



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
Facultad de Medicina

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE DETERMINAN LA VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA QUE SE PRODUCE EN PACIENTES CIRRÓTICOS EN RESPUESTA A FENÓMENOS DE TRASLOCACIÓN BACTERIANA MOLECULAR

*“STUDY OF THE FACTORS THAT MY BE INVOLVED IN THE VARIABILITY OF THE
INFLAMMATORY RESPONSE IN CIRRHOTIC PATIENS WITH BACTERIAL
TRASLOCATION”*

ELENA CARO MARTÍNEZ

San Juan de Alicante, 2014

**Tesis presentada para optar al Grado de Doctor en Medicina
Con Mención Europea**

DOCTORANDA:

Elena Caro Martínez. Especialista en Medicina Interna. Hospital General Universitario de Alicante.

DIRECCIÓN:

- ❖ *Dr. José Such Ronda.* Profesor Titular de Medicina. Departamento de Medicina Clínica. Universidad Miguel Hernández. I.P. del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) en el Hospital General Universitario de Alicante y Departamento de Medicina Clínica de la UMH.
- ❖ *Dr. Rubén Francés Guarinos:* Profesor Asociado de Inmunología. Departamento de Medicina Clínica. Universidad Miguel Hernández. Responsable del laboratorio del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Hospital General Universitario de Alicante. Universidad Miguel Hernández.
- ❖ *Dr. Pedro Zapater Hernández.* Profesor Asociado de Medicina. Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica. Universidad Miguel Hernández Médico Adjunto, Unidad de Farmacología Clínica. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) Hospital General Universitario de Alicante.

COLABORACIÓN:

- ❖ *Dr. Francisco Sánchez del Campo.* Departamento de Histología y Anatomía. Facultad de Medicina. Universidad Miguel Hernández.
- ❖ *Prof. Dr. Johannes Hensen.* Hospital Klinikum Region Hannover. Departamento de Medicina Interna.



“Dadas las circunstancias adecuadas, sin más base que los sueños, la determinación y la libertad de intentarlo, personas muy corrientes hacen constantemente cosas Extrarodinarias”.

Dee Ward Hock



“La gratitud en silencio no sirve a nadie”

Muchas personas se cruzan en la vida de uno mismo, para algunas pasamos desapercibidos, para otras permanecemos de forma superficial y existen otras, que se sumergen en tu día a día, y con sus actos, nos hacen evolucionar de forma personal y profesional..., ***¡Gracias a todos los que habéis hecho posible que este proyecto sea una realidad!***

En primer lugar quiero mostrar mi mayor agradecimiento a los que han sido el motor y los principales motivadores de la realización de esta tesis, los *Dres. José Such, Rubén Francés y Pedro Zapater*. Muchas gracias por creer en mí desde el primer momento y por vuestra paciencia hasta el final de este trabajo. Vuestra ayuda, orientación y contribución han hecho que esta tesis esté llena de triunfo y autenticidad.

Al departamento de Histología y Anatomía de la Universidad Miguel Hernández, principalmente al impulsor de mis deseos doctorales, los *Dres. Francisco Sánchez del Campo y Francisco F. Terol*, vuestros apoyos han sido siempre fundamentales para mi formación profesional y humana.

El carácter europeo de esta tesis no hubiera sido posible sin el personal que forma el departamento de Medicina Interna del Hospital Nordstadt Klinikum Hannover, liderado por el *Prof. Johannes Hensen* y sin el promotor del mismo en Alemania, el *Prof. Emilio Domínguez*. No podría olvidarme de *Franziska Cademartori*, tu contribución y tu ayuda en tierras germanas han sido cruciales.

Imposible realizar un trabajo sin el respaldo de un equipo dispuesto a ofrecer toda su labor y su apoyo logístico; a todos los que formais parte del *CIBERehd*, del *Servicio de Digestivo* y de la *Unidad de Investigación del Hospital General de Alicante*, por vuestra gran contribución para poder llegar a la meta de este gran reto.

A todos los que permanecéis diariamente dándome la fuerza, la protección y el afecto esenciales que completan mi vida, os dedico todos mis éxitos.

¡MUCHAS GRACIAS!

