



**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Medicina Clínica**  
**Campus Universitario de San Juan**  
**Universidad Miguel Hernández**

**ESTUDIO DE LA TRASLOCACIÓN BACTERIANA Y LA  
PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN DOS MODELOS  
EXPERIMENTALES DE LESIÓN HEPÁTICA EN RATAS**

**Tesis Doctoral:**

**José Miguel Seguí Ripoll**

**Directores de Tesis:**

**Dr. José Such Ronda**

**Dr. Pedro Zapater Hernández**

**Dr. Antonio Compañ Rosique**

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis ha sido madurada (cual pretendido y codiciado vino tinto de cosecha nacional, multivarietal, capa media-alta y color cardenalíco) hasta constituirse en pretendida reserva o gran reserva. Será la catadura de los componentes del Tribunal, a los que agradezco de antemano el generoso esfuerzo realizado, los que dictaminen finalmente la calidad del producto.

En esta andadura han sido claves mis Tutores de Tesis. El **Dr José Such**, quien tuvo la generosidad de ofrecermé este tema de investigación, facilitando y aportando sus profundos y destacados conocimientos del tema, así como su participación activa en la fase de experimentación. El **Dr. Antonio Compañ**, contribuyó de forma directa en todo el proceso experimental y, sin pretenderlo, su presencia fue balsámica. A la **Dra. Asunción Candela**, Adjunta del Servicio de Cirugía, quien al igual que el Dr. Compañ, participó activamente en los experimentos; su inestimable y desinteresada ayuda también la elevan a un rango de calidad superior.

Mi más sincera gratitud a todos y cada uno de los compañeros de viaje, o de recolecta en símil viticultor, que contribuyeron a la elaboración de este trabajo (**Luis Compañ, Juan José Miralles, Marián, Isabel, ...**). Un agradecimiento especial se lo debo a mi Jefe, el **Profesor Jaime Merino**, pues mantenía viva la ilusión por finalizar la tarea emprendida, como finalmente así ha sido.

En ocasiones, las cosas no salen como uno piensa, sino mucho mejor. Destacado merecimiento para el **Dr. Pedro Zapater**. En honor a la verdad, este trabajo se lo debo sobretodo y ante todo al ímpetu, motivación, reflexión, confianza, paciencia, inteligencia y una pléyade de buenas maneras que todos sabemos y conocemos que atesoras, y con qué facilidad y generosidad prestas. Mi más hondo, profundo y sincero reconocimiento en todo el proceso de supervisión. Reitero y subrayo lo antedicho con enorme admiración.

Expresión vívida, de intensa emoción y magnánima gratitud, por la silenciosa e incondicional ayuda, apoyo y constante aliento de mi entorno familiar. A mis padres, **José Seguí Morales y M<sup>a</sup> Rosa Ripoll Doménech**, ejemplos de vida, nobleza, compromiso, esfuerzo, sacrificio, generosidad, discreción y fuente inagotable de valores. Gracias por lo que soy, y por cómo intento ser, fiel a vuestro ejemplo. Gracias por ser mis padres. A mi mujer, **Susan Pérez Fullana**, por todos los sacrificios jamás impostados, dejando jirones de paciencia y comprensión, tu incondicional estímulo y apoyo, porque eres lo mejor que me ha ocurrido, y por estas dos esencias de vida que nos rodean, embargan, impregnan y envuelven, con ellos, las cosas tienen otro significado: Nuestros hijos, **Carmen y Marc**.

**A todos vosotros, por añadir agradables matices a mi existencia diaria.**

**A mis padres, José Seguí Morales y M<sup>a</sup> Rosa Ripoll Doménech**

**A mi mujer, Susan Pérez Fullana**

**A mis hijos, Carmen y Marc**



**Viu, i deixa viure  
(Vive, y deja vivir)  
Fàcil dir-ho, difícil complir-ho  
(Fácil decirlo, difícil cumplirlo)**

**En recuerdo de Rafael Ripoll Bonet. Mi abuelo**

## ÍNDICE TESIS

<b>TÍTULO .....</b>	<b>1</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>2</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1.    Cirrosis hepática e infección bacteriana ....., .....	9
2.    Etiología de la IB en cirróticos .....	11
3.    Principales infecciones bacterianas en la cirrosis .....	11
3.1.    Otras infecciones de causa bacteriana en el cirrótico ..	13
4.    Traslocación bacteriana (TB) .....	14
4.1.    Concepto e introducción al problema .....	14
4.2.    Patogenia de la TB .....	16
5.    Flora bacteriana intestinal .....	19
5.1.    Motilidad intestinal y carga bacteriana intestinal .....	22
5.2.    Sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) .....	23
a)    SBI y TB en cirróticos .....	23
b)    Factores reguladores de la población intestinal bacteriana	25
b.1.    Alteración anatómica y de la permeabilidad intestinal .....	25
b.2.    Disfunción del sistema inmune general .....	27
b.3.    Activación fagocítica del sistema retículoendotelial (SRE).	29
b.4.    Alteración inmune en líquido ascítico (LA) .....	30
6.    Estrés oxidativo y peroxidación lipídica (PL) .....	32
6.1.    Hipertensión portal y PL .....	36
6.2.    Peroxidación Lipídica y Traslocación Bacteriana .....	38
6.3.    Sales biliares .....	40
7.    Modelos experimentales en el estudio de la cirrosis hepática .....	42
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>44</b>

<b>OBJETIVO .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
1. Características de los animales .....	46
2. Fase experimental .....	46
3. Procedimiento prequirúrgico .....	48
4. Protocolo quirúrgico .....	51
4.1. Metodología anestésica .....	51
4.2. Intervención quirúrgica .....	53
a). Primera intervención .....	53
b). Reintervención .....	54
c). Procedimiento quirúrgico único .....	55
5. Determinación de los peróxidos lipídicos en plasma utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	57
5.1. Procedimientos .....	59
A). Hidrólisis y reacción con TBA .....	59
B). Medida HPLC. Lavado y regeneración del sistema y Columna .....	60
C). Lavado de los tubos .....	61
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
1. Animales incluidos en el estudio: Evolución del peso .....	63
2. Peso del Bazo .....	65
3. Mortalidad .....	66
4. Traslocación Bacteriana .....	70
4.1. Descripción por grupos y semanas .....	70
4.2. Identificación/Análisis Bacteriológico de la TB .....	73
4.3. TB y crecimiento extraganglionar .....	74
5. Anatomía Patológica .....	79
6. Sobrecrecimiento Bacteriano .....	82
7. Peroxidación Lipídica: MDA Compartimental .....	84
7.1. MDA en suero .....	84
7.2. MDA en hígado .....	87
7.3. Relación de la PL y la TB .....	89
8. Inflamación: Citocinas .....	90
8.1. Citocinas séricas y tras estimulación con Lipopolisacáridos (LPS) .....	91

A. TNF .....	91
B. IFN .....	94
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>110</b>
<b>LISTADO DEL MATERIAL ICONOGRÁFICO .....</b>	<b>143</b>



## LISTADO ABREVIATURAS

± Δ:	Incremento/Decremento
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGPI:	Ácidos Grasos Poliinsaturados
B:	Bazo
BGN/GN:	Bacilos Gram Negativos
C:	Grupo Control
VC:	Sangre de Vena Cava
C3:	Fracción C3 del Complemento
C5:	Fracción C5 del Complemento
C9:	Fracción C9 del Complemento
CAM:	Complejo de Ataque a la Membrana
CBC:	Conducto Biliar Común
CCl4:	Tetracloruro de Carbono
ERO:	Especies Reactivas de Oxígeno
F:	Grupo Ficticia
GGT:	Gamma Glutamil Transpeptidasa
GLM:	Ganglios Linfáticos Mesentéricos
GOT:	Glutámico Oxalacética Transaminasa
GP:	Gram Positivos
GPT:	Glutámico Pirúvica Transaminasa
H:	Hígado
H2:	Hidrógeno
H2O:	Agua
H3PO4:	Ácido Fosfórico
HDA:	Hemorragia Digestiva Alta
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HTP:	Hipertensión Portal
IB:	Infección Bacteriana
IFN	Interferón
IgA:	Inmunoglobulina A
IgG:	Inmunoglobulina G
IL-1:	Interleucina 1
IL-6:	Interleucina 6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Fosfato de Potasio Monobásico
KOH:	Hidróxido de Potasio
LA:	Líquido Ascítico
LBP:	Lipoproteína Ligadora de Polisacáridos
LDB:	Ligadura Doble Biliar

log/bact/g:	Nº bacterias en unidades logarítmicas por gramos de heces
LPS:	Lipopolisacáridos
LSB:	Ligadura Simple Biliar
MDA:	Malonildialdehído
MRSA:	<i>Stafilococcus Aureus Meticilín Resistente</i>
NaOH:	Hidróxido de Sodio
NI:	No Identificación crecimiento de colonias bacterianas
NO:	Óxido Nítrico
O2:	Oxígeno
°C:	Grados centígrados
p:	p valor
PBE:	Peritonitis Bacteriana Espontánea
PD:	Proliferación Ductal
PHA:	Polihidroxialcanoato
PL:	Peroxidación Lipídica
Red-ox:	Reacción de Óxido-Reducción
SBI:	Sobrecrecimiento Bacteriano Intestinal
SRE:	Sistema Retículoendotelial
TB:	Traslocación Bacteriana
TB-:	Traslocación Bacteriana sin Crecimiento Extraganglionar
TB+:	Traslocación Bacteriana con Crecimiento Extraganglionar
TBA:	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS:	ThioBarbituric Acid-Reactive Substances
Tc:	Tecnecio
TEP:	Tetraethoxypropano
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
UFC/ml:	Unidad Formadora de Colonias/Mililitro
v/v	Relación Volumen/Volumen
XDH:	Xantino Deshidrogenasa
XO:	Xantino Oxidasa
$\chi^2$ :	Prueba Chi cuadrado



## INTRODUCCIÓN

### 1. Cirrosis hepática e infección bacteriana

Las infecciones bacterianas (IB) son una complicación frecuente y grave de los pacientes con cirrosis (1, 2). Su presencia empeora el pronóstico en estos enfermos y, junto al mayor deterioro de la función hepática (3), constituyen factores pronósticos independientes de mortalidad (4). Sólo un 30% de enfermos cirróticos que sobreviven a un primer episodio de peritonitis bacteriana espontánea (PBE) siguen vivos el primer año.

Multitud de estudios que evalúan la incidencia de IB en la cirrosis corresponde a enfermos hospitalizados, con una incidencia del 32% durante su ingreso o estancia hospitalaria, netamente superior a la tasa global del 5-10% de infección nosocomial del enfermo no cirrótico (5, 6).

Existen múltiples factores involucrados en la génesis de IB en el contexto de la cirrosis, unos son consecuencia directa de la propia hepatopatía y otros de circunstancias exógenas a la propia cirrosis (ingresos hospitalarios, realización de maniobras diagnósticas invasivas). Los pacientes cirróticos, como consecuencia de múltiples descompensaciones de su enfermedad, requieren de numerosos ingresos hospitalarios, los cuales, por sí mismos, constituyen una situación de riesgo para sufrir IB, independientemente de la competencia inmunológica del individuo (7). Otros factores implicados serían la sustitución de la flora autóctona saprofita por gérmenes multirresistentes adquiridos en medio hospitalario, el contagio directo de otros enfermos, el uso prolongado de antibioterapia de amplio espectro y la utilización de maniobras instrumentales (8).

La susceptibilidad a estas infecciones depende en gran parte de alteraciones en la inmunidad celular y humoral que ocurren en los cirróticos. Entre los fenómenos asociados a la cirrosis, destacaremos el descenso en la capacidad bactericida de los macrófagos (9), la disminución en la capacidad humoral tanto en suero como en líquido ascítico (LA) (con la correspondiente predisposición para el desarrollo de episodios de PBE) (10, 11) y la disminución de la capacidad funcional del sistema reticuloendotelial (12) para el aclaramiento tanto de bacterias viables como de sus productos (ADN bacteriano y endotoxinas).

La importancia clínica del problema de la IB radica no sólo en la gravedad del propio proceso infeccioso (como causa de muerte hasta en el 10% de pacientes cirróticos) sino en la posibilidad de complicar el curso de una hemorragia digestiva alta (HDA) (13,14) o desencadenar otra complicación (insuficiencia renal, encefalopatía hepática) (15). De hecho se estima que las IB son, directa o indirectamente, la causa de muerte en el 25% de enfermos cirróticos, constituyendo un claro factor pronóstico de mortalidad intrahospitalaria.

Mención especial merece la IB en el contexto de una HDA. El 20% de pacientes cirróticos con HDA presentan una infección en el momento de su admisión en el hospital; el 32% la desarrollarán durante la siguiente semana al episodio hemorrágico, incidencia que se incrementa al 50% cuando consideramos todo el período de estancia hospitalaria (14,16-22). La presencia de IB es un factor predictivo independiente de aparición de recidiva hemorrágica precoz (14) y mortalidad intrahospitalaria.

## **2. Etiología de la IB en los cirróticos**

Las infecciones más frecuentes en enfermos cirróticos son las urinarias, la PBE y las neumonías; el 80% de ellas están causadas por gérmenes gramnegativos (GN), especialmente *Enterobacteriaceae*, géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y *Enterobacter* (23), lo que sugiere que la mayoría de infecciones en la cirrosis son de origen intestinal; el 15% de los casos son atribuibles a gérmenes grampositivos (*Pneumococcus*, *Staphylococcus* y *Listeria*) y el 5% restante a otros GN (*Pseudomonas*).

En las últimas décadas se detectaron incrementos de infecciones por grampositivos (GP), lo que se achaca al uso de la descontaminación intestinal selectiva en la profilaxis de la PBE con quinolonas y a las maniobras invasivas diagnósticas o terapéuticas aplicadas en las descompensaciones de la cirrosis (24-28). Una consideración especial merece la aparición progresiva de infecciones por gérmenes resistentes a quinolonas (29,31,32) y a las cefalosporinas (33) como causa de las PBE, así como la importancia que adquiere la infección por estafilococos resistentes a meticilina (34,35).

## **3. Principales infecciones bacterianas en la cirrosis**

Urinarias: Se sitúan entorno al 25% de los enfermos cirróticos ingresados. Habitualmente son asintomáticas (36) y el sedimento de orina es demostrativo en el 60% de los casos (37). Como factores predisponentes se

han implicado el sondaje urinario, el sexo femenino y la existencia de residuo postmiccional consecuencia de la ascitis a tensión.

Respiratorias: se presentan en el 6-9% de los cirróticos ingresados, principalmente en casos de enolismo activo o HDA (1).

Bacteriemia espontánea: Ocurre con relativa frecuencia en el contexto de la cirrosis. Mantiene algunas similitudes con la PBE: por una parte, desde el punto de vista patogénico, esta situación acontecería como preludio de una PBE en la mayoría de los casos; al igual que en la PBE, el 75% de los aislamientos en estas bacteriemias son bacilos GN de origen entérico; y se ha demostrado que guarda relación con la gravedad de la insuficiencia hepática y condiciona un peor pronóstico vital (38). Las formas de bacteriemia secundarias a focos pulmonar, cutáneo o urinario están causadas principalmente por cocos GP y conllevan una elevada mortalidad, entorno al 30% (39).

Peritonitis bacteriana espontánea (PBE): La infección más característica en estos enfermos es la PBE (40,41), con una prevalencia entre el 10 y 26% (42-50) así como elevada tendencia a la recidiva pues entre el 40-70% de los supervivientes de una PBE desarrollarán un nuevo episodio durante el primer año (51-54) si no se aplica una adecuada profilaxis. La mortalidad asociada a estos episodios sigue siendo alta, alrededor del 20-40% (25,42,55-60) y ello a pesar del uso habitual de antibioterapia no nefrotóxica de espectro ampliado, siendo la principal causa el desarrollo de insuficiencia renal en un importante porcentaje de casos (61). El uso concomitante de albúmina en pacientes considerados de riesgo disminuye

significativamente la mortalidad de estos episodios (182). Su diagnóstico está basado en un recuento de leucocitos polimorfonucleares superior a 250 células/ $\mu$ l en el líquido ascítico; de forma característica es una infección monomicrobiana, originada en su mayoría por enterobacterias GN, principalmente *E coli* y *Klebsiella* spp. El 70% de los casos muestra positividad del cultivo en líquido ascítico con las adecuadas técnicas de cultivo (62). El primer paso en la patogenia de la PBE es la traslocación bacteriana, de la que tenemos abundantes evidencias experimentales (63-76) y algunos de ámbito clínico (77) que apoyan su papel fundamental en este proceso. La claudicación de otros sistemas defensivos a nivel sistémico, permitiendo la subsistencia de bacterias viables translocadas (9,12,78-87) así como de la inmunidad local peritoneal, permitiendo la colonización bacteriana del líquido ascítico (10,11,88-95) son las siguientes estaciones patogénicas que determinan el ulterior desarrollo de la PBE.

### **3.1. Otras infecciones de causa bacteriana en el cirrótico:**

Tuberculosis pulmonar y peritoneal (96), las artritis séptica (97), las infecciones de partes blandas (1,42) y la endocarditis bacteriana (98) son relativamente infrecuentes en ellos.

Un 46% de cirróticos son portadores nasales de *S aureus*, siendo hasta el 30% cepas meticilín resistentes (MRSA) (99); la colonización se produce frecuentemente durante la hospitalización, asociándose con una mayor probabilidad de desarrollar infecciones por este germen y a una mayor mortalidad (100).

También se ha descrito una mayor prevalencia de infecciones por *Helicobacter pylori* en pacientes cirróticos, que en los controles no cirróticos (101). Se asocia con la mayor edad y la realización de endoscopias previas. Existen controversias acerca del papel que puede desempeñar en la encefalopatía hepática y por tanto, de la importancia de su erradicación, con estudios favorables (102) y otros no confirmatorios (103, 104).

#### **4. Traslocación bacteriana (TB)**

##### **4.1. Concepto e introducción al problema**

El fenómeno de TB se ha considerado como el elemento clave en la patogenia de la IB en los pacientes con cirrosis avanzada y ascitis (105). El criterio diagnóstico de TB actual requiere un aislamiento microbiológico (bacterias viables) a nivel de los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) (106,107); este hecho dificulta la generalización de estudios sobre TB en pacientes, aunque ha sido observada en el curso de laparotomía (108) y especialmente en pacientes cirróticos intervenidos para trasplante hepático o resección de hepatocarcinomas (109). La TB se ha demostrado en modelos experimentales de cirrosis en ratas. De acuerdo con diferentes estudios, la incidencia de TB en ratas cirróticas varía entre el 45% y el 78% (64,66,68,110). La incidencia estimada de TB en pacientes cirróticos con mala función hepatocelular (112) es del 20-30%. En otros escenarios clínicos y experimentales como en lesiones térmicas (113), administración parenteral de endotoxina (114,232) y el shock hemorrágico (115,116,299) se ha demostrado un aumento en el aislamiento de bacterias viables a nivel de GLM.

Para traslocar, las bacterias intestinales primero han de adherirse a los receptores localizados en las células epiteliales. El *E coli* se adhiere mediante adhesinas fimbriales, promoviendo la colonización inicial (307). La presencia de cápsula bacteriana se ha relacionado con una mayor incidencia de complicaciones en los enfermos cirróticos afectados por una PBE causada por *E coli* en comparación con episodios de PBE por cepas no capsuladas del mismo germen (118). En algunos casos, las bacterias pueden escapar al control de los ganglios linfáticos y alcanzar el torrente circulatorio. La detección de anticuerpos frente a bacterias GN, la presencia de hipergammaglobulinemia y el incremento de moléculas de adhesión solubles en suero y líquido ascítico pueden reflejar esta situación (119-121).

Los mecanismos que provocan la traslocación de la flora intestinal en la cirrosis no están totalmente esclarecidos; se han implicado diversos factores, tales como la endotoxemia (122), malnutrición (75,206), aumento de los niveles plasmáticos de TNF  $\alpha$  (124,161) y sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) (66). El SBI se relaciona y puede estar favorecido con alteraciones de la motilidad intestinal (125) entre otras causas. El SBI parece desempeñar un destacado papel, ya que la descontaminación intestinal selectiva con norfloxacinó previene la TB en ratas cirróticas (124), constituyendo la forma habitual de profilaxis secundaria de PBE en humanos (24,161).

La importancia clínica de la TB en los cirróticos radica en las alteraciones inmunológicas y hemodinámicas que origina, ya sea por el paso de bacterias viables o de sus productos (ADN bacteriano y endotoxina) al torrente circulatorio. Es importante destacar que el daño simultáneo a nivel

de los tres principales pilares de la barrera mucosa intestinal (equilibrio de la flora bacteriana intraluminal, integridad de la barrera epitelial intestinal y el sistema inmunitario local) se relaciona con mayor susceptibilidad a la TB que cuando se altera sólo uno de estos pilares (47,127). Ello explicaría la alta tasa de TB en la cirrosis (46,74). Que la TB a ganglios mesentéricos regionales es el paso inicial para el desarrollo de una eventual PBE (70) es un hecho comprobado experimentalmente con el modelo de rata cirrótica inducida por tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) (66, 68), principalmente si la ascitis está infectada (64,66,68,70,130); no obstante, existe un pequeño pool de ratas con PBE en las que no se detecta TB, lo que puede ser atribuible a la metodología de detección de bacterias viables en GLM (baja sensibilidad), la capacidad inmunológica de aclaramiento eficaz o a un origen distinto de las bacterias (no entérico).

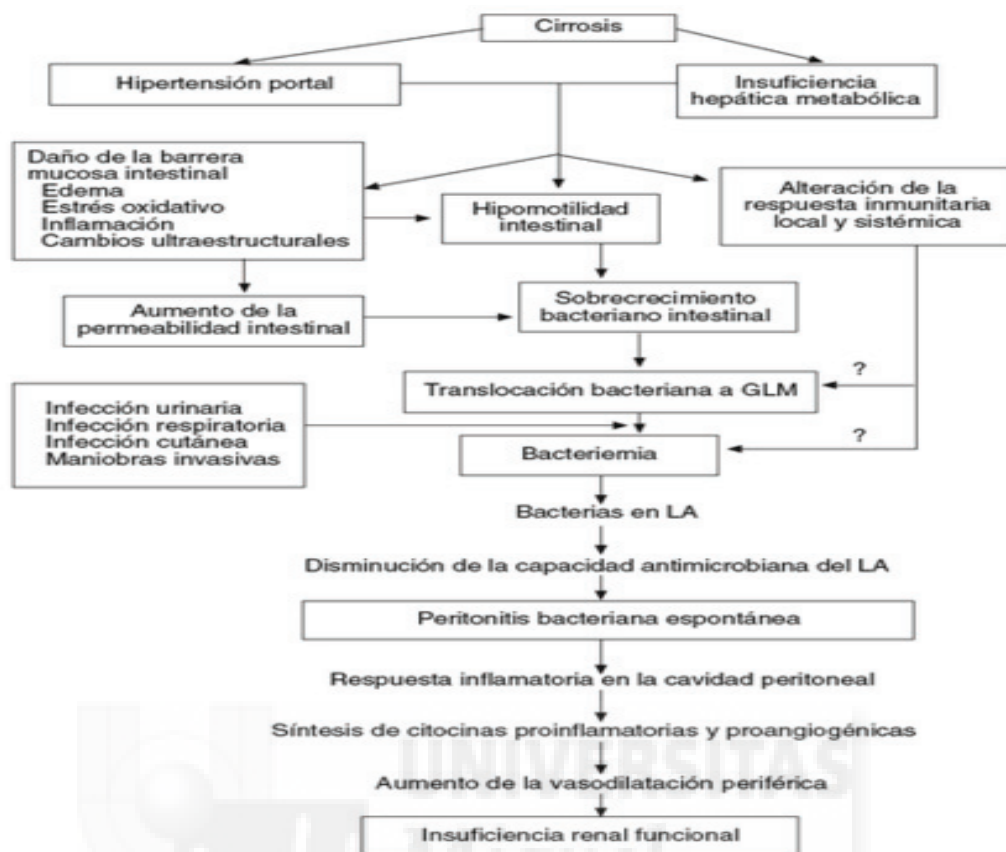
Debido a la dificultad de obtener muestras microbiológicas (ganglios linfáticos) de los pacientes cirróticos, el estudio de la TB se centra principalmente en estudios de modelos experimentales. De hecho la TB se encuentra presente hasta en el 50-60% de las ratas cirróticas con ascitis inducida por  $\text{CCl}_4$  frente a menos del 10% en ratas control (131).

#### **4.2. Patogenia de la TB:**

Las bacterias procedentes de la luz intestinal pueden atravesar la barrera mucosa epitelial para anidar en los GLM, ello sería reflejo del fracaso del equilibrio existente entre la integridad de la barrera intestinal mucosa, la flora bacteriana endoluminal y el sistema inmunitario local de defensa; si fallan los procesos de contención de la infección a nivel de los



GLM, las bacterias pueden, a través de la vía linfática, colonizar el torrente circulatorio y diseminarse (bacteriemia), este segundo escalón patogénico no está del todo bien dilucidado. A consecuencia del constante intercambio de fluidos entre la sangre y el líquido ascítico, las bacterias alcanzan la ascitis. Finalmente, el desarrollo de una PBE va a depender en gran medida del éxito o fracaso de la capacidad antimicrobiana en la ascitis; aquellos enfermos cuya capacidad defensiva en el líquido ascítico se encuentre disminuida podrán desarrollar una PBE (132). Esta diseminación sistémica y el crecimiento bacteriano en la ascitis se produce como consecuencia de la afectación general del sistema inmunitario existente en el contexto de la cirrosis por una parte, y por otra, a la sobreproducción de citocinas y otros mediadores proinflamatorios con propiedades vasoactivas en líquido ascítico que originan vasodilatación arterial y fracaso renal, complicando aún más el curso de la PBE (Esquema 1) (136).



Esquema 1: Patogenia de la PBE.

A nivel clínico, se han constatado los siguientes datos: a) el carácter monomicrobiano de la infección en la mayoría de los casos (62); b) el agente etiológico se aísla en los hemocultivos hasta en un 50% de los casos con PBE y cultivos en líquido ascítico positivo (132); c) la descontaminación intestinal selectiva con norfloxacino disminuye en un 71% la tasa de recurrencia de la PBE (8,24,146), base para su utilización en la profilaxis secundaria; y d) la probabilidad de PBE en los cirróticos con ascitis se incrementa en aquellos con capacidad opsónica del líquido ascítico reducida, definida por el hallazgo de una concentración total de proteínas en la ascitis  $< 1$  g/dl o por una importante alteración de la actividad fagocítica del sistema retículoendotelial que se identifica habitualmente en la insuficiencia

hepática avanzada (88). No se debe olvidar que en el 10-20% de los casos de PBE, las bacterias proceden de otro foco infeccioso (vías urinarias, vía respiratoria, piel, ...). De crucial importancia es la respuesta inmunitaria proinflamatoria del huésped y su influencia en el deterioro hemodinámico del enfermo cirrótico, siendo un importante factor condicionante en el pronóstico de una PBE (61).

En la práctica clínica, para el diagnóstico clínico de la TB se ha propuesto la utilización de marcadores indirectos de TB, tales como detección de ADN bacteriano en suero y LA (133) y el aumento en la concentración sérica de la proteína transportadora de Lipopolisacáridos (LPS), o proteína de unión a LPS (LBP) (13,14,134), ya que es difícil evaluar la existencia de TB mediante cultivo de GLM.

### **5. Flora bacteriana intestinal:**

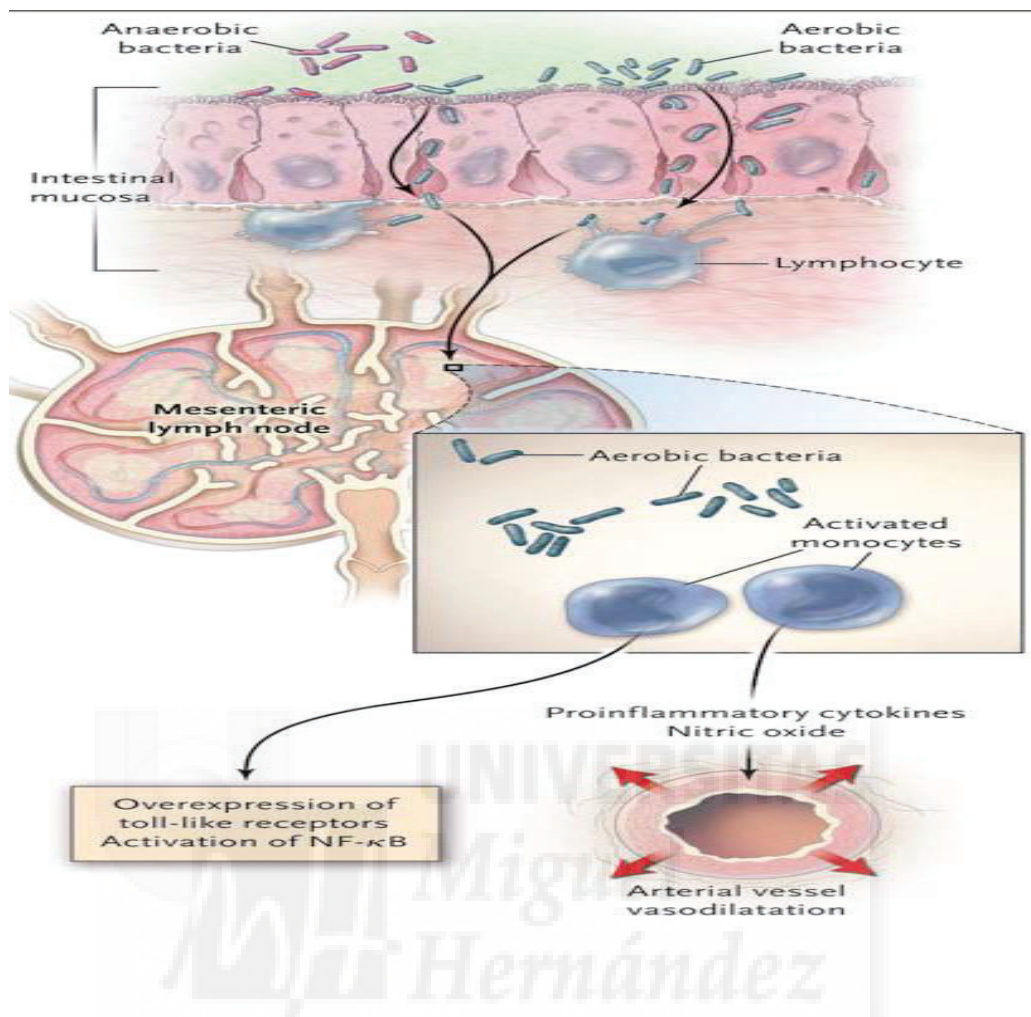
Se estima que el origen de la flora entérica procede del medio externo. El tracto gastrointestinal del recién nacido es estéril y la contaminación se inicia en el canal del parto. Este proceso de colonización bacteriana se completa al mes del nacimiento y se produce en sentido oro-anal (135). Durante las primeras horas se establecen en él los estreptococos y coliformes y en los siguientes días los enterococos y lactobacilos anaerobios. Los bacteroides aparecen a los 10 días del nacimiento y proliferan en las siguientes 2 semanas. Conforme aumenta la flora anaeróbica disminuye el número de coliformes hasta formarse una flora similar a la encontrada en adultos. Desde estómago a colon, el entorno es progresivamente más alcalino y anaeróbico. En la composición de la flora entérica desempeña un

papel importante el pH y el potencial óxido-reducción (red-ox). Esta circunstancia explica la progresiva preponderancia de la flora anaeróbica estricta (15,130).

El estómago y el intestino proximal contienen normalmente cantidades pequeñas de bacterias (en la tercera parte de los sujetos no se identifica crecimiento alguno) (16,17,131). En la cavidad oral hay una abundante carga bacteriana, principalmente anaerobios (*Peptoestreptococcus*, *Fusobacterium* y *Bacteroides*), que pueden pasar a estómago y son aclarados por la secreción ácida gástrica. La microflora gástrica es escasa, con predominio de aerobios y GP (137). La microflora del intestino delgado proximal se asemeja a la del estómago, aunque es cuantitativamente mayor, en ella predominan los aerobios GP y pueden aislarse coliformes en escasa cuantía, estando ausentes los anaerobios estrictos. A nivel de íleon distal el pH es superior a 7 y el potencial red-ox comienza a negativizarse, es la zona de transición entre la flora aeróbica gástrica e intestino delgado proximal y la población anaeróbica del colon. La concentración de gérmenes se sitúa en el intervalo  $10^5 - 10^9$  UFC/ml y se aíslan enterobacterias GN y anaerobios estrictos en una alta proporción. A nivel colónico la concentración bacteriana se incrementa de forma exponencial con predominio de anaerobios estrictos (*Bacteroides*, *Lactobacillus anaerobios*, *Clostridium*, *Peptococcus* y *Peptoestrptococcus* y *Bifidobacterium*), aunque también aparecen enterococos y algunas (135) especies de enterobacterias.

