 3C). In this case, as IL-10 can be produced by monocytes, *Rag1*^{-/-} mice show detectable serum levels of IL-10 despite not having any mature B or T cell populations. Nevertheless, these results demonstrate that norfloxacin enhances the Treg modulation of pro-inflammatory response in experimental cirrhosis.

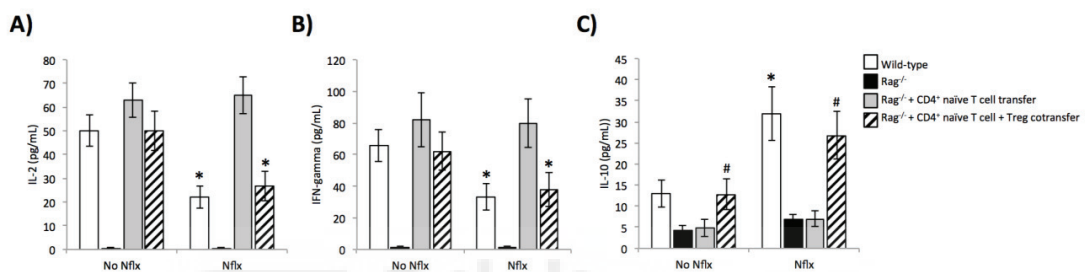


Figure 3. Serum IL-2 (A), IFN-gamma (B) and IL-10 (C) levels in mice with CCl₄-induced cirrhosis according to the administration of norfloxacin. Mean values \pm standard deviation from three independent experiments with 12 mice per group in each panel are represented. * $p=0.01$ compared with the same condition on the Nflx untreated group; # $p=0.01$ compared with *Rag1*^{-/-} mice and *Rag1*^{-/-} mice reconstituted with naïve CD4⁺ naïve T cells in both groups. IL: interleukin; IFN: interferon; Nflx: norfloxacin; *Rag1*^{-/-}: recombination activating gene 1 deficient mice; CD4⁺ Naïve T transfer: *Rag1*^{-/-} mice reconstituted with spleen derived CD4⁺ naïve T cells from wild-type mice; Naïve T / Treg cotransfer: *Rag1*^{-/-} mice reconstituted with spleen derived CD4⁺ naïve T and Treg cells from wild-type mice.

Treg cells participate in norfloxacin-associated reduction of bacterial antigen translocation.

Bacterial DNA translocation and LPS levels in MLNs were significantly reduced by the use of norfloxacin in wild-type cirrhotic mice (Table 2A). We also observe a significant reduction in their specific receptors TLR-9 and TLR-4, respectively, in DCs from cirrhotic mice (Table 2B).

Rag1^{-/-} mice didn't show increased bacterial DNA or LPS levels compared with wild-type mice. Norfloxacin was not associated with reduced bacterial antigen translocation either in Rag1^{-/-} mice or Rag1^{-/-} mice transferred with naïve CD4⁺T cells. However, the antibiotic administration was associated with a reduction in bacterial antigen translocation in Rag1^{-/-} mice cotransferred with both CD4⁺ naïve T cells and Treg cells. Similarly, TLRs gene expression levels were only downregulated in the presence of norfloxacin in Rag1^{-/-} mice cotransferred with both CD4⁺ naïve T cells and Treg cells compared with those untreated (Tables 2A and 2B).

A)

	Norfloxacin	MLN BactDNA rate (%)		DC TLR-9 (mRNA rel exp)	
		No	Yes	No	Yes
wild-type		60% (6/10)	20% (2/10)*	3.3 ± 1.7	0.8 ± 0.6*
Rag1 ^{-/-}		40% (4/10)	40% (4/10)	4.1 ± 2.1	3.5 ± 2.2
Rag1 ^{-/-} T naïve transf		60% (6/10)	50% (5/10)	3.6 ± 1.8	3.5 ± 2.5
Rag1 ^{-/-} , T naïve/Treg transf		60% (6/10)	30% (3/10)*	3.2 ± 2.0	1.2 ± 1.0*

* p=0.01 compared with the same group of mice not receiving norfloxacin

B)

	Norfloxacin	MLN LPS (UE/L)		DC TLR-4 (mRNA rel exp)	
		No	Yes	No	Yes
wild-type		3.8 ± 2.2	0.6 ± 0.4*	12.5 ± 3.8	4.2 ± 2.4*
Rag1 ^{-/-}		4.2 ± 2.5	3.6 ± 2.8	10.6 ± 2.8	10.2 ± 3.5
Rag1 ^{-/-} T naïve transf		3.5 ± 2.0	4.0 ± 2.6	9.7 ± 4.5	10.6 ± 4.3
Rag1 ^{-/-} , T naïve/Treg transf		4.2 ± 2.2	0.8 ± 0.5*	11.6 ± 4.4	5.1 ± 2.2*

* p=0.01 compared with the same group of mice not receiving norfloxacin

Table 2. Bacterial antigen translocation rates and TLR gene expression levels.

Discussion

In the present study, we demonstrate that norfloxacin enhances the Treg cell modulation of the inflammatory response in cirrhosis, as evidenced by the increase in Treg cell population, its correlation with norfloxacin serum levels and the reduction on dendritic cell expression of CD80 and CD86 in SID patients. By using adoptive transfer

experiments in Rag1^{-/-} mice, we have demonstrated that norfloxacin downregulation of essential co-stimulatory molecules, which leads to a reduced systemic pro-inflammatory response, is enhanced only after the reconstitution of the Treg cell population.

In our series of cirrhotic patients on SID, serum IL-10 levels were significantly increased compared with non-infected AF patients and this fact correlated with significantly increased percentages of CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Treg cells in peripheral blood of patients receiving norfloxacin. Moreover, the percentage of this Treg subpopulation showed a close correlation with serum levels of norfloxacin (Figure 1). These data identify Treg cells as a relevant IL-10 secreting cell population in SID patients and support its implication in norfloxacin-derived downregulation of serum proinflammatory levels in cirrhosis, as previously observed [19].

Tregs have been shown to directly interfere with effector T cells [20] as well as with DCs, inhibiting different aspects of their maturation and providing an immunosuppressive microenvironment [21-23]. One of the mechanisms for inhibiting T cell activation relies on the reduction of DCs co-stimulatory molecules [24]. Accordingly, as shown in Figure 1E, the protein expression levels of CD80 and CD86, which are key molecules for functional T cell activation, became downregulated on purified DCs from SID patients in a dose-dependent manner. To confirm Treg participation in norfloxacin's immunomodulatory function, adoptive transfer experiments were performed in CCl₄-induced cirrhotic Rag1-deficient mice. Gene expression levels of CD80 and CD86 in DCs from norfloxacin treated mice only decreased when Tregs were present (wildtype and Rag1^{-/-} mice cotransferred with naïve CD4⁺ T cells and Treg cells) (Figures 2A and 2B). These results show first, that norfloxacin reduces the co-stimulatory signaling in cirrhosis and, second, that Treg cells are necessary for this norfloxacin-driven downregulation. Although norfloxacin dose-dependent response has not been studied, the results presented herein are controlled by double-transferred mice in which levels of inflammatory markers studied are recovered, reaching those observed in wildtype mice.

DCs play a central role in the polarization of adaptive response via cytokine production [25]. In line with the above evidence, the classical Th1-biased response observed in cirrhosis was enhanced in the serum of Rag1^{-/-} mice transferred with naïve CD4⁺ T cells but lacking Treg cells. Norfloxacin immunomodulatory effect on the reduction of IL-2

and IFN-gamma and the increase of IL-10 was significantly achieved only when the Treg cell subpopulation was restored in these mice (Figure 3). These Treg population can be performing their regulatory function by consuming IL-2 from the tissue as a mechanism to reduce Th1 pro-inflammatory activity [26]. This effect is higher in the presence of norfloxacin, both in WT and Rag1^{-/-} cotransferred mice. It would be interesting to evaluate norfloxacin local effects on different immunocompetent tissues to provide further insight on this relationship.

With this body of evidence, we suggest that Tregs are stimulated in the presence of norfloxacin and, as a consequence, IL-10 increased levels compromise DC costimulation, switching their phenotype, and decreasing effector T cell activation in this context (Figure 4). However, the signaling pathway controlling the link between norfloxacin and Treg cell induction has not been defined yet. One of the immunomodulatory activities attributed to fluoroquinolones is the inhibitory effect over phosphodiesterases [27, 28] by possible blockade of NF- κ B and a consequent inhibition of proinflammatory cytokine production [29, 30]. Supporting this, we find a reduction on IL-2 and IFN-gamma production, two cytokines regulated by NFAT transcription factor which activation is under PLC-gamma phosphodiesterase stimulation. Nevertheless, precise experiments should be performed to make a definitive biochemical link.

Finally, both bacterial DNA translocation rate and MLN endotoxin levels were significantly downregulated by norfloxacin in wildtype mice and in Rag1^{-/-} mice co-transferred with naïve CD4⁺ T cells and Treg cells. In addition to the intrinsic drug bactericidal effect, a likely explanation for norfloxacin to reduce these rates in cirrhosis involves the improvement of the gut barrier integrity in the context of a reduced inflammatory outlook driven by Treg induction and IL-10 secretion. In fact, we have previously shown that IL-10 deficient mice have increased intestinal permeability and that norfloxacin is associated with the improvement of gut barrier integrity markers and reduced luminal endotoxin absorption only in the presence of IL-10 [31].

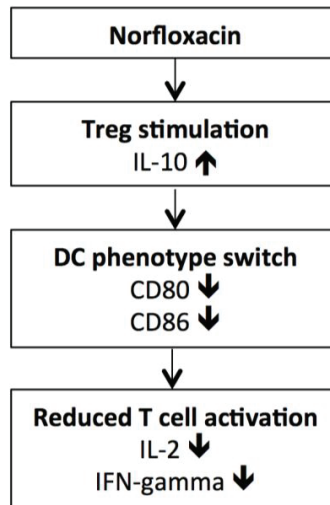


Figure 4. Tregs are stimulated in the presence of norfloxacin and, as a consequence, IL-10 increased levels compromise DC costimulation, switching their phenotype, and decreasing effector T cell activation. Treg: regulatory T cell; IL: interleukin; DC: dendritic cells.

From a clinical perspective, results presented herein may offer several interesting implications. As Treg cells secrete IL-10 and this cytokine has been associated with increased mean arterial pressure levels in cirrhotic patients [7], strategies to promote increased rates of this T cell subset might help in improving patients' hemodynamic status. In this regard, a selective intervention in the gut microbiota might be helpful, as several studies have shown specific microbe-associated induction of Treg cells in different settings [12, 13, 32, 33]. On the opposite, Treg cells have been postulated as a mechanisms of tumor-driven immune evasion and increased Treg cell rates have been reported in patients with hepatocellular carcinoma [34, 35], one of the most threatening complications in cirrhosis.

In summary, the present study shows the correlation between norfloxacin administration and Treg cells rates in patients with cirrhosis. The evaluation of norfloxacin effect in fully immunocompetent mice and in animals with partial and complete restoration of adaptive immunity demonstrates that Treg cells play a key role

in norfloxacin immunomodulatory activity, downregulating DC co-stimulatory signaling and controlling T cell activation in experimental cirrhosis.

References

- [1] Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35:140-148.
- [2] 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;23:403-411.
- [3] Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60:197-209.
- [4] Soriano G, Guarner C, Tomas A, Villanueva C, Torras X, Gonzalez D, et al. Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1992;103:1267-1272.
- [5] Gines P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, et al. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo- controlled trial. *Hepatology* 1990;12:716-724.
- [6] Zapater P, Cano R, Llanos L, Ruiz-Alcaraz AJ, Pascual S, Barquero C, et al. Norfloxacin modulates the inflammatory response and directly affects neutrophils in patients with decompensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:1669-1679.
- [7] Gomez-Hurtado I, Zapater P, Bellot P, Pascual S, Perez-Mateo M, Such J, et al. Interleukin-10-mediated heme oxygenase 1-induced underlying mechanism in inflammatory down-regulation by norfloxacin in cirrhosis. *Hepatology* 2011;53:935-944.
- [8] Albillos A, de La HA, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-217.

- [9] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:735-746; quiz 747-738.
- [10] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 2006;212:28-50.
- [11] Munoz L, Jose Borrero M, Ubeda M, Lario M, Diaz D, Frances R, et al. Interaction between intestinal dendritic cells and bacteria translocated from the gut in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2012;56:1861-1869.
- [12] Konieczna P, Groeger D, Ziegler M, Frei R, Ferstl R, Shanahan F, et al. Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* 2012;61:354-366.
- [13] O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, Murphy S, O'Brien F, Lyons A, et al. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation. *PLoS pathogens* 2008;4:e1000112.
- [14] Runyon BA, Antillon MR, Akriviadis EA, McHutchison JG. Bedside inoculation of blood culture bottles with ascitic fluid is superior to delayed inoculation in the detection of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2811-2812.
- [15] Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002;36:135-141.
- [16] Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, Zapater P, Gutierrez A, Perez-Mateo M, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl4-induced fibrosis. *PLoS One* 2011;6:e23037.
- [17] Guarner C, Gonzalez-Navajas JM, Sanchez E, Soriano G, Frances R, Chiva M, et al. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl(4)-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006;44:633-639.

- [18] Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Moya A, Peiro G, Zapater P, et al. Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2013.
- [19] Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, Cano R, Moreu R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008;47:978-985.
- [20] Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190.
- [21] Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538-1543.
- [22] Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, et al. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 2003;19:877-889.
- [23] Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4676-4680.
- [24] Bayry J, Triebel F, Kaveri SV, Tough DF. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178:4184-4193.
- [25] Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol* 2010;11:647-655.
- [26] Hofer T, Krichevsky O, Altan-Bonnet G. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Frontiers in immunology* 2012;3:268.
- [27] Dalhoff A, Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet InfectDis* 2003;3:359-371.

- [28] Bailly S, Fay M, Roche Y, Gougerot-Pocidallo MA. Effects of quinolones on tumor necrosis factor production by human monocytes. *International journal of immunopharmacology* 1990;12:31-36.
- [29] Dalhoff A. Pharmacokinetics of selected antibacterial agents. *Antibiot Chemother (1971)* 1998;49:1-148.
- [30] Ono Y, Ohmoto Y, Ono K, Sakata Y, Murata K. Effect of grepafloxacin on cytokine production in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:91-94.
- [31] Gomez-Hurtado I, Moratalla A, Moya-Perez A, Peiro G, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, et al. Role of interleukin 10 in norfloxacin prevention of luminal free endotoxin translocation in mice with cirrhosis. *J Hepatol* 2014;61:799-808.
- [32] Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331:337-341.
- [33] Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ccedia M, et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy* 2010;40:811-819.
- [34] Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007;132:2328-2339.
- [35] Oo YH, Sakaguchi S. Regulatory T-cell directed therapies in liver diseases. *J Hepatol* 2013;59:1127-1134.