ABREVIATURAS

AB	Actividad bactericida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNbact	ADN bacteriano
ARN	Ácido ribonucleico
Ag	Antígeno
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BGP	Bacterias gram positivas
BGN	Bacilos aerobios gram negativos
CGP	Cocos gram positivos
°C	Grados centígrados
FC	Frecuencia cardíaca
ELISA	Ensayo inmonoenzimático (<i>enzyme-linked immunosobernt assay</i>)
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
GLMs	Ganglios linfáticos mesentéricos
g/dl	Gramo/decilitro
HDA	Hemorragia intestinal alta
IL-12	Interleuquina 12
INF-γ	Interferon gamma
K	Potasio
LA	Líquido ascítico
LBP	Proteína de unión a lipopolisacárido
LPS	Lipopolisacárido
mg/ml	Miligramo por mililitro
Na	Sodio
NO	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
NOx	Óxido nítrico
NK	Células asesinas (<i>natural killer</i>)
PBE	Peritonitis bacteriana espontánea
PCR	Reacción cadena polimerasa

PMNs	Linfocitos polimorfonucleares
SRE	Sistema retículo-endotelial
Spp	Especies bacterianas
TA	Tensión arterial
TB	Traslocación bacteriana
TIPS	Shunt portosistémico intrahepático transyugular
TLR-2	Receptor Toll-like 2
TLR-9	Receptor Toll-like 9
TNF-α	Factor necrosis tumoral alfa
U	Unidades
μ l	Microlitro
VHC	Virus hepatitis C



ÍNDICE

I. Resumen / Summary	1
II. Introducción / Introduction	4
INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS. PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA (PBE)	5
1.1 Etiología de la PBE	8
1.2 Patogenia de la PBE	9
TRASLOCACIÓN BACTERIANA (TB)	11
2.1 Patogenia de la TB	11
2.2 Causas de la TB	12
2.2.1 Alteraciones de la flora local	13
2.2.2 Alteraciones de la barrera intestinal.....	13
2.2.3 Alteraciones de la inmunidad	15
2.2.3.1 La inmunidad local.....	15
2.2.3.2 La inmunidad sistémica.....	17
2.2.3.3 La inmunidad del líquido ascítico.....	18
2.2.4 Alteraciones clínicas y analíticas de los sujetos.....	19
DETECCIÓN DE TRASLOCACIÓN MOLECULAR	22
3.1 Cinética de los fragmentos de ADN bacteriano	24
3.2 ADN bacteriano y la respuesta inflamatoria	26
VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA	29
III. Hipótesis y Objetivos / Hypotheses and Objectives	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32

IV. Pacientes y Métodos / <i>Patients and Methods</i>	33
SELECCIÓN DE PACIENTES	34
PROCEDIMIENTO	35
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ADN BACTERIANO.....	37
CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES LIPOPOLISACÁRIDO EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO	38
CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS (TNF- α , INF- γ E IL-12) EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO	38
CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS DE ÓXIDO NÍTRICO EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
V. Resultados / <i>Results</i>	41
CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	42
FRAGMENTOS DE ADN BACTERIANO	45
LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)	47
ESTUDIO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO (LA)	48
4.1 Niveles del TNF- α en suero y LA	48
4.2 Relación entre el TNF- α y ADN bacteriano en suero y LA.....	49
4.2.1. Relación entre los niveles de TNF- α y ADNbact en suero.....	49
4.2.2. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y ADNbact en LA	50
4.3 Relación entre TNF- α y LPS en suero.....	51
4.4. Diferencias en las concentraciones séricas de TNF- α en función de la especie bacteriana identificada.....	52
4.4.1. Relación entre los niveles de TNF- α en suero y la especie bacteriana	52

4.4.2. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y especie bacteriana.....	54
4.5 Diferencias en las concentraciones séricas y en el LA de TNF- α en función del tipo de gram	56
4.5.1. Relación entre los niveles de TNF- α en suero y tipo de Gram	56
4.5.2. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y tipo de Gram.....	57
4.6 Relación entre el TNF- α y otras variables clínicas y analíticas.....	58
4.7 Análisis ANCOVA entre TNF- α y las variables.....	62
4.7.1. Variabilidad del TNF- α en suero.....	62
4.7.2. Variabilidad del TNF- α en LA.....	63

ESTUDIO DE INTERFERON GAMMA (INF- γ) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO (LA)
..... 65