El papel de la flora comensal en la fisiología intestinal es relevante; en su ausencia, se originan cambios significativos histológicos a nivel de la

mucosa (las vellosidades son de mayor longitud y la profundidad de las criptas es menor), disminuye la infiltración leucocitaria en la lámina propia, el número y tamaño de las placas de Peyer y la tasa de regeneración epitelial. Tras producirse la colonización bacteriana, la mucosa intestinal de estos animales se normaliza. Este ecosistema bacteriano desempeña un papel relevante en la prevención de la TB; la mucosa que cubre las vellosidades de la superficie apical epitelial están revestidas de bacterias anaerobias que previenen la adherencia al enterocito de otras posibles bacterias patógenas (el mismo papel desempeña la secreción de Ig A) y limitan el sobrecrecimiento de bacilos GN aerobios. Tanto el sobrecrecimiento entérico de bacterias GN como la disminución de la microflora anaeróbica aumentan la susceptibilidad a la TB. Existen algunos factores endógenos que mantienen el equilibrio a nivel de la flora intestinal (acidez gástrica, secreción pancreatobiliar, factores inmunológicos entéricos y, sobretudo, la motilidad intestinal). La conservación estructural y funcional del epitelio intestinal evita la migración transepitelial o paracelular de las bacterias. En condiciones normales, las bacterias contaminantes son fagocitadas y, junto a mecanismos inmunológicos, se produce el aclaramiento de bacterias. Esto justifica que la TB se produzca de forma fisiológica en los sujetos sanos, en bajo grado y que un marcado incremento de los fenómenos de TB o una alteración en las defensas del huésped conlleva la replicación bacteriana a nivel ganglionar regional y la posterior diseminación al torrente circulatorio o linfático (19,276).



Esquema 2: Relación entre TB e Inflamación. (Renal Failure in Cirrhosis Pere Ginès, Robert W. Schrier. NEJM 2009; 361:1279-90).

### 5.1. Motilidad intestinal y carga bacteriana intestinal

La disminución de la carga entérica aeróbica de bacilos GN y del SBI reduce la probabilidad de desarrollar una PBE, esto llevaría asociado un disminución previa en los fenómenos de TB. Es conocida la disminución de la prevalencia de PBE en enfermos cirróticos de alto riesgo tras la administración oral de antibióticos con baja biodisponibilidad (fundamentalmente quinolonas) (20,146); no obstante, en modelos

experimentales de cirrosis (murinos), el uso de antibióticos (cotrimoxazol, norfloxacino) se asoció en algunos casos a disminución de TB para bacterias GN sin disminuir la tasa global de TB dado el incremento secundario de cocos GP (65, 137).

La aparición de cepas bacterianas resistentes a quinolonas ha motivado la búsqueda de alternativas para el control de la PBE, entre las que se encuentran la disminución de la carga bacteriana entérica y maniobras que disminuyan el daño sobre la barrera mucosa entérica (74,138-144). El propranolol y el cisapride menguan la carga bacteriana intestinal al disminuir el tiempo de tránsito intestinal (74,146), de hecho, se sabe que el propranolol puede acelerar el tránsito al bloquear la hiperactividad adrenérgica que existe en los pacientes con cirrosis.

## **5.2. Sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI)**

Concepto: se define como un aumento de la concentración bacteriana intestinal superior a los valores considerados normales, referidos tanto a la población bacteriana global como a una especie en concreto. Consideramos que existe SBI para una especie bacteriana determinada en modelos experimentales de rata cirrótica, cuando el recuento cuantitativo es superior a dos desviaciones estándar respecto a la media para el mismo microorganismo en ratas normales (66).

### **a) SBI y TB en cirróticos**

EL SBI se ha documentado en pacientes cirróticos y se piensa que juega un importante papel en la TB de estos enfermos (147-149). Algunos

enfermos presentan colonización bacteriana a nivel de intestino proximal de flora bacteriana que normalmente se localiza en el colon (150).

Es constatable la elevada prevalencia de SBI en pacientes cirróticos (148,149,152-154,156-158), ya sea mediante cultivo de aspirado yeyunal (16,17,21,22,170,209) como a través de la prueba del aliento con H<sub>2</sub> (37,8%) (18,160,175). Su aparición parece guardar relación con la progresión de la enfermedad, relacionándose con el grado de Child y la presencia de ascitis.

Numerosas evidencias apoyan el papel del SBI como claro factor predisponente en la aparición de TB (161-167) y consiguiente desarrollo de PBE. A nivel experimental, se observó que las ratas cirróticas con ascitis presentaron SBI en heces del ciego de las especies bacterianas detectadas en 41 de 42 ganglios linfáticos de ratas con TB (66). Por otra parte, se ha constatado que la administración de ácidos biliares conjugados reduce tanto el SBI como la TB en ratas con cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> (170). La disminución de la carga bacteriana en heces en modelos experimentales mediante la administración de norfloxacino también redujo la incidencia de TB y PBE en animales expuestos y no expuestos a shock hemorrágico (65, 69), lo cual sugiere que la presencia de SBI es un prerrequisito para el desarrollo de TB y PBE en ratas cirróticas. Así pues, el SBI es más acusado en animales con TB (respecto a los que no la presentan) (74).

La aparición de SBI depende de la preservación de los mecanismos fisiológicos que regulan la composición de la flora intestinal (flora anaeróbica y secreción gástrica y biliopancreática). Un mecanismo regulador importante es la motilidad intestinal. Este complejo motor



migratorio interdigestivo se ha visto alterado en modelos animales con cirrosis (172,173) y en pacientes cirróticos (158,174-180), ello predispone para la aparición de SBI (182-188,190,191), ya que existe un tránsito intestinal enlentecido, favorecido por un incremento en la actividad adrenérgica, en la síntesis de óxido nítrico y por el daño oxidativo a nivel de la pared (180,74,193). De hecho, la administración de fármacos procinéticos ha mostrado disminuir el SBI y la TB en ratas cirróticas y su administración a pacientes cirróticos con SBI por BGN disminuye el tiempo de tránsito intestinal y el recuento yeyunal de bacterias (193). Por un mecanismo similar, la administración de propanolol a ratas cirróticas también disminuye el tiempo de tránsito intestinal, la tasa de SBI y la TB (74).

También la alteración de la respuesta inmune local puede favorecer el SBI. En pacientes cirróticos (196), la síntesis intestinal de IgA se encuentra reducida. En condiciones normales, la presencia de IgA disminuye los mecanismos de adherencia bacteriana a los receptores intestinales, su penetración mucosa y evitaría la recaptación de toxinas y la TB.

## **b) Factores reguladores de la población intestinal bacteriana**

### **b-1) Alteración anatómica y de la permeabilidad intestinal**

Los pacientes con cirrosis e hipertensión portal (HTP) presentan congestión vascular y edema a nivel intestinal (197,198), así como alteraciones ultraestructurales, consistentes en un incremento del espacio celular interepitelial con sellado intercelular de zónulas ocludens y acortamiento de

microvellosidades a nivel de duodeno distal (199). Es posible que estas alteraciones se asocien a pérdida de mecanismos de la barrera intestinal y a un incremento en la permeabilidad intestinal. Se ha constatado el aumento de la permeabilidad intestinal a macromoléculas en pacientes cirróticos, principalmente si tienen un grado más avanzado de hepatopatía (200), y los que se infectaron durante el seguimiento presentaron básicamente mayor aumento de la permeabilidad que los cirróticos no infectados (201).

Clínicamente se ha demostrado (a través de estudios funcionales) el incremento de la permeabilidad intestinal en el contexto de la cirrosis, sobretodo en los pacientes con hepatopatía más avanzada (20,112,201) y en pacientes con sepsis (200). Ambas alteraciones (incremento en la permeabilidad y alteración microestructural) parecen guardar relación.

Se ha observado endotoxemia en pacientes cirróticos, principalmente con ascitis y enfermedad hepática avanzada (203). La endotoxina produce un incremento de la permeabilidad intestinal y altera los mecanismos inmunes de defensa del huésped (204, 205). Tanto las alteraciones de la estructura como de la función intestinal pueden incrementar la permeabilidad intestinal, facilitando fenómenos de TB en pacientes con cirrosis. En relación a la disfunción intestinal, varios factores parecen favorecerlos: cuando se induce un shock hemorrágico en ratas cirróticas aumenta la TB (206), indicando que la hipovolemia secundaria a hemorragia y la hipoxia tisular (fenómeno frecuente en pacientes cirróticos con HDA) podrían incrementar la alteración de la barrera intestinal y aumentar la posibilidad de desarrollar una IB de origen entérico. También se ha observado alteración del flujo sanguíneo en la mucosa intestinal de enfermos cirróticos cuando se utilizan fármacos con capacidad vasoconstrictora a nivel esplácnico

(207,150) así como la existencia de un trastorno sistémico que afecta a otras barreras corporales (mucosa traqueal por ejemplo) en la cirrosis avanzada (22,135,208).

La secreción biliar intestinal ejerce un papel protector y/o de prevención de fenómenos de TB al inhibir el SBI, ya que parece tener un efecto trófico a nivel de la mucosa intestinal, neutralizando endotoxinas y, en consecuencia, un papel protector frente a la TB (209).

### **b-2) Disfunción del Sistema Inmune general**

Cuando una bacteria accede al torrente circulatorio puede ser fagocitada por neutrófilos o macrófagos; pero previamente debe ser opsonizada con IgG y/o CAM (complejo de ataque a la membrana, formado por la unión de los factores C5-C9 del sistema de complemento) (51). Así, la posibilidad de que una bacteria traslocada pueda finalmente inducir una infección depende también de la capacidad bactericida sérica del huésped.

Los macrófagos son agentes de primera línea en la respuesta defensiva del huésped frente a agentes externos, gozan de capacidad para reconocer y eliminar las bacterias previamente opsonizadas; estas células están ampliamente distribuidas por el organismo y se las puede encontrar en hígado, bazo y peritoneo (211-213). Se ha constatado la hipofunción de los receptores Fc-gamma en los macrófagos de pacientes cirróticos (79) similar a la observada en la cirrosis biliar primaria (214).

En la cirrosis, tanto la quimiotaxis, la fagocitosis como la actividad bactericida de los pacientes están alteradas (82,215-217), siendo significativamente mayor el grado de disfunción en los enfermos con PBE (25,218,309). Una de las causas de la disfunción neutrofilica se atribuye a la reducida producción de metabolitos oxidativos, con mejorías funcionales *in vitro* tras adicionar factor estimulante de colonias para granulocitos y macrófagos (9).

Evidencias experimentales y clínicas indican que la interacción entre las células del sistema inmune y los productos bacterianos de origen entérico explicarían la activación del sistema inmune y la cascada inflamatoria con el subsiguiente incremento de citocinas proinflamatorias (219,220). En este contexto también se ha observado la existencia de una notable alteración en la distribución y estado de activación del sistema inmunitario (220,222). Se sabe que en los GLM de ratas cirróticas se produce una expansión de monocitos y de células T (cooperadoras y supresoras) (220). La ulterior recirculación de estas células inmunes activadas al torrente circulatorio expande el fenómeno inflamatorio. Por tanto, en la cirrosis, la activación del sistema inmune e inflamatorio es consecuencia, en gran parte, de la traslocación de bacterias o sus productos, originando un estado proinflamatorio sistémico que es más acusado en pacientes con paso frecuente de productos bacterianos al torrente sanguíneo o por la presencia en sangre de ADN bacteriano (224,225). De hecho, la descontaminación intestinal selectiva disminuye las concentraciones de citocinas tanto a nivel clínico (134) como en modelos experimentales (220).

Las actuales evidencias indican que la activación inmunitaria se inicia a nivel local en los GLM regionales cuando las células inmunitarias interactúan con las bacterias intestinales o sus productos; tras esta activación, las células inmunitarias extienden la inflamación a nivel sistémico después de alcanzar la circulación sistémica (228).

### **b-3) Actividad fagocítica del sistema reticuloendotelial (SRE)**

El sistema mononuclear fagocítico, localizado principalmente en el hígado (células de Kupffer), se encarga, en condiciones normales, de aclarar las bacterias de la circulación sistémica (229) y constituye la principal arma de defensa para bacterias adquiridas a través de la vía hematológica. La presencia de shunts portosistémicos y la alteración fagocítica defectuosa de las células de Kupffer en el contexto de la cirrosis, origina una disminución de la actividad del SRE (12). La actividad funcional de este sistema está reducida en algunos cirróticos y se demuestra por la disminución del aclaramiento de sulfuro coloidal de  $^{99}\text{Tc}$  por el SRE en comparación con sujetos sanos (12), la menor eliminación de microesferas de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  por el SRE y el mayor riesgo de PBE en los pacientes con hepatopatía más avanzada (78). Es de suponer que la merma en la capacidad de eliminación del SRE pueda favorecer la bacteriemia, su diseminación hematológica y la siembra en otros santuarios y en líquido ascítico, con el posterior desarrollo de PBE.

#### **b-4) Alteración inmune en líquido ascítico (LA)**

La probabilidad de desarrollar una infección del LA es inversamente proporcional a la capacidad bactericida del mismo. La presencia de bacterias en LA activa los mecanismos humorales de defensa, en especial, la vía alterna del sistema del complemento.

En condiciones normales, el fluido peritoneal tiene actividad bactericida frente bacterias GN, algunas GP y *Candida albicans*, mediada principalmente por el sistema del complemento (230-234); esta actividad se asemeja a la observada en exudados peritoneales malignos (94) y es muy superior a la del LA de pacientes con cirrosis.

La bacteria causante de PBE más prevalente es la *E coli*, siendo la presencia de LPS de pared uno de los principales mecanismos de activación de la vía alternativa del complemento. Algunas cepas bacterianas GN virulentas pueden eludir este sistema de defensa (235). La existencia de factores de virulencia puede tener connotaciones clínicas, de hecho, los episodios de PBE por cepas capsuladas de *E coli* tienen unas tasas de complicaciones y mortandad más altos en los pacientes cirróticos que aquellos originados por cepas no capsuladas (118).

Los cirróticos que desarrollan infección del LA, habitualmente tienen una forma más avanzada de la enfermedad y unos niveles más bajos de proteínas en LA (42, 236). Varios factores predisponen al desarrollo de PBE en pacientes cirróticos con ascitis; aquellos con niveles bajos de proteínas totales y C3 están más predispuestos, en ellos se demuestra una relación directa (10, 88), ya que tienen menor actividad opsonizante y bactericida en

LA (11). Asimismo, la posibilidad de desarrollar un primer episodio de PBE se incrementa en los cirróticos con un dintel de proteínas totales en LA por debajo de 1 mg/dl, en comparación con pacientes con niveles más altos de proteínas, a los 3 años de seguimiento (24% vs 4% respectivamente) (48).

Existen al menos tres factores responsables del descenso de los factores del complemento en la cirrosis: 1º déficit en la síntesis, en relación al grado de insuficiencia hepática. El nivel sérico de bilirrubina es un factor independiente de aparición de un primer episodio de PBE (49); 2º el fenómeno de dilución en LA. Se sabe que el tratamiento diurético efectivo aumenta la concentración de proteínas totales y la capacidad bactericida del LA (90) y podría ser un mecanismo preventivo de PBE, y 3º el aumento en el consumo de factores del complemento. Los LPS de pared de las bacterias GN asentadas en LA activan la vía alterna del complemento, se lisan las bacterias y se consumen componentes del complemento, promoviendo la progresiva depresión de la capacidad funcional del sistema antimicrobiano del LA (237); estos mecanismos explican en parte la predisposición de los pacientes con niveles bajos de factores del complemento en LA a sufrir PBE, con la consiguiente pobre actividad bactericida en este compartimento, pues en ellos la presencia de bacterias no se sigue de la correspondiente lisis y su aclaramiento (89), de hecho, la descontaminación con norfloxacin incrementa los niveles de C3 en LA (92), probablemente por disminución del consumo de factores del complemento.

## **6. Estrés oxidativo y Peroxidación lipídica (PL):**

Los seres humanos y la mayor parte de organismos eucariotas precisan del oxígeno ( $O^2$ ) para mantener una producción de energía suficiente para sobrevivir. Paradójicamente, el  $O^2$  es potencialmente peligroso debido a la génesis de especies reactivas intermedias durante su utilización. En la protección celular contra la oxidación actúan diferentes niveles de defensa antioxidantes. En un organismo generalmente existe un equilibrio entre las especies reactivas de  $O^2$  (ERO) y los sistemas de defensa antioxidante. La descompensación de dicho equilibrio a favor de los mecanismos de oxidación se denomina estrés oxidativo (238). El equilibrio óxido-reducción a nivel intracelular supone la presencia de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de neutralizar o destruir estos radicales libres. El desbalance entre ERO y antioxidantes tras la acción de una determinada noxa que estimule la producción de radicales libres o genere destrucción o consumo de los antioxidantes, conocido como estrés oxidativo (239), ha sido estudiado a nivel experimental. Estudios previos han demostrado un cambio del balance en la relación prooxidación/antioxidación en ratas con obstrucción biliar, con el subsiguiente desarrollo de estrés oxidativo y reducción en los mecanismos antioxidantes (240-242).

Las células pueden tolerar estados oxidativos leves, pero cuando este proceso se exagera puede afectar al metabolismo celular originando rotura de moléculas de ADN, daño de proteínas y/o peroxidación de lípidos. Por tanto, el metabolismo aeróbico implica la producción de ERO incluso en condiciones basales. Estas atacan todo tipo de moléculas biológicas

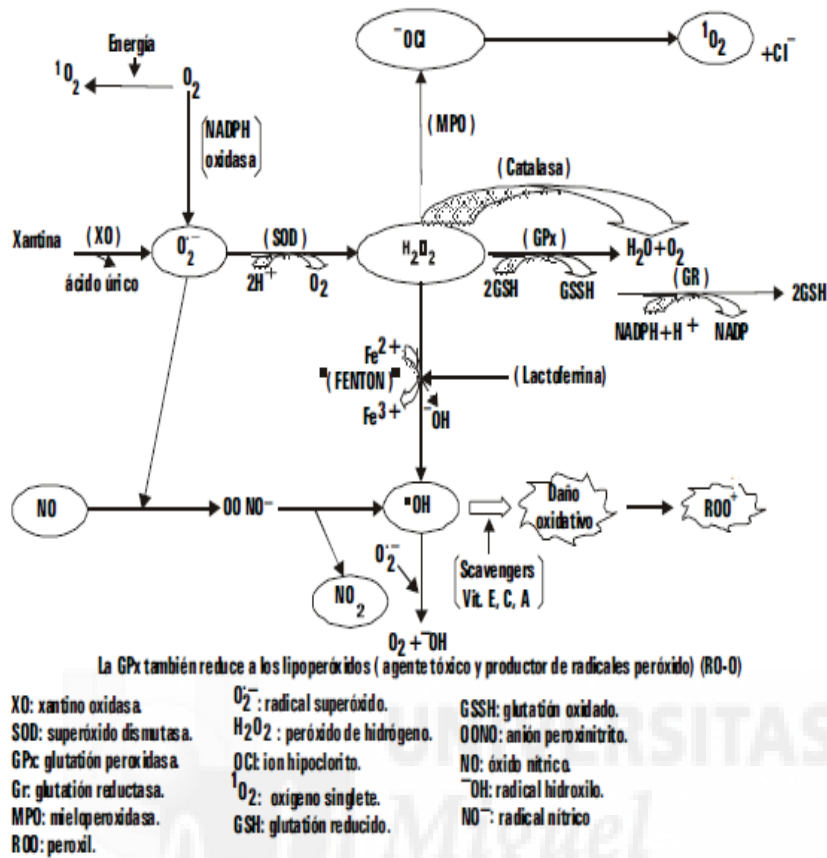


(sustratos lipídicos, proteínas, ADN, ...) induciendo su oxidación, originando nuevos radicales libres capaces de reaccionar con otras moléculas (243).

### **Especies reactivas de oxígeno:**

La producción de energía necesaria para su utilización en los múltiples procesos celulares requiere la participación del  $O^2$ , el cual es reducido de forma incompleta como aceptor de electrones, originando compuestos intermedios inestables, conocidos como ERO, capaces de producir daño sobre estructuras celulares, particularmente sobre las membranas, proteínas, lípidos y ADN.

Los mecanismos que explican el daño inducido por los radicales libres son principalmente la activación del sistema monocito-macrófago y de neutrófilos. El anión superóxido generado actúa como agente proinflamatorio, capaz de reclutar neutrófilos, inducir liberación de factores quimiotácticos, TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral) e Interleucina 1 (IL-1), generando daño sobre el DNA e iniciando la PL. El radical hidroxilo es un potente radical libre (miles de veces más reactivo que el  $O^2$ ); produce daño principalmente sobre el ADN, proteínas y lípidos, induciendo PL y daño sobre membranas capaz de estimular la respuesta inflamatoria. El peroxinitrito se forma por la interacción entre  $O^2$  y óxido nítrico; perpetúa la acción del anión superóxido (244,308), actuando como agente proinflamatorio, inactiva la superóxido dismutasa, induce la PL y produce depleción de glutatión (Esquema 3) (245).



Esquema 3: Representación metabólica de las Especies Reactivas de Oxígeno.

### Peroxidación Lipídica (PL):

Una de las biomoléculas más sensibles al ataque de las ERO son los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de la membranas y son responsables, en buena medida, de la función de ésta, al mantener la integridad de la célula. Los AGPI son las moléculas biológicas más sensibles al estrés oxidativo y su degradación constituye la PL. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, pues la destrucción de la bicapa lipídica provoca un daño

estructural en la membrana con pérdida de permeabilidad y posteriormente destrucción celular; por tanto, la PL es el daño oxidativo, producido particularmente por el radical hidroxilo, sobre los AGPI de las membranas celulares (246), originando alteraciones en las propiedades de fluidez, el potencial y la permeabilidad de la membrana (247), conduciendo finalmente a la pérdida de la integridad de la misma. Inicialmente, un ácido graso se oxida hacia el radical hidroxilo que actúa como agente oxidante, produciéndose radical peroxilo, el cual, a su vez, perpetúa el proceso en cadena hasta finalizar en la muerte celular. Este daño sobre los lípidos puede determinarse a través de la medición de TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) en plasma, pudiendo participar también como marcadores de PL (248). Por lo tanto, la PL es un mecanismo bien conocido de daño celular que puede utilizarse como biomarcador de estrés oxidativo. Tras la descomposición de los AGPI de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetalqueno, como productos finales de reacción. Gracias a su determinación se puede cuantificar la PL y, por tanto, el estrés oxidativo en los organismos.

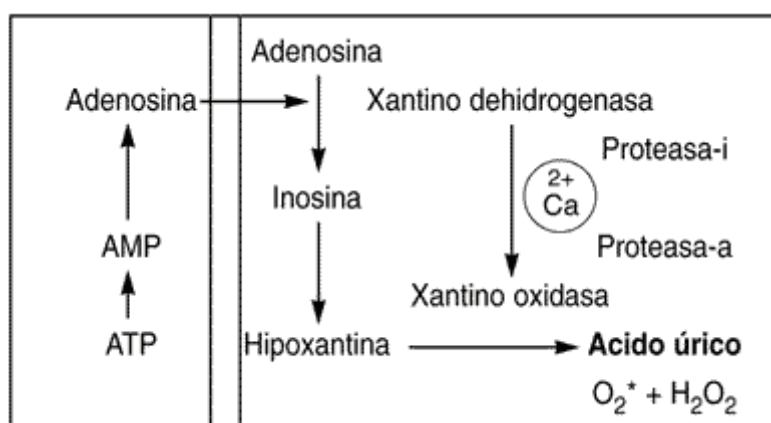
El aumento de radicales de oxígeno y productos tóxicos de degradación de la PL es un hallazgo que podemos encontrar a nivel plasmático en pacientes con enfermedad hepática colestática (249,250,291) y en modelos animales de enfermedad hepática (251), con acumulación de peróxidos lipídicos y MDA en hígado y otros tejidos extrahepáticos (252). El desbalance oxidativo/antioxidante y sus efectos deletéreos en órganos como el hígado puede minimizarse con el uso de sustancias antioxidantes a nivel experimental como mostró William Peres en un modelo experimental de rata con obstrucción biliar (253), en el cual la quercitina (sustancia

antioxidante) prevenía la PL al atenuar el depósito de colágeno y la fibrogénesis hepática. En modelos de rata con ligadura del tracto biliar, se demuestra un estrecho vínculo entre la PL y la activación de células inflamatorias, así como una posible correlación lineal entre el depósito de colágeno en hígado y la producción de MDA (16).

### **6.1. Hipertensión Portal y PL:**

La hipertensión portal, aislada o consecuencia de disfunción hepática, se caracteriza por el incremento patológico de la presión portal y la formación de una red de colaterales portosistémicas, derivando el flujo portal a la circulación venosa sistémica (255,256). La HTP también incrementa el flujo sanguíneo en la microvascularización intestinal, pero este fenómeno se asocia con una disminución de la presión arterial del 41-51%, originando fenómenos intermitentes de hipoperfusión de la mucosa intestinal y alteraciones en la oxigenación tisular (257); en estas circunstancias de hipoxia intermitente y reoxigenación, la enzima Xantino Oxidasa (XO) inactiva se activa por mediación de la Xantino Deshidrogenasa (XDH) (258-260), originando un estado aumentado de activación y/o conversión de la XO bajo condiciones de hipoxia tisular (261,262).

La XO y XDH son enzimas citoplasmáticas existentes de forma individualizadas pero en formas interconvertibles, siendo el intestino y el hígado los lugares con más alta actividad de estas dos enzimas (263). En condiciones fisiológicas, ambas enzimas degradan la fosfatasa alcalina a urato tras conversión de la hipoxantina a ácido úrico (**Figura 1**) (263).



**Figura 1:** Síntesis de ácido úrico y generación de radicales libres como productos de la acción de la XO en el metabolismo de las purinas.

Normalmente, la XDH representa el 80-96% de la forma enzimática, constituyendo en forma de XO sólo el 4-20% (265). En determinadas condiciones patológicas (isquemia, infección), se produce un aumento de la conversión de la XDH a la XO, originándose ERO tales como radicales de  $O_2^{\bullet}$ , aniones superóxidos y peróxidos de hidrógeno. Estas ERO tienen efectos citotóxicos a través de la peroxidación de los componentes lipídicos de las células epiteliales y las membranas mitocondriales, las cuales contienen la más elevada concentración de AGPI (266,267). Además, estas ERO tienen acción quimiotáctica sobre polimorfonucleares neutrófilos, induciendo extravasación de neutrófilos desde el torrente circulatorio a los tejidos, provocando más daño tisular debido a su capacidad de liberar sustancias tóxicas y activación de mediadores inflamatorios como citocinas (268,269). Varios estudios han documentado que la inhibición o inactivación de la vía XDO/XO en condiciones patológicas disminuye la génesis de ERO y, por extensión, el daño tisular (266,270,271). De hecho, la inhibición competitiva de la XO mediante Alopurinol en casos de HTP y ligadura biliar experimentales disminuyó la incidencia de TB, PL a nivel de la mucosa

intestinal y la migración de neutrófilos (144). La inactivación de la vía XDH/XO mediante suplementación de tungsteno en la dieta produjo una disminución significativa de la TB en ratas con HTP e ictericia obstructiva por ligadura doble del conducto biliar, apoyando la hipótesis fisiopatológica de que la presencia de niveles elevados de XO en mucosa intestinal puede contribuir al fallo en su función de barrera y facilitar la TB por producción de ERO, activación de citocinas y quimiotaxis de neutrófilos; la inactivación de la XO parece relacionarse con efectos beneficiosos sobre la función hepática en la colestasis crónica. El grupo de animales con doble ligadura que recibió dieta suplementada con tungsteno presentó niveles de enzimas hepáticas (Bilirrubina, GOT y GPT) significativamente más bajos que el grupo con ligadura sin suplementación (143). Estos hallazgos sugieren que la distribución heterogénea de la XDH y XO a nivel hepático (no solamente en intestino), puede contribuir al daño hepatocelular en la colestasis crónica (274,275).

## **6.2. Peroxidación Lipídica y Traslocación Bacteriana:**

El estrés oxidativo tiene efectos citotóxicos (276) (a través de la PL de las células epiteliales y las membranas mitocondriales) y quimiotácticos para neutrófilos induciendo su extravasación a los tejidos (144,268,277). La acumulación tisular de MDA en el tracto digestivo es indicativo de la existencia de fenómenos amplios de PL (280) y se ha asociado con daño epitelial y fallo de la barrera intestinal (274,282), factores ambos relacionados con la TB. Es conocido el importante papel que juegan los radicales libres de  $O^2$  en el daño epitelial de la mucosa intestinal, alterando la función de barrera anatómica y facilitando la TB. Uno de los más

importantes mecanismos de acción de estos radicales libres a nivel intestinal es vehiculizado a través de la XO. En el modelo experimental de rata cirrótica por administración intragástrica de CCl<sub>4</sub> (282) se observó niveles de actividad de XO a nivel intestinal prácticamente indetectables, actividad XDH significativamente disminuida y actividad de la Adenosina desaminasa (sustancia dadora de sustratos para la XO) incrementada de forma significativa. Cuando se midió parámetros de estrés oxidativo en la mucosa, se observó un incremento significativo de la PL (aumento en el MDA) en comparación con los animales control. Disponemos de mucha menos información sobre los fenómenos de PL que acontecen a nivel plasmático, hepático y en el bazo.

La barrera mucosa del intestino representa un importante componente funcional en estrecho contacto con el contenido intestinal intraluminal (incluyendo metabolitos procedentes del hígado). El estrés oxidativo se relaciona con procesos de fibrogénesis y muchos agentes que originan fibrosis estimulan procesos oxidativos de forma directa o a través de mediadores inflamatorios. En el contexto de la cirrosis establecida, el desarrollo de estrés oxidativo a nivel intestinal puede ser consecuencia directa de la producción en la mucosa de ERO o bien de forma indirecta por la génesis de inductores a nivel hepático y transportados a la luz intestinal a través de la bilis (273).

Los ácidos biliares son prooxidantes, causan daño directo tisular oxidativo mediante la activación *in situ* de los macrófagos titulares, liberando radicales libres (273). En este contexto, la elevación de ácidos biliares a nivel plasmático e hígado podría ser el inicio del proceso de PL en modelos animales con enfermedad hepática colestática.

En modelos experimentales de cirrosis se ha demostrado la existencia de estrés oxidativo a nivel de la mucosa de intestino delgado con incremento de actividad de la XO y de los fenómenos de PL en la mucosa (282). Por otra parte, el fracaso inmunológico para eliminar las bacterias traslocadas que ocurre en la cirrosis, se acompaña de la liberación de citocinas proinflamatorias por endotoxinas (134,288). La producción en cascada del factor de TNF- $\alpha$  y NO estimulada por endotoxinas agravaría el daño oxidativo a nivel del epitelio intestinal (289). De todos los factores conocidos involucrados en la patogenia de la TB, parece ser que la alteración en la flora intestinal es de mayor relevancia que el daño mucoso y la alteración de la permeabilidad intestinal (74,291).

### **6.3. Sales Biliares:**

Las sales biliares poseen efectos inhibitorios sobre la proliferación de microorganismos entéricos y podrían prevenir infecciones del tracto biliar ejerciendo un control de la flora bacteriana a nivel intestinal (111). Se ha detectado que a concentraciones fisiológicas y a nivel experimental inhiben el crecimiento de bacterias entéricas tales como *E. coli*, *Klebsiella spp* y *Enterococos spp*. En términos generales, este efecto inhibitorio parece ser más significativo para bacterias GP que para GN (44,100). En la práctica clínica, este efecto inhibitorio ha sido utilizado en la elaboración de cultivos selectivos para el aislamiento de organismos específicos (*Salmonella*, *Shigella* y *Bacteroides*) (41).

Las endotoxinas o LPS son un componente de la pared de las bacterias GN. La ictericia obstructiva se caracteriza por disminución de la



concentración de ácidos biliares a nivel intestinal y su aumento plasmático. Es decir, en los pacientes con enfermedad hepática colestática se produce acúmulo en plasma de ácidos biliares; estos pacientes son propensos a desarrollar endotoxemia e infecciones pues esta elevación de sales biliares puede ser causa de malfunción fagocítica del SRE (33,35), hecho este también demostrado a nivel experimental (30). Así pues, las sales biliares muestran un doble mecanismo en el desarrollo de endotoxemia en la colestasis; por una parte, las bajas concentraciones o su ausencia a nivel intestinal permite o facilita la absorción de endotoxinas, por otro lado, sus niveles séricos elevados producen un descenso o empeoramiento en la capacidad de aclaramiento de LPS por las células de Kupffer (28).

En modelos experimentales de rata con ligadura del conducto biliar, los niveles de ácidos biliares están incrementados entre 80-100 veces (292), se comportan como agentes prooxidantes y causan daño tisular directo mediante la génesis de ERO (293,294) o indirecta activando los macrófagos titulares para originar estrés oxidativo (277).

Los ácidos biliares también pueden acumularse a nivel intracelular mediante la unión con lipoproteínas de baja densidad (296). Estas pueden desempeñar un papel importante en el transporte intracelular en distintos tejidos extrahepáticos de ácidos biliares potencialmente tóxicos procedentes del plasma. Así, cuando la integridad de la circulación enterohepática se encuentra alterada como consecuencia de la existencia de shunts portosistémicos y/o paso a la circulación sistémica de estos ácidos biliares, generan ERO y daño tisular. Por otra parte, en la HTP y la ictericia obstructiva hay una importante alteración de la ecología bacteriana intestinal

y alteración de la mucosa intestinal. La formación de shunts portosistémicos, SBI como consecuencia de la ausencia intestinal de flujo biliar, la disminución en el aclaramiento bacteriano a nivel del SRE y el daño inmunológico son secuelas de la HTP y/o colestasis (297,298).