ARTÍCULO 2

Juanola, O., *et al.*, "Regulatory T Cells Restrict Permeability to Bacterial Antigen Translocation and Preserve Short-Chain Fatty Acids in Experimental Cirrhosis". *Hepatology*. 2018. 2(12): p. 1610-1623.

OBJETIVO

La permeabilidad intestinal a la TB aumenta en la cirrosis. Las células Treg adquieren relevancia en la interacción entre el huésped y su microbiota. En este estudio proponemos que las Treg participan en la promoción de la integridad de la barrera intestinal y una interacción equilibrada con los AGCCs que derivan de la microbiota intestinal.

RESUMEN


Se indujo cirrosis experimental en ratones WT y Rag1^{-/-} por administración oral de CCl₄. Se realizaron transferencias de células T vírgenes y Treg procedentes de ratones WT a ratones inmunodeficientes Rag1^{-/-}. La permeabilidad intestinal se evaluó *in vivo* tras la administración oral de LPS, conjugado a un fluorocromo, y se evaluó la presencia de ADNbact en GLMs. Los niveles de expresión génica y proteica de las proteínas TJ se midieron en muestras de colon. Se determinó el perfil Th de linfocitos T intestinales en respuesta a *E. coli* por citometría de flujo. Los AGCCs se midieron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en contenido de colon antes y después del tratamiento con *E. coli*.

Los ratones Rag1^{-/-} mostraron un incremento significativo en la permeabilidad intestinal a LPS y en la tasa de TB de ADNbact a GLMs en comparación con los ratones control. Los ratones Rag1^{-/-} cotransferidos con células T vírgenes y Treg mostraron una reducción significativa en la permeabilidad intestinal a la TB de antígenos bacterianos y recuperó la expresión de las proteínas TJ en el colon de ratones Rag1^{-/-}. La administración de células T vírgenes y Treg en ratones Rag1^{-/-} restringió la diferenciación proinflamatoria de los linfocitos intestinales en respuesta a *E. coli*. La concentración de los principales AGCCs resultó en una reducción significativa en ratones Rag1^{-/-} después de la administración de *E. coli*, pero permaneció inalterada en ratones Rag1^{-/-} cotransferidos con células T vírgenes y Treg. La expresión de los receptores de AGCCs se redujo por el tratamiento con *E. coli* pero sus niveles fueron restablecidos en ratones reconstituidos con linfocitos T vírgenes y Treg en ratones Rag1^{-/-}.

CONCLUSIÓN

La restricción en: 1) la permeabilidad intestinal, 2) la diferenciación inflamatoria local y 3) la pérdida de AGCCs derivados de bacterias fomenta el valor de las células Treg en la prevención de la TB en la cirrosis.

Regulatory T Cells Restrict Permeability to Bacterial Antigen Translocation and Preserve Short-Chain Fatty Acids in Experimental Cirrhosis

Oriol Juanola ^{1,2}, Paula Piñero,¹ Isabel Gómez-Hurtado,^{1,3} Esther Caparrós,² Rocío García-Villalba,⁴ Alicia Marín,⁴ Pedro Zapater,^{1,3,5} Fabián Tarín,¹ José M. González-Navajas,^{1,3} Francisco A. Tomás-Barberán,⁴ and Rubén Francés^{1,2,3}

Intestinal permeability to translocation of bacterial products is increased in cirrhosis. Regulatory T cells (Tregs) remain central to the interplay between the host and microbial milieu. We propose that Tregs are involved in promoting gut barrier integrity and a balanced interaction with gut microbiota-derived short-chain fatty acids (SCFAs). Carbon tetrachloride cirrhosis was induced in wild-type and recombination activating gene 1 (*Rag1*)^{-/-} mice. Naive T cells and Treg cells were transferred into *Rag1*^{-/-} mice. Intestinal permeability was assessed *in vivo* after lipopolysaccharide (LPS) oral administration, and bacterial DNA presence was evaluated in mesenteric lymph nodes. Transcript and protein levels of tight-junction (TJ) proteins were measured in colonic tissue. Intestinal T helper profile in response to *Escherichia coli* (*E. coli*) was determined by flow cytometry. SCFAs were measured by gas chromatography-mass spectrometry in colonic content before and after *E. coli* challenge. *Rag1*^{-/-} mice showed significantly increased permeability to LPS and bacterial DNA translocation rate compared with control mice. Naive T and Treg cotransfer significantly reduced gut permeability to bacterial antigen translocation and restored TJ protein expression in *Rag1*^{-/-} mice. Naive T and Treg replenishment in *Rag1*^{-/-} mice restrained proinflammatory differentiation of intestinal lymphocytes in response to *E. coli*. The main SCFA concentration resulted in significant reduction in *Rag1*^{-/-} mice after *E. coli* administration but remained unaltered after naive T and Tregs cotransfer. The reduced expression of SCFA receptors induced by *E. coli* was reestablished following naive T and Treg reconstitution in *Rag1*^{-/-} mice. **Conclusion:** The restriction of gut permeability, local inflammatory differentiation, and loss of bacteria-derived SCFAs foster the value of Tregs in preventing bacterial translocation in cirrhosis. (HEPATOLOGY Communications 2018;2:1610-1623).

Patients with cirrhosis are frequently threatened with bacterial infections that aggravate their prognosis.^(1,2) The increased exposure to bacterial antigens is due to a pathological translocation from the gut.^(3,4) Although living microorganisms may translocate and be responsible for severe

Abbreviations: BT, bacterial translocation; CCL₄, carbon tetrachloride; DCs, dendritic cells; *E. coli*, *Escherichia coli*; FFAR, free fatty acid receptor; FITC, fluorescein isothiocyanate; HBSS, Hank's balanced salt solution; IFN, interferon; IHC, immunohistochemical; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; MLN, mesenteric lymph node; mRNA, messenger RNA; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; *Rag1*, recombination activating gene 1; SCFAs, short-chain fatty acids; TJ, tight-junction; Tregs, regulatory T cells; WB, western blot; WT, wild type; ZO-1, zonula occludens.

Received July 5, 2018; accepted October 3, 2018.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1268/supinfo.

Supported by Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (PI16/0967); Consellería Educación, Generalitat Valenciana, Valencia, Spain (PROMETEO/2016/001); and FEDER funds (EU).

© 2018 The Authors. *Hepatology Communications* published by Wiley Periodicals, Inc., on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com).

DOI 10.1002/hep4.1268

Potential conflict of interest: Nothing to report.

infections such as spontaneous bacterial peritonitis,⁽⁵⁾ bacterial products have also been demonstrated to cross the gut barrier and be associated with poor disease outcomes.^(6,7)

The immunological response to increased bacterial antigen translocation rates in cirrhosis and other settings involves a decompensation toward a proinflammatory profile in which dendritic cells (DCs), monocytes, and neutrophils are recruited to the injured area.^(8,9) As a consequence of this polarization, the tolerogenic response that balances out the inflammation is likely compromised. In fact, the immune homeostasis is lost during progression of cirrhosis. The so-called cirrhosis-associated immune dysfunction helps induce intestinal inflammation, suggesting a plausible role for regulatory immune cells and anti-inflammatory cytokines in this context.⁽¹⁰⁾ Intestinal inflammation leads to increased intestinal permeability, which has been demonstrated in cirrhosis,⁽¹¹⁻¹³⁾ and is key in the translocation of small bacterial antigens that, in turn, are able to induce and/or perpetuate a sustained inflammatory environment.^(14,15) In this regard, tight-junction (TJ) proteins, a family of more than 50 members, play an important role in preventing any paracellular breach⁽¹⁶⁾ by which these bacterial antigens may enter the sterile intraepithelial area.

It is well established that normal bacterial colonization is needed for the development of the intestinal barrier.^(17,18) Short-chain fatty acids (SCFAs) are produced by the bacterial fermentation of undigested dietary carbohydrates in the intestine and act as the main energy source of colonocytes. SCFA products of commensal microorganisms are important functional players in the maintenance of intestinal barrier integrity. In particular, butyrate is a considerable TJ

regulator due to its ability to increase expression of zonula occludens (ZO-1) and claudin-1 as well as influence occluding redistribution *in vitro*.⁽¹⁹⁾ These metabolic intermediaries also work as communicators between the intestinal microbiota and the immune system by promoting extrathymic differentiation of regulatory T cells (Tregs).⁽²⁰⁾ SCFA receptors, G protein-coupled receptor (GPR)43/free fatty acid receptor 2 (FFAR2) and GPR42/FFAR3, are expressed on the innate immune cells and participate in regulation of the inflammatory response.^(21,22)

Treg cells are an essential immune population that interferes with effector T lymphocytes and DCs and provides an immunosuppressive counterpart.⁽²³⁻²⁶⁾ We have described in the past that the cellular proinflammatory response in patients with cirrhosis receiving norfloxacin was modulated by an interleukin (IL)-10-mediated mechanism.⁽²⁷⁾ Trying to understand the role of IL-10 in the cirrhotic context, we also reported that IL-10 was required in experimental cirrhotic models to restore normal gut barrier permeability and to lower luminal free endotoxin absorption.⁽²⁸⁾ Among adaptive IL-10-producing cells, Treg cells are especially relevant because of their homeostatic role in the host-microbe interaction. We have identified increased rates of Treg cells in patients on selective intestinal decontamination, their correlation with serum norfloxacin concentrations, and their role as relevant IL-10-secreting cells in these patients,⁽²⁹⁾ supporting their implication in norfloxacin-derived down-regulation of serum proinflammatory levels in cirrhosis observed in the past.⁽¹⁴⁾ In addition, this cell type is implicated in gut homeostatic functions, as their role in modulating SCFAs concentration in the gut microbiota has been reported.⁽³⁰⁾

ARTICLE INFORMATION:

From the ¹Instituto ISABIAL-FISABIO, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain; ²Dpto. Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, San Juan, Spain; ³CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁴CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo, 30100, Murcia, Spain; ⁵Dpto. Farmacología, Pediatría y Química Orgánica, Universidad Miguel Hernández, San Juan, Spain.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Rubén Francés, Ph.D.
Instituto ISABIAL-FISABIO
Hospital General Universitario de Alicante
Avda. Pintor Baeza 12

03010 Alicante, Spain
E-mail: frances_rub@gva.es
Tel.: +34965913928
Fax: +34965913922

In the present study, our specific aim is to evaluate whether the Tregs effect on reduced bacterial antigen translocation might be associated with an improvement in the gut barrier integrity. The purpose of the study, therefore, was to evaluate the contribution of Tregs on gut barrier integrity in the context of experimental cirrhosis. We propose that Treg cells help maintain a reduced gut permeability by promoting the barrier integrity and favoring a balanced interaction with gut microbiota anti-inflammatory products such as SCFAs in response to episodes of bacterial antigen translocation.

We performed adoptive transfer experiments in a recombination activating gene 1 (*Rag1*^{-/-})-deficient mice model of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhosis to evaluate gut barrier integrity markers, gut permeability, bacterial translocation (BT) to mesenteric lymph nodes (MLNs), and the immunological status of intestinal lymphocytes as a key cell population in maintaining gut homeostasis.

Animals and Methods

MICE

Male C57Bl/6J wild-type (WT) and *Rag1*^{-/-} mice on C57Bl/6J background (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MN) were included in 16-week cirrhosis-induced protocols. Immunodeficient *Rag1*^{-/-} mice have a defective VDJ (variable, diversity, and joining) recombination, so the immune adaptive response is altered by the lack of production of mature T cells and B cells. All of the animals were subjected to a week of quarantine before the cirrhosis protocol. We selected *Rag1*^{-/-} mice, which are a T cell-free mouse model, to induce liver toxicity with a classical CCl₄ protocol. The cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice let us evaluate the activation of sorted naive T cells and Tregs from WT animals. Mice were fed a standard rodent chow and kept at a constant room temperature of 21°C in a 12:12 light/dark cycle. The cirrhosis protocol began with the treatment of animals with 0.25 mmol/L phenobarbital in tap water that was maintained along the study protocol. After 4 weeks, the animals received 2 weekly weight-controlled doses of CCl₄ by oral gavage for 12 weeks. The first CCl₄ dose was 100 µL/kg (2 µL per mouse) in mineral oil, and subsequent doses were adjusted based on changes in weight 48 hours after the previous dose, up to 100 µL per mouse. A group

of naive WT mice not subjected to the CCl₄ protocol was used as a negative control for evaluating fibrosis.

Sample size was calculated according to preliminary TJ protein gene expression levels obtained by our group and published in abstract format (Juanola et al. *HEPATOLOGY* 2016;64:83A). Assuming an α error of 0.017, a β error of 0.2, an equal distribution of subjects between groups (0.5 each), and an observed mean difference (E) of colonic occludin gene expression between groups of 1 with a SD of 0.3, 4 animals per group per protocol were required. Typically, mortality rates in our work are about 20%. We increased the number of *Rag1*^{-/-} mice compared with control mice to prevent possible cell-transfer failures or an increased mortality rate. We included 40 to 45 mice in each protocol (30-35 *Rag1*^{-/-} and 10 WT) to make sure we were able to work with at least 5 to 6 mice per group.

Rag1^{-/-} cirrhotic mice were subjected to adoptive transfer experiments 48 hours before laparotomies, as described.⁽²⁹⁾ A group of 24 male C57Bl/6 WT mice not subjected to cirrhosis induction protocol were used for isolating spleen-derived sorted naive T (CD4⁺CD25⁻CD45RB^{high}) cells and Treg (CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low}) cells for these experiments. Postsort purity was typically more than 98%. *Rag1*^{-/-} cirrhotic animals were classified into three groups according to transferred cells: (1) mice not receiving sorted cells; (2) mice transferred with naive T cells (2 × 10⁵ cells per mouse); and (3) mice receiving naive T and Treg cells (1 × 10⁵ each per mouse). Twenty-four hours prior to laparotomies, a subgroup of cirrhotic *Rag1*^{-/-} animals in each condition received oral *Escherichia coli* (*E. coli*), as described subsequently.

Laparotomies were performed under anesthesia with isoflurane. Whole blood was obtained from the cava vein for gut permeability experiments before liver perfusion. Livers were then perfused *in situ* with 6 mL of Hank's balanced salt solution (HBSS) without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Life Technologies Corp., Grand Island, NY) at 37°C at a rate of 1.5 mL per minute. Detectable MLNs were removed, and the liver, spleen, complete small intestine, colon, and content from cecum were collected.

Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The study was approved by the Animal Research Committee of Universidad Miguel Hernández (Alicante, Spain).

FLUORESCEIN ISOTHIOCYANATE-LPS INTESTINAL PERMEABILITY ASSAY

A subgroup of animals in each condition was intragastrically administered 100 μ g of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated LPS from *E. coli* O111:B4 or dextran (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Gut permeability was evaluated 2 hours after FITC-LPS or FITC-dextran administration as the percentage of recovery measured by fluorometry at 488 nm in 100 μ L of serum samples collected from the cava vein. Dilutions of FITC-LPS and FITC-dextran in phosphate-buffered saline (PBS) were used for standard curves.

BACTERIAL DNA TRANSLOCATION ASSESSMENT IN MLNs

MLNs were harvested with sterile instruments in sterile PBS at laparotomies. All tissues were disrupted by using the Tissue Lyser LT (QIAgen, Hilden, Germany), and DNA was immediately isolated using the QIAamp DNA Mini Kit. Bacterial DNA was detected by performing a broad-range polymerase chain reaction (PCR) and partial sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene, as described.⁽¹⁴⁾

GENE EXPRESSION ANALYSIS

Total cellular RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (QIAgen). The qScript One-Step SYBR Green quantitative real-time PCR Kit (Quanta BioScience, Gaithersburg, MD) was used to perform the gene expression of claudin-1, claudin-2, ZO-1, occludin, collagen type I alpha-1 chain (*Col1a1*), tumor growth factor beta (*TGF- β*), matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (*TIMP1*), *FFAR2* and *FFAR3*, and *IL-10* in an IQ5 RT-PCR (Bio-Rad, Hercules, CA). *β 2-microglobulin* was used as a housekeeping gene in all gene expression analyses. Primer pairs used in the study can be followed in Supporting Table S1.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS

Immunohistochemical (IHC) assays were carried out in 4- μ m sections of paraffin-embedded colon tissue, and

processed following standard procedures. The slides were incubated with primary antibodies claudin-1, claudin-2, occludin, and ZO-1 (Abcam PLC, Cambridge, United Kingdom). As secondary antibodies, we incubated the sections with the correspondent α -goat or α -rabbit biotinylated antibodies (Palex Medical SA, Sant Cugat del Vallés, Spain). Slides were incubated with avidin-biotin complex (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and revealed with peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories Inc.). Nuclei were stained by incubating the sections in Harris hematoxylin (Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond, IL). As a negative control, staining was carried out in the absence of a primary antibody. Images were obtained in a camera-assisted optic Leica DM2000 LED microscope (Leica Biosystems, Richmond Inc.). All represented panels are shown at original magnification $\times 20$. A semiquantitative analysis of protein expression was performed using the ImageJ software (<https://rsbweb.nih.gov>).

WESTERN BLOT ANALYSIS

Colon homogenates were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer and protein concentration determined by Bradford protein assay (EMD Millipore Corp., Billerica, MA). Twenty micrograms of protein extracts were resolved under reducing conditions on 6% to 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P membranes (EMD Millipore Corp.). Primary antibodies used are β -actin (Sigma-Aldrich), ZO-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and claudin-1, claudin-2, and occludin (Abcam PLC). Finally, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands). Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (EMD Millipore Corp.) was used to detect the activity of the membrane-attached peroxidase, and images were obtained in ChemiDOC XRS+ operated by Image Lab software (Bio-Rad). Protein bands were quantified by densitometry using Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD). Band densities were expressed relative to total β -Actin protein.

E. COLI CULTURE CONDITIONS AND ADMINISTRATION TO MICE

E. coli (CECT45) was grown in 9 mL of thio-glycolate broth with resazurin (Biomérieux, Marcy

l'Etoile, France) and incubated overnight at 37°C. Serial dilutions of incubated bacteria were performed before plating them in McConkey agar (Biomérieux) overnight at 37°C. Colony-forming units (CFUs) were then counted, and cells were resuspended in PBS. Each animal was administered 1×10^6 CFUs orally.

INTESTINAL LYMPHOCYTE ISOLATION AND T_h DIFFERENTIATION

The whole small intestine from *E. coli*-challenged cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice was obtained. Peyer's patches, fatty tissue, and mesentery were removed from all intestines. The gut was cleaned using cold PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Euroclone, Milano, Italy), opened longitudinally, and cut into 1-cm pieces. Intraepithelial lymphocytes (IELs) were obtained by incubating the small intestine pieces twice with HBSS Ca²⁺ and Mg²⁺ free (Life Technologies Corp.) supplemented with 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid (Bio-Rad), 1 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich), and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies Corp.) in Incubating Orbital Shake (VWR, Llinars del Vallés, Spain) for 30 minutes at 37°C. Thereafter, the tissue pieces were washed with PBS and then incubated three times in HBSS with 0.5 mg/mL collagenase D (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 3 mg/mL dispase II (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL DNase I (Roche Diagnostics GmbH), and 1% penicillin-streptomycin with orbital agitation for 30 minutes at 37°C to collect the lamina propria lymphocyte (LPL) cells. All supernatant fractions were filtered with 70- μ m nylon cell strainers (Corning Incorporated Life Sciences, Oneonta, NY), washed with PBS 3% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies Corp.), and centrifuged to harvest cell suspensions. IELs and LPLs were pooled and constituted the intestinal lymphocyte content. Live lymphocytes were obtained by preparing a 40%/80% Percoll (Sigma-Aldrich) gradient and then cultured in advanced Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Life Technologies Corp.) supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (Life Technologies), and 1% penicillin-streptomycin. Cells were treated and marked according to manufacturer's instructions in the Mouse T_h1/T_h2/T_h17 Phenotyping Kit (BD Biosciences, San Diego, CA). To induce a complete T-cell activation, *E. coli* was

administered according to the conditions described here. T_h differentiation was evaluated as intracellular production of interferon (IFN)- γ , IL-4, and IL-17. Data acquisition and analysis of marked intestinal lymphocytes were performed using a FACSCanto II flow cytometer operated by FACSDiva software (BD Biosciences).

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF SCFAs IN INTESTINAL CONTENT

Intestinal content samples with PBS were homogenized, and 300 μ L were mixed with 300 μ L of 0.5% phosphoric acid. Intestinal content suspensions were sonicated in an ultrasonic bath for 5 minutes and centrifuged for 10 minutes at 17,949g. The aqueous supernatant was extracted with the same volume of methyl tert-butyl ether for 5 minutes and centrifuged in the same conditions. The upper organic phase was transferred into a tube and 4-methyl valeric acid added as internal standard at a final concentration of 500 μ M. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system and chromatographic and mass parameter conditions were followed, as reported.⁽³¹⁾

STATISTICAL ANALYSIS

Continuous variables are reported as mean \pm SD and categorical variables as frequency or percentages. Quantitative data were analyzed using the Mann-Whitney U test for simple comparisons with the *post hoc* Bonferroni correction for multiple comparisons. Differences in qualitative variables were analyzed using the χ^2 test. All reported *P* values are 2-sided, and *P* values less than 0.05 indicate significance. All calculations were performed using SPSS Statistics 19 (IBM, Chicago, IL).

Results

CIRRHOSIS INDUCTION PROTOCOLS AND MICE GROUPS

Five independent protocols of CCl₄-induced cirrhosis were run to complete the different experiments performed. Each protocol included a group of WT mice and three groups of *Rag1*^{-/-} mice (nontransferred

TABLE 1. PROTOCOLS AND NUMBER OF MICE IN DIFFERENT EXPERIMENTAL PROCEDURES DISTRIBUTED BY STUDY GROUPS

Protocol	Experiments	Number of CCl ₄ mice/group				Total number of CCl ₄ mice/protocol
		WT	Rag1 ^{-/-}	Rag1 ^{-/-} + naïve T	Rag1 ^{-/-} + naïve T + Treg	
1	FITC-LPS permeability assays	6	8	8	8	30
2	FITC-dextran permeability assays	6	8	8	8	30
3	TJ protein IHCs in colonic tissue	6	8	8	8	30
4	TJ proteins mRNA and WB in colonic tissue BT in MLNs FFARs mRNA in colonic tissue (except in C57Bl/6) SCFAs in colonic content (except in C57Bl/6)	6	8	8	8	30
5	T _H differentiation in colonic ILCs in response to <i>E. coli</i> FFARs mRNA in colonic tissue in response to <i>E. coli</i> SCFAs in colonic content in response to <i>E. coli</i>	-	8	8	8	24

Rag1^{-/-} mice, naïve T cell–transferred Rag1^{-/-} mice, and naïve T plus Treg cell–cotransferred Rag1^{-/-} mice). Table 1 lists the number of mice included in each experiment distributed by groups and protocol.

Gene expression levels of profibrogenic markers were evaluated in all CCl₄ protocols and combined in Supporting Fig. S1. Results in Rag1^{-/-} mice were similar to those present in WT mice and significantly increased compared with WT mice without liver damage.

GUT PERMEABILITY TO LPS IS REDUCED IN CIRRHOTIC RAG1^{-/-} MICE COTRANSFERRED WITH TREG CELLS

We aimed to study *in vivo* gut permeability to orally administered FITC-LPS. The results of this functional test are described in Fig. 1A. Rag1^{-/-} mice showed a significantly increased permeability to FITC-LPS compared with WT mice. The recovery rate of LPS

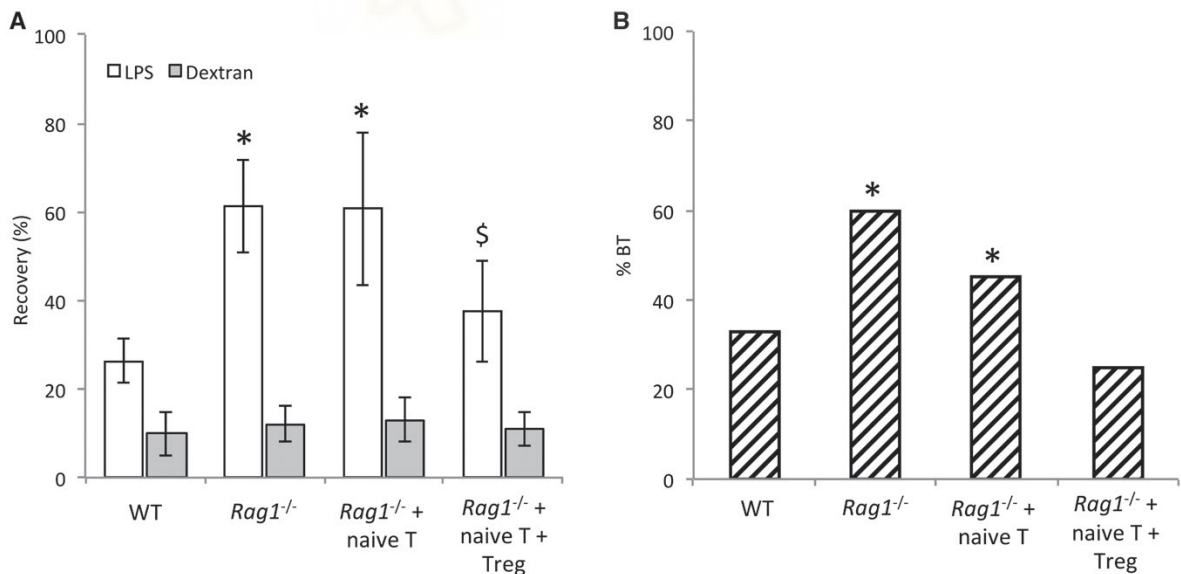


FIG. 1. *In vivo* gut permeability assay in WT and Rag1^{-/-} cirrhotic mice study groups. (A) FITC-LPS and FITC-dextran recovery percentages in blood 2 hours after their intragastrical administration. (B) Bacterial DNA translocation rates in MLNs of study groups. **P* < 0.05 compared with WT cirrhotic mice in both panels. [§]*P* < 0.05 compared with other Rag1^{-/-} groups in both panels.

in *Rag1*^{-/-} mice was not reduced after injection with spleen-derived naive T cells. On the contrary, only the coinjection of naive T and Treg cells significantly reduced gut permeability to FITC-LPS. In agreement with this, the translocation of bacterial DNA to MLNs of *Rag1*^{-/-} mice cotransferred with naive T and Treg cells was significantly down-regulated to levels present in WT cirrhotic mice (Fig. 1B).

TREG CELLS ARE ASSOCIATED WITH A RESTORATION OF TJ PROTEIN EXPRESSION IN CIRRHOTIC *RAG1*^{-/-} MICE

The observed reduction in gut permeability led us to study the status of TJ proteins in cirrhotic mice. The expression of TJ proteins ZO-1, occludin, claudin 1, and claudin 2 was measured by gene expression, IHC, and western blot (WB) in all study groups (Fig. 2). Messenger RNA (mRNA) levels of all studied genes were significantly decreased in cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice either nontransferred or transferred with naive T cells compared with cirrhotic WT mice. The cotransfer with naive T and Treg cells restored transcript expression of all genes to levels shown in cirrhotic WT mice (Fig. 2A).

Cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice without any transferred cells showed a significant reduction in the protein expression of the different TJ proteins compared with the cirrhotic WT, as shown by IHC and WB analyses (Fig. 2B,C, respectively). None of the TJ protein levels significantly increased when these mice were transferred with naive T cells. However, the cotransfer with naive T and Treg cells restored all TJ protein expression to the levels shown in WT. Visually observed differences between groups in TJ protein expression were shown to be statistically significant after a semiquantitative analysis of IHC and WB images.

TRANSFERRED TREG CELLS MODULATE IL PROINFLAMMATORY T_h1 AND T_h17 RESPONSES TO ORAL *E. COLI* ADMINISTRATION IN CIRRHOTIC *RAG1*^{-/-} MICE

Because Treg cells are functionally required to maintain gut barrier integrity and reduced permeability in

CCl₄-cirrhotic mice, we were interested in evaluating whether transferred Treg cells in cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice restrained the induced proinflammatory T_h differentiation as a possible explanation for the function of Treg cells in gut barrier improvement. Figure 3A shows the flow cytometry gating strategy for determining T_h subpopulations in ILs of *Rag1*^{-/-} mice in response to oral *E. coli* administration. *Rag1*^{-/-} mice showed a low T_h differentiation from residual intestinal CD4⁺ cells, as expected (Fig. 3B). The injection of T naive cells induced exacerbated proinflammatory T_h1 and T_h17 responses that were significantly down-regulated by the cotransfer with Treg cells. The T_h2 profile was not altered in any experimental condition.