P. Ljubuncic (299) ha demostrado que en las ratas con doble ligadura y sección, en comparación con el grupo control, existía colestasis bioquímica y cirrosis histológica secundaria. Al estudiar fenómenos de PL en plasma y órganos extrahepáticos (riñón, cerebro, corazón), se observaron niveles más elevados de MDA en el grupo con ligadura respecto al control que era indicativo de un incremento de la PL. Los autores concluyeron que el estrés oxidativo producido en la enfermedad hepática colestásica no queda restringida al daño hepático sino que afecta a múltiples órganos y por consiguiente, la PL debe ser considerada como un fenómeno sistémico.

## **7. Modelos experimentales en el estudio de la cirrosis**

Los modelos experimentales utilizados con más frecuencia para el estudio de las complicaciones de la cirrosis son el modelo de rata con cirrosis inducida por  $\text{CCl}_4$  (300), la ligadura portal parcial calibrada (76) (modelo de HTP prehepática) y la ligadura del conducto biliar común (CBC) (297). Las ratas sometidas a oclusión experimental quirúrgica del CBC, utilizando la doble ligadura con/sin sección del conducto biliar, desarrollan endotoxemia y TB (302) tras la primera semana desde la ligadura, mientras que la fibrosis hepática puede no evidenciarse hasta las cuatro semanas desde la intervención (303). Comparado con el modelo del  $\text{CCl}_4$ , el modelo de ligadura del CBC se asocia con menor morbilidad y mortalidad (la cual

puede ser hasta del 70% en el modelo del CCl<sub>4</sub>) y con aparición más precoz a nivel hepático de los cambios funcionales e histológicos.

La ligadura del CBC se asocia con el desarrollo de alteraciones en la mucosa intestinal, más evidente a nivel de íleon distal, con edema, infiltrado inflamatorio moderado, disrupción a nivel de los desmosomas y formación de espacios laterales entre enterocitos (304). Se ha sugerido que estos hallazgos están relacionados inicialmente con la ausencia de bilis en la mucosa intestinal, provocando daño de la mucosa y TB, y no la obstrucción intestinal per se, ya que la incidencia de TB y edema subepitelial a nivel ileal es similar en el grupo de ratas sometidas a ligadura del CBC o derivación del CBC mediante bypass colédoco-vesical y más alto que en el grupo de ratas control o sham (305).

La utilización de modelos quirúrgicos más complejos y agresivos puede asociarse a un incremento de la mortalidad en los animales de experimentación. Las evidencias existentes sugieren que la TB ocurre de forma temprana a la noxa inferida y es causada por la ausencia de bilis a nivel de la luz intestinal más que por el daño hepático inducido por la propia ligadura. Así, para el estudio de las complicaciones de la cirrosis, parece razonable practicar procedimientos quirúrgicos experimentales más sencillos.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

La TB es la base patogénica de la PBE y para su investigación se usan modelos de Cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> o por ligadura doble biliar (LDB) quirúrgica, procedimientos validados en estudios previos para la investigación de la patogenia de las IB en la cirrosis (63-70,74,75,300). La LDB es el modelo quirúrgico estándar para el estudio experimental de la patogenia de las IB en la cirrosis, causa importante daño estructural hepático y conlleva alta mortalidad asociada a la técnica. No obstante, en la descripción de la LDB no queda bien establecida o descrita el nivel en el cual se realizan ambas ligaduras en el CBC, incluso si se procede a la sección posterior del mismo interligadura (144,192,194,198,202,223,306).

Nuestra hipótesis de trabajo, basada en la realización de una técnica quirúrgica más sencilla, como la práctica de una ligadura biliar simple (LSB) (306) realizada a nivel proximal, también se asociaría a fenómenos de TB en la misma medida que la LDB; pero con las ventajas que al tratarse de una técnica quirúrgica más simple, produciría un menor daño hepático y menor mortalidad, convirtiendo a este modelo en adecuado para su estudio.

## **OBJETIVO**

### **Primario:**

Evaluar la idoneidad del modelo de Ligadura Simple Biliar para el estudio de la Traslocación Bacteriana a lo largo de 4 semanas, con respecto a la Ligadura Doble Biliar.

### **Secundarios:**

Análisis comparado en ambos modelos de Ligadura Biliar, de las siguientes variables:

1. Peso y Mortalidad
2. Caracterización microbiológica a nivel intestinal y extraganglionar
3. Lesión hepática
4. Estrés oxidativo en suero e hígado y parámetros de Inflamación

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Características de los animales**

Se destinaron 82 ratas macho adultas Sprague-Dawley nacidas en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández de Elche, con un peso entre 231-446 g. Los animales fueron mantenidos individualmente en jaulas con fondo de rejilla para minimizar la coprofagia y el consumo del sustrato del lecho, a temperatura constante de 21 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 17-7 horas. Recibieron ad libitum agua y alimento diario en forma de pienso estándar para ratas. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Miguel Hernández conforme a la normativa para la investigación animal (Guide for the care and use of laboratory animals). Previo al inicio de la fase experimental, se destinaron 6 animales para adquirir las destrezas y habilidades necesarias, así como para familiarizarse con la anatomía y técnica quirúrgica en la recogida de las distintas muestras (Curva de aprendizaje).

### **2. Fase Experimental**

Los animales fueron divididos en 4 grupos: 1º) Un total de 20 animales se destinaron al grupo Control y fueron sometidos a una única intervención quirúrgica, extrayéndose las distintas muestras para el estudio. Este grupo fue necesario para calcular el porcentaje de ratas con TB fisiológica; 2º) Un grupo de intervención Ficticia (Sham) con 21 ratas que fueron sometidas a una primera laparotomía para la identificación y liberación del conducto biliar con pinzas atraumáticas, sin ligadura ni sección del mismo, con cierre

posterior de la laparotomía; 3°) El grupo de ratas destinadas a la LSB (N=19) en las que en la primera laparotomía se identificó y se ligó en una única ligadura el conducto biliar común con seda 000, sin sección posterior del mismo, a nivel proximal para minimizar al máximo la ligadura accidental del conducto pancreático y la consiguiente pancreatitis secundaria; y 4°) El grupo de LDB (N=22) en las que durante la primera intervención se realizó una doble ligadura con seda 000 a nivel proximal y sección del conducto biliar común entre ambas ligaduras. Los animales de cada grupo se repartieron de forma aleatoria en base a una temporalización semanal comprendida de 1 a 4 semanas, realizándose la segunda laparotomía (excepto grupo Control) conjuntamente con sus correspondientes grupos de Control. En la **Tabla 1** se resumen los datos de los grupos según la secuencia temporal.

Nº SEMANAS:	1ª SEMANA	2ª SEMANA	3ª SEMANA	4ª SEMANA
GRUPO:	N			
CONTROL (N=20)	5	5	5	5
SHAM (N=21)	5	5	6	5
LSB (N=19)	6	4	5	4
LDB (N=22)	6	7	5	4

**Tabla 1:** Total de animales (82 ratas) distribuidos según el grupo y la semana de sacrificio.

Todos los ejemplares, con independencia del grupo asignado, se sacrificaron cada semana en número de 5 ó 6 según correspondiese para los grupos control y de intervención ficticia, y en grupos de 4 a 7 para los grupos con

ligadura biliar. De los animales a estudio, en 41 se procedió a la ligadura biliar en sus dos modalidades.

### **3. Procedimiento prequirúrgico:**

Los animales destinados a la cirugía, en jaulas individuales, fueron alimentados a primera hora de la mañana (no después de las 10:00) y posteriormente sólo recibían agua ad libitum.

Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron a partir de las 16:00 horas. Cada animal se pesó utilizando la misma báscula estándar, previa calibración en cada una de las sesiones. Se preparó la solución anestésica con Ketamina y Diazepam en dosis calculada según el peso para su administración intraperitoneal. Con el concurso de dos personas, se procedió a anestesiarse a la rata; la primera persona sujetaba al animal por debajo de las patas delanteras asiéndola desde detrás y, con la otra mano, sujetaba las patas traseras para colocar finalmente el animal en posición horizontal y supino. La segunda persona se encargaba de la administración intraperitoneal de la dosis calculada mediante jeringa de 2 cm<sup>3</sup> y aguja subcutánea. Se volvió a depositar el animal en la jaula correspondiente. Anestesiado el animal, se le rasuraba el abdomen con una cortapelos eléctrica y se fijaba a la mesa quirúrgica mediante esparadrapo en tres patas.

Se trabajó con un mínimo de 4 personas, dos de ellas para realizar la cirugía y las otras dos para recoger las muestras, identificarlas, clasificarlas y aislar heces.



### **Material quirúrgico, de laboratorio y medicación necesaria:**

Material inventariable: 4 juegos de cajas quirúrgicas estériles (mediante autoclave) con 2 juegos de material cada una, consistente en: hojas de bisturí (número 11) y mangos acoplables [2], separadores automáticos indentados [2], pinzas cortas traumáticas [2] y atraumáticas [2], pinzas de relojero [2], tijeras curvas de disección cortas [4], pinzas cortas de hemostasia [4], tijeras rectas normales cortas [2] y largas [2]. Paños verdes estériles fenestrados [2] y paquetes de gasas estériles.

La extracción de muestras y las determinaciones realizadas en los animales de experimentación fueron las siguientes:

#### **Bioquímicas:**

\* Tubo EDTA 2 ml con sangre (0.5 ml) para determinación de MDA y capacidad total antioxidante sérica.

\* Bote estéril conteniendo un fragmento de hígado para determinación de MDA y capacidad antioxidante.

\* Un tubo de sangre con Heparina Litio para cultivo y determinación de citocinas.

#### **Microbiología:**

\* Bote estéril para recogida de nódulos linfáticos (228). Cultivo de nódulos linfáticos, bazo, hígado, sangre portal y sangre de cava inferior (identificación de TB).

\* Bote previamente pesado (báscula alta precisión) con medio de transporte estéril conteniendo bazo.

- \* Bote estéril con la cuarta parte del hígado.
- \* Bote estéril con heces aisladas de íleon terminal y ciego (detección de SBI).
- \* Tubo EDTA con sangre portal (0.5-1 ml).
- \* Tubo EDTA con sangre Vena Cava Inferior (0.5-1 ml).
- \* Escobillado peritoneal realizado sobre peritoneo parietal y visceral en medio de cultivo (control de esterilidad del método).

### **Anatomía Patológica:**

Para tipificar las lesiones hepáticas en las dos modalidades de ligadura biliar realizadas, utilizamos el sistema de categorización empleado por Kountouras (306), que define 5 estadios: 0, histología normal; I, mínima o sutil proliferación ductal (PD) y limitada a espacio porta; II, PD leve-moderada en espacio porta y parénquima; III, PD severa que conforma nódulos incompletos y causa una desestructuración arquitectural hepática; y IV, PD que delimita claros nódulos fibróticos hepatocitarios.

Las distintas muestras histológicas se han recogido en bote con formol para estudio morfológico del hígado, realizando un análisis cuantitativo/semicuantitativo de la fibrosis con la tinción eosina-hematoxilina a 50 y 100 aumentos.

Otras determinaciones:

- \* Determinación de TNF $\alpha$  en sobrenadante de cultivos de sangre total en situación basal, a las 24 horas sin estimulación y a las 24 horas tras estimulación con la asociación al medio de cultivo de LPS y PHA.

- \* Estudio de citocinas en cultivos de sangre total.
- \* Peso del animal (previo a cada intervención) y del bazo como indicadores indirectos de HTP (144).

#### **4. Protocolo Quirúrgico:**

Los animales fueron identificados con un código según el grupo al que pertenecían y la semana de sacrificio correspondiente.

Antes de la intervención quirúrgica, las ratas se mantuvieron en el animalario del Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández, a una temperatura ambiente de 25°C y con un ciclo luz-oscuridad de 17-7 horas.

Se pretendió conseguir que el ambiente en que se encontraban los animales de experimentación fuera el más estable posible, procurando un clima silencioso, evitando en lo posible ruidos y maniobras bruscas que provocasen niveles de excitabilidad o nerviosismo excesivos. De esta manera se facilitó el acto anestésico y se disminuyó el estrés que dicho acto lleva implícito debido a la manipulación del animal.

Para evitar interferencias derivadas de la digestión alimentaria, las ratas permanecieron en ayunas 6-8 horas previas al experimento (excepto ingesta a demanda de agua). Se pesó al animal para ajustar de forma precisa la dosis de anestesia que iba a ser necesaria.

##### **4.1. Metodología anestésica:**

Se ha utilizado Ketamina 50mg/ml, ampolla 10 ml ( Ketolar® de Parke Davis S.A., Barcelona. España ) y Diazepam 10mg, ampolla 2 ml ( Valium

® de Roche S.A., Basilea . Suiza ) a las dosis de 116,66 mg/Kg y 3,33 mg/Kg respectivamente, disueltas en suero fisiológico.

Para ello se preparó una solución compuesta por 7 ml de Ketamina, 2 ml de diazepam y 1 ml de suero fisiológico, obteniéndose así una solución de 10 ml de la que administra 3,33 ml/Kg, lo cual supone 1 ml para una rata de 300 g, calculándose el volumen para otros pesos mediante el cálculo de la proporción adecuada. Como dosis de refuerzo se aplicó  $\frac{1}{3}$  o  $\frac{1}{2}$  de la dosis inicial, según lo requiriera el estado del animal para conseguir la anestesia. La dosis inicial se administró por vía intraperitoneal y la de refuerzo por vía subcutánea o intramuscular, ya que la dosis de refuerzo no debía administrarse vía intraperitoneal en caso de ser necesario (prolongación acto quirúrgico por ejemplo) pues al tener la cavidad abdominal expuesta podrían existir problemas de absorción debido a pérdidas.

La aplicación del anestésico por vía intraperitoneal se realizó cogiendo delicadamente al animal de experimentación despierto con la mano izquierda protegida por un grueso guante de tela, de tal forma que el pulgar quedaba dispuesto debajo de la parte media del abdomen y los otros cuatro dedos abarcaban el dorso del animal en su porción más craneal. Una vez así y presionando suavemente la mano contra la rata, se giraba la mano izquierda de forma que el dedo pulgar subía y bajaban los otros dedos exponiendo así el abdomen del animal, al cual se le administró con la mano derecha la solución anestésica, previamente cargada, por punción realizada en la porción caudal del abdomen, mediante jeringuilla de 1 ml con aguja intradérmica. Toda esta maniobra se realizó con mucha suavidad y tacto para paliar en la medida de lo posible la excitación del animal, lo cual conllevaba

una mayor dificultad de esta maniobra y un aumento del estrés. Otra técnica utilizada en el procedimiento anestésico, cuando se trataba de una única persona para manipular el animal, consistió en sujetar al animal por el lomo con la mano izquierda enguantada, estando éste en posición normal sobre la mesa, aplicar sujeción y leve presión a la vez que se enlazaba con el pulgar izquierdo su cola, y se evertía ligeramente el abdomen; de esta forma, conteniendo en la mano derecha la jeringa previamente cargada con la dosis anestésica calculada, se le administró a nivel intraperitoneal.

Anestesiada la rata, se procedía al rasurado de su región abdominal y se colocaba sobre la mesa de intervención, procediendo a fijar las extremidades y cola con esparadrapo. Nosotros decidimos fijar la cola, las extremidades inferiores y la extremidad superior derecha, dejando libre la extremidad superior izquierda con la finalidad de optimizar la funcionalidad pulmonar.

Con todo lo anterior, ya se tenía al animal de experimentación preparado para esterilizar el campo quirúrgico con Povidona Yodada, colocar paños estériles con uno central fenestrado y proceder a la intervención con las medidas asépticas habituales.

#### **4.2. Intervención quirúrgica:**

**a) Primera intervención:** Grupos B, C y D (Sham, LSB y LDB) (**Figura 2**).

Esterilización y aislamiento de la cavidad abdominal rasurada con Povidona Yodada y paños de campo verdes estériles respectivamente.

Laparotomía media cráneo-caudal subxifoidea con bisturí frío, de unos 3 cm de extensión en la primera intervención (sham o ligadura biliar en sus dos modalidades) y de unos 5-6 cm en las reintervenciones y los grupo de control.

Identificación del CBC y referenciación del mismo con pinza de relojero (sham), sin ninguna otra maniobra; ligadura simple con seda 3/0 o ligadura doble con seda 3/0 y sección. La ligadura se acordó realizarla lo más proximal posible con la intención de no provocar pancreatitis en caso de ligadura distal.

Cierre estéril de la laparotomía con cierre en bloque de la pared abdominal con seda de 2/0 y sutura de la piel con seda 3/0. Se deposita el animal intervenido en su jaula correspondiente y se transporta a la zona correspondiente en el animalario en condiciones de alimentación basales.

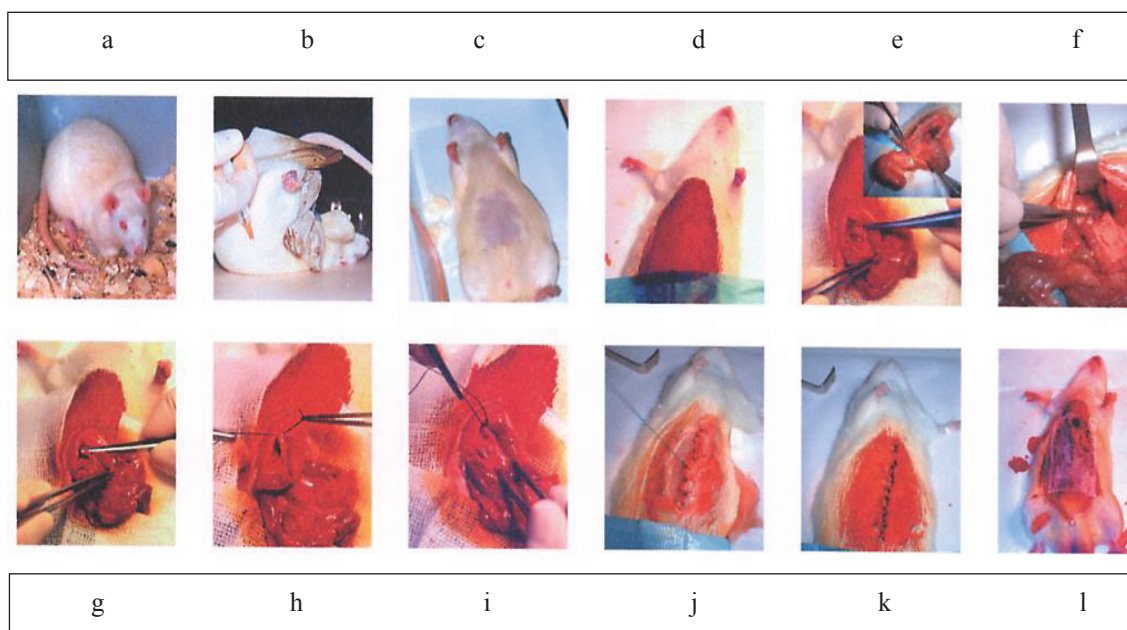
**b) Reintervención:** Grupos B, C y D (Sham, LSB y LDB).

En función del grupo y la semana asignada, se procede, previo a la cirugía, al mismo procedimiento de aislamiento del animal y restricción alimentaria descrito con anterioridad. Se pesan de nuevo cada animal y se anestesia con la técnica habitual. Tras la laparotomía, la primera maniobra en la recogida de muestras es el escobillado peritoneal para cultivo (medida de calidad de asepsia o contaminación). A continuación, se identifican y se disecan los ganglios linfáticos mesentéricos identificados (mínimo 6), depositándolos en bote estéril preparado para estudio microbiológico. Se identifican las venas Porta y Cava Inferior, procediendo, en el mismo orden, e extracción por venopunción directa, de 1 cc de sangre en jeringa estéril de 2 cc con aguja

subcutánea (cultivos de sangre). Se procede a hemostasia de los puntos de venopunción mediante compresión directa con gasa estéril durante 1 ó 2 minutos, comprobándose la efectividad de la maniobra. Se obtienen, mediante excisión con bisturí frío, 3 bloques de hígado para cada uno de sus correspondientes botes y estudio. Se realiza esplenectomía y colocación en su bote de muestra correspondiente. Mediante 2 pinzas de hemostasia, se clampa a nivel de íleon terminal, 2-3 cm proximal al ciego, y a nivel distal 1 cm distal al ciego con otras 2 pinzas hemostáticas, procediendo a la sección entre ambas pinzas, en cada uno de los extremos, con una nueva hoja de bisturí frío. La pieza se saca en bloque para la recogida de heces del ciego y el correspondiente estudio. El campo quirúrgico que queda, al ser contaminado tras la resección intestinal, se aísla con gasas estériles y se retira todo el instrumental utilizado hasta ahora, sustituyéndose por nuevo material estéril. Se realiza esternotomía media y corte del hemidiafragma izquierda para una óptima exposición cardíaca. Con jeringa de 5 cc y aguja intramuscular, se procede a punción cardíaca y extracción entre 4-5 cc de sangre, con éxitus del animal por exanguinación intracardíaca quirúrgica.

**c) Procedimiento quirúrgico único:** Grupos A (Control).

Con los mismos cuidados y preparación prequirúrgica, se procede a la recogida de muestras en un único acto quirúrgico. Los grupos control son simultaneados con sus homólogos de ligadura para cada una de las semanas correspondientes, con una diferencia de 24 horas entre los mismos grupos para la realización de la cirugía y consiguiente toma de muestras.



**Figura 2.** Panel Resumen del procedimiento de anestesia y cirugía en la primera intervención siguiendo la secuencia temporal: a, b y c (rata Sprague Dawley macho adulta, con administración intraperitoneal del anestésico y rasurado con maquinilla eléctrica convencional); d (esterilización campo quirúrgico tras fijación a mesa quirúrgica); e (identificación GLM y su exéresis posterior. Detalle); f (identificación del CBC); g (tunelización del CBC en Grupo Sham); h (ligadura única en el Grupo de LSB); i (Ligadura doble previa a sección en el Grupo LDB); j y k (cierre con puntos sueltos del plano preperitoneal y de la cavidad abdominal); l (colocación apósito de protección).

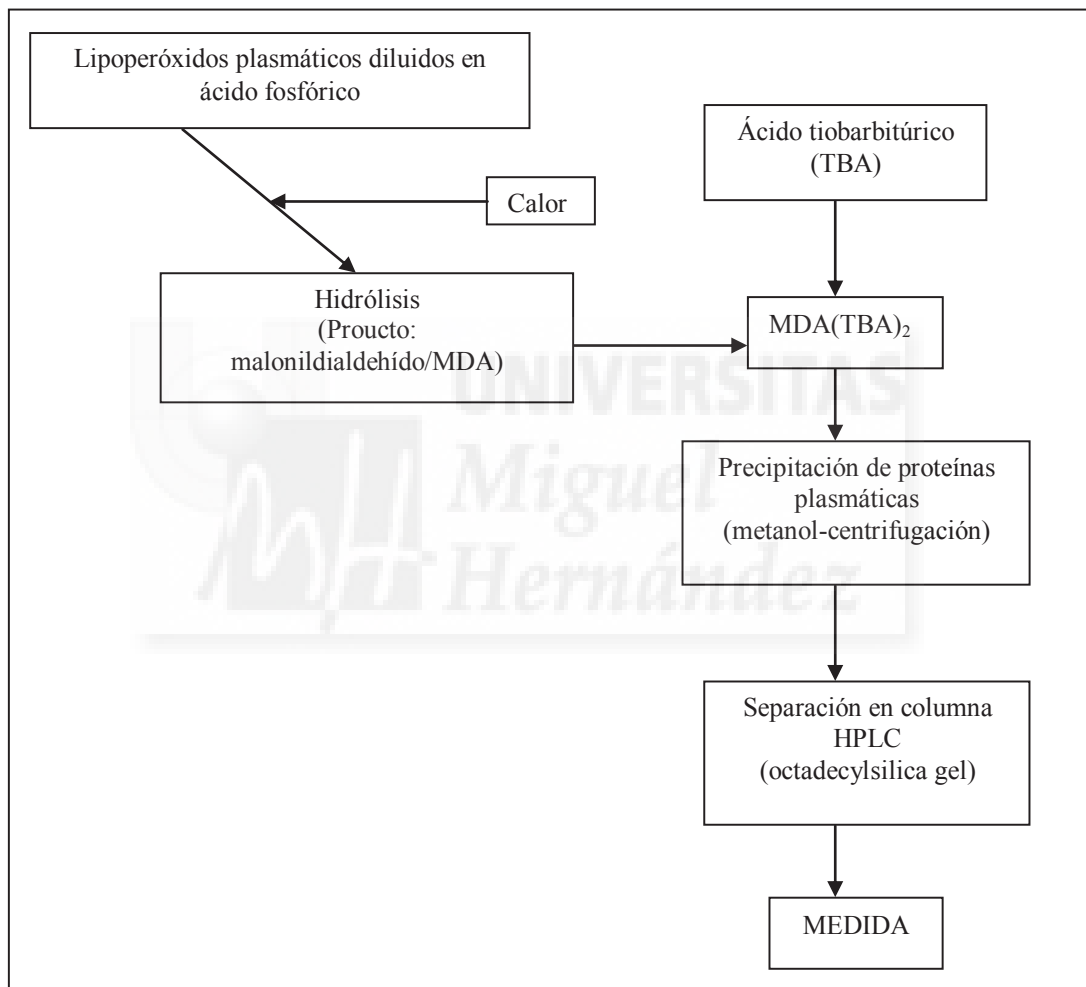
### **Recogida de muestras microbiológicas:**

Durante la laparotomía, después de obtener las muestras para el estudio de la TB, se identificó el íleon y ciego, y bajo condiciones de estricta asepsia, se recogieron en tubo cerrado y estéril muestras de heces del ciego para remitir y procesar en bacteriología. Las muestras se incubaron durante 48 horas en medio no selectivo tras inoculación de 0,1 ml de contenido cecal



y mediante técnicas estándar se identificó la flora aislada. El resultado se expresó en UFC/ml de contenido cecal.

**5. Determinación de los peróxidos lipídicos (193) en plasma utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC): Principio de la técnica (Esquema 4)**



Referencia de calibración – tetraethoxypropano (TEP): cuando se hidroliza origina cantidades estequiométricas de MDA.

### Preparación de reactivos y materiales:

- 1) Solución de ácido fosfórico 0,44 mol/L.
  - Diluir 10 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- 2) Solución de TBA 42 mmol/L.
  - Disolver 0,6 g de TBA en 80 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada calentando la solución a 50-55 °C.
  - Enfriar la solución a 25 °C.
  - Diluir la solución hasta 100 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
  - Almacenar a temperatura ambiente (estabilidad durante 2 semanas).
- 3) Solución de Etanol 400 mL/L.
  - Diluir 420 mL de etanol 95% a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- 4) Solución estándar TEP.
  - En un matraz de 25 mL, diluir 50 mL de TEP hasta enrasar a 25 mL con etanol 400 mL/L. Almacenar a 4 °C (estabilidad durante 1 mes).
  - Para preparar una solución estándar intermedia, tenemos que pipetear 0,5 mL de la solución estándar TEP en un matraz de 100 mL y enrasar a 100 mL con etanol 400 mL/L.
  - Para preparar las soluciones estándar de TEP de cada sesión de trabajo (almacenar a 4 °C; estabilidad durante 1 semana).

Solución (mmol/L)	Matraz (mL)	Vol de TEP (mL)	Enrasar los 25 mL con $\text{H}_2\text{O}$ destilada
-------------------	-------------	-----------------	--

0,61	25	0,375	“
1,22	25	0,75	“
2,43	25	1,5	“
4,86	25	3,0	“

5) Solución Metanol-NaOH.

- Preparar una solución NaOH 1 mol/L.
- Pipetear 4,5 mL de la solución NaOH 1 mol/L en un matraz de 50 mL y enrasar con metanol Procedimientos. Almacenada en una botella de polietileno a 4 °C es estable por tiempo indefinido.

6) Buffer fosfato potásico, 50 mmol/L, pH 6,8

- Disolver 13,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1,6 L de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada aproximadamente y titular a un pH de 6,8 con una solución 1 mol/L KOH.
- Completar hasta 2 L con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y filtrar usando un filtro de policarbono (0,45 micras de diámetro de poro).

7) Fase móvil.

- Se preparan 2 mezclas Metanol/Agua (degasificadas y agua filtrada) de 400 mL/600 mL y 800 mL/200 mL.

Preparación de muestras de sangre de rata.

- 1) Se recogen 0,5 mL por venopunción en tubos con  $\text{K}_2\text{EDTA}$  (0,75 mg de  $\text{K}_2\text{EDTA}$  seco).
- 2) Centrifugar la sangre (900 x g, 20 minutos).

**5.1. Procedimientos:**

**A) Hidrólisis y reacción con TBA.**

Para cada análisis se deben preparar los siguientes tubos por duplicado (tubos de 13 mL) → Blancos, Estándares TEP y Muestras de plasma.

- 1) Pipetear 750 mcL de solución de ácido fosfórico 0,44 mol/L en cada tubo de 13 mL.
- 2) Pipetear 50 mcL de solución estándar TEP en los tubos estándares TEP y 50 mcL de la muestra de plasma en los tubos Muestras de plasma.
- 3) Agitar todos los tubos en el vórtex.
- 4) Añadir a todos y cada uno de los tubos, 250 mcL de la solución de TBA 4,2 mmol/L.
- 5) Añadir H<sub>2</sub>O destilada.
  - 500 mcL en los tubos blancos.
  - 450 mcL en los tubos Estándares TEP y Muestras de plasma.
- 6) Cerrar los tubos y colocarlos en un baño de agua caliente a 100 °C durante 60 minutos.
- 7) Preparar tubo de polipropileno de 2 mL con 500 mcL cada uno de la solución Metanol-NaOH.
- 8) Diez minutos como máximo antes de la medida, se pipetea 500 mcL de cada muestra caliente en un tubo de polipropileno de 2 mL con solución Metanol-NaOH. Se cierra el tubo, se agita en el vórtex y se centrifuga (9500 x g, 5 minutos) para sedimentar las proteínas plasmáticas precipitadas.
- 9) Pasar los tubos a un baño de agua helada (0 °C) hasta que se realiza el análisis en el equipo de HPLC (en menos de 10 minutos).

## **B) Medida HPLC. Lavado y regeneración del sistema y columna.**

- 1) Antes de empezar el procedimiento, debe inyectarse Metanol/Agua (80/20 v/v) para lavar el loop (10 mL aproximadamente).

- 2) Equilibrar con fase móvil a un flujo de 2 mL/min durante al menos 30 minutos.
- 3) Inyectar muestras de 50 mcL con las siguientes condiciones.
  - Tiempo de registro: 10 minutos.
  - Longitud de onda: 532 nm.
  - Tiempo medio de retención de MDA-TBA: 4,2 minutos.
  - Se mide la altura de pico (curva de calibración con blancos y estándares TEP): el resultado obtenido se mide en mcmol/L de MDA.
- 4) Lavado y regeneración de la columna y el sistema. La columna y precolumna se lavan siguiendo los siguientes pasos.
  - Eliminar la columna y precolumna.
  - Lavar el sistema de inyección:
    - \* 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
    - \* 10 mL de metanol.
    - \* 10 mL de solución de ácido nítrico (5mol/L).
    - \* 10 mL de metanol/agua (40/60 v/v).
  - Reconectar la columna de HPLC, sin la precolumna, y regenerarla bombeando secuencialmente metanol/agua en pases de 30 minutos a un flujo de 2 mL/min:
    - 40/60 v/v
    - 80/20 v/v
    - 40/60 v/v

### **C) Lavado de los tubos**

- Tratar con una solución TBA-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> preparada de la siguiente manera:

- 300 mL de ácido fosfórico diluido
- 100 mL de solución TBA
- 200 mL de agua destilada

- Los tubos se cierran llenos de la solución y se colocan en un baño de agua caliente durante 1 hora.

Hemos estudiado el comportamiento del MDA a nivel del suero e hígado, comprobando que los resultados no siguen una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0,0001$ ), por lo que para el análisis estadístico se ha utilizado un contraste no paramétrico (U de Mann-Whitney).



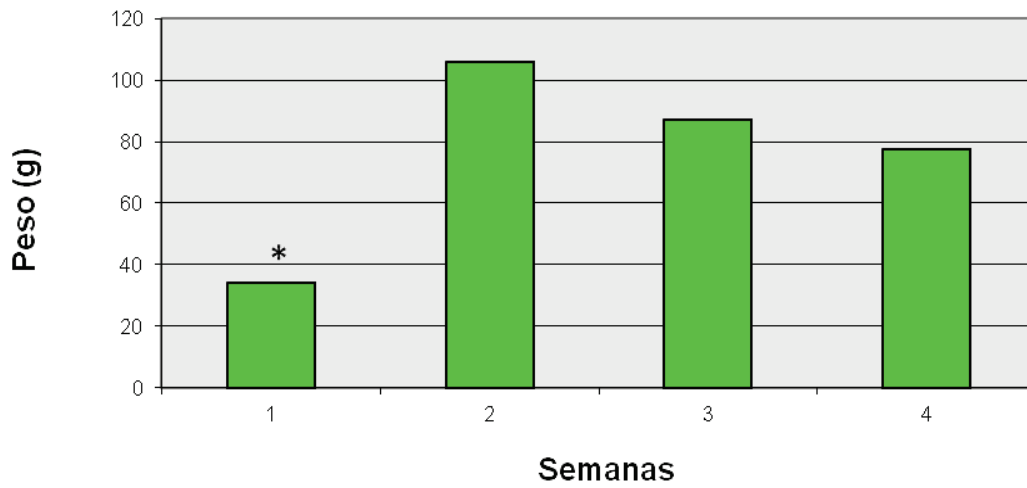
## RESULTADOS

### 1. Animales incluidos en el estudio: Evolución del peso.

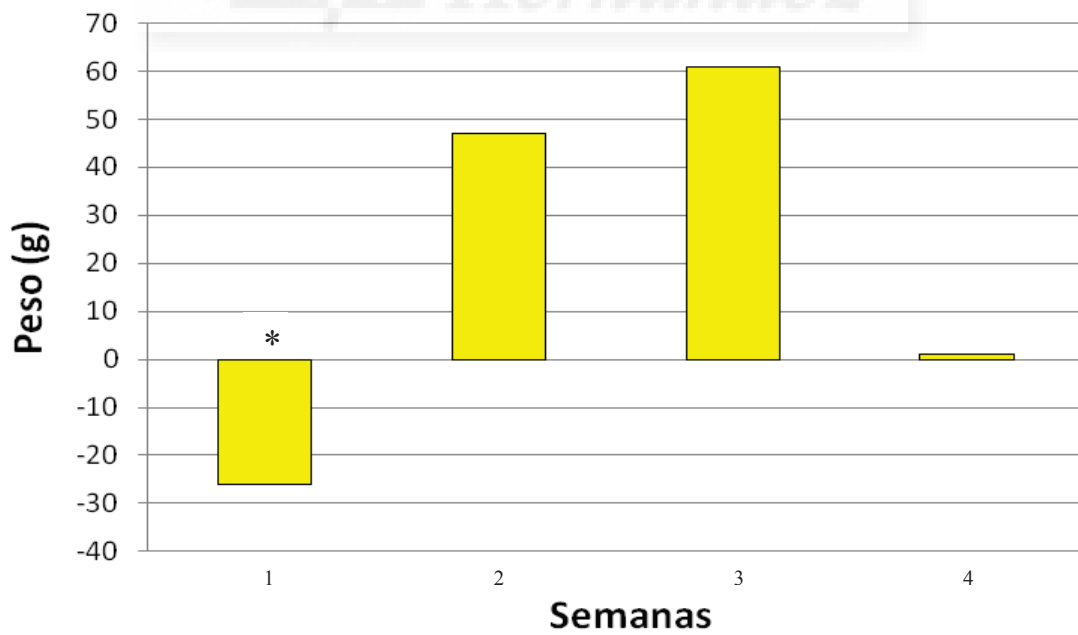
En el estudio se han incluido 76 ratas macho adultas con una mediana de peso basal de 330 g (rango intercuartil de 231-430 g) distribuidos en los distintos grupos de estudio. Los animales del grupo Control sólo se han pesado al inicio del estudio (Mediana de peso 317 g. Rango intercuartil 272-340 g). Se dispone de la evolución a lo largo del tiempo de los pesos en los grupos Ficticia, LSB y LDB.

En la **Figura 3** se representan los pesos de los animales a lo largo del estudio dependiendo del grupo al que pertenecen. Observamos que en los animales del grupo Ficticia, en la 1ª semana tras la cirugía hay un incremento mínimo del peso (Mediana del  $\Delta$  de +34 g), comparado con la ganancia de peso significativa observado a partir de la 2ª semana (Mediana del  $\Delta$  de +106,+87 y +77,5 g respectivamente para las semanas 2ª a 4ª). Sin embargo, en los animales con LSB hay un decremento significativo respecto al peso basal en la 1ª semana (Mediana del  $\Delta$  de -26g); durante la 2ª y 3ª semanas del estudio se incrementa el peso (Mediana del  $\Delta$  de +47 y +61 g respectivamente) y no se continúa en la 4ª semana (Mediana del  $\Delta$  de +1g). En los animales con LDB, hay un decremento significativo de peso en las primeras 2 semanas, principalmente la 1ª (Mediana de  $\Delta$  de -22 y -1 g respectivamente para las semanas 1ª y 2ª), con incremento del peso a partir de las semanas 3ª y 4ª (Mediana del  $\Delta$  de +49,5 y +52 g respectivamente).

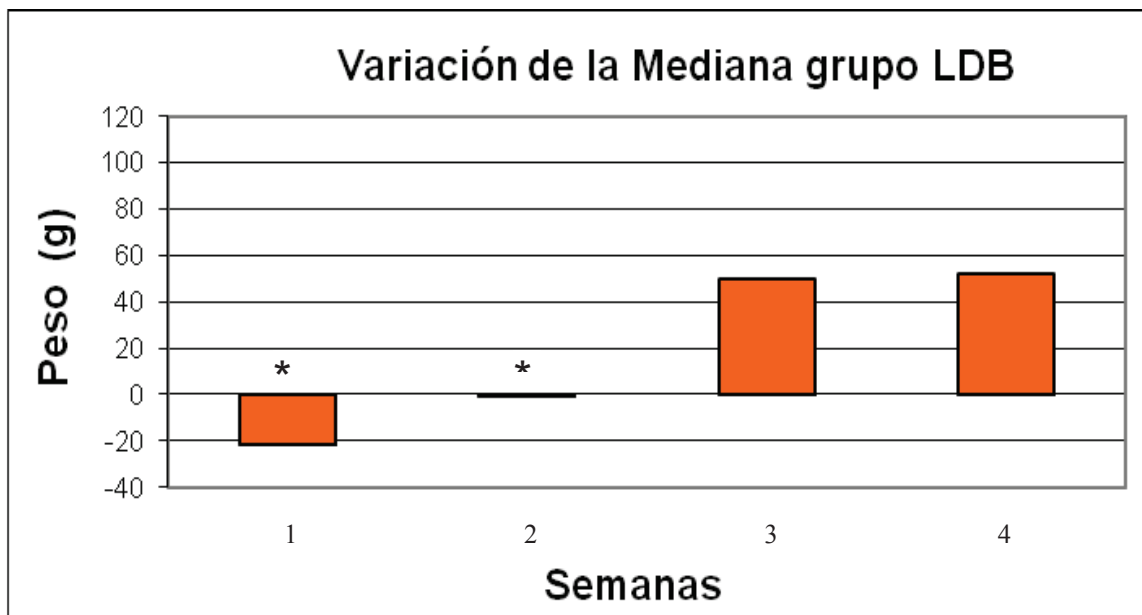
Variación de la Mediana grupo Ficticia



Variación de la Mediana grupo LSB







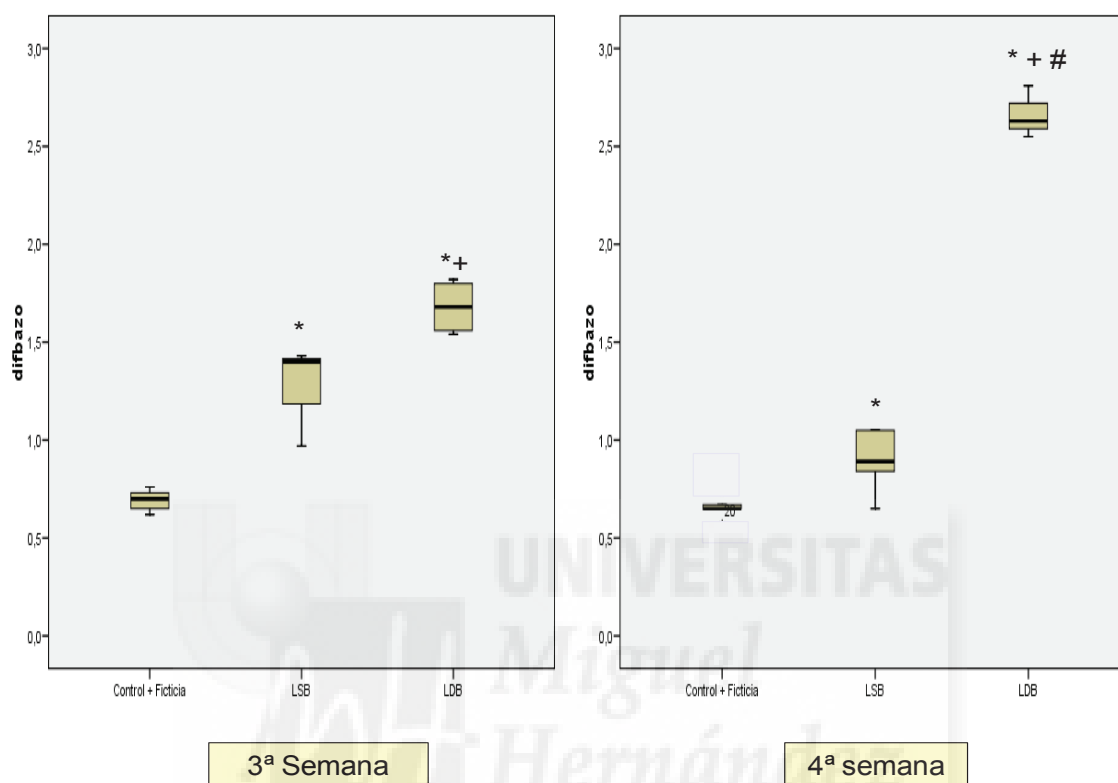
**Figura 3:** Representación de los pesos (g) en los grupos Ficticia, LSB y LDB a lo largo de las 4 semanas. Los datos representan la Mediana de los valores del peso. (\*)  $p < 0,05$  vs siguiente semana. Prueba de Kruskal-Wallis.

## 2. Peso del Bazo:

Se ha medido el peso del bazo como variable subrogada de desarrollo de HTP en los animales a la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semanas de la ligadura y en el grupo Ficticia+Control como control.

En el **Gráfico 1** se observa que a la 3<sup>a</sup> semana, la mediana del peso del bazo es significativamente mayor en los animales sometidos a LSB respecto a los Controles y en los sometidos a LDB respecto a Controles y LSB (Control + Ficticia=0.68 g, LSB=1,27 g y LDB=1,68 g;  $p < 0,05$ . Prueba de Kruskal-Wallis). En la 4<sup>a</sup> semana, sólo se aprecia un incremento significativo respecto a los valores de la 3<sup>a</sup> semana en el grupo de LDB

(Control + Ficticia=0.66 g, LSB= 0.9 g y LDB=2.64 g;  $p < 0,05$ . Prueba U Mann-Whitney).



**Gráfico 1:** Mediana del peso del Bazo en la 3ª y 4ª semanas para animales sin ligadura, LSB y LDB. (\*) =  $p < 0,05$  vs No ligadura; (+) =  $p < 0,05$  respecto LSB; (#) =  $p < 0,05$  vs 3ª semana. Prueba U Mann-Whitney.

### 3. Mortalidad

No se ha producido ninguna muerte en el grupo Control. En el grupo Ficticia se han producido dos muertes (una en la semana 2 y otra en la semana 4). En la LSB sólo hay una muerte en la segunda semana.

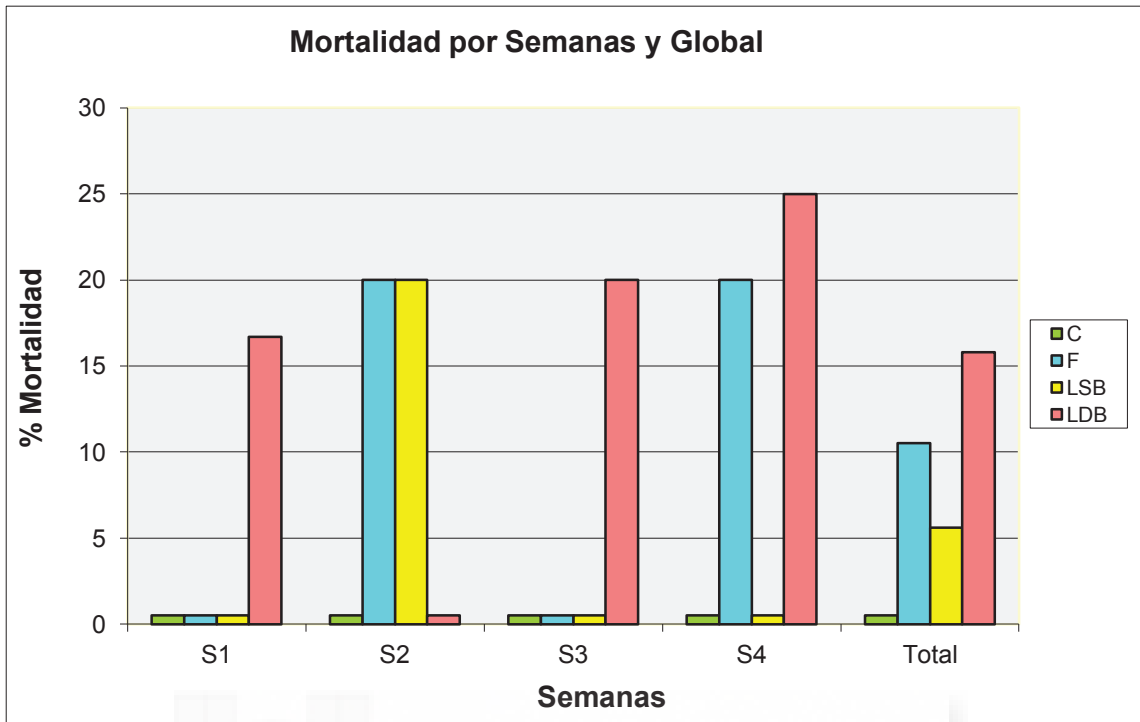
Finalmente, en el grupo de LDB se han contabilizado 3 muertes, uno en cada una de las semanas 1, 3 y 4 (**Tabla 2**).

Se realiza un análisis de la mortalidad de los animales no sometidos a ligadura (Control+ Ficticia. N=39) considerados como un grupo y se compara con cada grupo de animal ligado (LSB, LDB), así como con los animales sometidos en su conjunto a algún tipo de ligadura (LSB + LDB. N=37). No se observan diferencias en la mortalidad entre estos dos grupos en las distintas semanas del estudio (Test de Fisher,  $p=0.425$  entre subgrupos).

Grupo	N° Total	N° éxitos postcirugía por semanas				
		N=76	Total (%)	S1	S2	S3
CONTROL	20	0 (0/20) (0%)	0 (0/5) (0%)	0 (0/5) (0%)	0 (0/5) (0%)	0 (0/5) (0%)
FICTICIA	19	2 (2/21) (9,5%)	0 (0/5) (0%)	1 (1/5) (20%)	0 (0/6) (0%)	1 (1/5) (20%)
LSB	18	1 (1/19) (5,3%)	0 (0/6) (0%)	1 (1/5) (20%)	0 (0/3) (0%)	0 (0/5) (0%)
LDB	19	3 (3/22) (13,6%)	1 (1/6) (16,7%)	0 (0/7) (0%)	1 (1/5) (20%)	1 (1/4) (25%)
No LIG (C+F)	39	2/41 (4.9%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	0/11 (0%)	1/10 (10%)
LIG (LSB+LDB)	37	4/41 (9,75%)	1/12 (8.4%)	1/12 (8.4%)	1/8 (12.5%)	1/9 (11.2%)

**Tabla 2:** Mortalidad total de animales por grupos y semanas.

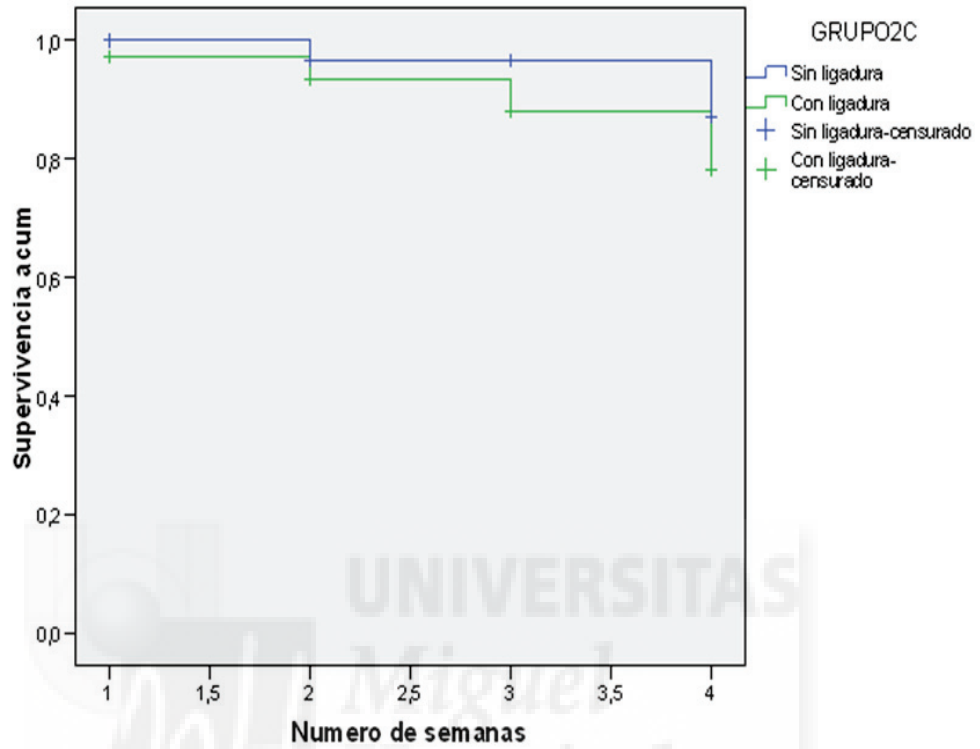
En la **Figura 4** se observa que no existen diferencias significativas en la mortalidad de cada grupo cuando se analizan por semanas y de forma conjunta ( $p>0,05$  para todas las comparaciones realizadas).



**Figura 4:** Representación de la mortalidad total de los diferentes grupos según el número de semanas y de forma global. C= Control, F = Ficticia, LSB = Ligadura Simple Biliar, LDB = Ligadura Doble Biliar.

Las curvas de supervivencia construidas usando el método de Kaplan-Meier se representan en la **Figura 5**. Se aprecia que no existen diferencias significativas en la probabilidad de muerte a lo largo del tiempo del estudio entre los animales con y sin ligadura (log rank-test;  $p= 0,550$ ).

### Funciones de supervivencia



**Figura 5:** Supervivencia entre grupos recategorizados.

## 4. Traslocación bacteriana (TB)

### 4.1. Descripción por grupos y semanas:

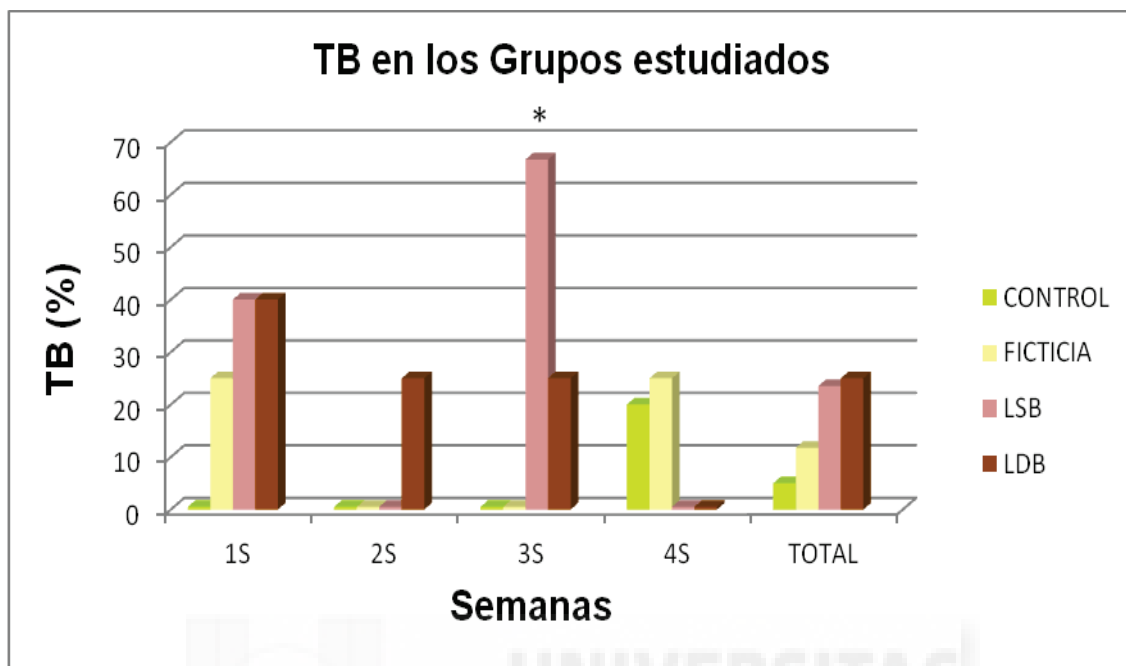
Los datos de TB (cultivo positivo de bacterias viables en GLM) se recogen en la **Tabla 3** y se representan en la **Figura 6**. En el grupo Control y Ficticia globalmente existe un número de animales en los que aparecen fenómenos de TB de forma espontánea no superior al 12%, y que pueden acontecer en distintos períodos de tiempo (por ejemplo en la 4ª semana). En animales con alguna forma de ligadura (simple o doble), la TB acontece de forma global en más del 20% (excepto en la 4ª semana), sobretodo durante las 3 primeras semanas y especialmente en el grupo sometido a LDB. Sólo en la 3ª semana las diferencias en la TB alcanzan significación estadística entre los animales sometidos a LSB (67%) y los Controles (Test exacto de Fisher;  $p=0.038$ ).

Grupo	Nº Total	Nº sacrificados por semanas				TB
-------	----------	-----------------------------	--	--	--	----

	N=70	S1	S2	S3	S4	Total TB
<b>CONTROL</b>	20	5	5	5	5	
TB		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1/5 (20%)	1/20 (5%)
<b>FICTICIA</b>	17	4	4	5	4	
TB		1/4 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	1/4 (25%)	2/17 (11,76%)
<b>LSB</b>	17	5	4	3	5	
TB		2/5 (40%)	0 (0%)	2/3 (*) (66,7%)	0 (0%)	4/17 (23,52%)
<b>LDB</b>	16	5	4	4	3	
TB		2/5 (40%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)	0 (0%)	4/16 (25%)

<b>No LIG (C+F)</b>	37	9	9	10	9	
TB		1/9 (11,2%)	0/9 (0%)	0/10 (0%)	2/9 (22,3%)	3/37 (8.1%)
<b>LIG (LBS+LDB)</b>	33	10	8	7	8	
TB		2/10 (20%)	1/8 (12,5%)	3/7 (42,8%)	0/8 (0%)	8/33 (24.2%)

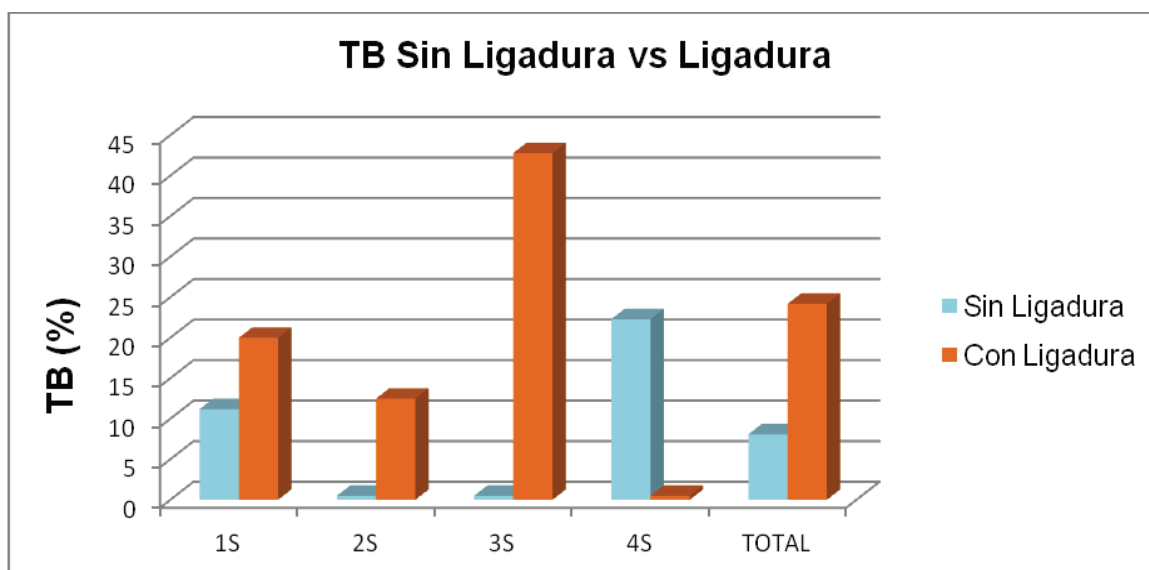
**Tabla 3:** TB para cada grupo durante las 4 semanas. En la Tabla inferior se han reagrupado los animales en 2 categorías: sin ligadura y con algún tipo de ligadura. (\*)  $p < 0,05$ .



**Figura 6:** TB en los grupos de estudio a lo largo de las 4 semanas y Total de cada grupo. (\*):  $p < 0,05$  respecto a Control + Ficticia.

No hay diferencias significativas en la TB cuando se comparan los dos tipos de ligadura ( $p > 0,05$ ). Reagrupando los animales en ligados y no ligados (**Figura 7**), se aprecia que los animales con ligadura tienen mayor porcentaje de TB en cada semana excepto en la 4<sup>a</sup> semana, sin alcanzar significación estadística ( $p = 0,064$ ). No se observan diferencias significativas en la TB tras la reagrupación (Test exacto de Fisher;  $p = 0,13$  y  $0,113$  respectivamente).







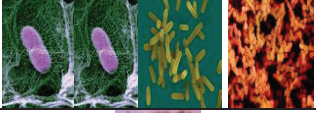




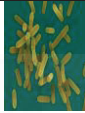
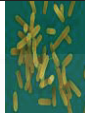
**Figura 7:** Representación de la TB (%) por semanas con los animales reagrupados en 2 subgrupos (ligados vs no ligados).

No se han encontrado diferencias significativas ( $p=0,128$ ) en cuanto a supervivencia entre los animales que presentan TB frente a los que no (tasas de supervivencia en animales con y sin TB del 94.9% y 89.2% respectivamente).

#### 4.2. Identificación/Análisis Bacteriológico de la TB:

En 11 animales se han identificado 13 cultivos positivos en ganglios, en 10 el crecimiento es monomicrobiano y en 1 animal (LDB de la 1ª semana) polimicrobiano con crecimiento tanto de GN como GP. Las especies aisladas son 10 bacterias GN en 8 animales (*E coli*: 4, *K pneumoniae*: 2, *P mirabilis*: 1 y *Pseudomona sp*: 3) y una única bacteria GP en 3 animales (*S faecalis*). En la **Tabla 4** se describe la secuencia temporal de los crecimientos en GLM. No se observa crecimiento de GP en los

animales sin ligadura. Tampoco se aíslan Anaerobios en ninguno de los grupos considerados.

	CONTROL	FICTICIA	LSB	LDB
Semana 1				
Semana 2				
Semana 3			 	
Semana 4				

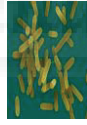
**Tabla 4:** Descripción de la TB en los distintos grupos a lo largo de las 4 semanas. Leyendas:



= *E. coli*;



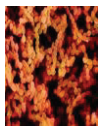
= *Klebsiella pneumoniae*;



= *Pseudomona sp.*;



= *Proteus mirabilis*;

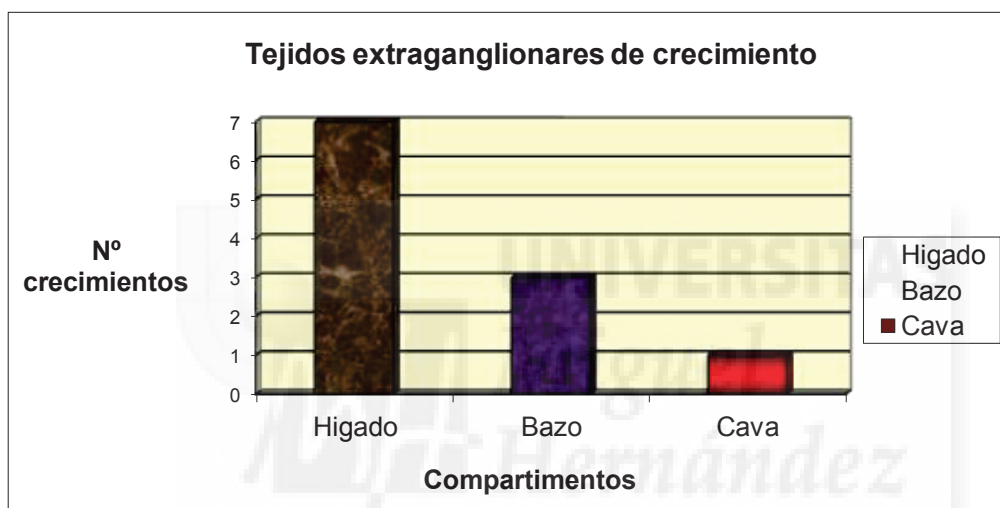


= *Streptococcus faecalis*

### 4.3. TB y crecimiento extraganglionar.

Definimos crecimiento extraganglionar a la presencia de cultivos de bacterias viables en compartimentos distintos a los GLM regionales, en las diferentes muestras recogidas para nuestro estudio y, concretamente, hígado, bazo y sangre de porta y cava.

En los animales del estudio se han producido 11 aislamientos extraganglionares (**Figura 8**). El compartimento con más número de crecimientos es el hígado (N=7), seguido del bazo (N=3) y de sangre de cava (N=1). El aislamiento en sangre de cava se encuentra en un animal con LSB de 3 semanas y sin TB. No se han identificado bacterias viables en sangre portal.



**Figura 8:** Compartimentos extraganglionares en los que se aíslan crecimientos de bacterias viables.





De los 11 animales con TB (**Tabla 5**), la mayoría (N=7; 64%) no presentan crecimientos en otros compartimentos y la mayor parte son animales ligados (N=5), siendo el aislamiento principal BGN. Es destacable el hecho que el crecimiento de GP aparezca sólo en los animales ligados. Excepto un animal con LDB en la 2ª semana con crecimiento bicompartimental extraganglionar, el resto son crecimientos

monocompartimentales. No hay aislamientos en el compartimento sanguíneo.

	N (aislamientos bacterianos)	Crecimiento Ganglionar (TB)		Crecimiento Extraganglionar
		GP	GN	
Nº TB sin crecimiento extraganglionar	7 (5 con Ligadura)	-	2 (C+F)	-
		1	1 (LSB)	-
		2	1 (LDB)	-
Total		3	4 (100%)	-
Nº TB con crecimiento extraganglionar	4 (3 con Ligadura)	-	1 (C+F)	1 GN (H)
		-	2 (LSB)	2 (1GP y 1 GN): (H)
		-	1 (LDB)	2 GN: (H y B)
Total		-	4 (100%)	5 (80% H, 20% B)

**Tabla 5:** Síntesis del crecimiento ganglionar (TB) y extraganglionar. TB = Traslocación Bacteriana. GP = Gram Positivos. GN = Gram Negativos. C = grupo Control. F = grupo Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. H = Hígado. B = Bazo. C = Sangre de Vena Cava.

Sólo 4 animales con TB presentan crecimiento extraganglionar (**Tabla 6**), en su mayoría del grupo con ligadura (N=3) y todos son GN excepto en un animal con LSB de la 3ª semana (GP en hígado).

Ratas con TB y crecimiento extraganglionar (N=4)				
Control + Ficticia	1 GN	1 GN	-	-
LSB	2 GN	1 GP y 1 GN	-	-
LDB	1 GN	1 GN	1 GN	-

**Tabla 6:** Representación gráfica del crecimiento extraganglionar en los animales que presentan TB.

Leyendas:



=Ganglios linfáticos mesentéricos (Flecha)



= Hígado.

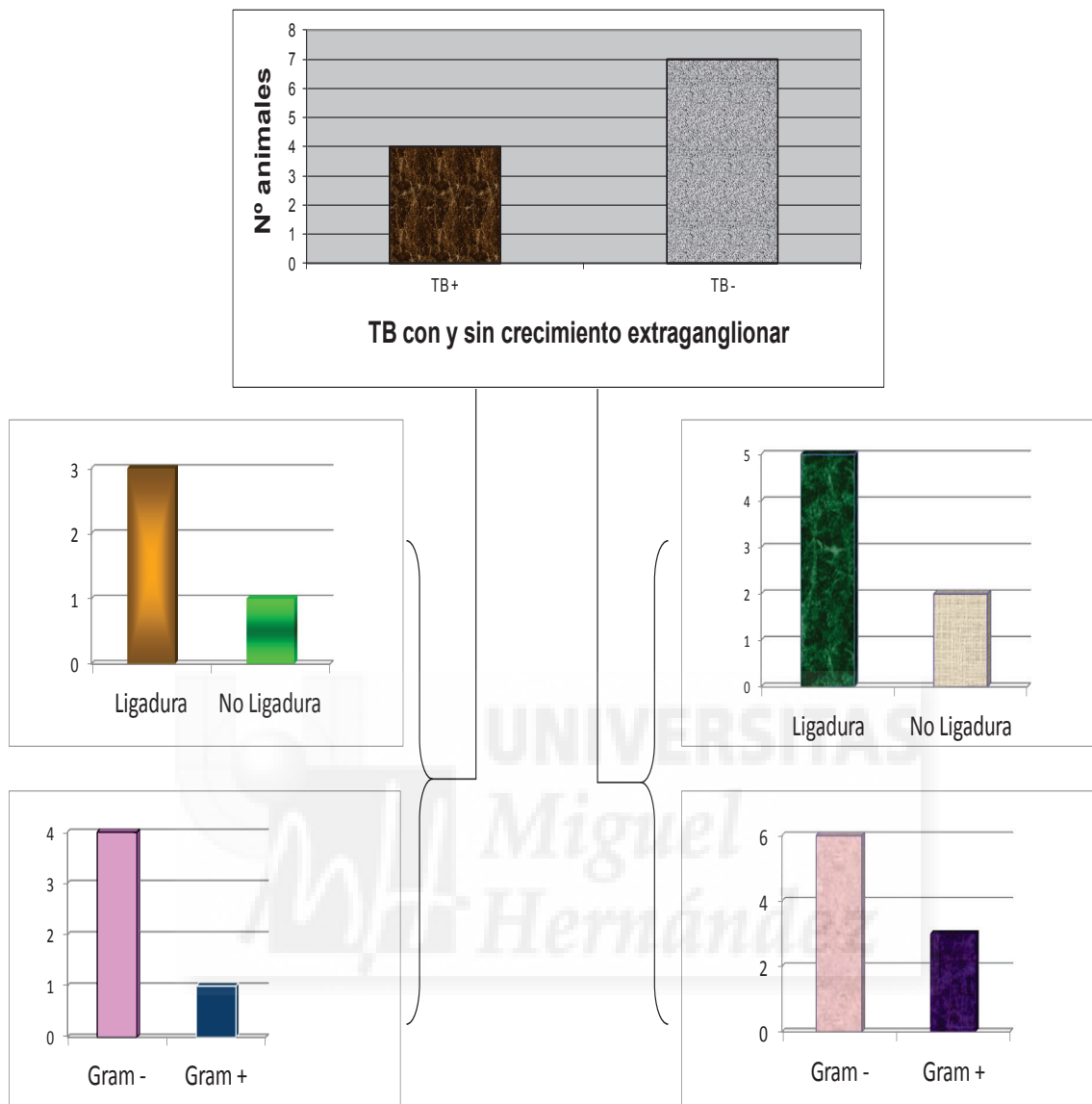


= Bazo



= Sangre de Porta o Cava.