Because Treg cells exert their action through IL-10 production, we set out to determine transcript expression levels of IL-10 in intestinal lymphocytes. IL-10 levels in cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice cotransferred with naive T and Treg cells were significantly increased in response to *E. coli* compared with the rest of the groups, providing a counterbalance for the observed T_h proinflammatory polarization (Fig. 3C).

TREG CELLS CONTRIBUTE TO SUSTAIN SCFA LEVELS IN THE INTESTINAL CONTENT OF CIRRHOTIC *RAG1*^{-/-} MICE AFTER EXPOSURE TO *E. COLI*

Microbiota products such as SCFAs also play a role in maintaining gut homeostasis. We evaluated whether Treg cells are also relevant in SCFA modification in response to *E. coli*, as a model of induced BT, in the intestinal content of cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice. The concentration of all measured SCFAs resulted in a significant reduction after *E. coli* administration, but for acetic acid in nontransferred *Rag1*^{-/-} mice. The concentration of all SCFAs remained unaltered in the intestinal content of cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice cotransferred with naive T and Treg cells except for valeric and isovaleric acids (Fig. 4A). The gene expression levels of receptors FFAR2 and FFAR3 for these SCFAs were measured in colonic tissue homogenates (Fig. 4B). Both receptors were significantly reduced in response to *E. coli* in cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice either nontransferred or transferred with naive T cells. The cotransfer with naive T and Treg cells was able to reestablish FFAR2 and FFAR3 levels shown in cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice not challenged with *E. coli*.

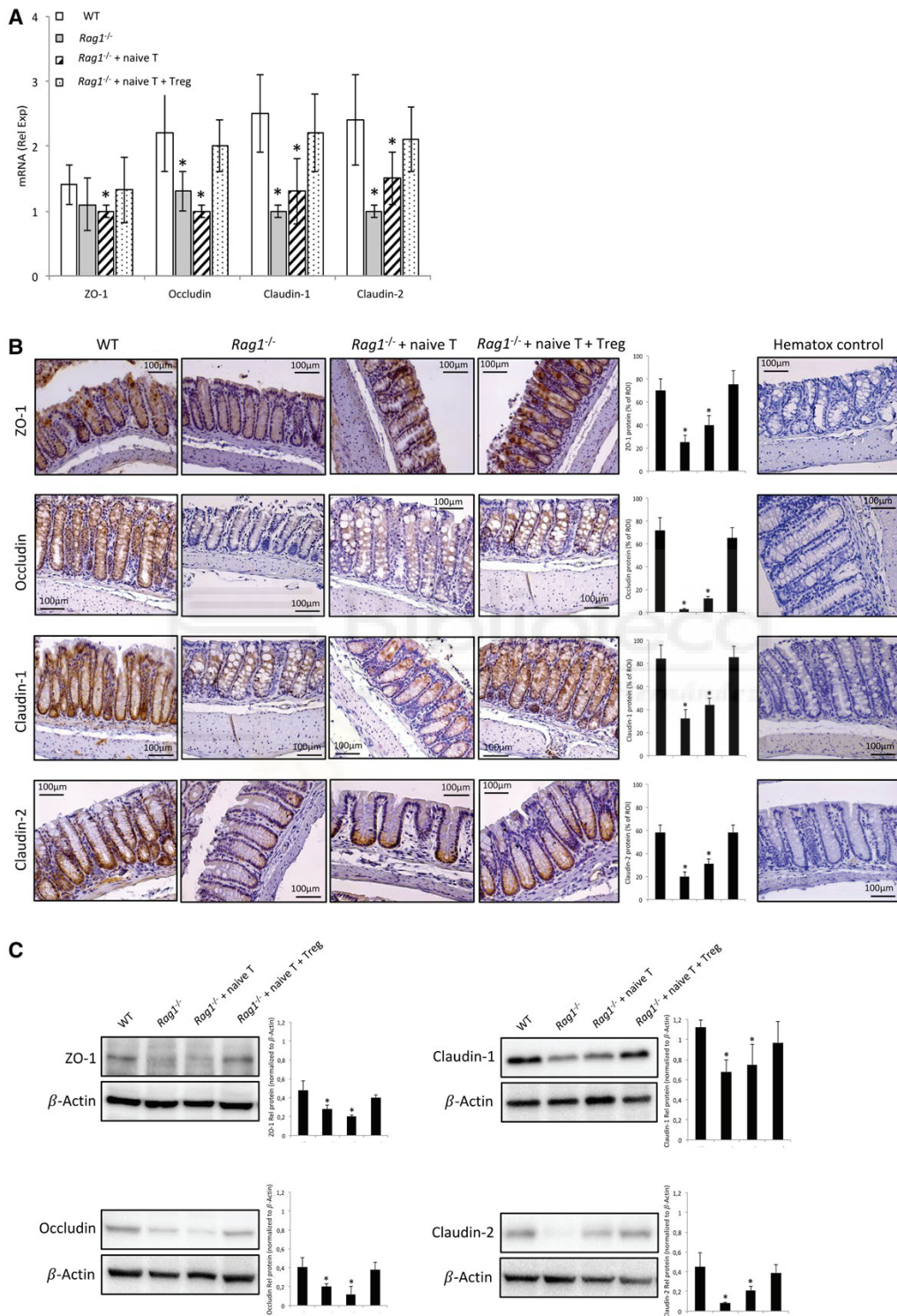


FIG. 2. TJ protein expression in WT and *Rag1*^{-/-} cirrhotic mice study groups. (A) mRNA transcripts relative expression of ZO-1, occludin, claudin-1, and claudin-2 in colon tissue homogenates. (B) Representative images of colonic tissue sections from the different study groups. Protein expression was blindly measured in user-specified regions of interest (ROIs) as percent brown area in hematoxylin-stained colon samples using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov>). The mean and SDs from three independent ROIs in each sample are represented in bar graphs. Negative control hematoxylin-stained sections without primary antibody are also shown. (C) Western blot analysis of ZO-1, occludin, claudin-1, and claudin-2 in colon tissue homogenates. Band densitometry analysis shows the mean and SDs from four independent blots run for each protein. **P* < 0.05 compared with cirrhotic WT mice in all panels.

Discussion

In the present study, we show that Treg cells help maintain reduced gut permeability to bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis by improving the barrier integrity. Additionally, in response to an induced bacterial challenge, Treg cells restrict an exacerbated proinflammatory T_h commitment and preserve the levels of the most representative anti-inflammatory SCFAs and their receptors. These results give rise to the possibility of designing new interventions aimed at promoting Treg cell differentiation to prevent increased permeability and bacterial antigen translocation episodes in advanced cirrhosis.

BT is a common accepted mechanism for the development of significant bacteria-related complications in cirrhosis, and its prevention must be considered as a permanent goal during disease progression. In the past, we have reported that Treg cells are relevant to the inverse correlation observed between bacterial antigen translocation and norfloxacin through the anti-inflammatory cytokine IL-10 in CCl₄-induced cirrhosis.⁽²⁹⁾ In the present study, we show *in vivo* that gut permeability to bacterial antigens is sensitive to the Treg cell population in cirrhotic mice, as orally administered LPS recovered in blood is significantly increased in cirrhotic mice lacking adaptive immunity, and it is down-regulated when these mice are cotransferred with spleen-derived naive T and Treg cells from WT donors (Fig. 1). As a result, these mice also show significantly decreased rates of bacterial DNA translocation in MLNs compared with nontransferred and naive T transferred *Rag1*^{-/-} mice. It is important to outline that, although T naive transfer into *Rag1*^{-/-} mice is frequently used as an experimental model of spontaneous colitis, which normally takes several weeks to develop, our interest in this model was its intrinsic lack of adaptive immunity. We used it to study the short-term effect (48 hours before laparotomies) of T-cell replenishment in a liver

damage-induced protocol. Under these conditions, *Rag1*^{-/-} mice do not develop colitis.

We have proposed that inflammation precedes BT, despite the fact that they feedback each other, in cirrhosis.⁽³²⁾ In fact, systemic inflammation has been described in the absence of BT in experimental cirrhosis,⁽³³⁾ and the reduction of inflammatory environment and improvement of gut barrier integrity markers by means of the Farnesoid X receptor agonist obeticholic acid has been associated with a significant reduction of BT in cirrhotic rats.⁽³⁴⁾ Our results, in line with this evidence, would point to a progressive depletion of the intestinal Treg population that controls local proinflammatory differentiation as a possible mechanism to explain increased BT observed in advanced cirrhosis.

We provide solid data on the Treg cell involvement in the expression of TJ proteins in colon samples of cirrhotic mice (Fig. 2). The important function of these proteins in preventing paracellular movement across the barrier suggests an effect on expression and distribution of these proteins as a relevant mechanism in the association between Treg cells and a reduced permeability to small bacterial products. Although the transcellular passage of bacterial antigens cannot be discarded, the widening of intercellular spaces has been described among the structural changes of the intestinal mucosa, reviewed by Wiest et al.⁽³⁾ A decreased expression of ZO-1 and occludin in colonic samples of bile duct-ligated mice has been described,⁽³⁵⁾ and reduced expression of TJ proteins has also been reported in duodenal biopsies from patients with cirrhosis.⁽³⁶⁾ Considering that the improved expression of different TJ proteins has been reported in experimental cirrhosis with the use of probiotic strains,^(37,38) some of which are known to stimulate Treg cell expression in intestinal mucosa upon interaction with DCs,⁽³⁹⁾ it is plausible that the progressive, cirrhosis-related inflammatory environment in which T_h1 and T_h17 CD4⁺ T cells are differentiated^(40,41) is accompanied by the

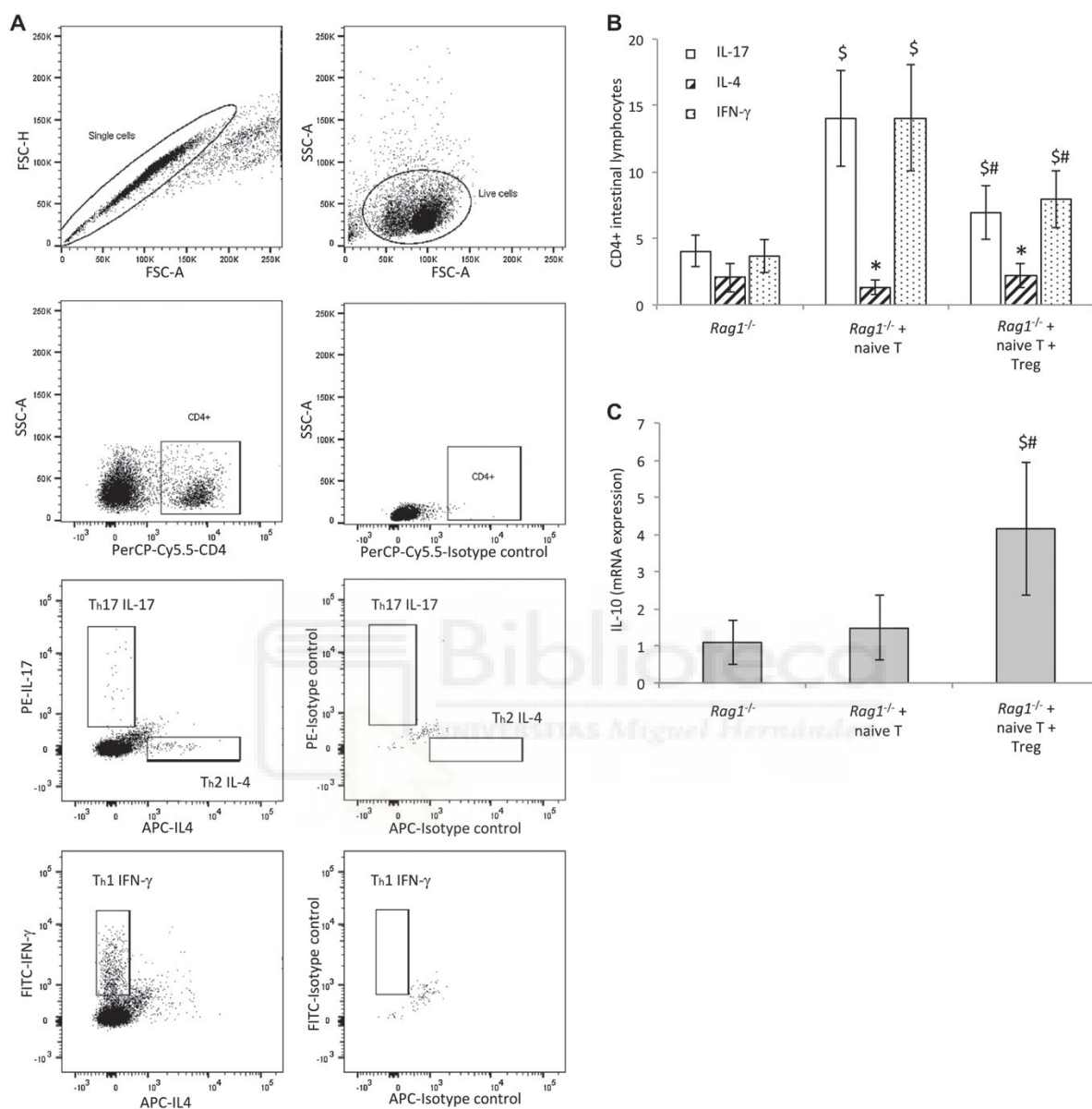


FIG. 3. (A) Flow cytometry strategy for gating of T helper subpopulations. T helper differentiation was evaluated as intracellular production of IFN- γ , IL-4, and IL-17. Isotype-matched controls are also shown. (B) Percentage of CD4⁺ intestinal lymphocytes with intracellular secretion of IFN- γ , IL-4, or IL-17 in response to *E. coli* in the different groups of *Rag1*^{-/-} cirrhotic mice. (C) mRNA expression of IL-10 in intestinal lymphocytes isolated from the different groups of *Rag1*^{-/-} cirrhotic mice. **P* < 0.01 compared with the other conditions within the same group. \$*P* < 0.01 compared with nontransferred *Rag1*^{-/-} group. #*P* < 0.01 compared with naive T-transferred *Rag1*^{-/-} group. Abbreviations: APC, allophycocyanin; FSC-A, forward scatter area; FSC-H, forward scatter height; PE, phycoerythrin; PerCP-Cy5.5, peridinin-chlorophyll-protein complex-Cy5.5 conjugate; and SSC, side scatter.

reduction of the Treg population and the decreased expression of TJ proteins. This likely favors increased permeability and BT.