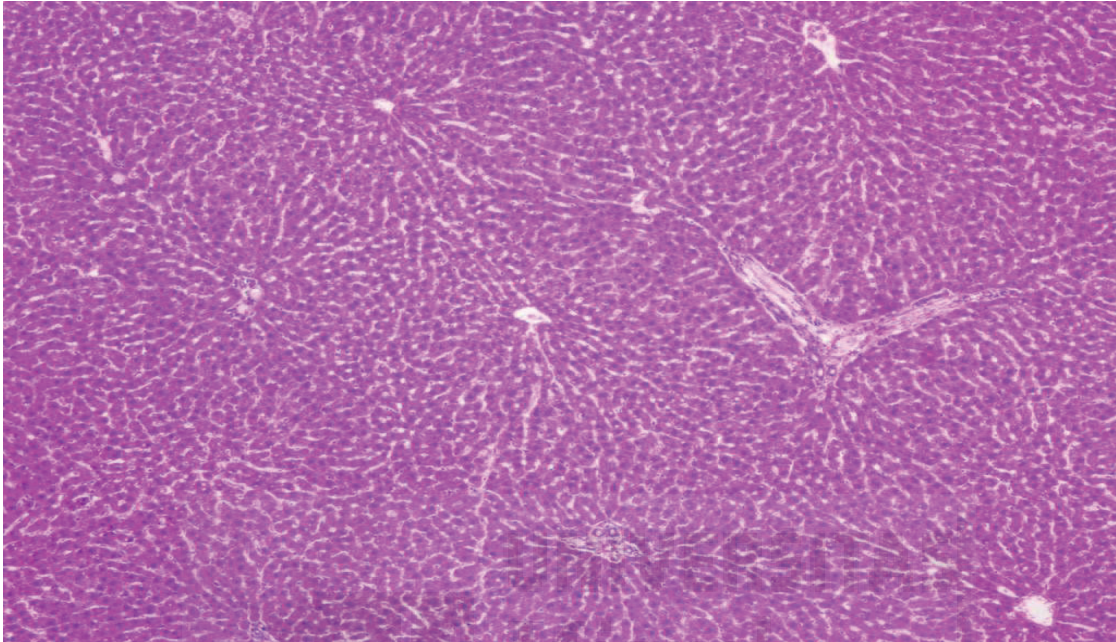
En la **Figura 9** se ve que en animales con TB, los aislamientos extraganglionares son en su mayoría gérmenes GN y se producen fundamentalmente en ratas sometidas a ligadura. En los animales con TB, el crecimiento extraganglionar coincide en la mayoría de los casos la especie con la bacteria translocada (excepto en el citado animal con LSB de la 3<sup>a</sup> semana que presenta TB por BGN y un GP a nivel de hígado).



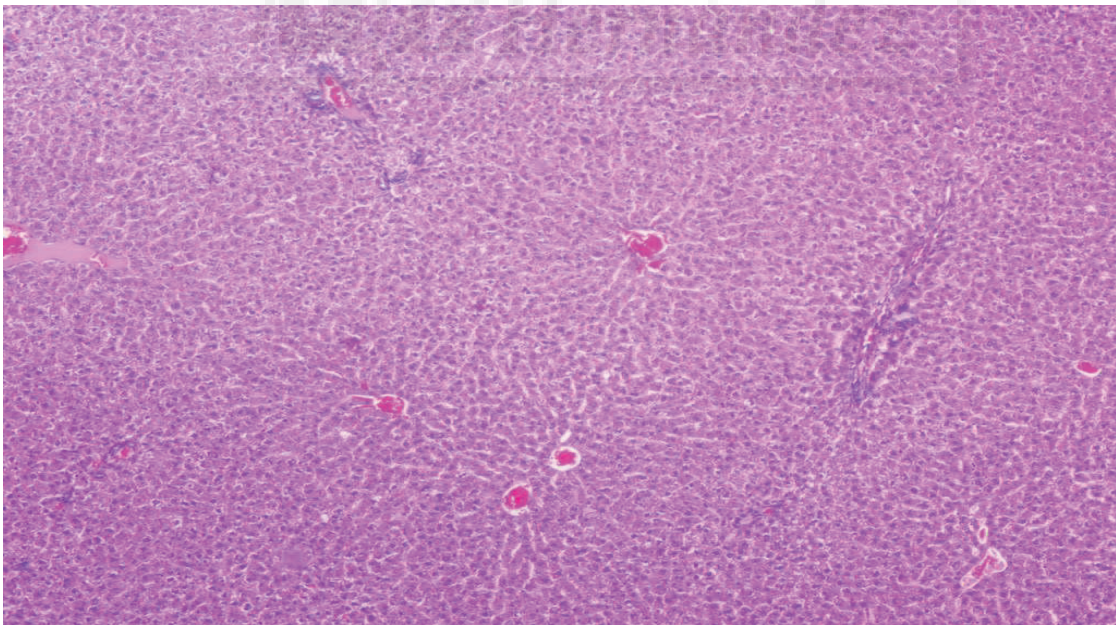
**Figura 9:** Número de animales con TB y crecimiento extraganglionar (TB +) o sin crecimiento extraganglionar (TB -) en función de animales con/sin ligadura y tipo de aislamiento encontrado.

## 5. Anatomía Patológica:

En animales Control y Ficticia, no hemos encontrado lesión histológica (Grado 0) a lo largo del estudio (**Fotos a y b**).

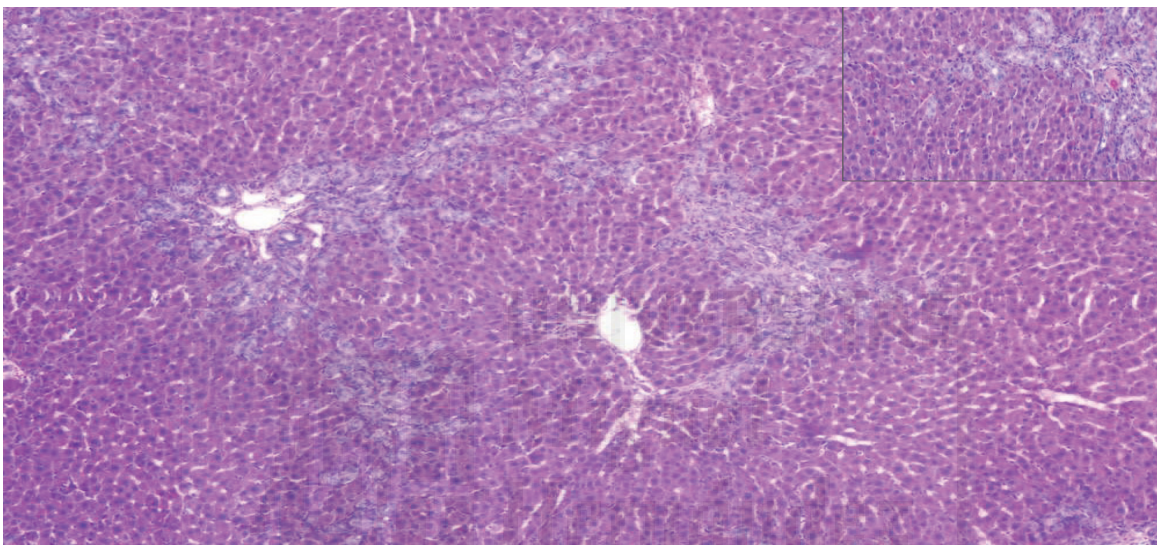


a) Histología hepática representativa de los animales del grupo Control.

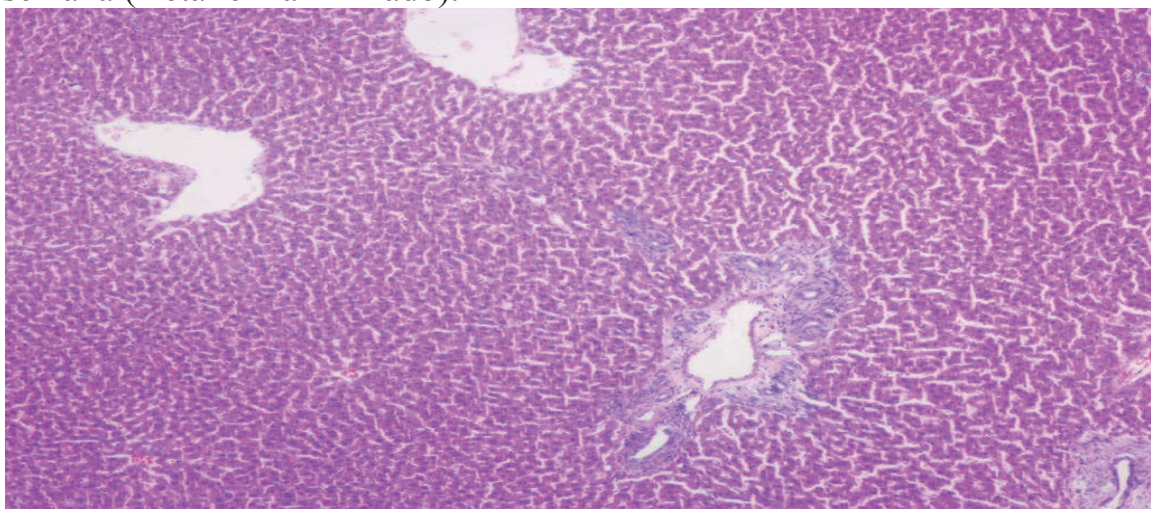


b) Histología hepática representativa de los animales del grupo Ficticia.

En el grupo de la LSB, durante la 1ª semana la lesión es de Grado 0. Los cambios histológicos se producen durante la 2ª semana (lesión Grado II en 4 animales. **Foto c con detalle**); pero en la 3ª y 4ª semanas las lesiones observadas son inexistentes o mínimas (4 animales grado 0 y un animal grado I. **Foto d**) y equiparables a los encontrados en la semana 1 y al de los animales sin ningún tipo de ligadura (Control + Ficticia).



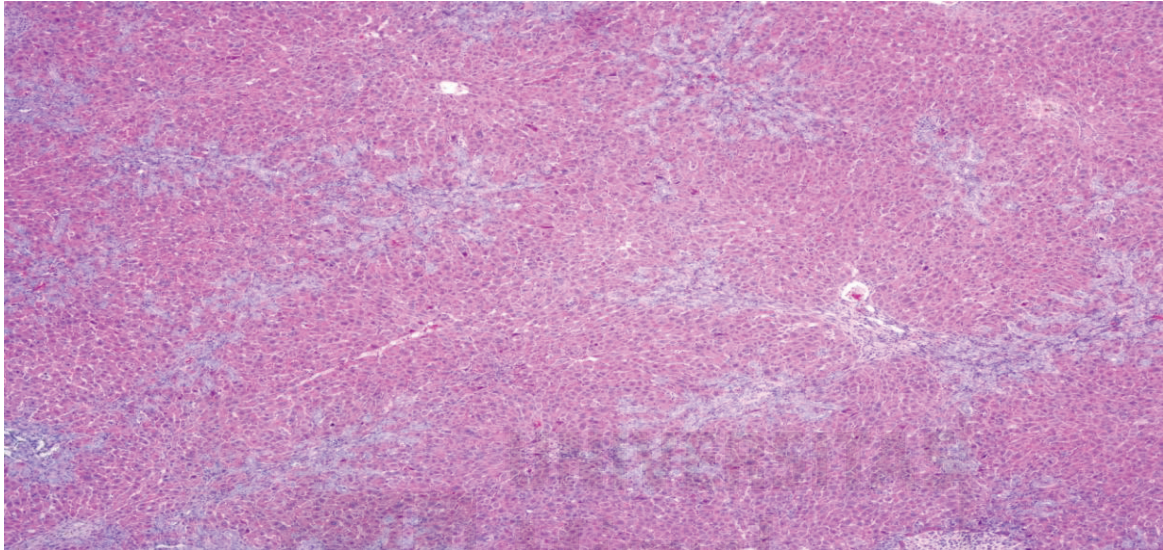
c) Lesión Grado II representativa de los animales del grupo con LSB en la 2ª semana (Detalle maximizado).



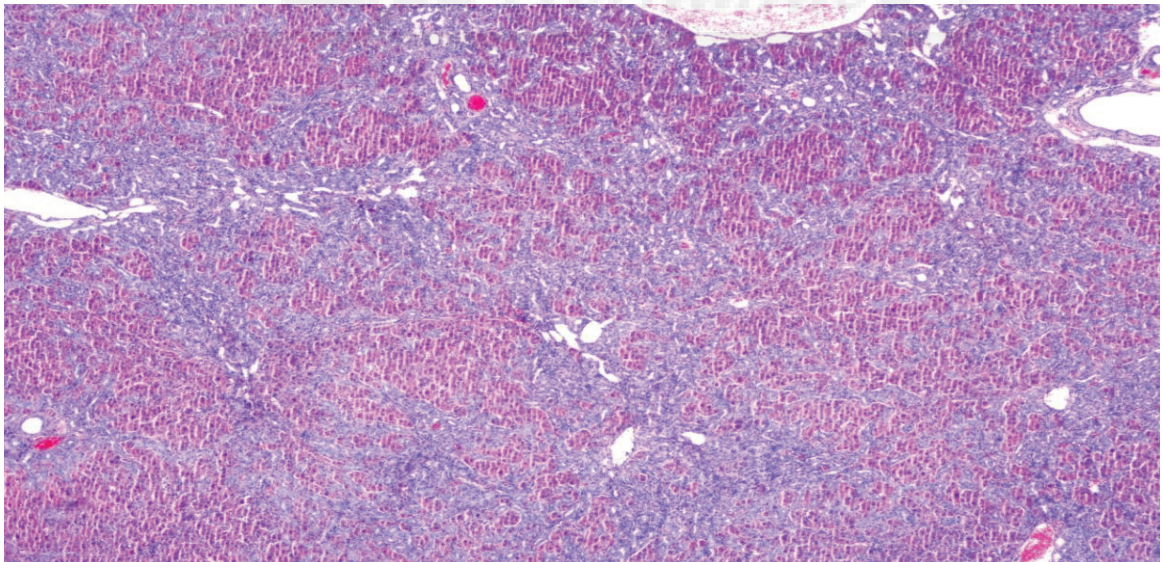
d) Lesión Grado I representativa de animales del grupo con LSB.



En el grupo con LDB y a partir de la 1ª semana, encontramos los mayores y más severos cambios anatomopatológicos (**Fotos e y f**). Estos cambios morfológicos son significativos respecto a los animales sin ligadura y al grupo de LSB (Test exacto de Fisher), tal como se resume en la **Figura 10**.

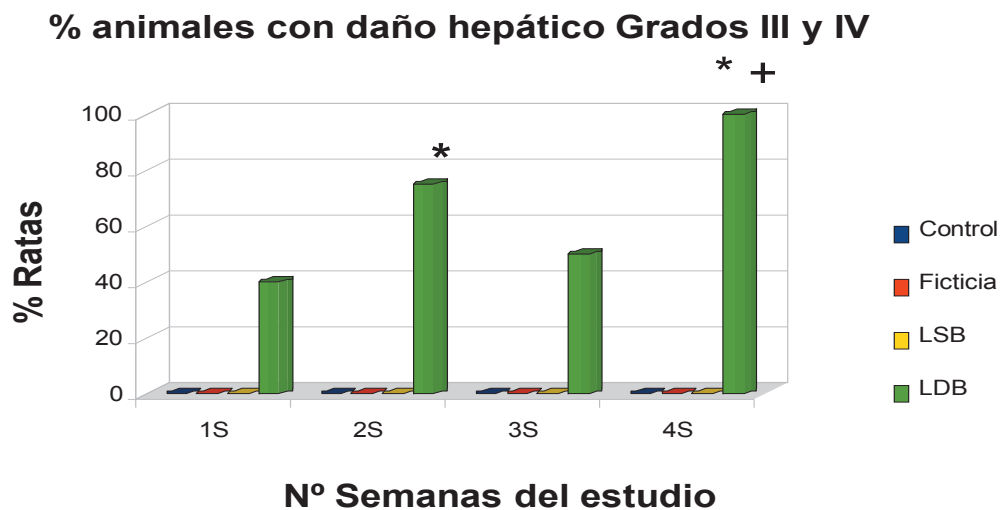


e) Lesión Grado III representativa del grupo de ratas con LDB.



f) Lesión Grado IV representativa de uno de los animales del grupo de LDB.

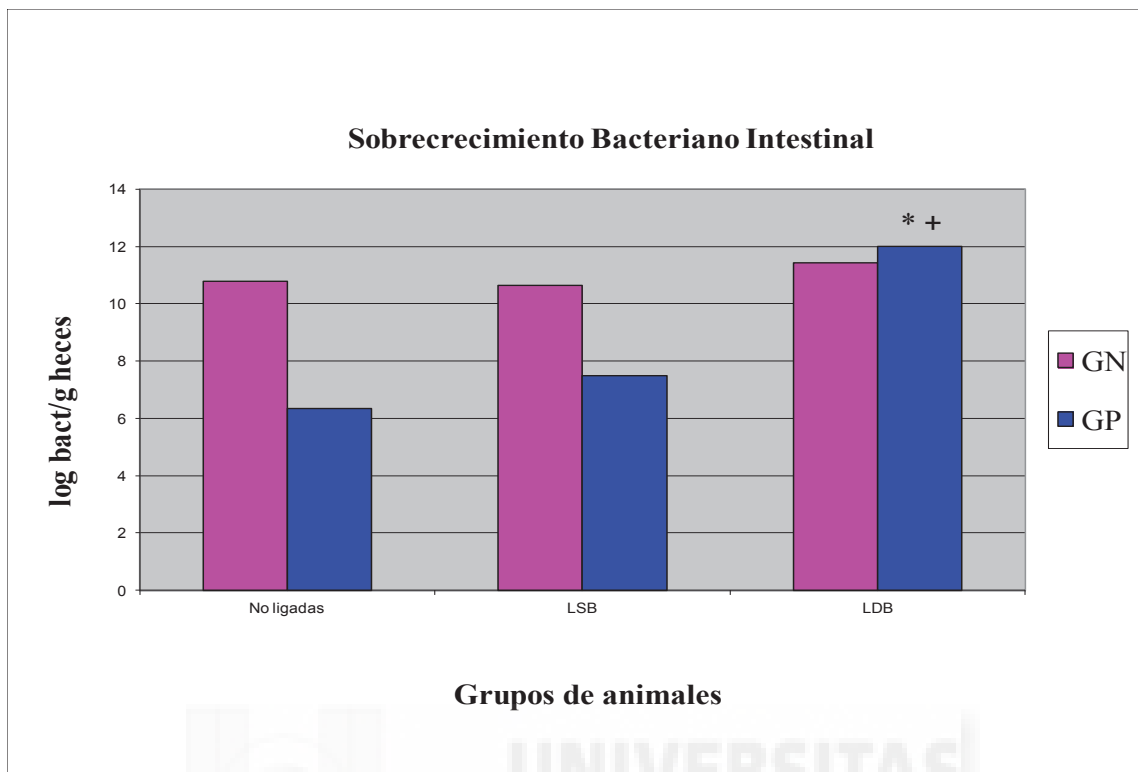
**FOTOS** : Lesión hepática representativa en los grupos Control (a), Ficticia (b), LSB (fotos c con detalle y d) y LDB (e y f).



**Figura 10:** Porcentaje de animales con daño hepático moderado-severo en los distintos grupos y a lo largo de las 4 semanas. (\*) =  $p < 0.05$  respecto a Control más Ficticia; (+) =  $p < 0.05$  respecto a LSB.

## 6. Sobrecrecimiento bacteriano

El crecimiento a nivel cecal expresado como N° de bacterias en logaritmos por gramo de heces (log/bact/g heces) se representa en la **Figura 11**, en ella se aprecia que los animales con LSB no modifican cuantitativamente su flora cuando se la compara con los animales no ligados, y sin embargo, en los animales con LDB, con respecto a los animales sin ligadura y con LSB, se observa un incremento notable y significativo en la cantidad de GP (U de Mann-Whitney).



**Figura 11:** Sobrecrecimiento Bacteriano Intestinal. Datos globales por grupos. No Ligadas (Control + Ficticia). LSB=Ligadura Simple Biliar. LDB=Ligadura Doble Biliar. GN= Gram Negativos. GP=Gram Positivos. (\*) =  $p < 0.05$  vs LSB. (+) =  $p < 0.05$  vs No Ligadas.

En la **Tabla 7** se muestran los datos de sobrecrecimiento a lo largo de las 4 semanas y de forma global. El crecimiento de bacterias GN se mantiene de forma uniforme en los distintos grupos durante las 4 semanas del estudio. Se puede comprobar que el incremento en el número de colonias de bacterias GP se ve con claridad en los animales con ligadura, y principalmente con la LDB, en la que se observa cómo este crecimiento se produce ya desde la 1ª semana y se mantiene a lo largo del período de estudio.

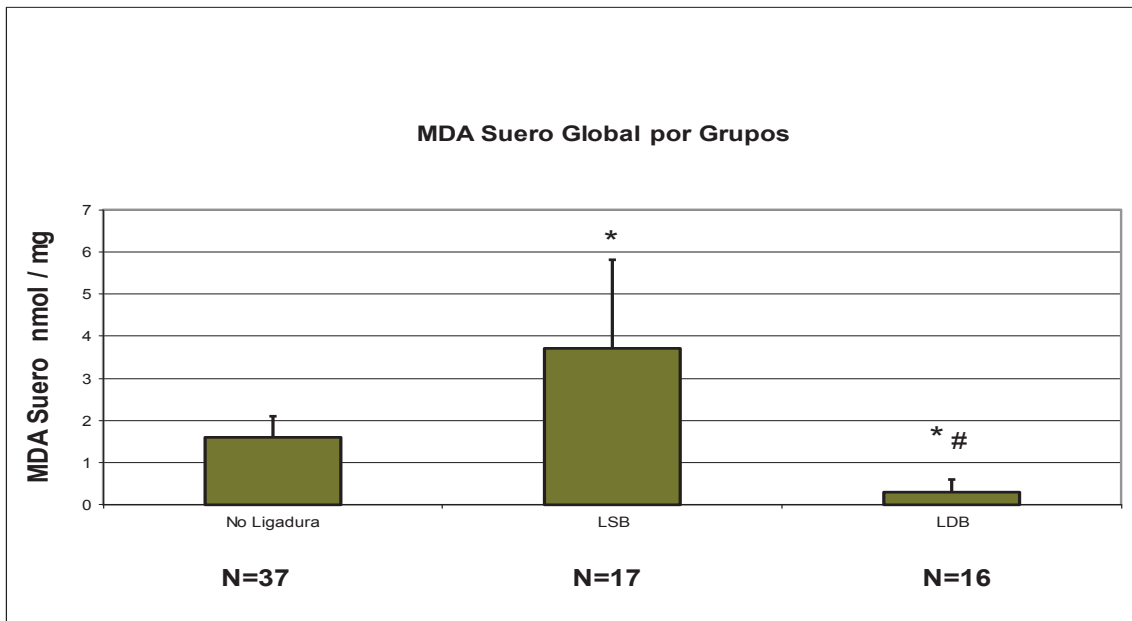
		S E M A N A S										
		1		2		3		4		Global		
GRUPO	N	GN	GP	GN	GP	GN	GP	GN	GP	GN	GP	Total
NO LIGADAS	37	11.37	4.06	10.56	11.14	10.64	5.17	10.57	3.42	10.78	6.34	8.57
LSB	17	11.72	11.04	11.46	NI	9.91	10.95	9.51	8	10.65	7.5	9.1
LDB	16	12.17	11.96	12.19	12.31	9.92	12.01	11.49	11.82	11.44	12	11.73

**Tabla 7:** Sobrecrecimiento Bacteriano Intestinal (SBI) en N° bacterias en unidades logarítmicas por gramos de heces (log bact/g heces), por grupos y semanas (1-4). No Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. GN = Gram Negativos, GP = Gram Positivos. NI = No Identificadas colonias.

## 7. Peroxidación Lipídica: MDA Compartimental

### 7.1. MDA en suero:

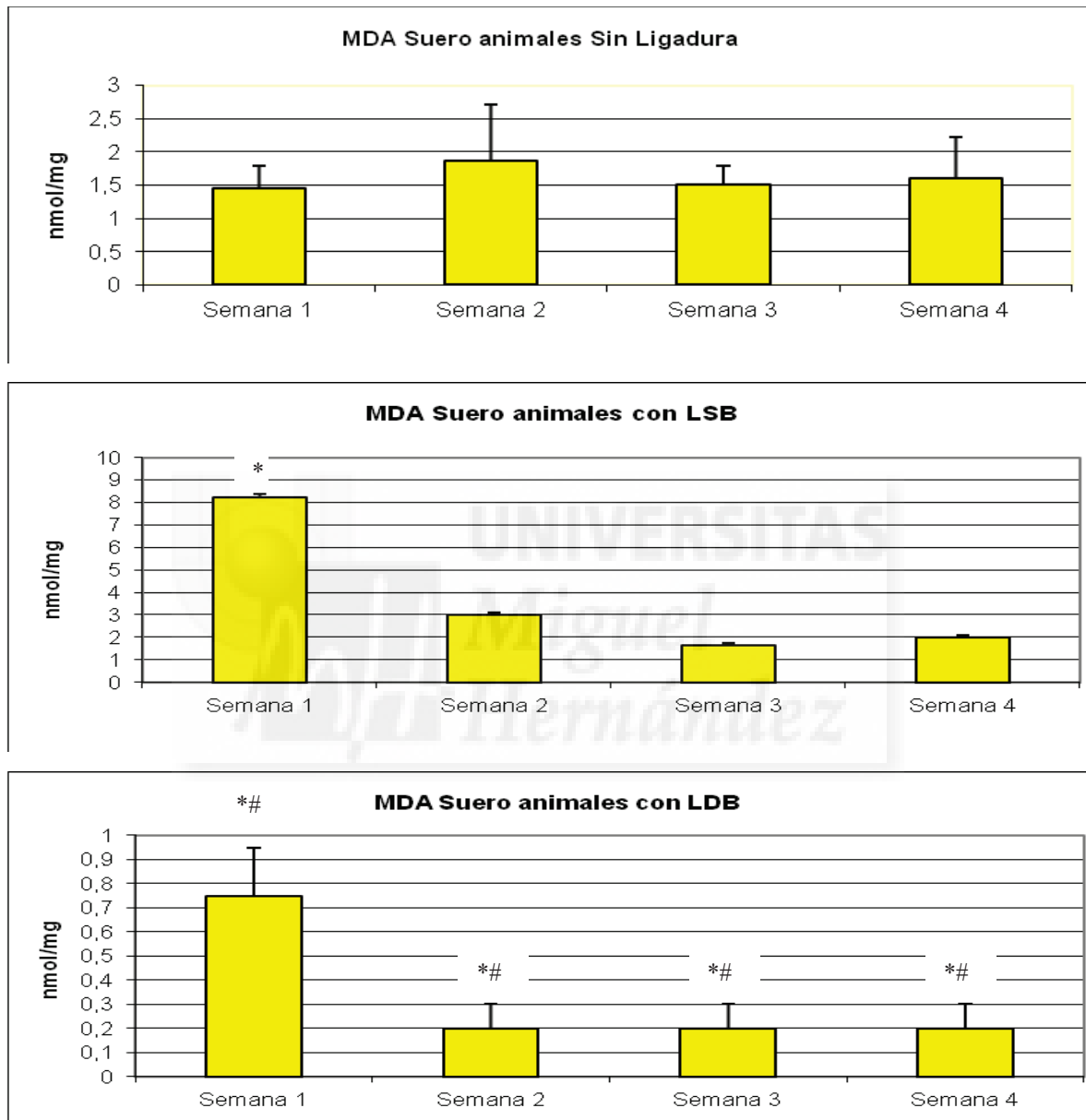
En la **Figura 12** se representa de forma global el MDA sérico de los diferentes grupos. Los niveles de PL se incrementan de forma significativa en los animales con LSB respecto a los animales sin ligadura y aquellos con LDB (Prueba U de Mann-Whitney).



**Figura 12:** Valores globales de MDA en suero para animales con y sin ligadura. Sin Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. (\*)  $p < 0,05$  vs No Ligadura, (#)  $p < 0,05$  vs LSB.

Cuando analizamos el comportamiento de la PL en suero a lo largo del período de estudio, se aprecia cómo en los animales sin ligadura los valores permanecen estables, mientras que en la LSB se produce un incremento de la PL sérica y, como se puede observar en la **Figura 13**, este efecto es claro durante las primeras 2 semanas (comparado con los animales sin ligadura), próximas al daño quirúrgico, de manera significativa en la 1ª semana tras la ligadura ( $p = 0,001$  vs grupo sin ligadura), descendiendo progresivamente a partir de la 2ª semana hasta alcanzar niveles séricos de MDA similares a los observados en el grupo sin ligadura a partir de la 3ª y 4ª semanas. Por el contrario, en el grupo de animales sometido a LDB, se produce un descenso

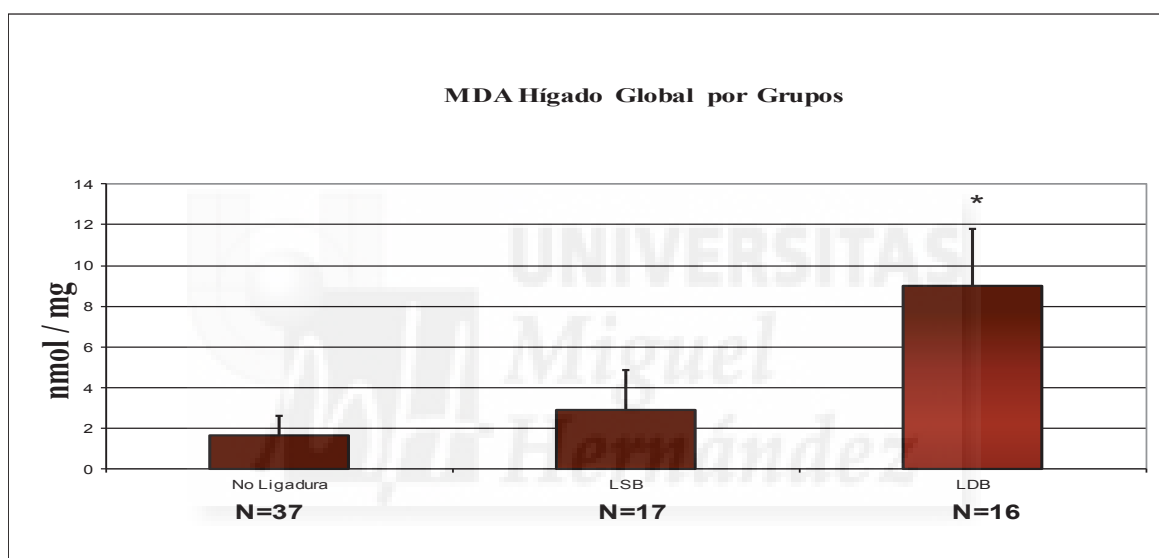
marcado, significativo y mantenido ( $p=0,007$  vs grupo sin ligadura y  $p=0,001$  vs LSB) de las cifras de MDA sérico desde la 1ª semana y a lo largo del estudio (Prueba U de Mann-Whitney).



**Figura 13:** MDA en suero. Temporalización de los hallazgos según las semanas y el grupo. Sin Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. (\*)  $p<0,05$  vs Sin Ligadura, (#)  $p<0,05$  vs LSB.

## 7.2. MDA en hígado:

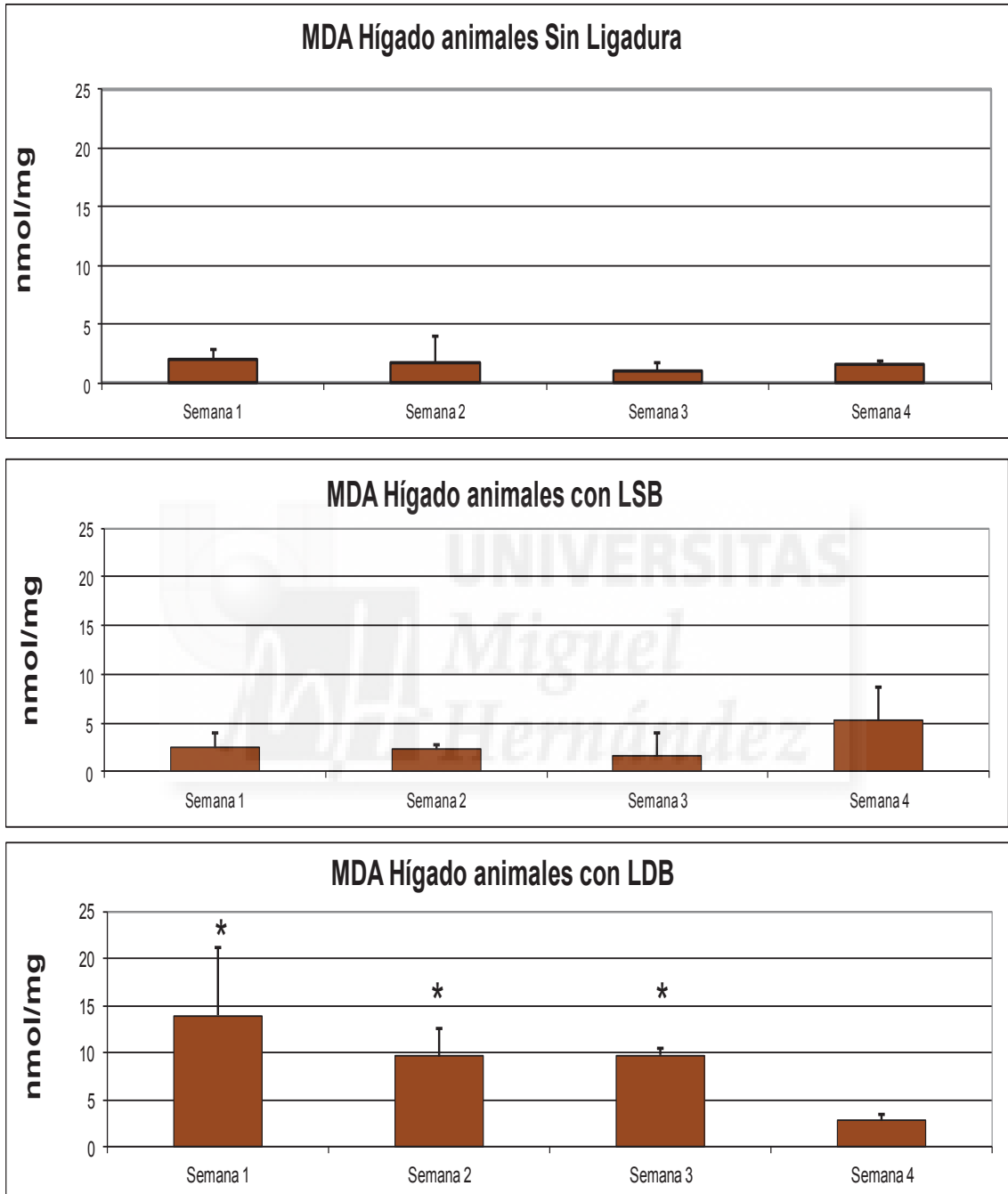
Los datos globales de PL en hígado para los diferentes grupos de estudio se muestran en la **Figura 14**. Estos niveles de PL se incrementan de forma significativa en los animales con LDB respecto a los animales sin ligadura y con LSB. Respecto a los animales sin ligadura, con la LSB se obtienen valores similares e inferiores a 2,5 nmol/g de tejido, sin observarse diferencias significativas (Prueba U de Mann-Whitney).



**Figura 14:** Valores globales de MDA en hígado en animales con y sin ligadura. No Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. (\*)  $p < 0,05$  vs No Ligadura y LSB.

Cuando vemos en el tiempo el comportamiento de la PL en hígado (**Figura 15**), se aprecia que los animales con LDB sí mantienen una respuesta de peroxidación aumentada y mantenida durante las primeras 3 semanas, siendo estadísticamente significativo respecto a la LSB y animales

sin ligadura. A la 4ª semana, se alcanzan niveles similares a los anteriores grupos (Prueba U de Mann-Whitney).



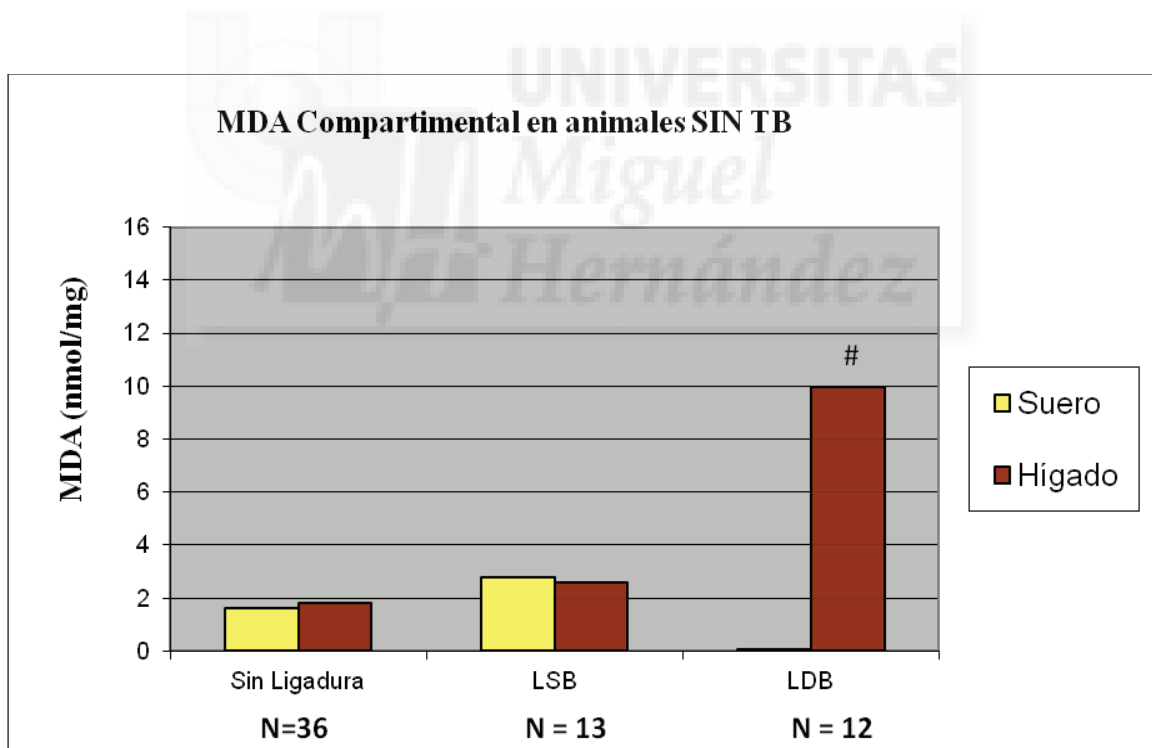
**Figura 15:** MDA en hígado en función del tiempo y el modelo utilizado.

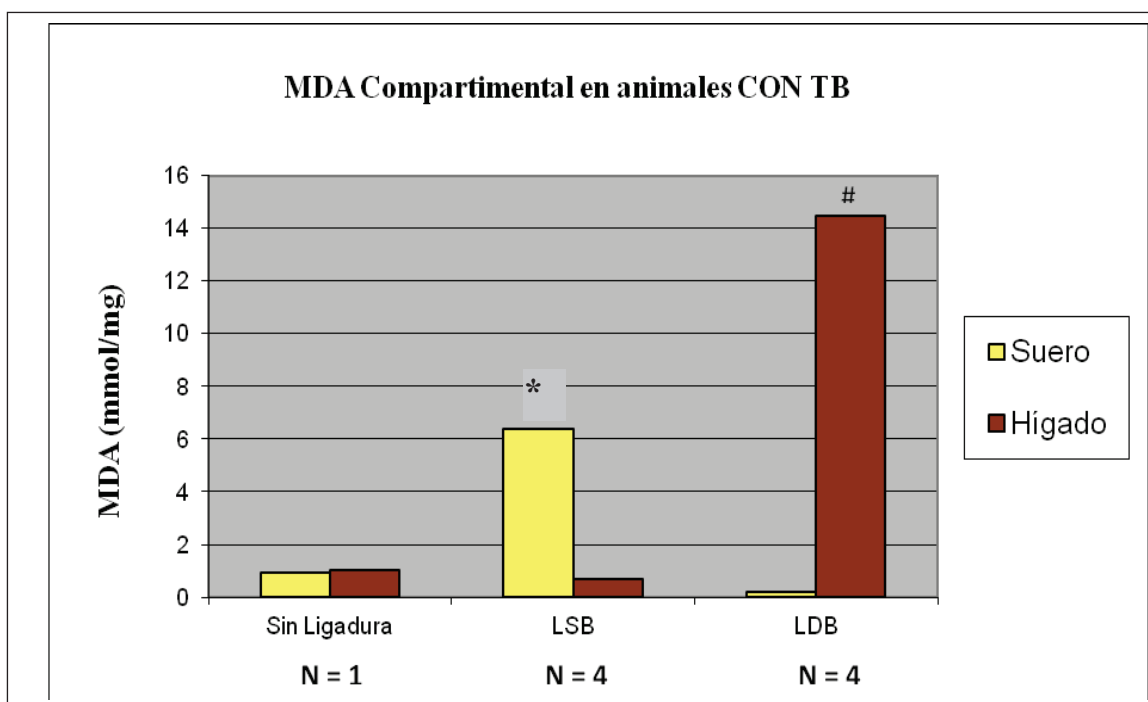
No Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. (\*)  $p < 0,05$  vs No Ligadura y LSB.



### 7.3. Relación de la PL y la TB:

En la **Figura 16** se representa de forma global la relación existente en nuestro estudio entre la ausencia (Panel A) o presencia (Panel B) de TB en los distintos grupos de animales y el comportamiento del MDA en suero e hígado. En la LDB, es el daño producido a nivel del hígado el que origina de manera significativa los fenómenos de PL, con independencia de la existencia o no de TB. No obstante, el mayor incremento del MDA en hígado se produce en los animales con LDB que traslocan. Con la LSB, los niveles de MDA sólo se incrementan de forma significativa en suero en los animales que presentan TB (Test exacto de Fisher).





**Figura 16:** Representación global del comportamiento del MDA en los distintos compartimentos en los grupos de estudio y su relación con la ausencia (Panel A) o presencia (Panel B) de Traslocación. TB = Traslocación Bacteriana. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. (\*)  $p < 0,05$  vs Sin Ligadura. (#)  $p < 0,05$  vs LSB.

## 8. Inflamación: Citocinas

Hemos estudiado las variables inmunológicas Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e Interferón gamma (IFN) en suero. También se ha estudiado bajo condiciones de estimulación celular, en las cuales, las células de los animales extraídas del suero para cultivo han sido sometidas a estimulación in vitro con LPS para comprobar su respuesta frente a bacterias GN.

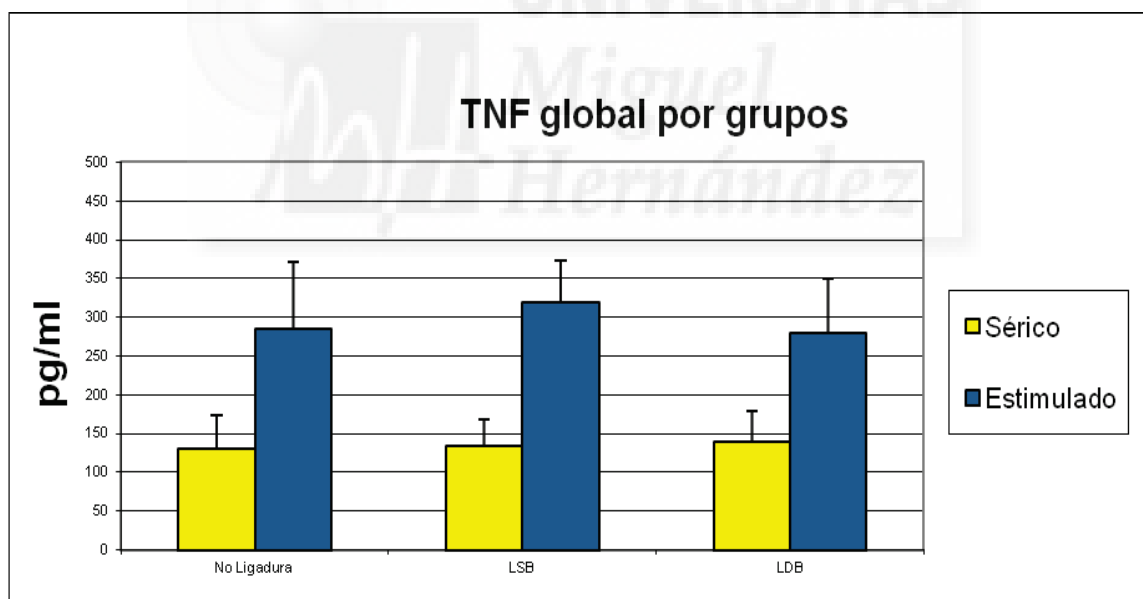
Los valores de las dos variables analizadas (TNF e IFN) no se ajustan a una distribución normal ( $p = 0,563$ . Prueba de Kolmogorov-Smirnov), por

tanto, para el análisis comparativo de los resultados se ha utilizado una prueba paramétrica.

### 8.1: Citocinas séricas y tras estimulación con Lipopolisacáridos (LPS):

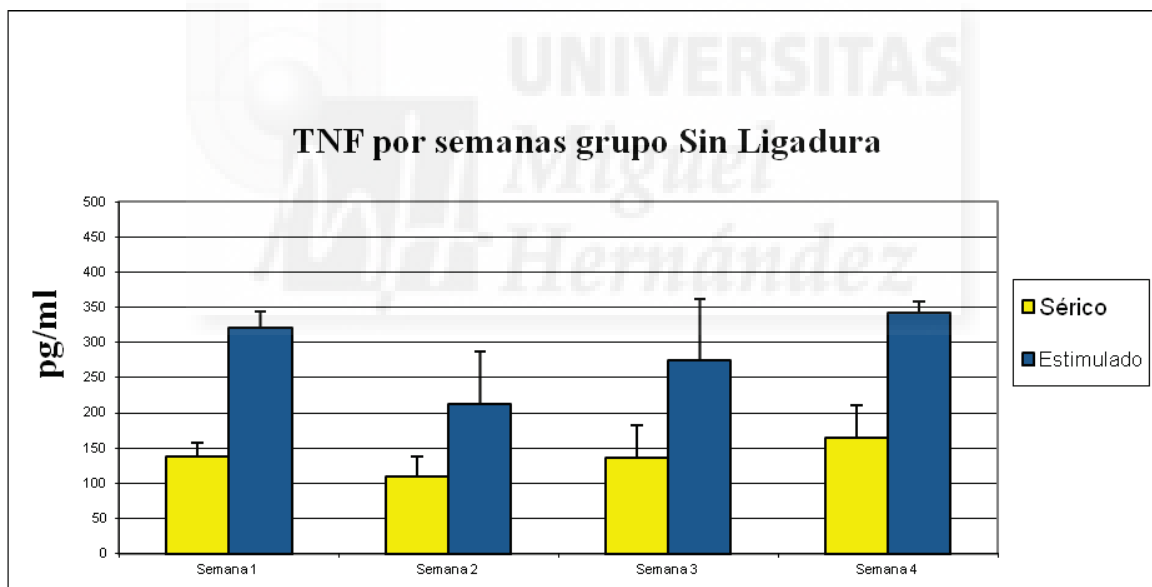
#### A. TNF:

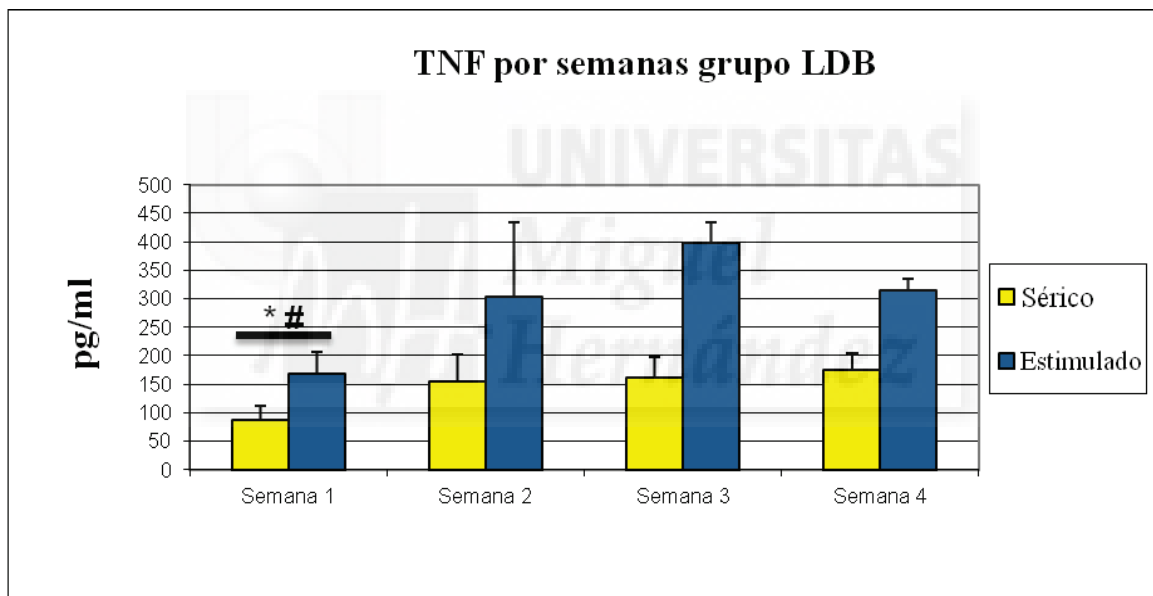
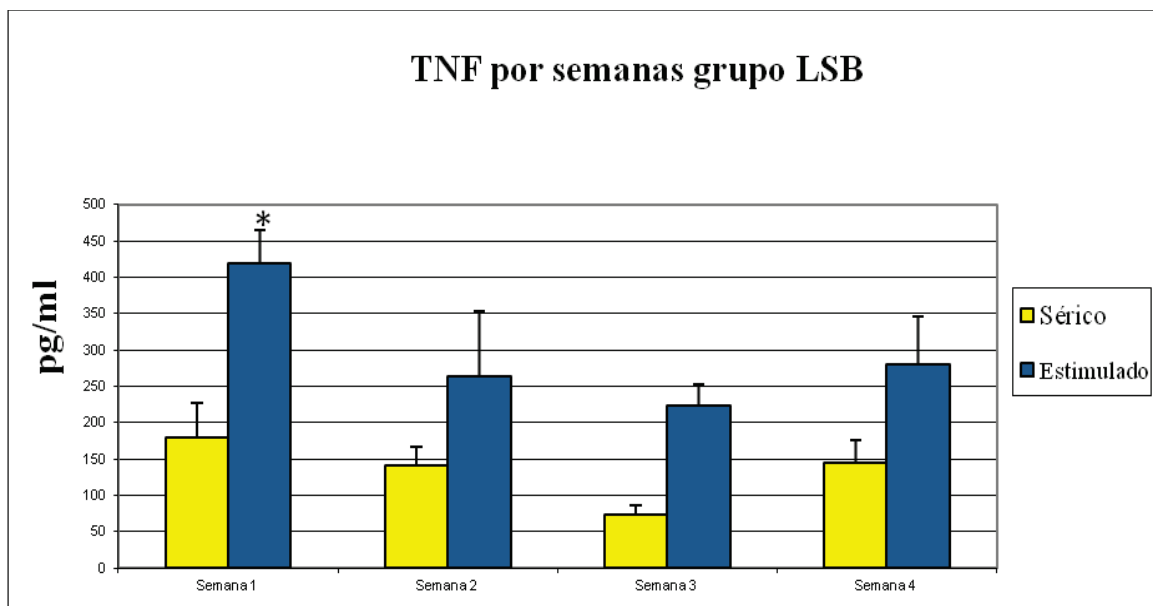
En la **Figura 17** se observa que las concentraciones séricas de TNF son similares en los tres grupos estudiados. Cuando las células de estos grupos de animales son estimuladas con LPS, vemos un incremento en la producción de TNF en una magnitud similar en los tres grupos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de animales respecto a los valores séricos y estimulados de TNF ( $p=0,764$  y  $0,591$  respectivamente).



**Figura 17:** Valores globales de TNF séricos y tras estimulación con Lipopolisacáridos en los distintos grupos. No Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. TNF = Factor de Necrosis Tumoral.

Cuando vemos el comportamiento del TNF a lo largo del tiempo (**Figura 18**), observamos que en el grupo sin ligadura, los valores séricos se mantienen estables y alrededor de 100 pg/ml durante las 4 semanas. En la LSB, se observa una reducción no significativa de las concentraciones séricas en la 3ª semana. Sin embargo, la respuesta de las células al estímulo con LPS es significativamente superior ( $p=0,006$ ) respecto a la respuesta observada en los animales sin ligadura en la 1ª semana. En el grupo de LDB, a diferencia de lo que ocurre con la LSB, se produce un descenso significativo en la 1ª semana, tanto de los valores séricos como tras estimulación, con recuperación y estabilización de los valores a partir de la 2ª semana (T-Student).

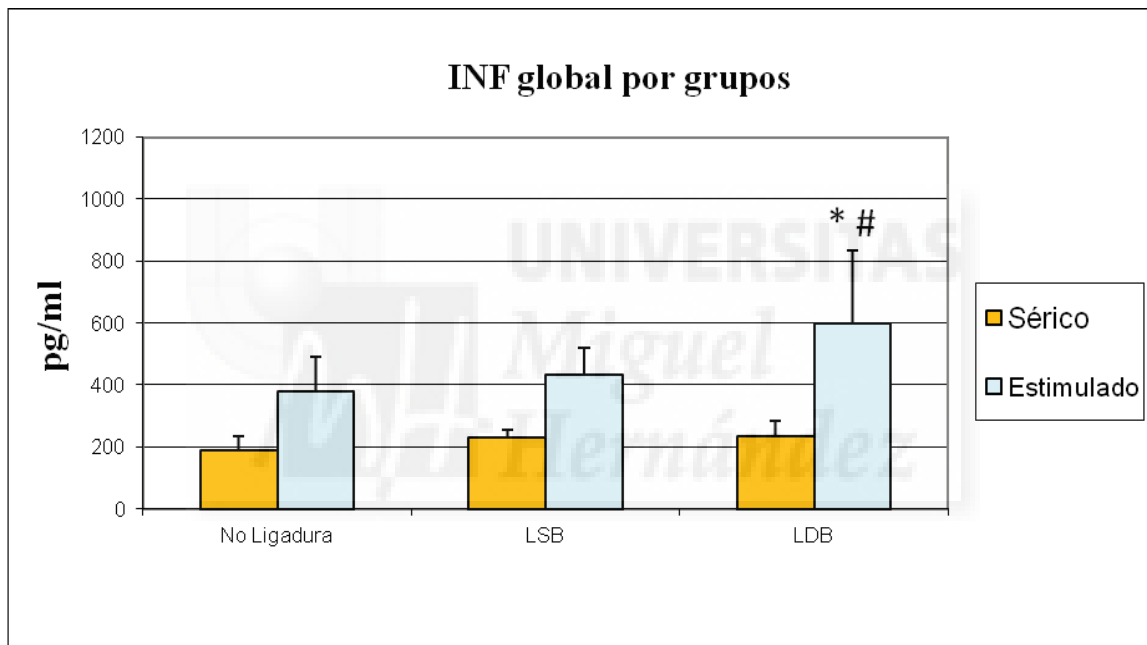




**Figura 18:** Valores de TNF séricos y tras estimulación con LPS en los distintos grupos y en función del tiempo. No Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. TNF = Factor de Necrosis Tumoral. (\*)  $p < 0,05$  vs No Ligadura. (#)  $p < 0,05$  vs LSB.

## B. IFN :

La **Figura 19** representa los niveles séricos de IFN. Se aprecia cómo estos niveles se mantienen constantes y sin diferencias significativas entre los 3 grupos del estudio ( $p > 0,05$ ). Tras la estimulación, las células de los animales sin ligadura y con LSB duplican los valores séricos, mientras que en la LDB, estos valores se triplican, siendo significativo con respecto a los otros grupos ( $p = 0.019$ . Test ANOVA).

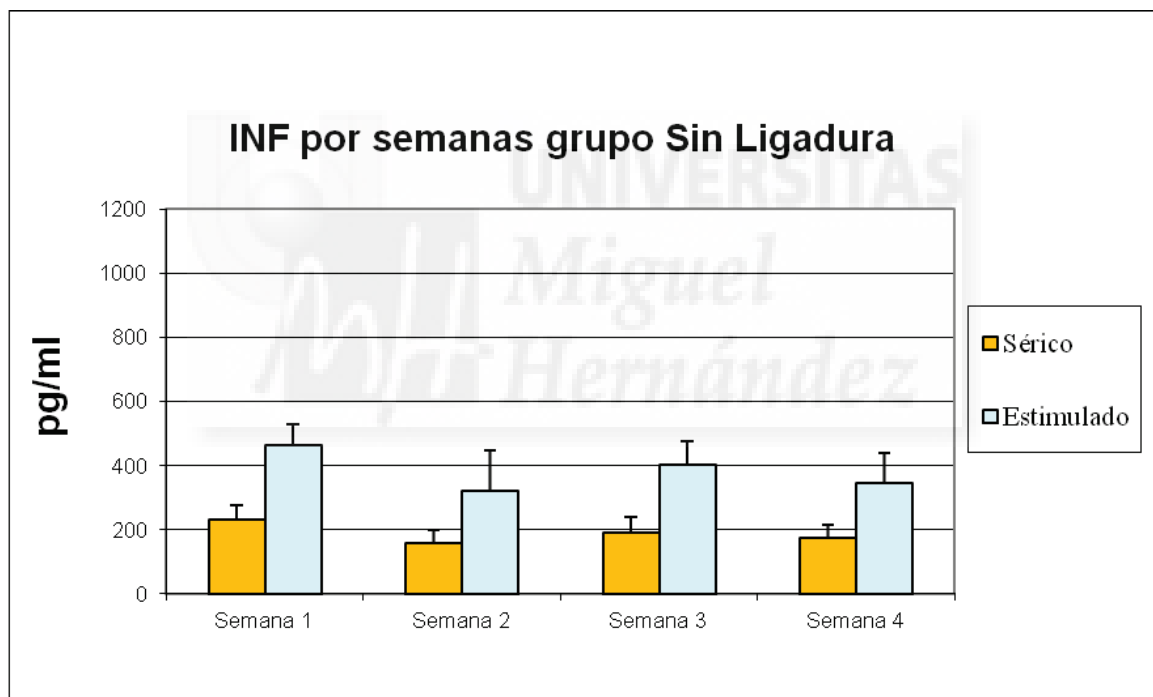


**Figura 19:** Valores globales de IFN séricos y tras estimulación con LPS en los distintos grupos. No Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. IFN = Interferón. (\*):  $p < 0,05$  respecto No ligadura. (#):  $p < 0,05$  respecto LSB.

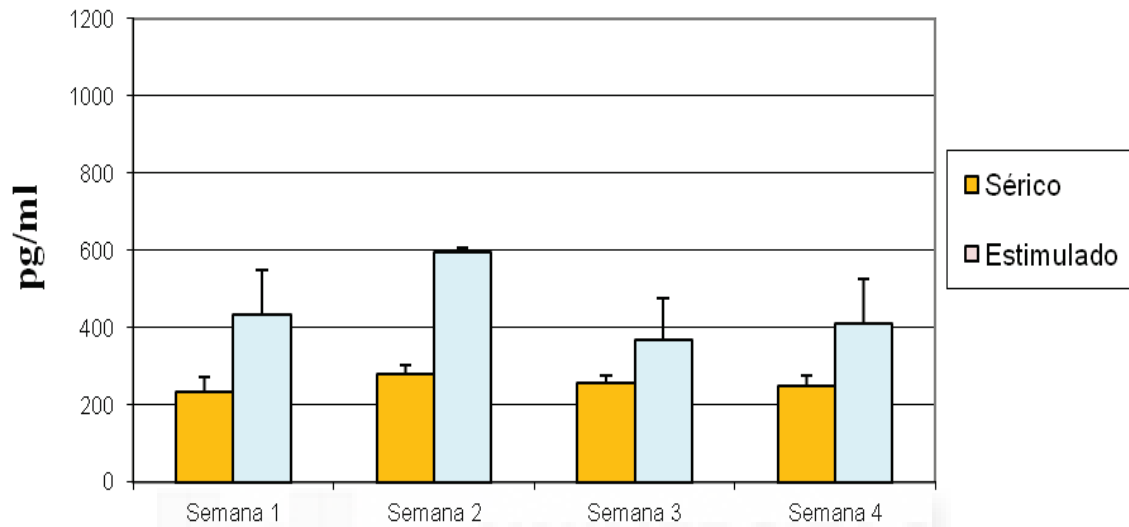
El comportamiento en el tiempo de los niveles séricos de IFN se representa en la **Figura 20**. En el grupo sin ligadura, los valores se mantienen alrededor de 200 pg/ml durante las 4 semanas y sin grandes

oscilaciones. En la LSB hay un incremento no significativo respecto a los animales sin ligadura a partir de la 2ª semana que se mantiene hasta la 4ª semana. En el grupo de LDB, se produce un descenso respecto a los otros grupos en la 1ª y 3ª semanas; en las semanas 2 y 4 se produce un aumento respecto a los animales sin ligadura.

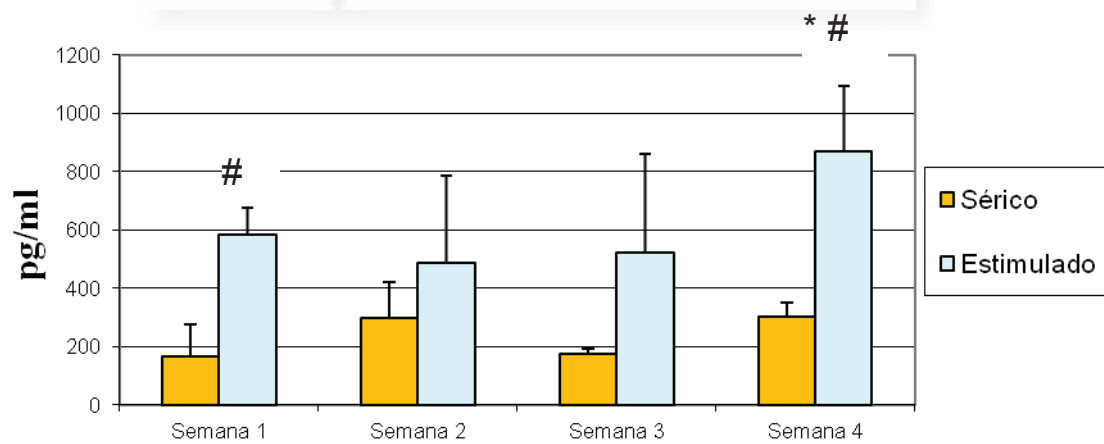
Cuando las células de estos grupos de animales son estimuladas con LPS, observamos un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la producción de IFN en las semanas 1ª y 4ª en los animales sometidos a LDB respecto al grupo sin ligadura y/o LSB (T-Student).



### IFN por semanas grupo LSB



### IFN por semanas grupo LDB





**Figura 20:** IFN sérico y estimulado en los grupos de estudio considerados a lo largo de las 4 semanas. No Ligadura = Control + Ficticia. LSB = Ligadura Simple Biliar. LDB = Ligadura Doble Biliar. IFN = Interferón. (\*):  $p < 0,05$  respecto No ligadura. (#):  $p < 0,05$  respecto LSB.



## DISCUSIÓN

En este estudio hemos investigado el efecto de dos tipos distintos de ligadura biliar en un modelo animal sobre los fenómenos de TB, la PL y la respuesta inflamatoria estudiada mediante la determinación de citocinas proinflamatorias.

De forma similar a estudios previos en ratas (144,295,301), observamos fenómenos de TB en el 5-12 % de animales control o sometidos a una intervención ficticia. En nuestros animales todos los casos de TB fueron por BGN. G. Schimpl et al, también observó una tasa de TB del 8-10% en ratas Ficticia, aunque las bacterias traslocadas fueron en un 80% GP (especies de *Lactobacilli*) y sólo el 20% GN (*E. Coli*) (144). Se han sugerido diversos mecanismos que podrían estar implicados en la causalidad de los fenómenos de TB en animales, por otro lado sanos, como la existencia de mecanismos fisiológicos mediados por células dendríticas intestinales para muestrear el contenido bacteriano intestinal y presentar los antígenos a linfocitos (290), sin olvidar el hecho de que las ratas son animales coprófagos y en los que por razones obvias es más fácil que haya contaminación bacteriana de tramos intestinales altos.