Functionally, the inflammatory control established by Treg cells in response to an oral bacterial challenge is clearly shown in cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice (Fig. 3). The

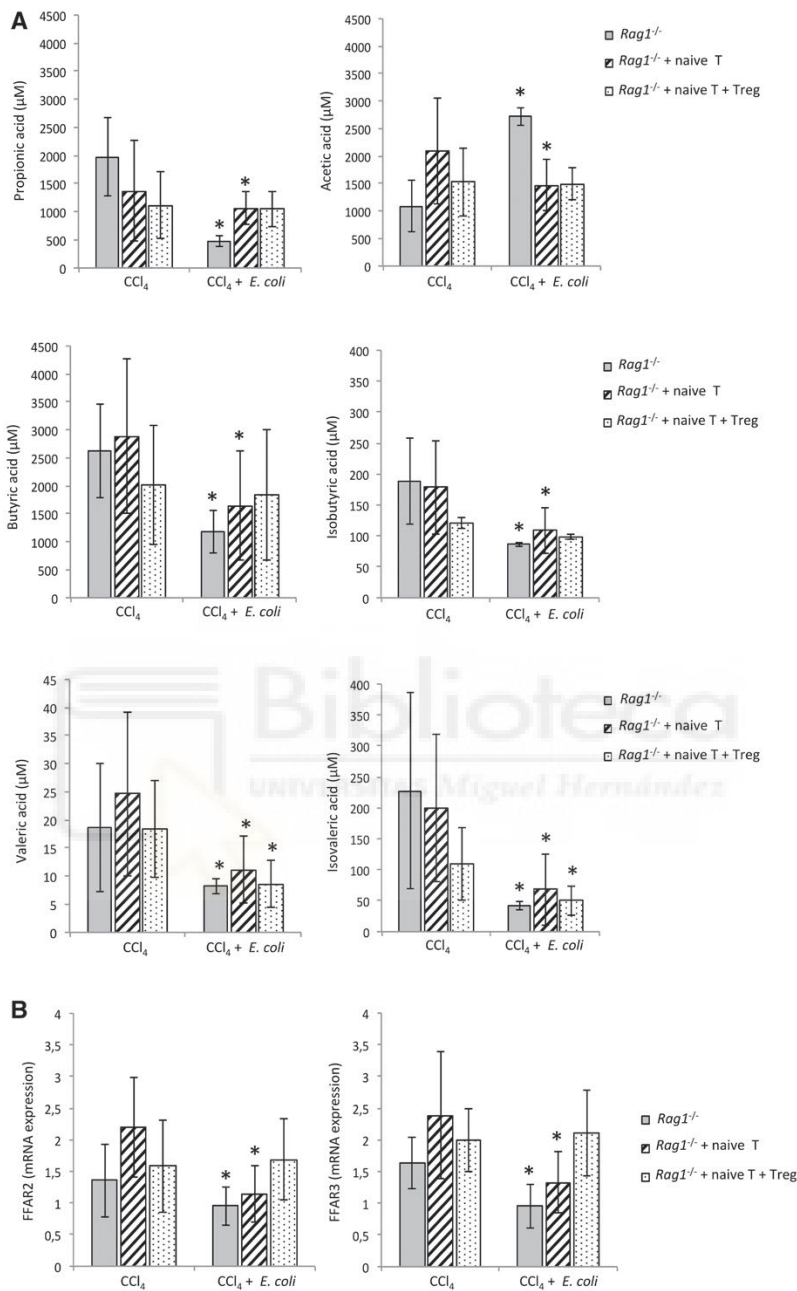


FIG. 4. (A) SCFA concentration measured by GC-MS analysis before and after *E. coli* intragastrical administration in the colonic content of different groups of *Rag1*^{-/-} cirrhotic mice. (B) mRNA expression of SCFA receptors FFAR2 and FFAR3 in colon tissue homogenates before and after *E. coli* intragastrical administration in the different groups of *Rag1*^{-/-} cirrhotic mice. **P* < 0.01 compared with CCl₄-induced cirrhotic mice without *E. coli*.

lack of Treg cells is associated with an increased percentage of intracellular IFN- γ and IL-17 expressing cells. Inversely, intestinal lymphocyte-derived IL-10

mRNA expression is significantly increased in Treg-cotransferred *Rag1*^{-/-} mice. T-cell activation requires the expression of DCs' costimulatory molecules.⁽⁴²⁾

IL-10-increased levels may compromise DCs' costimulation, switching their phenotype and decreasing effector T-cell activation. In fact, CD80 and CD86 have shown to be down-regulated in DCs from norfloxacin-treated CCl₄ mice only after restoration of the Treg cell population.⁽²⁹⁾ The evidence that IL-10-deficient cirrhotic mice show increased permeability to bacterial products such as LPS or DNA⁽²⁸⁾ also supports the implication of Treg cells as relevant IL-10-producing cells⁽⁴³⁾ in providing the balanced tissue environment to prevent BT episodes in cirrhosis. Whether Tregs can modulate other immune cell populations remains to be addressed in this context and may represent a limitation in this study.

Treg cells stand central to the interplay between the host and microbial milieu.⁽⁴⁴⁾ Cirrhosis progression is associated with intestinal bacterial overgrowth⁽⁴⁵⁾ and the gut microbiota dysbiosis toward an increment of Proteobacteria and the reduction of SCFA-producing species.^(32,34) Accordingly, the concentration of propionic, butyric, and isobutyric acids in cirrhotic *Rag1*^{-/-} mice significantly decreased after the oral challenge with *E. coli*. Treg cells attenuate the SCFA reduction provoked in this condition and contribute to maintain the SCFA receptors FFAR2 and FFAR3 expression in colonic tissue (Fig. 4). Of interest, the concentration of acetic acid was increased after *E. coli* administration. This may likely respond to the fact that acetic acid is a fermentation product of this bacterial species.⁽⁴⁶⁾ The induction of Treg cells by cytokine production in response to SCFAs is well established.^(30,44,47) Butyrate and propionate have also been described to promote Treg differentiation. Specifically, butyrate induces repression of LPS-response genes in DCs and confers them with a higher capacity to promote Treg cell polarization.⁽²⁰⁾ In contrast, Treg cells have also been described to shape the intestinal microbial community, promoting the diversification of commensal microbiota and the generation of immunoglobulin A.^(44,48) Our results suggest that Treg cells are important contributors to this regulatory loop, restricting the loss of SCFAs in experimental cirrhosis and supporting the mutual regulation between microbiota and the immune system in the gut.

In summary, increased gut permeability to bacterial antigens in cirrhosis is lessened by Treg cells, which are associated with the expression of TJ proteins in colonic tissue. The improvement of the intercellular

sealing likely reduces paracellular translocation of antigenic bacterial products. Treg cell participation in controlling local inflammatory differentiation and bacterial-derived metabolic products such as SCFAs, which help provide homeostatic conditions, fosters the value of this population in restricting BT episodes in cirrhosis. More studies are needed to establish whether restoring the number of Tregs may have any advantages such as fewer BT episodes or less portal hypertension and liver failure in cirrhosis.

Authors' contributions: O.J., P.P., I.G.H., E.C.: experimental work, data acquisition, and manuscript writing; R.G.V., A.M., F.T.: short-chain fatty acids measurements; P.Z., J.M.G.N.: statistical analysis and interpretation of results; F.T.: flow cytometry analysis; and R.F.: study concept and design, manuscript writing.

REFERENCES

- 1) Fernandez J, Gustot T. Management of bacterial infections in cirrhosis. *J Hepatol* 2012;56(Suppl 1):S1-S12.
- 2) Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, et al. Bacterial infections in cirrhosis. A position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol* 2014;60:1310-1324.
- 3) Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60:197-209.
- 4) Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433.
- 5) Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut* 2012;61:297-310.
- 6) Zapater P, Frances R, Gonzalez-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008;48:1924-1931.
- 7) Bellot P, Garcia-Pagan JC, Frances R, Abalde JG, Navasa M, Perez-Mateo M, et al. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2010;52:2044-2052.
- 8) Shimizu T, Tani T, Hanasawa K, Endo Y, Kodama M. The role of bacterial translocation on neutrophil activation during hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2001;16:59-63.
- 9) Garcia Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841.
- 10) Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385-1396.
- 11) Campillo B, Pernet P, Bories PN, Richardet JP, Devanlay M, Aussel C. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:755-759.
- 12) Zuckerman MJ, Menzies IS, Ho H, Gregory GG, Casner NA, Crane RS, et al. Assessment of intestinal permeability and

absorption in cirrhotic patients with ascites using combined sugar probes. *Dig Dis Sci* 2004;49:621-626.

- 13) Norman K, Pirlich M, Schulzke JD, Smoliner C, Lochs H, Valentini L, et al. Increased intestinal permeability in malnourished patients with liver cirrhosis. *Eur J Clin Nutr* 2012;66:1116-1119.
- 14) Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, Cano R, Moreu R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008;47:978-985.
- 15) Caro E, Frances R, Zapater P, Pascual S, Bellot P, Such J. Grade of soluble inflammatory response is mainly affected by circulating bacterial DNA concentrations in cirrhosis. *Liver Int* 2016;36:1473-1480.
- 16) Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* 2010;5:119-144.
- 17) Schumann A, Nutten S, Donnicola D, Comelli EM, Mansourian R, Cherbut C, et al. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics* 2005;23:235-245.
- 18) Kansagra K, Stoll B, Rognerud C, Niinikoski H, Ou CN, Harvey R, et al. Total parenteral nutrition adversely affects gut barrier function in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1162-G1170.
- 19) Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci* 2012;57:3126-3135.
- 20) Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013;504:451-455.
- 21) Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 2009;461:1282-1286.
- 22) Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* 2013;145:396-406.e10.
- 23) Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190.
- 24) Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538-1543.
- 25) Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, et al. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 2003;19:877-889.
- 26) Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4676-4680.
- 27) Gomez-Hurtado I, Zapater P, Bellot P, Pascual S, Perez-Mateo M, Such J, et al. Interleukin-10-mediated heme oxygenase 1-induced underlying mechanism in inflammatory down-regulation by norfloxacin in cirrhosis. *Hepatology* 2011;53:935-944.
- 28) Gomez-Hurtado I, Moratalla A, Moya-Perez A, Peiro G, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, et al. Role of interleukin 10 in norfloxacin prevention of luminal free endotoxin translocation in mice with cirrhosis. *J Hepatol* 2014;61:799-808.
- 29) Juanola O, Gomez-Hurtado I, Zapater P, Moratalla A, Caparros E, Pinero P, et al. Selective intestinal decontamination with

norfloxacin enhances a regulatory T cell-mediated inflammatory control mechanism in cirrhosis. *Liver Int* 2016;36:1811-1820.

- 30) Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;341:569-573.
- 31) Garcia-Villalba R, Gimenez-Bastida JA, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA, Carlos Espin J, Larrosa M. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *J Sep Sci* 2012;35:1906-1913.
- 32) Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, Zapater P, Gutierrez A, Perez-Mateo M, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl4-induced fibrosis. *PLoS One* 2011;6:e23037.
- 33) Ubeda M, Lario M, Munoz L, Diaz D, Borrero MJ, Garcia-Bermejo L, et al. Systemic inflammation in absence of gut bacterial translocation in C57BL/6 mice with cirrhosis. *Gut* 2013;62:330-331.
- 34) Ubeda M, Lario M, Munoz L, Borrero MJ, Rodriguez-Serrano M, Sanchez-Diaz AM, et al. Obeticholic acid reduces bacterial translocation and inhibits intestinal inflammation in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2016;64:1049-1057.
- 35) Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, Brenner DA, Schnabl B. Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012;143:1330-1340.e1.
- 36) Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest* 2012;42:439-446.
- 37) Sanchez E, Nieto JC, Boulosa A, Vidal S, Sancho FJ, Rossi G, Sancho-Bru P, et al. VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Liver Int* 2015;35:735-745.
- 38) Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Moya A, Peiro G, Zapater P, et al. Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2014;34:850-858.
- 39) Konieczna P, Groeger D, Ziegler M, Frei R, Ferstl R, Shanahan F, et al. *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* 2012;61:354-366.
- 40) Munoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledo L, Monserrat J, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:411-419.
- 41) Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Marechal R, Degre D, Demetter P, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646-657.
- 42) Bayry J, Triebel F, Kaveri SV, Tough DF. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178:4184-4193.
- 43) Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212:28-50.
- 44) Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol* 2015;36:3-12.
- 45) Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997;26:1372-1378.

- 46) Kirkpatrick C, Maurer LM, Oyelakin NE, Yoncheva YN, Maurer R, Slonczewski JL. Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001;183:6466-6477.
- 47) Zhang M, Zhou Q, Dorfman RG, Huang X, Fan T, Zhang H, et al. Butyrate inhibits interleukin-17 and generates Tregs to ameliorate colorectal colitis in rats. *BMC Gastroenterol* 2016;16:84.
- 48) Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, et al. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection

and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 2014;41:152-165.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1268/supinfo.





DISCUSIÓN
DISCUSSION



Los trabajos presentados en esta tesis doctoral muestran la relevancia de la población de células Treg en los mecanismos involucrados en el desarrollo de TB patogénica durante la cirrosis. Las Treg modulan la respuesta inflamatoria, aumentan la integridad de la barrera intestinal y están involucradas en el mantenimiento de los niveles de los AGCCs más representativos procedentes de la microbiota. Dado que el Nflx se asocia con un aumento en la población de este tipo celular, la activación de las Treg supone un mecanismo potencial de la homeostasis inflamatoria inducida por Nflx en el ámbito de la cirrosis.

Las infecciones bacterianas son complicaciones comunes en pacientes con cirrosis descompensada y se piensa que ocurren por una alteración en la respuesta inmune del huésped, un incremento en la permeabilidad de la barrera intestinal y por el SBI (16, 23, 262). Estos tres factores favorecen la aparición de TB en cirrosis avanzada, la cual ha sido demostrada en la cirrosis experimental (263, 264) y su prevención debe ser considerada durante la progresión de la enfermedad. De entre las infecciones bacterianas que sufren los pacientes con cirrosis, la PBE es la complicación más frecuente y está producida principalmente por bacterias entéricas aerobias Gram-negativas (7). Por este motivo, se administran antibióticos por vía oral como medida profiláctica para evitar el crecimiento selectivo de la microbiota intestinal de estos pacientes (111). El tratamiento de elección como pauta profiláctica en pacientes con cirrosis con riesgo de sufrir infecciones bacterianas es el Nflx, el cual ha demostrado su eficacia en la prevención de episodios de PBE (102) y una actividad inmunomoduladora a través de la IL-10 (76).