Los fenómenos de TB aumentan al 24-25% en los dos modelos de ligadura biliar, simple (LSB) y doble (LDB), analizados en el presente trabajo, aunque el desarrollo de la TB difiere en cada uno de los modelos en su evolución temporal. En conjunto los porcentajes de TB en nuestro estudio son inferiores a los observados a las 4 semanas por G. Schimpl para la LDB,

con una tasa de TB del 52% (144). Estas diferencias pueden explicarse por distintos tamaños muestrales, variaciones en el modelo experimental utilizado (Schimpl no especifica si se realiza sección del colédoco) y el hecho de que las ratas usadas por Schimpl estaban en período de crecimiento (rango de peso de 150-170 g vs 231-340 g en nuestro grupo de ratas adultas), circunstancia en la que existe inmadurez de la mucosa intestinal y en su función de barrera (290). En contraste con el estudio previo, no observamos TB en la 4ª semana en ninguno de los grupos de animales ligados, sin embargo, estos datos podrían ser muy distintos si en los GLM de los animales hubiéramos podido investigar la presencia de bacterias no viables mediante la detección e identificación del ADN de las bacterias, técnica que en la época en la que se desarrolló este estudio no estaba disponible en nuestro laboratorio.

El modelo de LSB muestra un patrón temporal de aparición de TB diferente al observado en la LDB. La mayor incidencia de TB se produce durante la 3ª semana del estudio. Este dato debemos interpretarlo con precaución por el reducido tamaño muestral, pero acontece en animales que, después de presentar alteraciones histológicas hepáticas leves-moderadas (primeras 2 semanas), han normalizado su histología. Este hallazgo puede deberse a fenómenos de recanalización biliar a partir de la 2ª semana.

Los fenómenos de recanalización del colédoco en la LSB se han observado en estudios previos. En uno de ellos se observó a los 14 días de la ligadura del colédoco un 98% de recanalizaciones (285). Otros trabajos describen frecuencias de recanalización similares pero a partir de 28 días (286,287). Aunque diversas publicaciones formulan hipótesis sobre el mecanismo por

el que se produce la recanalización, ninguna explica las circunstancias por la que este fenómeno ocurre (281,283-286). Nuestro trabajo carece de estudios colangiográficos e histológicos del conducto biliar. Mediante la observación directa en la segunda intervención se apreció que la dilatación forzada del colédoco proximal a la ligadura era menos evidente y notoria que con la LDB. Esta menor dilatación podría explicarse por la desaparición de la estasis y el restablecimiento del flujo biliar tras la recanalización, con lo que el daño hepático producido es leve en forma de proliferación ductal, observación que coincide con las realizadas en el mismo modelo por otros autores (285).

En el modelo de LSB, al contrario que en la LDB, no se observa SBI en ninguno de los períodos estudiados, por lo que en este modelo, y en nuestro estudio, la carga bacteriana intestinal no es un factor determinante para que ocurra la TB. El ecosistema bacteriano en los animales sometidos a LSB no difiere del observado en el grupo de animales sin ligadura, por lo que su mantenimiento y conservación serían un factor de prevención de la TB. Por el contrario, en la LDB sí se observan fenómenos de SBI durante todo el período estudiado, sobre todo de GP. Aunque el porcentaje encontrado es menor al descrito por otros autores (279), nuestros hallazgos sugieren que los animales adultos que muestran un incremento en el peso del bazo presentan SBI y aumento de la TB desde la 1ª semana.

Hemos observado crecimiento bacteriológico extraintestinal tanto en animales no ligados como en los sometidos a ligadura, tal como se describe en la literatura (144). Nuestro grupo ha descrito en trabajos previos en modelos experimentales de HTP, que los fenómenos de TB a órganos

pueden manifestarse de este modo (278). En estos trabajos se demostraba la presencia de fragmentos genómicos bacterianos correspondientes a las mismas bacterias en los GLM y en otros órganos de ratas control y cirróticas, tanto en presencia de cultivos positivos como en algunos casos negativos, demostrando así la existencia de traslocación viable o no viable. Frente a otros trabajos (144), nuestro estudio presenta algunas diferencias: en la mayoría de nuestras ratas con LDB no hay crecimiento extraganglionar, es más, no se objetiva a la 4ª semana, como tampoco hemos encontrado TB. Tampoco hemos observado crecimiento bacteriano en compartimentos diferentes al hígado y bazo. Probablemente, estas diferencias se deban al modelo utilizado. Este crecimiento extraganglionar aparece, de forma similar a lo observado en la LDB, en los animales sin ligadura y en los sometidos a LSB. Estos datos nos indican que el crecimiento extraintestinal también es un fenómeno normal y espontáneo, que ocurre en animales no sometidos a ligadura. La escasa coexistencia con la TB podría explicarse por la presencia de bacterias no viables en GLM, aunque lamentablemente en esta investigación no fue posible analizar la presencia de traslocación no viable. Es muy probable que nuestros resultados infraestimen la presencia bacteriana real en distintos tejidos por la metodología utilizada.

La ausencia de flujo biliar intestinal tras la LDB es un factor asociado con el desarrollo de TB (305). La ausencia de bilis favorece la endotoxemia e induce daño en la barrera mucosa, promoviendo no sólo la TB, sino la diseminación sistémica (273), coincidiendo con observaciones clínicas que demuestran que la endotoxemia portal y sistémica es un fenómeno

relativamente frecuente en los pacientes con ictericia obstructiva (272). Por el contrario, en los animales sometidos a LSB se observa ausencia de TB viable en la 2ª semana, lo que podría explicarse como consecuencia de fenómenos de recanalización y restablecimiento del flujo biliar intestinal con limitación de la endotoxemia. Sin embargo, y a pesar de no existir alteraciones hepáticas, se observan nuevamente fenómenos de TB en la semana 3 incluso en mayor proporción que en la LDB. Este dato no ha sido descrito en ningún trabajo previo y nos sugiere la posibilidad de que la TB en la LSB no guarde relación con la obstrucción biliar, si bien no disponemos de datos objetivos que permitan explicar esta aparente discrepancia.

En una revisión de 30 estudios publicados entre 2004 y 2011 sobre modelos experimentales de cirrosis que comparó los modelos de ligadura biliar y CCl4, se concluía que el método de ligadura del conducto biliar, además de ofrecer mayor seguridad, podía inducir cirrosis en ratas en un tiempo medio de 2 semanas (181). Después de la LDB, se observan ya en la 1ª semana tras la ligadura importantes daños histológicos consistentes en fenómenos de proliferación ductulillar y tendencia a la formación de nódulos de regeneración que se mantienen a lo largo de todo el estudio. El tiempo que transcurre entre la realización de la LDB y el desarrollo de la cirrosis varía ampliamente en la literatura (226,227,246,264,285,306). La mayoría de trabajos no describen la localización exacta de la LDB y sección (202,221,223,306), no realizan la sección entre ligaduras (144,192,194,198) o no se especifica la realización de doble ligadura (189). Las diferencias en el método quirúrgico empleado y el nivel de la ligadura del conducto biliar pueden influir de forma relevante, no sólo en la intensidad y duración de las

alteraciones producidas, sino también en los cambios histológicos que a nivel hepático puedan apreciarse, explicando la amplia variabilidad observada en la literatura.

Se ha documentado previamente que una ligadura doble con sección se asocia a la multiplicación canalicular y la formación de fibrosis y comunicaciones portosistémicas (287,307). En el diseño de nuestro trabajo, decidimos realizar la LDB y sección lo más proximalmente posible, a fin de minimizar el riesgo de pancreatitis aguda por ligadura accidental del conducto pancreático. Esta sería una posible razón que explicaría el daño hepático precoz que desencadena los cambios histológicos definitorios de cirrosis de forma temprana, ya en la 1ª semana tras la LDB, y que marca una diferencia importante respecto a otros trabajos (24-26,81,82,143,171,240,252,305).

En la LSB, realizada de forma proximal, los cambios histológicos son distintos. No se observan puentes de fibrina que conformen nódulos de regeneración en ningún período. El mayor daño histológico aparece a los 15 días de la ligadura, para normalizarse en las siguientes 2 semanas. Las razones de estos hallazgos podrían explicarse por la aparición de fenómenos de recanalización, tal como hemos sugerido previamente. De hecho, ninguna otra explicación parece plausible.

El comportamiento de la PL varía en los grupos de animales estudiados. Nuestro trabajo pone de manifiesto que tras la LDB, el mayor daño histológico ocurre de forma paralela a una gran cantidad de fenómenos de peroxidación a nivel del hígado ya desde la 1ª semana, manteniéndose en

casi todo el período estudiado. Estos resultados coinciden con la literatura en las primeras 2 semanas (83-85), amplían el período estudiado y demuestran el aumento de la PL hepática existente y observada en modelos experimentales en ratas con ligadura del conducto biliar más allá de las 2 semanas (252) . Estos datos sugieren un papel de los fenómenos de peroxidación en el daño hepático por LDB. Nuestros hallazgos coinciden con los datos publicados de incrementos de la PL en hígado tanto en biopsias hepáticas de humanos en distintos escenarios clínicos (Hemocromatosis, enfermedad de Wilson, enfermedad hepática alcohólica) (86) como en otros modelos de experimentación animal en los que se constataba daño hepático crónico (87-89).

El descenso inicial significativo y persistente en todo el período abarcado del MDA sérico en nuestro grupo de LDB contrasta con lo descrito previamente en la literatura. P. Ljubuncic (252) encuentra niveles séricos elevados de MDA en el grupo de 11 animales (0,52 (0,14) nmol/ml) a los 24 días de la LDB. Es más, observan un incremento de la PL en otros tejidos extrahepáticos (riñón, corazón y cerebro) respecto a los controles, con lo que concluyen que el estrés oxidativo en la enfermedad hepática colestásica experimental es un proceso sistémico que probablemente involucre a otros tejidos extrahepáticos. Nuestros resultados no apoyan, al menos en parte, esta hipótesis, pues aunque sí hemos demostrado un incremento de la PL a nivel hepático, no hemos visto reflejado dicho fenómeno a nivel plasmático en ninguna de las semanas estudiadas. Incluso los niveles encontrados han sido siempre significativamente inferiores a los encontrados en los animales sin ligadura. Tampoco reflejarían las observaciones clínicas que constatan el aumento de la PL en plasma en pacientes con enfermedad hepática (169).



En contra de lo descrito en la literatura (159,171), no hay aumento en sangre de IFN y TNF con la LDB. Una posible explicación podría ser la migración precoz (antes de la 1ª semana) de las células del sistema inmune del torrente circulatorio al hígado, lugar en el que de forma precoz está ocurriendo un importante daño, tanto oxidativo como histológico. Esta migración justificaría en parte la ausencia de respuesta sistémica inflamatoria, a pesar que estén ocurriendo fenómenos de TB y SBI.

Otra posible explicación sería la participación del hígado en la defensa del huésped tras el daño hepático e infección, y el papel de los hepatocitos como células involucradas en la síntesis de citocinas (155). En concreto, las células de Kupffer son responsables de producir potentes citocinas proinflamatorias, como el TNF, después de su estímulo con lipopolisacárido o IB (138,145,151). La lesión hepatocitaria desarrollada precozmente tras la LDB produciría una respuesta dominante inflamatoria con acción paracrina y autocrina, desarrollo de fibrosis y cirrosis, siendo el TNF local el estímulo para la amplificación y síntesis colágena que produce daño histológico e HTP, pudiendo incluso anteceder a la TB. Por otra parte, el hígado también desempeña una importante función en el aclaramiento precoz de citocinas circulantes en sangre (entre ellas, el TNF y el IFN) (128,129) a los pocos minutos de su producción. Este hecho resultaría ser un rasgo diferencial respecto a la LSB, pues en la LDB la respuesta sistémica está atenuada y el daño inflamatorio se concentra en el hígado.

En el modelo de LSB (con daño hepático histológico sutil, sin respuesta oxidativa hepática, pero con tasas similares de TB) se produce una respuesta

inflamatoria sistémica (aumento del TNF sérico) precoz, principalmente en la 1ª semana, que puede reflejar el efecto endocrino mediado por citocinas producidas en el hígado, una menor depuración hepática de las mismas, o bien, ser la respuesta a estos fenómenos de TB que también están ocurriendo. Se precisarán de nuevos estudios que analicen y cuantifiquen en ambos modelos de ligadura, el perfil de citocinas en hígado para ayudar a esclarecer estas hipótesis.

Los animales con LSB se comportan de forma distinta a la LDB desde la 1ª semana. No vemos esa reacción intensa inflamatoria y oxidativa a nivel hepático ni se producen cambios histológicos importantes; en este sentido, se comportan como los animales sin ligadura. Sí se produce, contrariamente a lo descrito con la LDB y animales no ligados, un incremento inicial en la respuesta inflamatoria a nivel sérico que se manifiesta en las primeras 2 semanas tras la ligadura. Esto nos hace sugerir varias hipótesis: a) la TB acontece en relación a cambios inflamatorios y de peroxidación previos al desarrollo de lesiones estructurales hepáticas, b) existe un incremento inicial de la PL hepática no objetivado que acontece antes de los 7 días, con posterior “spillover” a nivel sérico a la semana de la ligadura. En ambas situaciones, y favorecido por la ausencia inicial intestinal de bilis, podría favorecerse la TB a pesar de no tener SBI.

A nivel clínico, C Fabris et al (126) describieron un mayor incremento de la PL sérica en una serie pequeña de 8 pacientes con hepatitis aguda, en contraste con otros pacientes con enfermedad hepática crónica (6 con esteatofibrosis, 5 con hepatitis crónica activa, 22 con hepatocarcinoma y 28 con cirrosis hepática), los autores concluyen que este incremento

significativo en la PL sérica se observa en las enfermedades hepáticas agudas con importante componente inflamatorio. Aunque se trata de dos situaciones distintas, una en la que predomina la colestasis y otra en la que predomina la inflamación, nuestro modelo de LSB sería congruente con estos hallazgos y apoyarían esta hipótesis etiopatogénica, pues observamos un importante incremento de los niveles séricos de MDA en suero (reflejo de daño oxidativo) y de los niveles de TNF en la primera semana, como reflejo de una importante inflamación sistémica.

Son escasos los datos de mortalidad y porcentajes de letalidad asociados al procedimiento descritos en la literatura (301). En nuestro trabajo no observamos diferencias significativas de mortalidad a lo largo de las 4 semanas entre los grupos de ligadura, ni frente a los controles. Con la LSB, la mortalidad se mantiene baja en todo el período de estudio, siendo mayor en la LDB aunque sin alcanzar significación estadística, probablemente por el tamaño muestral y la duración del estudio. Posiblemente, prolongando el período de estudio, hubiesen aparecido diferencias significativas, pues el aumento de mortalidad con la LDB es más llamativa a la 4ª semana, con el desarrollo de HTP (123,144).

En resumen, en el estudio realizado se constata la existencia de destacadas diferencias que nos permite afirmar que son dos modelos distintos, y ha permitido ver el comportamiento de cada modelo de ligadura biliar a lo largo del tiempo y no de forma puntual. La estratificación temporal de nuestro trabajo según una secuencia semanal durante 28 días nos ha permitido ver la evolución a lo largo de estos períodos de los distintos procesos implicados

para la mejor comprensión de la fisiopatogenia y las complicaciones de la cirrosis experimental; los cambios no son iguales y dependen del momento en que se decida realizar su análisis. El modelo de LDB origina un daño histológico importante hepático y cambios morfológicos comparables a los que se observan en la cirrosis humana, coincidiendo con mayor daño inflamatorio local (hepático) que se perpetúa e incrementa a lo largo de las 4 semanas, traducándose en signos de HTP (301,306). A nivel sérico, observamos una importante pérdida del potencial oxidativo a lo largo de todo el estudio. La respuesta inflamatoria sérica medida mediante el TNF está reducida en la 1ª semana. Todos estos cambios, conjuntamente con otros a nivel intestinal (por ejemplo SBI) pueden favorecer no sólo fenómenos de TB, (mayoritariamente por GN), si no de crecimiento extraganglionar, lo cual ocurre de forma prioritaria a nivel de hígado y por bacterias GN. Frente a estas alteraciones, en el modelo de LSB no aparecen tales cambios. Tiene un comportamiento distinto en el hígado. El daño histológico hepático no es comparable (o no aparece o es sutil en las primeras 2 semanas); tampoco vemos daño en términos de PL en hígado. El patrón oxidativo en suero también es distinto, con claro aumento de la PL en las primeras 2 semanas para normalizarse en las 2 siguientes. Los valores de TNF sérico son más altos que en la LDB, principalmente en la 1ª semana. Por tanto, claramente el patrón temporal y el tipo de daño es diferente. La LSB es un modelo donde hay inflamación sistémica, con un patrón global de menor daño histológico e inflamación hepática, a pesar de lo cual también se observan fenómenos de TB (sin que se exprese a nivel intestinal SBI) y, al igual que en el modelo de LDB, acontecen en las primeras semanas, por lo que la LSB puede ser un modelo quirúrgico experimental válido y técnicamente más sencillo a considerar para el estudio de la TB en estadios precirróticos.

## CONCLUSIONES

Las principales características de ambos modelos se resumen en el siguiente cuadro:

	T	Dificultad técnica	Mortalidad	SBI	TB	Daño histológico	Daño Suero	Oxidativo Hígado	↑ TNF $\alpha$
<b>LDB</b>	S1-4	++	~	++	+	+++	-	++	-/+
<b>LSB</b>	S1-2	+	~	+	+	+/ $\emptyset$	++	-	++
	S3-4	+	~	+	++	+/ $\emptyset$	+	-/+	-/+

### Conclusión principal de nuestro trabajo:

Podemos afirmar que el modelo experimental de LSB en ratas es un modelo sencillo para el estudio de la TB en condiciones de mínimo daño estructural hepático sin HTP.

### Otras Conclusiones:

- a. La LSB es un modelo con baja mortalidad.
- b. La LSB presenta menores tasas de SBI que el modelo de LDB.
- c. La LSB produce un daño estructural hepático mínimo (grado de fibrosis  $\leq$  II) y no es un buen modelo para el estudio de la HTP y fenómenos asociados a la misma porque se asocia a recanalización en una elevada proporción de casos.
- d. En el modelo de LSB predominan los procesos séricos de peroxidación lipídica y respuesta inflamatoria sistémica (TNF $\alpha$ ) en las 2 primeras semanas frente al modelo de LDB, donde estos procesos se localizan a nivel hepático.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rimola A. Infecciones bacterianas en la cirrosis hepática. *MTA-Medicina Interna* 1987;5:161-224.
2. Wyke RJ. Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 1987 May;28(5):623-641.
3. Yoshida H, Hamada T, Inuzuka S, Ueno T, Sata M, Tanikawa K. Bacterial infection in cirrhosis, with and without hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1993;88(12):2067-2071.
4. 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 Jan;35(1):140-148.
5. Dixon RE. Effect of infections on hospital care. *Ann Intern Med* 1978 Nov;89(5 Pt 2 Suppl):749-753.
6. Bellot P, Frances R, Such J. [Bacterial translocation in cirrhosis.]. *Gastroenterol Hepatol* 2008 Oct;31(8):508-514.
7. Haley RW, Culver DH, Emori TG, Hooton TM, White JW. Progress report on the evaluation of the efficacy of infection surveillance and control programs. *Am J Med* 1981 Apr;70(4):971-975.
8. Lai D, Gorbach SL, Levitan R. Intestinal microflora in patients with alcoholic cirrhosis: urea-splitting bacteria and neomycin resistance. *Gastroenterology* 1972 Feb;62(2):275-279.
9. Garcia Gonzalez M, Boixeda D, Herrero D, Burgaleta C. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993;105(2):527-531.
10. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988;6(1):80-84.
11. Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1988;8(3):632-635.

12. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984;4(1):53-58.
13. Bernard B, Cadranel JF, Valla D, Escolano S, Jarlier V, Opolon P. Prognostic significance of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients: a prospective study. *Gastroenterology* 1995;108(6):1828-1834.
14. Goulis J, Armonis A, Patch D, Sabin C, Greenslade L, Burroughs AK. Bacterial infection is independently associated with failure to control bleeding in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1998;27:1207-1212.
15. Mihas AA, Toussaint J, Hsu HS, Dotherow P, Achord JL. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: clinical and laboratory features, survival and prognostic indicators. *Hepatogastroenterology* 1992;39(6):520-522.
16. Rimola A, Bory F, Teres J, Perez Ayuso RM, Arroyo V, Rodes J. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1985;5(3):463-467.
17. Bleichner G, Boulanger R, Squara P, Sollet JP, Parent A. Frequency of infections in cirrhotic patients presenting with acute gastrointestinal haemorrhage. *Br J Surg* 1986;73(9):724-726.
18. 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(4):1267-1272.
19. Blaise M, Pateron D, Trinchet JC, Levacher S, Beaugrand M, Pourriat JL. Systemic antibiotic therapy prevents bacterial infection in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1994;20(1 Pt 1):34-38.
20. Pauwels A, Mostefa Kara N, Debenes B, Degoutte E, Levy VG. Systemic antibiotic prophylaxis after gastrointestinal hemorrhage in cirrhotic patients with a high risk of infection. *Hepatology* 1996;24(4):802-806.

21. Hsieh WJ, Lin HC, Hwang SJ, Hou MC, Lee FY, Chang FY, et al. The effect of ciprofloxacin in the prevention of bacterial infection in patients with cirrhosis after upper gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 1998 Jun;93(6):962-966.
22. Goulis J, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in the pathogenesis of variceal bleeding. *Lancet* 1999 Jan 9;353(9147):139-142.
23. Dupeyron C, Campillo B, Mangeney N, Richardet JP, Leluan G. Changes in nature and antibiotic resistance of bacteria causing peritonitis in cirrhotic patients over a 20 year period. *J Clin Pathol* 1998 Aug;51(8):614-616.
24. 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(4 Pt 1):716-724.
25. Llovet JM, Rodriguez Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa 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(1):88-95.
26. Campillo B, Dupeyron C, Richardet JP, Mangeney N, Leluan G. Epidemiology of severe hospital-acquired infections in patients with liver cirrhosis: effect of long-term administration of norfloxacin. *Clin Infect Dis* 1998;26:1066-1070.
27. Aparicio JR, Such J, Pascual S, Arroyo A, Plazas J, Girona E, et al. Development of quinolone-resistant strains of *Escherichia coli* in stools of patients with cirrhosis undergoing norfloxacin prophylaxis: clinical consequences. *J Hepatol* 1999;31:277-283.
28. Van BH, Desmaretz C, Gaeta GB, Wisse E. The role of bile acids in the development of endotoxemia during obstructive jaundice in the rat. *J Hepatol* 1990 May;10(3):274-279.
29. Novella M, Sola R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, et al. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of



spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997;25(3):532-536.

30. Scott-Conner CE, Bernstein JM, Scher KS, Mack ME. The effect of biliary obstruction on a gram-negative bacteremic challenge: a preliminary report. *Surgery* 1986 Jun;99(6):679-683.
31. Ortiz J, Vila MC, Soriano G, Minana J, Gana J, Mirelis B, et al. Infections caused by *Escherichia coli* resistant to norfloxacin in hospitalized cirrhotic patients. *Hepatology* 1999 Apr;29(4):1064-1069.
32. Dupeyron C, Mangeney N, Sedrati L, Campillo B, Fouet P, Leluan G. Rapid emergence of quinolone resistance in cirrhotic patients treated with norfloxacin to prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(2):340-344.
33. Tanaka N, Ryden S, Bergqvist L, Christensen P, Bengmark S. Reticulo-endothelial function in rats with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1985 Dec;72(12):946-949.
34. Yokoyama Y, Alterman DM, Sarmadi AH, Baveja R, Zhang JX, Huynh T, et al. Hepatic vascular response to elevated intraperitoneal pressure in the rat. *J Surg Res* 2002 Jun 15;105(2):86-94.
35. Drivas G, James O, Wardle N. Study of reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis. *Br Med J* 1976 Jun 26;1(6025):1568-1569.
36. Borzio M, Salerno F, Piantoni L, Cazzaniga M, Angeli P, Bissoli F, et al. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001 Jan;33(1):41-48.
37. Rabinovitz M, Prieto M, Gavaler JS, Van Thiel DH. Bacteriuria in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1992 Sep;16(1-2):73-76.
38. Kuo CH, Changchien CS, Yang CY, Sheen IS, Liaw YF. Bacteremia in patients with cirrhosis of the liver. *Liver* 1991;11(6):334-339.
39. Barnes PF, Arevalo C, Chan LS, Wong SF, Reynolds TB. A prospective evaluation of bacteremic patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1988;8(5):1099-1103.

40. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998 Oct;27(4):669-674.
41. Sung JY, Shaffer EA, Olson ME, Leung JW, Lam K, Costerton JW. Bacterial invasion of the biliary system by way of the portal-venous system. *Hepatology* 1991 Aug;14(2):313-317.
42. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18(3):353-358.
43. Planas R, Arroyo V. Spontaneous bacterial peritonitis. *Acta Gastroenterol Belg* 1995;58(3-4):297-310.
44. Floch MH, Gershengoren W, Diamond S, Hersh T. Cholic acid inhibition of intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr* 1970 Jan;23(1):8-10.
45. Storgaard JS, Svendsen JH, Hegnhøj J, Krintel JJ, Nielsen PB. Incidence of spontaneous bacterial peritonitis in patients with ascites. Diagnostic value of white blood cell count and pH measurement in ascitic fluid. *Liver* 1991;11(4):248-252.
46. Toledo C, Salmeron JM, Rimola A, Navasa M, Arroyo V, Llach J, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 1993;17(2):251-257.
47. Llovet JM, Planas R, Morillas R, Quer JC, Cabre E, Boix J, et al. Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993;88(3):388-392.
48. Llach J, Rimola A, Navasa M, Gines P, Salmeron JM, Gines A, et al. Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites: relevance of ascitic fluid protein concentration. *Hepatology* 1992;16(3):724-727.
49. Andreu M, Sola R, Sitges Serra A, Alia C, Gallen M, Vila MC, et al. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology* 1993;104(4):1133-1138.
50. Sola R, Andreu M, Coll S, Vila MC, Oliver MI, Arroyo V. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients treated using

- paracentesis or diuretics: results of a randomized study. *Hepatology* 1995;21(2):340-344.
51. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Rodes J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988;8(1):27-31.
  52. Guarner C, Soriano G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Semin Liver Dis* 1997;17(3):203-217.
  53. Abalia I, Rodríguez E, Umaran A, Lacalle J, Sarasua A, Huarte M, et al. Modulación de la fimbriación P por ciprofloxacina en *Escherichia coli* uropatógena. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15:255-259.
  54. Navasa M, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis. *Liver Int* 2004 Aug;24(4):277-280.
  55. Curry N, McCallum RW, Guth PH. Spontaneous Bacterial Peritonitis in cirrhotic ascites. A decade of experience. *Am J Dig Dis* 1974;19(8):685-692.
  56. Rimola A, Salmeron JM, Clemente G, Rodrigo L, Obrador A, Miranda ML, et al. Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study. *Hepatology* 1995;21(3):674-679.
  57. Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vargas V, Rimola A, et al. Randomized, comparative study of oral ofloxacin versus intravenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1996;111(4):1011-1017.
  58. Mesquita MA, Balbino EP, Albuquerque RS, Carmona CA, Okubo BT, Lorena SL, et al. Ceftriaxone in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis: ascitic fluid polymorphonuclear count response and short-term prognosis. *Hepatogastroenterology* 1997 Sep;44(17):1276-1280.
  59. Ricart E, Soriano G, Novella MT, Ortiz J, Sabat M, Kolle L, et al. Amoxicillin-clavulanic acid versus cefotaxime in the therapy of bacterial infections in cirrhotic patients. *J Hepatol* 2000 Apr;32(4):596-602.

60. Thuluvath PJ, Morss S, Thompson R. Spontaneous bacterial peritonitis--in-hospital mortality, predictors of survival, and health care costs from 1988 to 1998. *Am J Gastroenterol* 2001 Apr;96(4):1232-1236.
61. Follo A, Llovet JM, Navasa M, Planas R, Forns X, Francitorra A, et al. Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 1994;20(6):1495-1501.
62. Albillos A, Cuervas Mons V, Millan I, Canton T, Montes J, Barrios C, et al. Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1990;98(1):134-140.
63. 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 Jun;108(6):1835-1841.
64. 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 Nov;21(5):792-796.
65. Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21(6):1719-1724.
66. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997;26(6):1372-1378.
67. Guarner C, Runyon BA, Heck M, Young S, Sheikh MY. Effect of long-term trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on ascites formation, bacterial translocation, spontaneous bacterial peritonitis, and survival in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* 1999 Oct;44(10):1957-1962.
68. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Cabre E, Jimenez M, Urban A, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994;35(11):1648-1652.

69. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Vinado B, Perez J, Cabre E, et al. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996;23(4):781-787.
70. Llovet JM, Bartoli R, March F, Planas R, Viñado B, Cabre E, et al. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998;28:307-313.
71. Wang XD, Guo WD, Wang Q, Andersson R, Ekblad E, Soltesz V, et al. The association between enteric bacterial overgrowth and gastrointestinal motility after subtotal liver resection or portal vein obstruction in rats. *Eur J Surg* 1994;160(3):153-160.
72. Wang XD, Soltesz V, Molin G, Andersson R. The role of oral administration of oatmeal fermented by *Lactobacillus reuteri* R2LC on bacterial translocation after acute liver failure induced by subtotal liver resection in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1995;30(2):180-185.
73. Wang XD, Soltesz V, Andersson R. Cisapride prevents enteric bacterial overgrowth and translocation by improvement of intestinal motility in rats with acute liver failure. *Eur Surg Res* 1996;28(6):402-412.
74. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, et al. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000 Jan;31(1):43-48.
75. Casafont F, Sanchez E, Martin L, Agüero J, Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 1997 Jun;25(6):1334-1337.
76. Garcia Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993;17(6):1081-1085.
77. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001 Jan;34(1):32-37.

78. Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, Angeli P, Sacerdoti D, Amodio P, et al. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994;19(3):628-634.
79. Gomez F, Ruiz P, Schreiber AD. Impaired function of macrophage Fc gamma receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N Engl J Med* 1994;331(17):1122-1128.
80. Rajkovic IA, Williams R. Mechanisms of abnormalities in host defences against bacterial infection in liver disease. *Clin Sci* 1985;68(3):247-253.
81. Laffi G, Carloni V, Baldi E, Rossi ME, Azzari C, Gresele P, et al. Impaired superoxide anion, platelet-activating factor, and leukotriene B4 synthesis by neutrophils in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993 Jul;105(1):170-177.
82. Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP. Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* 1992;16(1-2):98-101.
83. Rabinovitz M, Gavaler JS, Kumar S, Kajani M, Van Thiel DH. Role of serum complement, immunoglobulins, and cell-mediated immune system in the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). *Dig Dis Sci* 1989;34(10):1547-1552.
84. Fierer J, Finley F. Deficient serum bactericidal activity against *Escherichia coli* in patients with cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* 1979 May;63(5):912-921.
85. Hassner A, Kletter Y, Shlag D, Yedvab M, Aronson M, Shibolet S. Impaired monocyte function in liver cirrhosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981 Apr 18;282(6272):1262-1263.
86. Zetterman RK, Sorrell MF. Immunologic aspects of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1981 Sep;81(3):616-624.
87. Laso FJ, Madruga JI, Giron JA, Lopez A, Ciudad J, San Miguel JF, et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology* 1997 May;25(5):1096-1100.

88. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986;91(6):1343-1346.
89. Runyon BA, Morrissey RL, Hoefs JC, Wyle FA. Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1985;5(4):634-637.
90. Runyon BA, Van Epps DE. Diuresis of cirrhotic ascites increases its opsonic activity and may help prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1986;6(3):396-399.
91. Runyon BA, Antillon MR, McHutchison JG. Diuresis increases ascitic fluid opsonic activity in patients who survive spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1992;14(2-3):249-252.
92. Such J, Guarner C, Soriano G, Teixido M, Barrios J, Tena F, et al. Selective intestinal decontamination increases serum and ascitic fluid C3 levels in cirrhosis. *Hepatology* 1990;12(5):1175-1178.
93. Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients. *J Infect Dis* 1983;147(6):1011-1017.
94. Mal F, Huu TP, Bendahou M, Trinchet JC, Garnier M, Hakim J, et al. Chemoattractant and opsonic activity in ascitic fluid. A study in 47 patients with cirrhosis or malignant peritonitis. *J Hepatol* 1991;12(1):45-49.
95. Homann C, Varming K, Hogasen K, Mollnes TE, Graudal N, Thomsen AC, et al. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. *Gut* 1997;40(4):544-549.
96. Shakil AO, Korula J, Kanel GC, Murray NG, Reynolds TB. Diagnostic features of tuberculous peritonitis in the absence and presence of chronic liver disease: a case control study. *Am J Med* 1996 Feb;100(2):179-185.

97. Malnick SD, Attali M, Israeli E, Gratz R, Geltner D. Spontaneous bacterial arthritis in a cirrhotic patient. *J Clin Gastroenterol* 1998 Dec;27(4):364-366.
98. McCashland TM, Sorrell MF, Zetterman RK. Bacterial endocarditis in patients with chronic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1994 Jun;89(6):924-927.
99. Chang FY, Singh N, Gayowski T, Wagener MM, Marino IR. Staphylococcus aureus nasal colonization in patients with cirrhosis: prospective assessment of association with infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998 May;19(5):328-332.
100. Floch MH, Gershengoren W, Elliott S, Spiro HM. Bile acid inhibition of the intestinal microflora--a function for simple bile acids? *Gastroenterology* 1971 Aug;61(2):228-233.
101. Siringo S, Vaira D, Menegatti M, Piscaglia F, Sofia S, Gaetani M, et al. High prevalence of Helicobacter pylori in liver cirrhosis: relationship with clinical and endoscopic features and the risk of peptic ulcer. *Dig Dis Sci* 1997 Oct;42(10):2024-2030.
102. Dasani BM, Sigal SH, Lieber CS. Analysis of risk factors for chronic hepatic encephalopathy: the role of Helicobacter pylori infection. *Am J Gastroenterol* 1998 May;93(5):726-731.
103. Zullo A, Rinaldi V, Meddi P, Hassan C, Winn S, Attili AF. Helicobacter pylori infection, plasma ammonia levels, and psychometric testing in cirrhotic patients. *Am J Gastroenterol* 1999 Aug;94(8):2214-2218.
104. Scotinotis IA, Lucey MR, Metz DC. Helicobacter pylori infection is not associated with subclinical hepatic encephalopathy in stable cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2001 Dec;46(12):2744-2751.
105. Wiest R, Garcia-TSAO G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005 Mar;41(3):422-433.
106. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992;23(3-4):217-244.



107. 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 Feb;23(2):403-411.
108. Sedman PC, MacFie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, et al. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology* 1994 Sep;107(3):643-649.
109. Cirera I, Navasa M, Andreu H, Garcia-Valdecasas JC, Grande L. [Indications and contraindications of liver transplantation]. *Gastroenterol Hepatol* 1996 Oct;19(8):394-400.
110. 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(6):1835-1841.
111. Hill MJ, Drasar BS, Hawksworth G, Aries V, Crowther JS, Williams RE. Bacteria and aetiology of cancer of large bowel. *Lancet* 1971 Jan 16;1(7690):95-100.
112. Mercader J, Gomez J, Ruiz J, Garre MC, Valdes M. Use of ceftriaxone in the treatment of bacterial infections in cirrhotic patients. *Chemotherapy* 1989;35 Suppl 2:23-26.
113. Maejima K, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infect Immun* 1984;43(1):6-10.
114. Deitch EA, Berg RD. Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice. *J Trauma* 1987;27(2):161-166.
115. Deitch EA, Morrison J, Berg R, Specian RD. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. *Crit Care Med* 1990;18(5):529-536.
116. Sorell WT, Quigley EM, Jin G, Johnson TJ, Rikkens LF. Bacterial translocation in the portal-hypertensive rat: studies in basal conditions and on exposure to hemorrhagic shock. *Gastroenterology* 1993;104(6):1722-1726.

117. Siitonen A. Escherichia coli in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity. *J Infect Dis* 1992 Nov;166(5):1058-1065.
118. Soriano G, Coll P, Guarner C, Such J, Sanchez F, Prats G, et al. Escherichia coli capsular polysaccharide and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Hepatology* 1995;21(3):668-673.
119. Palazon JM, Requena J, Plazas J, Casellas JA, Muñoz C, Carnicer F, et al. Anticuerpos contra enterobacterias y peritonitis bacteriana espontánea en la cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol* 1994;17:460-465.
120. Thomas HC, McSween RN, White RG. Role of the liver in controlling the immunogenicity of commensal bacteria in the gut. *Lancet* 1973 Jun 9;1(7815):1288-1291.
121. Giron-Gonzalez JA, Rodriguez-Ramos C, Elvira J, Galan F, Del Alamo CF, Diaz F, et al. Serial analysis of serum and ascitic fluid levels of soluble adhesion molecules and chemokines in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Exp Immunol* 2001 Jan;123(1):56-61.
122. Deitch EA, Berg R, Specian RD. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987;122:185-190.
123. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwarth ME. Bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats. *Pediatr Surg Int* 1996 Jun;11(5-6):322-325.
124. Frances R, Chiva M, Sanchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, et al. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007 May;46(5):797-803.
125. Madrid AM, Hurtado C, Venegas M, Cumsille F, Defilippi C. Long-Term treatment with cisapride and antibiotics in liver cirrhosis: effect on small intestinal motility, bacterial overgrowth, and liver function. *Am J Gastroenterol* 2001 Apr;96(4):1251-1255.

126. Fabris C, Pirisi M, Panozzo MP, Soardo G, Toniutto P, Hocza V, et al. Intensity of inflammatory damage and serum lipid peroxide concentrations in liver disease. *J Clin Pathol* 1993 Apr;46(4):364-367.
127. O'Boyle CJ, MacFie J, Dave K, Sagar PS, Poon P, Mitchell CJ. Alterations in intestinal barrier function do not predispose to translocation of enteric bacteria in gastroenterologic patients. *Nutrition* 1998 Apr;14(4):358-362.
128. Diez RA, Perdereau B, Falcoff E. From old results to new perspectives: a look at interferon's fate in the body. *J Interferon Res* 1987 Oct;7(5):553-557.
129. Ferraiolo BL, Moore JA, Crase D, Gribling P, Wilking H, Baughman RA. Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human tumor necrosis factor-alpha in mice. *Drug Metab Dispos* 1988 Mar;16(2):270-275.
130. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984 Jan;86(1):174-193.
131. Bevins CL, Martin-Porter E, Ganz T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* 1999 Dec;45(6):911-915.
132. Garcia Tsao G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21(1):257-275.
133. 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 Jul;36(1):135-141.
134. 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 Jan;37(1):208-217.
135. Soriano G, Teixido M, Guarner C, Such J, Espinos JC, Sainz S, et al. Variación del C3 en líquido ascítico de pacientes cirróticos sometidos

a esterilización intestinal o a descontaminación intestinal selectiva. *Rev Esp Enferm Apar Dig* 1989;75(2):123-126.

136. Gonzalez AR, Gonzalez GM, Albillos MA. [Physiopathology of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis]. *Gastroenterol Hepatol* 2007 Feb;30(2):78-84.
137. Bouhnik Y, Alain S, Attar A, Flourie B, Raskine L, Sanson-Le PM, et al. Bacterial populations contaminating the upper gut in patients with small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *Am J Gastroenterol* 1999 May;94(5):1327-1331.
138. Bauer J, Birmelin M, Northoff GH, Northemann W, Tran-Thi TA, Ueberberg H, et al. Induction of rat alpha 2-macroglobulin in vivo and in hepatocyte primary cultures: synergistic action of glucocorticoids and a Kupffer cell-derived factor. *FEBS Lett* 1984 Nov 5;177(1):89-94.
139. Pardo A, Bartoli R, Lorenzo-Zuniga V, Planas R, Vinado B, Riba J, et al. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000 Apr;31(4):858-863.
140. Bauer TM, Fernandez J, Navasa M, Vila J, Rodes J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002 Apr;36(4):501-506.
141. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R, Hofmann AF, Vinado B, Hagey LR, et al. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 2003 Mar;37(3):551-557.
142. Chiva M, Soriano G, Rochat I, Peralta C, Rochat F, Llovet T, et al. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002 Oct;37(4):456-462.
143. Schimpl G, Pabst MA, Feierl G, Kuesz A, Zbey H, Takahashi S, et al. A tungsten supplemented diet attenuates bacterial translocation in chronic portal hypertensive and cholestatic rats: role of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *Gut* 1999 Dec;45(6):904-910.

144. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwarth ME. Allopurinol and glutamine attenuate bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct ligated growing rats. *Gut* 1996 Jul;39(1):48-53.
145. Busam KJ, Bauer TM, Bauer J, Gerok W, Decker K. Interleukin-6 release by rat liver macrophages. *J Hepatol* 1990 Nov;11(3):367-373.
146. Bernard B, Grange JD, Khac EN, Amiot X, Opolon P, Poynard T. Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology* 1999 Jun;29(6):1655-1661.
147. Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Durr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology* 1984 Feb;31(1):30-34.
148. Chesta J, Defilippi C, Defilippi C. Abnormalities in proximal small bowel motility in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1993 May;17(5):828-832.
149. Casafont F, de las Heras G, Martin L, Lopez MJ, Ledesma F, Pons-Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995;40(6):1252-1256.
150. Huu TP, Bendahou M, Sourbier P, Mal F, Beaugrand M, Hakim J. Opsonic activity of ascitic fluids by a chemiluminescent method. *J Biolumin Chemilumin* 1989;3(2):89-92.
151. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990 Sep 11;192(2):245-261.
152. Shindo K, Machida M, Miyawaka K, Fukumura M. A syndrome of cirrhosis, achlorhydria, small intestinal bacterial overgrowth, and fat malabsorption. *Am J Gastroenterol* 1993;88(12):2084-2091.
153. Bauer TM, Schwacha H, Steinbruckner B, Brinkmann FE, Ditzen AK, Kist M, et al. Diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis of the liver: poor performance of the glucose breath hydrogen test. *J Hepatol* 2000 Sep;33(3):382-386.

154. Bauer TM, Steinbruckner B, Brinkmann FE, Ditzen AK, Schwacha H, Aponte JJ, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001 Oct;96(10):2962-2967.
155. Andus T, Bauer J, Gerok W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 1991 Feb;13(2):364-375.
156. Yang CY, Chang CS, Chen GH. Small-intestinal bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis, diagnosed with glucose H<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub> breath tests. *Scand J Gastroenterol* 1998 Aug;33(8):867-871.
157. Chang CS, Yang SS, Kao CH, Yeh HZ, Chen GH. Small intestinal bacterial overgrowth versus antimicrobial capacity in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Gastroenterol* 2001 Jan;36(1):92-96.
158. Madrid AM, Cumsille F, Defilippi C. Altered small bowel motility in patients with liver cirrhosis depends on severity of liver disease. *Dig Dis Sci* 1997;42(4):738-742.
159. Bemelmans MH, Gouma DJ, Greve JW, Buurman WA. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. *Hepatology* 1992 Jun;15(6):1132-1136.
160. Bode C, Koleyke R, Schafer K, Bode JC. Breath hydrogen excretion in patients with alcoholic liver disease--evidence of small intestinal bacterial overgrowth. *Z Gastroenterol* 1993 Jan;31(1):3-7.
161. Imperiale TF, Esber EJ. Preventing infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1993;104(4):1238.
162. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990 Mar;125(3):403-404.
163. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* 1990 Jul;162(1):82-90.

164. Steffen EK, Berg RD. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect Immun* 1983;39(3):1252-1259.
165. Jackson RJ, Smith SD, Rowe MI. Selective bowel decontamination results in gram-positive translocation. *J Surg Res* 1990 May;48(5):444-447.
166. Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG, et al. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1998 Aug;228(2):188-193.
167. Veal N, Auduberteau H, Lemarie C, Oberti F, Cales P. Effects of octreotide on intestinal transit and bacterial translocation in conscious rats with portal hypertension and liver fibrosis. *Dig Dis Sci* 2001 Nov;46(11):2367-2373.
168. Yi JH, Ni RY, Luo DD, Li SL. Intestinal flora translocation and overgrowth in upper gastrointestinal tract induced by hepatic failure. *World J Gastroenterol* 1999 Aug;5(4):327-329.
169. Chen MF, Mo LR, Lin RC, Kuo JY, Chang KK, Liao C, et al. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. *Free Radic Biol Med* 1997;23(4):672-679.
170. Peron JM, Barange K, Otal P, Rousseau H, Payen JL, Pascal JP, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts in the treatment of refractory ascites: results in 48 consecutive patients. *J Vasc Interv Radiol* 2000 Oct;11(9):1211-1216.
171. Heller J, Sogni P, Barriere E, Tazi KA, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, et al. Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 2000 Sep;33(3):376-381.

172. Reilly JA, Quigley EMM, Forst CF, Ridders LF. Small intestinal transit in the portal hypertensive rat. *Gastroenterology* 1991;100:670-674.
173. Stewart JJ, Battarbee HD, Farrar GE, Betzing KW. Intestinal myoelectrical activity and transit time in chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1992 Oct;263(4 Pt 1):G474-G479.
174. Baraona E, Orrego H, Fernandez O, Amenabar E, Maldonado E, Tag F, et al. Absorptive function of the small intestine in liver cirrhosis. *Am J Dig Dis* 1962;7(4):318-330.
175. Ramelli GP, Tonz O, Zimmermann A, Lentze MJ. Crohn disease with sclerosing cholangitis and liver cirrhosis in adolescence. *Eur J Pediatr* 1991;150(8):557-559.
176. Chesta J, Smok G. [Morphology of the myenteric plexus of the small intestine in patients with liver cirrhosis]. *Rev Med Chil* 1993 Feb;121(2):139-143.
177. Van Thiel DH, Fagiuoli S, Wright HI, Chien MC, Gavalier JS. Gastrointestinal transit in cirrhotic patients: effect of hepatic encephalopathy and its treatment. *Hepatology* 1994 Jan;19(1):67-71.
178. Madrid AM, Brahm J, Antezana C, Gonzalez-Koch A, Defilippi C, Pimentel C, et al. Small bowel motility in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1998 Dec;93(12):2436-2440.
179. Galati JS, Holdeman KP, Bottjen PL, Quigley EMM. Gastric emptying and orocecal transit in portal hypertension and end-stage chronic liver disease. *Liver Transpl Surg* 1997;3(1):34-38.
180. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestinal dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998;28:1187-1190.
181. Marques TG, Chaib E, da Fonseca JH, Lourenco AC, Silva FD, Ribeiro MA, Jr., et al. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cir Bras* 2012 Aug;27(8):589-594.



182. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, et al. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 1999 Aug 5;341(6):403-409.
183. Nieuwenhuijs VB, van Dijk JE, Gooszen HG, Akkermans LM. Obstructive jaundice, bacterial translocation and interdigestive small-bowel motility in rats. *Digestion* 2000;62(4):255-261.
184. Moody FG, Haley-Russell D, Muncy DM. Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995 Aug;40(8):1798-1804.
185. Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, Chen Y, LaRocco MT, et al. Alterations in rat intestinal transit by morphine promote bacterial translocation. *Dig Dis Sci* 1993;38(8):1530-1536.
186. Stotzer PO, Bjornsson ES, Abrahamsson H. Interdigestive and postprandial motility in small-intestinal bacterial overgrowth. *Scand J Gastroenterol* 1996 Sep;31(9):875-880.
187. Vantrappen G, Janssens J, Hellemans J, Ghoois Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest* 1977 Jun;59(6):1158-1166.
188. Scott LD, Cahall DL. Influence of the interdigestive myoelectric complex on enteric flora in the rat. *Gastroenterology* 1982 Apr;82(4):737-745.
189. Weinstein WM. Epithelial cell renewal of the small intestinal mucosa. *Med Clin North Am* 1974 Nov;58(6):1375-1386.
190. Husebye E, Skar V, Hoverstad T, Iversen T, Melby K. Abnormal intestinal motor patterns explain enteric colonization with gram-negative bacilli in late radiation enteropathy. *Gastroenterology* 1995 Oct;109(4):1078-1089.
191. Castiglione F, Del Vecchio BG, Rispo A, Petrelli G, Amalfi G, Cozzolino A, et al. Orocecal transit time and bacterial overgrowth in

- patients with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2000 Jul;31(1):63-66.
192. Hagemann RF, Sigdestad CP, Leshner S. A quantitative description of the intestinal epithelium of the mouse. *Am J Anat* 1970 Sep;129(1):41-51.
193. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Jr., Sunderman FW, Jr. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987 Feb;33(2 Pt 1):214-220.
194. Altmann GG, Enesco M. Cell number as a measure of distribution and renewal of epithelial cells in the small intestine of growing and adult rats. *Am J Anat* 1967 Sep;121(2):319-336.
195. Marinelli IA, Sanchez MA, Izquierdo F, Burgos LF, Arce AA, del Castillo-Olivares Ramos JL. [Morphopathological changes before and after biliodigestive derivation in experimental cirrhosis induced by biliary ligation in the rat]. *Rev Esp Enferm Dig* 1995 Jan;87(1):25-31.
196. Pelletier G, Briantais MJ, Buffet C, Pillot J, Etienne JP. Serum and intestinal secretory IgA in alcoholic cirrhosis of the liver. *Gut* 1982;23:475-480.
197. Norman DA, Atkins JM, Seelig JrLL, Gomez-Sanchez C, Krejs GJ. Water and electrolyte movement and mucosal morphology in the jejunum of patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1980;79:707-715.
198. Nagral AS, Joshi AS, Bhatia SJ, Abraham P, Mistry FP, Vora IM. Congestive jejunopathy in portal hypertension. *Gut* 1993 May;34(5):694-697.
199. Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, et al. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002 Apr;14(4):371-376.

200. 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.
201. Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, et al. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2003 Sep;50(53):1482-1486.
202. Zimmermann H, Blaser H, Zimmermann A, Reichen J. Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol* 1994 Feb;20(2):231-239.
203. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993;18(5):1139-1143.
204. Deitch EA, Specian RD, Berg RD. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med* 1991 Jun;19(6):785-791.
205. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* 1979;28:293-450.
206. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993;104(5):1492-1497.
207. Bar Meir S, Conn HO. Spontaneous bacterial peritonitis induced by intraarterial vasopressin therapy. *Gastroenterology* 1976;70(3):418-421.
208. Mellencamp MA, Preheim LC. Pneumococcal pneumonia in a rat model of cirrhosis: effects of cirrhosis on pulmonary defense mechanisms against *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991 Jan;163(1):102-108.
209. Leandro G, Colloredo Mels G, Minoia M, Manghisi OG, Di Nolfo MA, Moretti GB. The spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic

- patients. To a new gold standard. *Ital J Gastroenterol* 1991;23(7):416-420.
210. Young LS, Martin WJ, Meyer RD, Weinstein RJ, Anderson ET. Gram-negative rod bacteremia: microbiologic, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 1977 Apr;86(4):456-471.
  211. Schifferli JA, Ng YC, Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med* 1986 Aug 21;315(8):488-495.
  212. Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, VanAman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest* 1983 Feb;71(2):236-247.
  213. Dunn DL, Barke RA, Ewald DC, Simmons RL. Macrophages and translymphatic absorption represent the first line of host defense of the peritoneal cavity. *Arch Surg* 1986;122:105-110.
  214. Ekdahl KN, Loof L, Nyberg A, Nilsson UR, Nilsson B. Defective Fc receptor-mediated clearance in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1991 Oct;101(4):1076-1082.
  215. Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, Cramer E, Auclair C, Rueff B, et al. Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1977 Dec;7(6):571-577.
  216. Yousif Kadaru AG, Rajkovic IA, Wyke RJ, Williams R. Defects in serum attractant activity in different types of chronic liver disease. *Gut* 1984;25(1):79-84.
  217. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986 Mar;6(2):252-262.
  218. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 2000 Aug;182(2):526-533.
  219. Genesca J, Marti R, Rojo F, Campos F, Peribanez V, Gonzalez A, et al. Increased tumour necrosis factor alpha production in mesenteric

- lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut* 2003 Jul;52(7):1054-1059.
220. 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 Aug;42(2):411-419.
221. Accatino L, Contreras A, Fernandez S, Quintana C. The effect of complete biliary obstruction on bile flow and bile acid excretion: postcholestatic choleresis in the rat. *J Lab Clin Med* 1979 May;93(5):706-717.
222. Albillos A, Hera Ad AL, Reyes E, Monserrat J, Munoz L, Nieto M, 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 Apr;40(4):624-631.
223. Accatino L, Contreras A, Berdichevsky E, Quintana C. The effect of complete biliary obstruction on bile secretion. Studies on the mechanisms of postcholestatic choleresis in the rat. *J Lab Clin Med* 1981 Apr;97(4):525-534.
224. Frances R, Benlloch S, Zapater P, Gonzalez JM, Lozano B, Munoz C, et al. A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology* 2004 Feb;39(2):484-491.
225. Such J, Munoz C, Zapater P, Perez-Mateo M. Bacterial DNA induces a proinflammatory immune response in patients with decompensated cirrhosis. *Gut* 2005 Oct;54(10):1500.
226. Johnstone JM, Lee EG. A quantitative assessment of the structural changes the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *Br J Exp Pathol* 1976 Feb;57(1):85-94.
227. Franco D, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H. Portal hypertension after bile duct obstruction: effect of bile diversion on portal pressure in the rat. *Arch Surg* 1979 Sep;114(9):1064-1067.

228. Gómez-Jiménez j, Ribera E, Martínez-Vázquez jm, Gasser I, Segura RM. Ascitis neutrocítica con cultivo negativo. Comparación con la peritonitis bacteriana espontánea del cirrótico. *Gastroenterol Hepatol* 1992;15.
229. Rogers DE. Host mechanisms which act to remove bacteria from the blood stream. *Bacteriol Rev* 1960 Mar;24(1):50-66.
230. Bercovici B, Michel J, Miller J, Sacks TG. Antimicrobial activity of human peritoneal fluid. *Surg Gynecol Obstet* 1975;141:885-887.
231. Fromkes JJ, Thomas FB, Mekhjian HS, Evans M. Antimicrobial activity of human ascitic fluid. *Gastroenterology* 1977;73:668-672.
232. Runyon BA. Bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18(3):271-272.
233. Michel J, Bercovici B, Sacks T. Comparative studies on the antimicrobial activity of peritoneal and ascitic fluids in human beings. *Surg Gynecol Obstet* 1980;151:55-57.
234. Simberkoff MS, Moldover NH, Weiss G. Bactericidal and opsonic activity of cirrhotic ascites and nonascitic peritoneal fluid. *J Lab Clin Med* 1978;91:831-839.
235. Stevens P, Young LS, Adamu S. Opsonization of various capsular (K) *E. coli* by the alternative complement pathway. *Immunology* 1983;50:497-502.
236. Hurwich DB, Lindor KD, Hay JE, Gross JB, Jr., Kaese D, Rakela J. Prevalence of peritonitis and the ascitic fluid protein concentration among chronic liver disease patients. *Am J Gastroenterol* 1993;88(8):1254-1257.
237. Fromkes JJ, Thomas FB, Kraut EH. Activation of the alternative complement pathway in ascitic fluid during spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Gastroenterol* 1982;4(4):347-350.
238. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002 Nov;30(6):620-650.

239. Andresen HM, Regueira HT, Leighton F. [Oxidative stress in critically ill patients]. *Rev Med Chil* 2006 May;134(5):649-656.
240. Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 1992 Nov;103(5):1625-1629.
241. Krahenbuhl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995 Aug;22(2):607-612.
242. Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. Microsomal function in biliary obstructed rats: effects of S-adenosylmethionine. *J Hepatol* 1996 Mar;24(3):353-359.
243. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995 Jan;35(1-2):21-39.
244. Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 1998 Jun 5;273(23):14085-14089.
245. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of peroxynitrite and poly (ADP-ribosyl) synthetase activation in cardiovascular derangement induced by zymosan in the rat. *Life Sci* 1998;63(11):923-933.
246. Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, et al. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005 Oct;20(10):1538-1544.
247. Alvarez E, Ruiz-Gutierrez V, Santa MC, Machado A. Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech Ageing Dev* 1993 Oct 1;71(1-2):1-12.
248. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979 Jun;95(2):351-358.

249. Tsai LY, Lee KT, Tsai SM, Lee SC, Yu HS. Changes of lipid peroxide levels in blood and liver tissue of patients with obstructive jaundice. *Clin Chim Acta* 1993 Apr 16;215(1):41-50.
250. Ono M, Sekiya C, Ohhira M, Ohhira M, Namiki M, Endo Y, et al. Elevated level of serum Mn-superoxide dismutase in patients with primary biliary cirrhosis: possible involvement of free radicals in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1991 Nov;118(5):476-483.
251. Bomzon A, Holt S, Moore K. Bile acids, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction. *Semin Nephrol* 1997 Nov;17(6):549-562.
252. Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut* 2000 Nov;47(5):710-716.
253. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 2000 Nov;33(5):742-750.
254. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 1996;20(3):351-359.
255. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983 Jan;244(1):G52-G57.
256. Blanchet L, Lebrec D. Changes in splanchnic blood flow in portal hypertensive rats. *Eur J Clin Invest* 1982 Aug;12(4):327-330.
257. Moreau R, Lee SS, Soupison T, Roche-Sicot J, Sicot C. Abnormal tissue oxygenation in patients with cirrhosis and liver failure. *J Hepatol* 1988 Aug;7(1):98-105.
258. Moriwaki Y, Yamamoto T, Yamakita J, Takahashi S, Higashino K. Comparative localization of aldehyde oxidase and xanthine oxidoreductase activity in rat tissues. *Histochem J* 1998 Feb;30(2):69-74.



259. Johnson JL, Waud WR, Cohen HJ, Rajagopalan KV. Molecular basis of the biological function of molybdenum. Molybdenum-free xanthine oxidase from livers of tungsten-treated rats. *J Biol Chem* 1974 Aug 25;249(16):5056-5061.
260. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:87-99.
261. Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981 May;240(5):G371-G375.
262. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 1988 May;254(5 Pt 1):G768-G774.
263. Kooij A. A re-evaluation of the tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase. *Histochem J* 1994 Dec;26(12):889-915.
264. Antoine M, Tag CG, Wirz W, Borkham-Kamphorst E, Sawitza I, Gressner AM, et al. Upregulation of pleiotrophin expression in rat hepatic stellate cells by PDGF and hypoxia: implications for its role in experimental biliary liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Dec 2;337(4):1153-1164.
265. Frederiks WM, Bosch KS. The proportion of xanthine oxidase activity of total xanthine oxidoreductase activity in situ remains constant in rat liver under various (patho)physiological conditions. *Hepatology* 1996 Nov;24(5):1179-1184.
266. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:47-63.
267. Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N, Lieber CS. Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 1990 Jan;98(1):203-210.
268. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989 Feb 9;320(6):365-376.

269. Spitzer JA, Mayer AM. Hepatic neutrophil influx: eicosanoid and superoxide formation in endotoxemia. *J Surg Res* 1993 Jul;55(1):60-67.
270. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983 Sep;94(3):415-422.
271. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986 Oct;251(4 Pt 1):G567-G574.
272. Wilkinson SP, Moodie H, Stamatakis JD, Kakkar VV, Williams R. Endotoxaemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. *Br Med J* 1976 Dec 11;2(6049):1415-1418.
273. Cahill CJ, Pain JA, Bailey ME. Bile salts, endotoxin and renal function in obstructive jaundice. *Surg Gynecol Obstet* 1987 Dec;165(6):519-522.
274. Muriel P, Suarez OR. Role of lipid peroxidation in biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol* 1994 Nov;14(6):423-426.
275. Lemasters JJ, Nieminen AL. Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes. *Biosci Rep* 1997 Jun;17(3):281-291.
276. Gomez Jimenez J, Ribera E, Martinez Vazquez JM, Gasser I, Segura RM. Peritonitis bacteriana del cirrótico. Estudio prospectivo de 80 episodios. *Med Clin Barc* 1992;99(13):493-497.
277. Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M, Bomzon A. Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut* 1996 Sep;39(3):475-478.
278. Carlos Guarner, José M. González-Navajas, Elisabet Sánchez, Germán Soriando, Rubén Francés, Maite Chiva, Pedro Zapater et al. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006 Sept; 44(3):633–639.

279. Miura S, Asakura H, Munakata Y, Kobayashi K, Yoshioka M, Morishita T, et al. Lymphatic role in the pathogenesis of fat malabsorption in liver cirrhosis in rats. *Dig Dis Sci* 1982 Nov;27(11):1030-1036.
280. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991 Sep 30;91(3C):14S-22S.
281. Wright JE, Braithwaite JL. Collateral biliary channels. *Nature* 1962 Jul 7;195:95-96.
282. Ramachandran A, Prabhu R, Thomas S, Reddy JB, Pulimood A, Balasubramanian KA. Intestinal mucosal alterations in experimental cirrhosis in the rat: role of oxygen free radicals. *Hepatology* 2002 Mar;35(3):622-629.
283. Ni Y, Lukito G, Marchal G, Cresens E, Yu J, Petre C, et al. Potential role of bile duct collaterals in the recovery of the biliary obstruction: experimental study in rats using microcholangiography, histology, serology and magnetic resonance imaging. *Hepatology* 1994 Dec;20(6):1557-1566.
284. Kraus GE, Beltran A. Effect of induced infarction on rat liver implanted with Walker carcinoma 256. *Arch Surg* 1959 Nov;79:769-774.
285. Wright JE, Braithwaite JL. The effects of ligation of the common bile duct in the rat. *J Anat* 1964 Apr;98:227-233.
286. Cameron GR, Prasad LB. Recovery from biliary obstruction after spontaneous restoration of the obstructed common bile-duct. *J Pathol Bacteriol* 1960 Jul;80:127-136.
287. Symeonidis A, Trams EG. Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct. *Am J Pathol* 1957 Jan;33(1):13-27.

288. 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 Nov;104(9):1223-1233.
289. Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997 Oct;113(4):1246-1257.
290. Wasser S, Tan CE. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann Acad Med Singapore* 1999 Jan;28(1):109-111.
291. Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. In situ detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases. *Hepatology* 1997 Jul;26(1):135-142.
292. Kinugasa T, Uchida K, Kadowaki M, Takase H, Nomura Y, Saito Y. Effect of bile duct ligation on bile acid metabolism in rats. *J Lipid Res* 1981 Feb;22(2):201-207.
293. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991 Sep 30;91(3C):14S-22S.
294. Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM, Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 1995 Oct;109(4):1249-1256.
295. Proctor E, Chatamra K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1983 Jun;64(3):320-330.
296. Ceryak S, Bouscarel B, Fromm H. Comparative binding of bile acids to serum lipoproteins and albumin. *J Lipid Res* 1993 Oct;34(10):1661-1674.
297. Deitch EA, Sittig K, Li M, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990 Jan;159(1):79-84.

298. Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Willen R, Bengmark S. The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* 1993 Jan;25(1):11-19.
299. Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology* 2000 Jun;118(6):1157-1168.
300. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100(2):489-493.
301. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982 Dec;83(6):1183-1190.
302. Van Bossuyt H, Desmaretz C, Gaeta GB, Wisse E. The role of bile acids in the development of endotoxemia during obstructive jaundice in the rat. *J Hepatol* 1990 May;10(3):274-279.
303. Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, et al. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim* 2005 Apr;54(2):155-161.
304. Parks RW, Stuart Cameron CH, Gannon CD, Pope C, Diamond T, Rowlands BJ. Changes in gastrointestinal morphology associated with obstructive jaundice. *J Pathol* 2000 Dec;192(4):526-532.
305. Slocum MM, Sittig KM, Specian RD, Deitch EA. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surg* 1992;58(5):305-310.
306. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984 Jun;65(3):305-311.
307. Tomas A, Soriano G, Guarner C, Portorreal R, Novella MT, Vilardell F. Hospital-acquired bacterial infections in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination [letter]. *J Hepatol* 1993;18(2):262-263.

308. Rajkovic IA, Williams R. Mechanisms of abnormalities in host defences against bacterial infection in liver disease. *Clin Sci* 1985;68(3):247-253.
309. Wilcox CM, Dismukes WE. Spontaneous bacterial peritonitis. A review of pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Medicine Baltimore* 1987;66(6):447-456.



## LISTADO DEL MATERIAL ICONOGRÁFICO

<b>Epígrafe</b>	<b>Iconografía</b>	<b>Resumen Título</b>	<b>Página</b>
Introducción	Esquema 1	Patogenia de la PBE Síntesis de ácido úrico y generación de radicales libres	18
	Esquema 2	Relación TB e Inflamación	22
	Esquema 3	Representación metabólica de las Especies Reactivas de Oxígeno	34
	Figura 1	Síntesis de ácido úrico y generación de radicales libres	37
Material y métodos	Tabla 1	Total animales por grupos y semanas de sacrificio	47
	Figura 2	Panel resumen procedimiento anestésico y quirúrgico	56
	Esquema 4	Determinación de los peróxidos lipídicos en plasma con HPLC	57
Resultados	Figura 3	Representación de la Mediana de los pesos por grupos y semanas	64 y 65
	Gráfico 1	Mediana del peso del Bazo semanas 3 <sup>a</sup> y 4 <sup>a</sup> en animales sin/con ligadura	66
	Tabla 2	Mortalidad total por grupos y semanas	67
	Figura 4	Mortalidad total por grupos y semanas	68
	Figura 5	Supervivencia entre grupos recategorizados	69
	Tabla 3	TB por grupos y semanas. Reagrupamiento sin/con ligadura	71
	Figura 6	TB por grupos y semanas	72
	Figura 7	TB por grupos recategorizados	73
	Tabla 4	Descripción de la TB por grupos y semanas	74
	Figura 8	Compartimentos con crecimiento extraganglionar	75
	Tabla 5	Síntesis creto. bact. ganglionar y extraganglionar	76

Tabla 6	Representación gráfica crecimiento ectraganglionar en animales con TB	77	
Figura 9	Animales con TB con/sin ligadura y crecimiento extraganglionar	78	
Fotos	AP por grupos	79-81	
Figura 10	Daño hepático moderado-severo por grupos y semanas	82	
Figura 11	SBI	83	
Tabla 7	SBI por grupos y semanas	84	
Figura 12	MDA en suero global	85	
Figura 13	MDA en suero: Temporalización por grupos	86	
Figura 14	MDA en hígado global	87	
Figura 15	MDA en hígado: Temporalización por grupos	88	
Figura 16	MDA global por compartimentos	89 y 90	
Figura 17	TNF global sérico basal y tras estimulación	91	
Figura 18	TNF sérico basal y tras estimulación por grupos y semanas	92 y 93	
Figura 19	IFN global sérico basal y tras estimulación	94	
Figura 20	IFN sérico basal y tras estimulación por grupos y semanas	95 y 96	
Conclusiones	Cuadro	Cuadro resumen	109