En el primer estudio presentado demostramos que el Nflx fomenta la modulación de la respuesta inflamatoria a través de las Treg en pacientes con cirrosis. Esto lo pudimos comprobar debido a la presencia de un incremento de la población Treg en circulación periférica, su correlación con los niveles séricos de Nflx y la reducción en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en CD4 de pacientes cirróticos sometidos a DIS. Así, los niveles séricos de IL-10 en nuestra serie de pacientes en DIS estaban significativamente incrementados en comparación con pacientes con LA no infectado y

PBE, lo que se correlaciona con el incremento en el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) en sangre periférica de pacientes que reciben Nflx. El incremento en el porcentaje de Tregs mostró una asociación con los niveles de Nflx en el suero de estos pacientes. Por ello, estos datos identifican a las Treg como una población celular relevante en la secreción de IL-10 en pacientes con DIS, respaldando la implicación del Nflx en la disminución de la respuesta proinflamatoria observada previamente en el suero de pacientes con cirrosis (265).

A parte del mecanismo de supresión de la respuesta proinflamatoria ejercido por las Treg que está asociado a la secreción de citocinas antiinflamatorias, como la IL-10, también se ha observado que son capaces de interactuar con CDs inhibiendo su maduración y actividad (237-240) al interactuar con sus moléculas coestimuladoras e impidiendo de esta forma la activación de células T (266). Así, se observó una reducción en los niveles de expresión proteica de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, indispensables en la activación funcional de células T, en CDs de pacientes en DIS de forma dosis-dependiente.

Para poder confirmar la participación de las Treg en la función inmunomoduladora ejercida por el Nflx durante la cirrosis se utilizaron ratones inmunodeficientes Rag1^{-/-}, que carecen de respuesta B y T funcional, a los que se administraron células T vírgenes y células Treg funcionales tras la administración oral de CCl₄ para inducir cirrosis experimental. Utilizando este modelo pudimos observar que el efecto inmunomodulador del Nflx disminuyendo la expresión de moléculas coestimuladoras en CDs y la consecuente reducción en la respuesta proinflamatoria sistémica ocurría tras la reconstitución de la población Treg en ratones cirróticos Rag1^{-/-}. De esta forma, la expresión génica de CD80 y CD86 en CDs de ratones Rag1^{-/-} tratados con Nflx sólo se redujo cuando la población Treg estaba presente (ratones WT y cotransferidos con células T vírgenes y Treg). Puesto que la actuación de las CDs es indispensable en la polarización de la respuesta adaptativa a través de la producción de citocinas (267), quisimos evaluar la producción sistémica de las citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-10. La

administración de Nflx se relacionó con una reducción en los niveles sistémicos de las citocinas proinflamatorias IFN- γ e IL-2, junto con un incremento de la citocina antiinflamatoria IL-10 en los ratones Rag1^{-/-} en los que se recuperó la población Treg, observándose resultados similares a los obtenidos en ratones WT. Estos resultados confirman que la supresión de la respuesta Th1 proinflamatoria ejercida por las Tregs en presencia de Nflx durante la cirrosis experimental podría deberse al incremento en la producción de IL-10, así como gracias al consumo de la IL-2, molécula involucrada en la diferenciación de la célula T a un fenotipo efector (268).

En un estudio anterior pudimos observar que ratones deficientes en IL-10 (IL-10^{-/-}) presentaban una permeabilidad intestinal aumentada y cómo la administración de Nflx se asociaba con un aumento en los marcadores de integridad de la barrera y una disminución en la absorción de la endotoxina luminal en presencia de IL-10 (76). En este primer trabajo también se observó una reducción significativa en la traslocación de ADN_{bact} y LPS a GLMs cuando se administra Nflx a ratones WT y Rag1^{-/-} cotransferidos por células T vírgenes y Treg. La reducción de los episodios de TB asociados a la administración de Nflx podría deberse a un aumento de la integridad de la barrera intestinal en el contexto de una reducción del ambiente inflamatorio asociado a la inducción de la población Treg y la secreción de IL-10.

En esta línea, en el segundo trabajo quisimos estudiar si la reducción en el ambiente inflamatorio inducido por las Treg tiene una implicación en el desarrollo de la TB patológica que ocurre durante la cirrosis. Para ello, utilizamos el mismo modelo de cirrosis experimental que en el primer trabajo y pudimos observar que tras la administración oral de LPS, conjugado a un fluorocromo, los niveles de endotoxina recuperada en sangre de ratones Rag1^{-/-} son inferiores cuando se recupera la población de células Treg y son similares a los observados en ratones WT. De la misma forma, el ratio de traslocación de ADN_{bact} a GLMs se encontraba incrementado en ratones Rag1^{-/-} donde la población de Treg no está presente, pero disminuye significativamente

al cotransferir estos animales con células T vírgenes y Treg a los niveles observados en los ratones WT.

En este trabajo demostramos cómo las células Treg se relacionan con la expresión génica y proteica de TJs en el colon de los ratones Rag1^{-/-} con cirrosis experimental. Como ya hemos visto, la función de estas proteínas es prevenir el paso paracelular de moléculas a lo largo de la barrera intestinal, por lo que el incremento en su expresión podría ser el mecanismo que asocia las Treg con la reducción en la permeabilidad a productos bacterianos. La expresión de estas proteínas está alterada en la cirrosis tanto en pacientes (64, 269) como en modelos experimentales (270) y se ha demostrado un aumento en su expresión en la cirrosis experimental con el uso de cepas probióticas (75, 271), algunas de las cuales estimulan la expresión de células Treg (259). Por ello, es probable que durante la progresión de la cirrosis se genere un ambiente inflamatorio en el que las células T CD4⁺ se diferencian a Th1 (71) y Th17 (220), acompañado de una reducción en la población de células Treg y una expresión disminuida de las proteínas TJ. Esto genera un incremento en la permeabilidad intestinal y favorece la TB en el contexto de la cirrosis.

Las células Treg ejercen un control de la respuesta inflamatoria tras la administración oral de *E. coli* en ratones Rag1^{-/-} cirróticos. La presencia de la población de células Treg en estos animales se asocia con una disminución en el porcentaje de linfocitos intestinales transferidos que producen las citocinas IFN- γ e IL-17 asociadas a las vías Th1 y Th17. Además, la expresión génica de IL-10 en estos linfocitos intestinales aumenta de forma significativa en el grupo de ratones cirróticos Rag1^{-/-} cotransferidos con células T vírgenes y Treg. Estos datos apoyan otros estudios en los que las células Treg han demostrado ser una población relevante producción de IL-10 (242) y parece ser un mecanismo por el que suprimen las respuestas proinflamatorias en este contexto. Esta citocina antiinflamatoria está implicada en la disminución de la capacidad de las CDs para activar células T efectoras (266) y su ausencia se relaciona con un incremento en la permeabilidad a antígenos bacterianos como ADNbact o LPS (76).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que las células Treg intervienen en la interacción entre la microbiota y su huésped a través de los AGCCs (272). Durante la progresión de la cirrosis se produce un SBI y una disbiosis en la microbiota con un incremento de Proteobacterias y una reducción de las especies productoras de AGCCs (159, 204, 273). En este sentido, se observa una reducción de ácido butírico, isobutírico y propiónico y de los receptores de AGCCs, FFAR2 y FFAR3, mientras que el ácido acético aumenta tras el tratamiento oral con *E.coli*. El incremento en el ácido acético podría deberse a que es un producto de la fermentación de esta especie bacteriana (274). Sin embargo, la población Treg restringe esta pérdida de AGCCs en contenido intestinal y atenúa la disminución de la expresión génica en colon de sus receptores, FFAR2 y FFAR3, tras la administración de *E. coli* por vía oral en ratones cirróticos Rag1^{-/-}. La interacción entre AGCCs y células Treg ya ha sido previamente descrita (191, 272, 275), así como que el butirato induce una mayor capacidad de las CD4 para polarizar la diferenciación de células T a Treg (202). Por tanto, nuestros resultados sugieren la implicación de las células Treg en los niveles de AGCCs en contenido intestinal, restringiendo la pérdida de AGCCs y apoyando la regulación mutua existente entre microbiota y el sistema inmune en el intestino.

Desde una perspectiva clínica, los resultados aquí mostrados pueden ofrecer implicaciones interesantes. Dado que las células Treg secretan IL-10 y esta citocina se ha asociado con un incremento en los niveles de presión arterial media en pacientes cirróticos (128), estrategias para promover un incremento en esta subpoblación de linfocitos T podrían ayudar a la mejora del estado hemodinámico de los pacientes con cirrosis. En este sentido, una intervención selectiva en la microbiota intestinal podría ser de interés, ya que numerosos estudios han demostrado la inducción específica de las células Treg asociada a este tratamiento (259, 260, 276, 277). Además, se están realizando ensayos clínicos para su aplicación terapéutica en el tratamiento de trasplante de hígado (NCT02166177, NCT02949492) y enfermedades hepáticas de base autoinmune (NCT03842254, NCT02704338). Estos ensayos se basan en el aislamiento, estimulación *ex vivo* y consecuente infusión de las células Treg autólogas o bien en su estimulación mediante la administración de dosis bajas de IL-2. Sin embargo, las células Treg parecen inducir el desarrollo de tumores al interferir en la función de los linfocitos

T CD8⁺ en pacientes con hepatocarcinoma (257, 278), una de las complicaciones más severas de la cirrosis.

En conclusión, la homeostasis intestinal inducida por las células Treg al modular las respuestas inflamatorias, incrementar la expresión de TJs y controlar los niveles de productos metabólicos de la microbiota como los AGCCs previene los episodios de TB en la cirrosis experimental. La población de células Treg ejerce un papel clave en la actividad inmunomoduladora del Nflx en la cirrosis que se correlaciona con un descenso de la señal coestimuladora de las CDs y un control de la activación de la célula T. Además, esta población celular es capaz de establecer un control de la respuesta inflamatoria sobre linfocitos intestinales al limitar su diferenciación Th1/Th17 en respuesta a *E. coli* administrado por vía oral en un mecanismo IL-10 dependiente, así como mantener los niveles de AGCCs en estas condiciones favoreciendo una interacción balanceada entre microbiota y su huésped. La inducción de un contexto de homeostasis intestinal durante la cirrosis experimental se asocia con un incremento en la expresión de proteínas TJ en colon explicando la reducción en los episodios de TB observados en ratones inmunodeficientes Rag1^{-/-} con cirrosis donde se ha restaurado la población celular Treg.



CONCLUSIONES
CONCLUSIONS



-Las células T reguladoras aumentan su expresión en presencia de norfloxacin y juegan un papel clave en la actividad inmunomoduladora ejercida por esta quinolona al disminuir la señalización coestimuladora de células dendríticas y controlar la activación de células T en un modelo experimental de cirrosis.

-Las células T reguladoras contribuyen a la recuperación de la expresión de proteínas *tight junction* en colon, lo que se asocia con una disminución en la permeabilidad a antígenos bacterianos en cirrosis.

-Las células T reguladoras modulan la diferenciación inflamatoria local de células T y mantienen los niveles de ácidos grasos de cadena corta en respuesta a *Escherichia coli*.

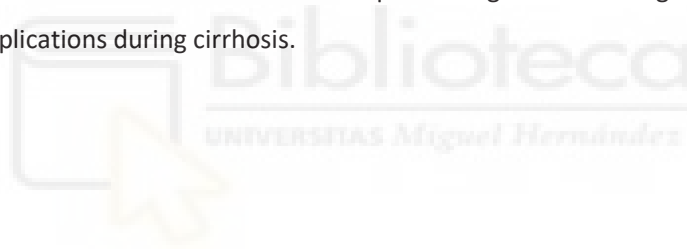
-Las células T reguladoras constituyen, por tanto, una población tolerogénica clave en la restauración de la homeostasis intestinal y la prevención de complicaciones derivadas de la traslocación de antígenos bacterianos en la cirrosis.

-Regulatory T cells are expanded in the presence of norfloxacin and play a key role in its quinolone immunomodulatory activity, downregulating dendritic cells co-stimulatory signalling and controlling T cell activation in experimental cirrhosis.

-Regulatory T cells contribute to the recovery of tight junction proteins expression in the colonic tissue, favouring a decreased gut permeability to bacterial antigens in cirrhosis.

-Regulatory T cells modulate local inflammatory T cell differentiation and maintain short chain fatty acids concentrations in response to *Escherichia coli*.

-These results foster the value of regulatory T cells as a key population in providing a homeostatic host-microbiota interaction and preventing bacterial antigen translocation related complications during cirrhosis.





BIBLIOGRAFÍA
REFERENCES



1. Fernández J, Gustot T. Management of bacterial infections in cirrhosis. *J Hepatol* 2012;56 Suppl 1:S1-12.
2. Fernández J, Navasa M, Gómez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodés J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35:140-148.
3. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, Burroughs AK. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246-1256, 1256.e1241-1245.
4. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, Stadlbauer V, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol* 2014;60:1310-1324.
5. Wyke RJ. Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 1987;28:623-641.
6. Gustot T, Durand F, Lebrec D, Vincent JL, Moreau R. Severe sepsis in cirrhosis. *Hepatology* 2009;50:2022-2033.
7. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998;27:669-674; quiz 675-666.
8. Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:353-372.
9. Deschênes M, Villeneuve JP. Risk factors for the development of bacterial infections in hospitalized patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2193-2197.
10. Greig PD, Langer B, Blendis LM, Taylor BR, Glynn MF. Complications after peritoneovenous shunting for ascites. *Am J Surg* 1980;139:125-131.
11. Shrake PD, Troiano F, Rex DK. Peritonitis following colonoscopy in a cirrhotic with ascites. *Am J Gastroenterol* 1989;84:453-454.
12. Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut* 2012;61:297-310.
13. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336:1268-1273.
14. Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1204-1208.
15. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. Role of the microbiome in human development. *Gut* 2019;68:1108-1114.
16. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60:197-209.
17. 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;23:403-411.
18. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433.
19. González Alonso R, González García M, Albillos Martínez A. [Physiopathology of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis]. *Gastroenterol Hepatol* 2007;30:78-84.
20. Such J, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodríguez-Valera F, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002;36:135-141.

21. Albillos A, de la Hera A, González M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-217.
22. Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008;48:1924-1931.
23. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997;26:1372-1378.
24. Llovet JM, Bartolí R, Planas R, Cabré E, Jimenez M, Urban A, Ojanguren I, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994;35:1648-1652.
25. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792-796.
26. Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:1719-1724.
27. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841.
28. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taurá P, Fuster J, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-37.
29. Aranow JS, Fink MP. Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. *Br J Anaesth* 1996;77:71-81.
30. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1765:189-222.
31. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:319-330.
32. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003;72:137-174.
33. Ding JW, Andersson R, Soltész V, Willén R, Bengmark S. The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* 1993;25:11-19.
34. Lorenzo-Zúñiga V, Bartolí R, Planas R, Hofmann AF, Viñado B, Hagey LR, Hernández JM, et al. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 2003;37:551-557.
35. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000;1:113-118.
36. Ogle CK, Noel JG, Guo X, Wells DA, Valente JF, Ogle JD, Alexander JW. The ability of endotoxin-stimulated enterocytes to produce bactericidal factors. *Crit Care Med* 2002;30:428-434.
37. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20858-20863.
38. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006;313:1126-1130.
39. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:141-153.
40. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:799-809.

41. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C1213-1228.
42. McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992;10:75-88.
43. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2013;33:31-39.
44. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996;14:275-300.
45. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-341.
46. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675-680.
47. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361-367.
48. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 2009;462:226-230.
49. Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 1994;62:2874-2884.
50. Kirkland D, Benson A, Mirpuri J, Pifer R, Hou B, DeFranco AL, Yarovinsky F. B cell-intrinsic MyD88 signaling prevents the lethal dissemination of commensal bacteria during colonic damage. *Immunity* 2012;36:228-238.
51. Ponziani FR, Zocco MA, Cerrito L, Gasbarrini A, Pompili M. Bacterial translocation in patients with liver cirrhosis: physiology, clinical consequences, and practical implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;12:641-656.
52. Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, Cahenzli J, et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 2010;328:1705-1709.
53. Gao B. Basic liver immunology. *Cell Mol Immunol* 2016;13:265-266.
54. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016;535:85-93.
55. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-1638.
56. Consortium HMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-214.
57. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837-848.
58. Yurist-Doutsch S, Arrieta MC, Vogt SL, Finlay BB. Gastrointestinal microbiota-mediated control of enteric pathogens. *Annu Rev Genet* 2014;48:361-382.
59. Sassone-Corsi M, Raffatellu M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol* 2015;194:4081-4087.
60. Willing BP, Vacharaksa A, Croxen M, Thanachayanont T, Finlay BB. Altering host resistance to infections through microbial transplantation. *PLoS One* 2011;6:e26988.
61. Gómez-Hurtado I, Such J, Francés R. Microbiome and bacterial translocation in cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol* 2016;39:687-696.
62. Campillo B, Pernet P, Bories PN, Richardet JP, Devanlay M, Aussel C. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:755-759.
63. Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, Girona E, et al. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1482-1486.

64. Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Solá-Vera J, et al. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:371-376.
65. ASTALDI G, STROSSELLI E. Peroral biopsy of the intestinal mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J Dig Dis* 1960;5:603-612.
66. Llovet JM, Bartolí R, Planas R. [Intestinal bacterial translocation]. *Gastroenterol Hepatol* 1996;19:374-382.
67. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Höllwarth ME. Allopurinol reduces bacterial translocation, intestinal mucosal lipid peroxidation, and neutrophil-derived myeloperoxidase activity in chronic portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats. *Pediatr Res* 1996;40:422-428.
68. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Höllwarth ME. The effect of vitamin C and vitamin E supplementation on bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common-bile-duct-ligated rats. *Eur Surg Res* 1997;29:187-194.
69. Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 1998;63:683-691.
70. Genescà J, Martí R, Rojo F, Campos F, Peribáñez V, González A, Castells L, et al. Increased tumour necrosis factor alpha production in mesenteric lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut* 2003;52:1054-1059.
71. Muñoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledó L, Monserrat J, Sanz E, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:411-419.
72. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology* 2011;141:1323-1333.
73. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993;18:1139-1143.
74. Francés R, Chiva M, Sánchez E, González-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, et al. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007;46:797-803.
75. Moratalla A, Gómez-Hurtado I, Santacruz A, Moya Á, Peiró G, Zapater P, González-Navajas JM, et al. Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2014;34:850-858.
76. Gómez-Hurtado I, Moratalla A, Moya-Pérez Á, Peiró G, Zapater P, González-Navajas JM, Giménez P, et al. Role of interleukin 10 in norfloxacin prevention of luminal free endotoxin translocation in mice with cirrhosis. *J Hepatol* 2014;61:799-808.
77. Bellot P, García-Pagán JC, Francés R, Abraldes JG, Navasa M, Pérez-Mateo M, Such J, et al. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2010;52:2044-2052.
78. Lin RS, Lee FY, Lee SD, Tsai YT, Lin HC, Lu RH, Hsu WC, et al. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1995;22:165-172.
79. Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385-1396.
80. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Stärkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96-105.
81. Teltschik Z, Wiest R, Beisner J, Nuding S, Hofmann C, Schoelmerich J, Bevens CL, et al. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology* 2012;55:1154-1163.
82. 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;55:709-719.

83. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol* 2012;590:447-458.
84. Abdul-Cader MS, Amarasinghe A, Abdul-Careem MF. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. *Arch Virol* 2016;161:2075-2086.
85. Piñero P, Juanola O, Caparrós E, Zapater P, Giménez P, González-Navajas JM, Such J, et al. Toll-like receptor polymorphisms compromise the inflammatory response against bacterial antigen translocation in cirrhosis. *Sci Rep* 2017;7:46425.
86. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010;10:826-837.
87. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodríguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988;6:80-84.
88. Schäfer C, Parlesak A, Schütt C, Bode JC, Bode C. Concentrations of lipopolysaccharide-binding protein, bactericidal/permeability-increasing protein, soluble CD14 and plasma lipids in relation to endotoxaemia in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* 2002;37:81-86.
89. Yousif-Kadaru AG, Rajkovic IA, Wyke RJ, Williams R. Defects in serum attractant activity in different types of chronic liver disease. *Gut* 1984;25:79-84.
90. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Píera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984;4:53-58.
91. ROGERS DE. Host mechanisms which act to remove bacteria from the blood stream. *Bacteriol Rev* 1960;24:50-66.
92. Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, Angeli P, Sacerdoti D, Amodio P, Gatta A. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994;19:628-634.
93. Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:727-738.
94. Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis* 2007;27:339-350.
95. KERR DN, PEARSON DT, READ AE. INFECTION OF ASCITIC FLUID IN PATIENTS WITH HEPATIC CIRRHOSIS. *Gut* 1963;4:394-398.
96. CONN HO. SPONTANEOUS PERITONITIS AND BACTEREMIA IN LAENNEC'S CIRRHOSIS CAUSED BY ENTERIC ORGANISMS. A RELATIVELY COMMON BUT RARELY RECOGNIZED SYNDROME. *Ann Intern Med* 1964;60:568-580.
97. Dever JB, Sheikh MY. Review article: spontaneous bacterial peritonitis--bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:1116-1131.
98. Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *International Ascites Club. J Hepatol* 2000;32:142-153.
99. Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1984;4:1209-1211.
100. Terg R, Levi D, Lopez P, Rafaelli C, Rojter S, Abecasis R, Villamil F, et al. Analysis of clinical course and prognosis of culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and neutrocytic ascites. Evidence of the same disease. *Dig Dis Sci* 1992;37:1499-1504.
101. Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008;28:26-42.
102. Ginés P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forné M, et al. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1990;12:716-724.

103. Garcia-Tsao G. Current Management of the Complications of Cirrhosis and Portal Hypertension: Variceal Hemorrhage, Ascites, and Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Dig Dis* 2016;34:382-386.
104. Liver EAftSot. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:397-417.
105. Garcia-Tsao G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:257-275.
106. Barnes PF, Arevalo C, Chan LS, Wong SF, Reynolds TB. A prospective evaluation of bacteremic patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1988;8:1099-1103.
107. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18:353-358.
108. Soriano G, Guarner C, Tomás A, Villanueva C, Torras X, González D, Sainz S, et al. Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1992;103:1267-1272.
109. Novella M, Solà R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, Coll S, et al. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997;25:532-536.
110. Grangé JD, Roulot D, Pelletier G, Pariente EA, Denis J, Ink O, Blanc P, et al. Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial. *J Hepatol* 1998;29:430-436.
111. Soriano G, Guarner C, Teixidó M, Such J, Barrios J, Enríquez J, Vilardell F. Selective intestinal decontamination prevents spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:477-481.
112. Rolachon A, Cordier L, Bacq Y, Noursbaum JB, Franza A, Paris JC, Fratte S, et al. Ciprofloxacin and long-term prevention of spontaneous bacterial peritonitis: results of a prospective controlled trial. *Hepatology* 1995;22:1171-1174.
113. Singh N, Gayowski T, Yu VL, Wagener MM. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 1995;122:595-598.
114. Llovet JM, Rodríguez-Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa M, Menacho M, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *J Hepatol* 1997;26:88-95.
115. Grange JD, Amiot X, Grange V, Gutmann L, Biour M, Bodin F, Poupon R. Amoxicillin-clavulanic acid therapy of spontaneous bacterial peritonitis: a prospective study of twenty-seven cases in cirrhotic patients. *Hepatology* 1990;11:360-364.
116. LESHER GY, FROELICH EJ, GRUETT MD, BAILEY JH, BRUNDAGE RP. 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *J Med Pharm Chem* 1962;91:1063-1065.
117. Goldstein EJ. Norfloxacin, a fluoroquinolone antibacterial agent. Classification, mechanism of action, and in vitro activity. *Am J Med* 1987;82:3-17.
118. Ito A, Hirai K, Inoue M, Koga H, Suzue S, Irikura T, Mitsuhashi S. In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:103-108.
119. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377-392.
120. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:504-508.
121. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001;70:369-413.
122. Shen LL, Kohlbrenner WE, Weigl D, Baranowski J. Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. Appearance of unique norfloxacin binding sites in enzyme-DNA complexes. *J Biol Chem* 1989;264:2973-2978.

123. Muñoz R, De La Campa AG. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2252-2257.
124. Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2321-2326.
125. Fernández J, Navasa M, Planas R, Montoliu S, Monfort D, Soriano G, Vila C, et al. Primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis delays hepatorenal syndrome and improves survival in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:818-824.
126. Zapater P, Caño R, Llanos L, Ruiz-Alcaraz AJ, Pascual S, Barquero C, Moreu R, et al. Norfloxacin modulates the inflammatory response and directly affects neutrophils in patients with decompensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:1669-1679.e1661.
127. Such J, Guarner C, Soriano G, Teixidó M, Barrios J, Tena F, Méndez C, et al. Selective intestinal decontamination increases serum and ascitic fluid C3 levels in cirrhosis. *Hepatology* 1990;12:1175-1178.
128. Gómez-Hurtado I, Zapater P, Bellot P, Pascual S, Pérez-Mateo M, Such J, Francés R. Interleukin-10-mediated heme oxygenase 1-induced underlying mechanism in inflammatory down-regulation by norfloxacin in cirrhosis. *Hepatology* 2011;53:935-944.
129. Fernández J, Acevedo J, Castro M, García O, de Lope CR, Roca D, Pavesi M, et al. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 2012;55:1551-1561.
130. Tandon P, Delisle A, Topal JE, Garcia-Tsao G. High prevalence of antibiotic-resistant bacterial infections among patients with cirrhosis at a US liver center. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:1291-1298.
131. Merli M, Lucidi C, Giannelli V, Giusto M, Riggio O, Falcone M, Ridola L, et al. Cirrhotic patients are at risk for health care-associated bacterial infections. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:979-985.
132. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:736-755.
133. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1647-1650.
134. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:215-223.
135. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1996;178:5853-5859.
136. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996;4:430-435.
137. Ross JM, Needham JR. Genital flora during pregnancy and colonization of the newborn. *J R Soc Med* 1980;73:105-110.
138. Rotimi VO, Duerden BI. The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol* 1981;14:51-62.
139. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003;91:48-55.
140. Nobili V, Bedogni G, Alisi A, Pietrobattista A, Alterio A, Tiribelli C, Agostoni C. A protective effect of breastfeeding on the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Dis Child* 2009;94:801-805.
141. Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews PJ, Morgan ML, McKee C, Soeda J, et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J Hepatol* 2010;52:913-920.

142. Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 2014;158:705-721.
143. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 2013;57:601-609.
144. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012;13:260-270.
145. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012;489:242-249.
146. Norman JM, Handley SA, Virgin HW. Kingdom-agnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities. *Gastroenterology* 2014;146:1459-1469.
147. Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010;466:334-338.
148. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-519.
149. Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol* 2010;21:149-156.
150. Bäckhed F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann Nutr Metab* 2011;58 Suppl 2:44-52.
151. Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Lei D, Wang Y, Zhu B, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2011;54:562-572.
152. De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Mingarelli E, et al. Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. *Hepatology* 2014;59:1738-1749.
153. Quigley EM, Stanton C, Murphy EF. The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications. *J Hepatol* 2013;58:1020-1027.
154. Acharya C, Bajaj JS. Gut Microbiota and Complications of Liver Disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2017;46:155-169.
155. Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2010;28:737-744.
156. Terjung B, Spengler U. Atypical p-ANCA in PSC and AIH: a hint toward a "leaky gut"? *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36:40-51.
157. Abu-Shanab A, Quigley EM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:691-701.
158. Ponziani FR, Gerardi V, Pecere S, D'Aversa F, Lopetuso L, Zocco MA, Pompili M, et al. Effect of rifaximin on gut microbiota composition in advanced liver disease and its complications. *World J Gastroenterol* 2015;21:12322-12333.
159. Gómez-Hurtado I, Santacruz A, Peiró G, Zapater P, Gutiérrez A, Pérez-Mateo M, Sanz Y, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl4-induced fibrosis. *PLoS One* 2011;6:e23037.
160. Tuomisto S, Pessi T, Collin P, Vuento R, Aittoniemi J, Karhunen PJ. Changes in gut bacterial populations and their translocation into liver and ascites in alcoholic liver cirrhotics. *BMC Gastroenterol* 2014;14:40.
161. Zhang Z, Zhai H, Geng J, Yu R, Ren H, Fan H, Shi P. Large-scale survey of gut microbiota associated with MHE Via 16S rRNA-based pyrosequencing. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1601-1611.
162. Bajaj JS, Betrapally NS, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, White MB, Unser A, et al. Salivary microbiota reflects changes in gut microbiota in cirrhosis with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2015;62:1260-1271.

163. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, Guo J, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 2014;513:59-64.
164. Lang S, Duan Y, Liu J, Torralba MG, Kuelbs C, Ventura-Cots M, Abraldes JG, et al. Intestinal fungal dysbiosis and systemic immune response to fungi in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2019.
165. Corazza GR, Menozzi MG, Strocchi A, Rasciti L, Vaira D, Lecchini R, Avanzini P, et al. The diagnosis of small bowel bacterial overgrowth. Reliability of jejunal culture and inadequacy of breath hydrogen testing. *Gastroenterology* 1990;98:302-309.
166. Chesta J, Silva M, Thompson L, del Canto E, Defilippi C. [Bacterial overgrowth in small intestine in patients with liver cirrhosis]. *Rev Med Chil* 1991;119:626-632.
167. Bauer TM, Steinbrückner B, Brinkmann FE, Ditzgen AK, Schwacha H, Aponte JJ, Pelz K, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2962-2967.
168. Bauer TM, Schwacha H, Steinbrückner B, Brinkmann FE, Ditzgen AK, Aponte JJ, Pelz K, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2364-2370.
169. Pardo A, Bartolí R, Lorenzo-Zúñiga V, Planas R, Viñado B, Riba J, Cabré E, et al. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:858-863.
170. Morencos FC, de las Heras Castaño G, Martín Ramos L, López Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995;40:1252-1256.
171. Yang CY, Chang CS, Chen GH. Small-intestinal bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis, diagnosed with glucose H₂ or CH₄ breath tests. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:867-871.
172. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998;28:1187-1190.
173. Chesta J, Defilippi C. Abnormalities in proximal small bowel motility in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:828-832.
174. Sánchez E, Casafont F, Guerra A, de Benito I, Pons-Romero F. Role of intestinal bacterial overgrowth and intestinal motility in bacterial translocation in experimental cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:805-814.
175. Thalheimer U, De Iorio F, Capra F, del Mar Lleo M, Zuliani V, Ghidini V, Tafi MC, et al. Altered intestinal function precedes the appearance of bacterial DNA in serum and ascites in patients with cirrhosis: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:1228-1234.
176. Jun DW, Kim KT, Lee OY, Chae JD, Son BK, Kim SH, Jo YJ, et al. Association between small intestinal bacterial overgrowth and peripheral bacterial DNA in cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2010;55:1465-1471.
177. Lichtman SN, Sartor RB, Keku J, Schwab JH. Hepatic inflammation in rats with experimental small intestinal bacterial overgrowth. *Gastroenterology* 1990;98:414-423.
178. Steffen EK, Berg RD. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect Immun* 1983;39:1252-1259.
179. Rimola A, Bory F, Teres J, Perez-Ayuso RM, Arroyo V, Rodes J. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1985;5:463-467.
180. Bajaj JS, Ridlon JM, Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, Sikaroodi M, et al. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G168-175.
181. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, Noble NA, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol* 2014;60:940-947.

182. Bajaj JS, Betrapally NS, Hylemon PB, Thacker LR, Daita K, Kang DJ, White MB, et al. Gut Microbiota Alterations can predict Hospitalizations in Cirrhosis Independent of Diabetes Mellitus. *Sci Rep* 2015;5:18559.
183. Chen Y, Guo J, Qian G, Fang D, Shi D, Guo L, Li L. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:1429-1437.
184. Wiest R, Albillos A, Trauner M, Bajaj JS, Jalan R. Targeting the gut-liver axis in liver disease. *J Hepatol* 2017;67:1084-1103.
185. Schumann A, Nutten S, Donnicola D, Comelli EM, Mansourian R, Cherbut C, Cortesy-Theulaz I, et al. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics* 2005;23:235-245.
186. Kansagra K, Stoll B, Rognerud C, Niinikoski H, Ou CN, Harvey R, Burrin D. Total parenteral nutrition adversely affects gut barrier function in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1162-1170.
187. Bain MD, Jones M, Borriello SP, Reed PJ, Tracey BM, Chalmers RA, Stacey TE. Contribution of gut bacterial metabolism to human metabolic disease. *Lancet* 1988;1:1078-1079.
188. Usami M, Miyoshi M, Yamashita H. Gut microbiota and host metabolism in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2015;21:11597-11608.
189. Marques FZ, Mackay CR, Kaye DM. Beyond gut feelings: how the gut microbiota regulates blood pressure. *Nat Rev Cardiol* 2018;15:20-32.
190. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe* 2015;17:662-671.
191. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;341:569-573.
192. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, Brunet I, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4410-4415.
193. Marques FZ, Nelson E, Chu PY, Horlock D, Fiedler A, Ziemann M, Tan JK, et al. High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive Mice. *Circulation* 2017;135:964-977.
194. Miyauchi S, Hirasawa A, Ichimura A, Hara T, Tsujimoto G. New frontiers in gut nutrient sensor research: free fatty acid sensing in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* 2010;112:19-24.
195. Ohata A, Usami M, Miyoshi M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition* 2005;21:838-847.
196. Miyoshi M, Usami M, Ohata A. Short-chain fatty acids and trichostatin A alter tight junction permeability in human umbilical vein endothelial cells. *Nutrition* 2008;24:1189-1198.
197. Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci* 2012;57:3126-3135.
198. Willemsen LE, Koetsier MA, van Deventer SJ, van Tol EA. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* 2003;52:1442-1447.
199. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 2009;461:1282-1286.
200. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:2247-2252.

201. Schulthess J, Pandey S, Capitani M, Rue-Albrecht KC, Arnold I, Franchini F, Chomka A, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* 2019;50:432-445.e437.
202. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013;504:451-455.
203. Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes* 2014;5:202-207.
204. Jin M, Kalainy S, Baskota N, Chiang D, Deehan EC, McDougall C, Tandon P, et al. Faecal microbiota from patients with cirrhosis has a low capacity to ferment non-digestible carbohydrates into short-chain fatty acids. *Liver Int* 2019;39:1437-1447.
205. Juanola O, Ferrusquía-Acosta J, García-Villalba R, Zapater P, Magaz M, Marín A, Olivás P, et al. Circulating levels of butyrate are inversely related to portal hypertension, endotoxemia, and systemic inflammation in patients with cirrhosis. *FASEB J* 2019:fj201901327R.
206. Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:232-236.
207. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 1995;3:149-154.
208. Son G, Kremer M, Hines IN. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol Res Pract* 2010;2010.
209. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 2010;10:753-766.
210. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013;14:996-1006.
211. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008;47:729-736.
212. Albillos A, Hera Ad Ael, Reyes E, Monserrat J, Muñoz L, Nieto M, Prieto A, et al. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-631.
213. Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CE, Roos L, Slavik T, Stivaktas PI, Nieuwoudt M, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol* 2013;58:1125-1132.
214. Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell Mol Immunol* 2016;13:316-327.
215. Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Francés R, Shah N, Mookerjee RP, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:574-581.
216. Schierwagen R, Alvarez-Silva C, Madsen MSA, Kolbe CC, Meyer C, Thomas D, Uschner FE, et al. Circulating microbiome in blood of different circulatory compartments. *Gut* 2018.
217. Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* 2012;143:1158-1172.
218. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:433-439.
219. Tazi KA, Quioc JJ, Saada V, Bezeaud A, Lebrec D, Moreau R. Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol* 2006;45:280-289.
220. Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P, de Nadai P, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646-657.

221. Chackelevicius CM, Gambaro SE, Tiribelli C, Rosso N. Th17 involvement in nonalcoholic fatty liver disease progression to non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2016;22:9096-9103.
222. Girón JA, Alvarez-Mon M, Menéndez-Caro JL, Abreu L, Albillos A, Manzano L, Durántez A. Increased spontaneous and lymphokine-conditioned IgA and IgG synthesis by B cells from alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1992;16:664-670.
223. Deviere J, Content J, Denys C, Vandenbussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E. High interleukin-6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. *Clin Exp Immunol* 1989;77:221-225.
224. Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, Kogan S, Brenner I, Casola S, Shlomchik MJ, et al. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest* 2005;115:3072-3082.
225. Thapa M, Chinnadurai R, Velazquez VM, Tedesco D, Elrod E, Han JH, Sharma P, et al. Liver fibrosis occurs through dysregulation of MyD88-dependent innate B-cell activity. *Hepatology* 2015;61:2067-2079.
226. Girón-González JA, Martínez-Sierra C, Rodríguez-Ramos C, Macías MA, Rendón P, Díaz F, Fernández-Gutiérrez C, et al. Implication of inflammation-related cytokines in the natural history of liver cirrhosis. *Liver Int* 2004;24:437-445.
227. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-274.
228. Eriksson AS, Gretzer C, Wallerstedt S. Elevation of cytokines in peritoneal fluid and blood in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2004;51:505-509.
229. 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;104:1223-1233.
230. Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, Mani AR, et al. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2007;45:1517-1526.
231. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:1257-1266.
232. Kerfoot SM, D'Mello C, Nguyen H, Ajuebor MN, Kubes P, Le T, Swain MG. TNF-alpha-secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice. *Hepatology* 2006;43:154-162.
233. Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, Dunn KW, El-Achkar TM, Plotkin Z, Sandoval RM, et al. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1505-1516.
234. Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, Yende S, Kong L, Carter M, Angus DC, et al. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int* 2010;77:527-535.
235. Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum JA. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock* 2014;41:3-11.
236. Martin-Mateos R, Alvarez-Mon M, Albillos A. Dysfunctional Immune Response in Acute-on-Chronic Liver Failure: It Takes Two to Tango. *Front Immunol* 2019;10:973.
237. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190.
238. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538-1543.

239. Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verdaguer J, et al. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 2003;19:877-889.
240. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4676-4680.
241. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
242. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212:28-50.
243. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490-500.
244. Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem* 2010;147:781-792.
245. Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol* 2012;3:178.
246. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005;174:1783-1786.
247. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-1265.
248. Jeffery HC, Braitch MK, Brown S, Oo YH. Clinical Potential of Regulatory T Cell Therapy in Liver Diseases: An Overview and Current Perspectives. *Front Immunol* 2016;7:334.
249. Almeida J, Polvorosa MA, Gonzalez-Quintela A, Marcos M, Pastor I, Hernandez Cerceño ML, Orfao A, et al. Decreased peripheral blood CD4+/CD25+ regulatory T cells in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:1361-1369.
250. Rau M, Schilling AK, Meertens J, Hering I, Weiss J, Jurowich C, Kudlich T, et al. Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver. *J Immunol* 2016;196:97-105.
251. Rong G, Zhou Y, Xiong Y, Zhou L, Geng H, Jiang T, Zhu Y, et al. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. *Clin Exp Immunol* 2009;156:217-225.
252. Taubert R, Hardtke-Wolenski M, Noyan F, Wilms A, Baumann AK, Schlue J, Olek S, et al. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. *J Hepatol* 2014;61:1106-1114.
253. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, Tsuneyama K, Yang GX, Moritoki Y, Chuang YH, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:729-737.
254. Choi YS, Lee J, Lee HW, Chang DY, Sung PS, Jung MK, Park JY, et al. Liver injury in acute hepatitis A is associated with decreased frequency of regulatory T cells caused by Fas-mediated apoptosis. *Gut* 2015;64:1303-1313.
255. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005;41:771-778.
256. Claassen MA, de Knegt RJ, Janssen HL, Boonstra A. Retention of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in the liver after therapy-induced hepatitis C virus eradication in humans. *J Virol* 2011;85:5323-5330.

257. Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007;132:2328-2339.
258. Muñoz L, José Borrero M, Ubeda M, Lario M, Díaz D, Francés R, Monserrat J, et al. Interaction between intestinal dendritic cells and bacteria translocated from the gut in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2012;56:1861-1869.
259. Konieczna P, Groeger D, Ziegler M, Frei R, Ferstl R, Shanahan F, Quigley EM, et al. Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut* 2012;61:354-366.
260. O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, Murphy S, O'Brien F, Lyons A, Sherlock G, et al. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000112.
261. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:489-493.
262. Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:27-31.
263. Guarner C, González-Navajas JM, Sánchez E, Soriando G, Francés R, Chiva M, Zapater P, et al. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006;44:633-639.
264. Inamura T, Miura S, Tsuzuki Y, Hara Y, Hokari R, Ogawa T, Teramoto K, et al. Alteration of intestinal intraepithelial lymphocytes and increased bacterial translocation in a murine model of cirrhosis. *Immunol Lett* 2003;90:3-11.
265. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreu R, Pascual S, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008;47:978-985.
266. Bayry J, Triebel F, Kaveri SV, Tough DF. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178:4184-4193.
267. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol* 2010;11:647-655.
268. Höfer T, Krichevsky O, Altan-Bonnet G. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Front Immunol* 2012;3:268.
269. Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, Spiliopoulou I, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest* 2012;42:439-446.
270. Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, Brenner DA, Schnabl B. Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012;143:1330-1340.e1331.
271. Sánchez E, Nieto JC, Boullosa A, Vidal S, Sancho FJ, Rossi G, Sancho-Bru P, et al. VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Liver Int* 2015;35:735-745.
272. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol* 2015;36:3-12.
273. Ubeda M, Lario M, Muñoz L, Borrero MJ, Rodríguez-Serrano M, Sánchez-Díaz AM, Del Campo R, et al. Obeticholic acid reduces bacterial translocation and inhibits intestinal inflammation in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2016;64:1049-1057.
274. Kirkpatrick C, Maurer LM, Oyelakin NE, Yoncheva YN, Maurer R, Slonczewski JL. Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of Escherichia coli. *J Bacteriol* 2001;183:6466-6477.

275. Zhang M, Zhou Q, Dorfman RG, Huang X, Fan T, Zhang H, Zhang J, et al. Butyrate inhibits interleukin-17 and generates Tregs to ameliorate colorectal colitis in rats. *BMC Gastroenterol* 2016;16:84.
276. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331:337-341.
277. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ceedia M, Russell WM, et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy* 2010;40:811-819.
278. Oo YH, Sakaguchi S. Regulatory T-cell directed therapies in liver diseases. *J Hepatol* 2013;59:1127-1134.