5.1 Niveles de INF- γ en sangre y LA	65
5.2 Relación entre INF- γ y ADN bacteriano en suero y LA.....	66
5.2.1. Relación entre los niveles de INF- γ en suero y ADNbact en suero.....	66
5.2.2. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y ADNbact en LA.....	67
5.3 Relación entre INF- γ y LPS.....	68
5.3.1. Relación entre los niveles de INF- γ y LPS en suero.....	68
5.3.2. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y LPS en suero.....	69
5.4. Diferencias en las concentraciones séricas de INF- γ en función de la especie bacteriana identificada.....	70
5.4.1. Relación entre los niveles de INF- γ en suero y la especie bacteriana	70
5.4.2. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y la especie bacteriana.....	71
5.5. Diferencias en las concentraciones séricas y del líquido ascítico de INF- γ en función del tipo de gram	73
5.5.1. Relación entre los niveles de INF- γ y tipo de Gram.....	73
5.5.1. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y Gram.....	74
5.6 Relación entre el INF- γ y otras variables clínicas y analíticas.....	75

5.7 Relación entre el INF- γ y análisis ANCOVA.....	79
5.7.1. Variabilidad de los valores de INF- γ en suero.....	79
5.7.2. Relación entre en INF- γ en LA.....	80
ESTUDIO DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 12 (IL-12) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO (LA).....	81
6.1 Niveles de IL-12 en sangre y LA	81
6.2 Relación entre IL-12 y ADN bacteriano en sangre y LA	82
6.2.1. Relación entre los niveles de IL-12 en suero y ADNbact en suero.....	82
6.2.2. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y ADNbact en LA.....	83
6.3 Relación entre IL-12 y LPS	84
6.3.1. Relación entre los niveles de IL-12 y LPS en suero	84
6.3.2. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y LPS en suero	85
6.4 Diferencias en las concentraciones séricas y de LA de IL-12 en función de la especie bacteriana identificada	86
6.4.1. Relación entre los niveles de IL-12 y la especie bacteriana	86
6.4.2. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y la especie bacteriana	87
6.5 Diferencias en las concentraciones séricas y de LA de IL-12 en función del tipo de gram	89
6.5.1 Relación entre los niveles de IL-12 y el tipo de gram	89
6.5.2 Relación entre los niveles de IL-12 en LA y el tipo de gram.....	90
6.6 Relación entre IL-12 y otras variables clínicas y analíticas	91
6.7 Relación entre IL-12 y análisis ANCOVA	95
6.7.1. Variabilidad en las concentraciones de IL-12 en suero	95
6.7.2. Relación entre IL-12 en LA	96

ESTUDIO DE ÓXIDO NÍTRICO (NOx) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO (LA)	99
7.1 Niveles de NOx en sangre y LA.....	99
7.2 Relación entre los niveles de NOx y ADN bacteriano en sangre y líquido ascítico	100
7.2.1 Relación entre los niveles de NOx y ADNbact en suero	100
7.2.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y ADNbact en LA	101
7.3 Relación entre los niveles de NOx y LPS	102
7.3.1 Relación entre los niveles de NOx y LPS en suero	102
7.3.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y LPS en suero	103
7.4 Diferencias en las concentraciones séricas y en LA de los niveles de NOx en función de la especie bacteriana identificada	104
7.4.1 Relación entre los niveles de NOx y la especie bacteriana	104
7.4.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y la especie bacteriana.....	106
7.5 Diferencias en las concentraciones séricas y en LA de los niveles de NOx en función del tipo de gram	107
7.5.1 Relación entre los niveles de NOx y el tipo de gram	107
7.5.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y el tipo de gram	108
7.6 Relación entre los niveles de NOx y otras variables clínicas y analíticas.....	109
7.7 Relación entre los niveles de NOx y análisis ANCOVA.....	110
7.7.1. Variabilidad en las concentraciones de NOx en suero	110
7.7.2. Variabilidad en las concentraciones de NOx en LA.....	115
VI. Discusión / Discussion.....	116
VII. Conclusiones / Conclusions.....	137
VIII. Bibliografía / References.....	144

UNIVERSITAS
Miguel



RESUMEN
Summary

Background

Spontaneous bacterial peritonitis is a deadly complication in patients with advanced cirrhosis, and the pathogenic mechanism involved is considered to be bacterial translocation (BT) from the intestinal lumen. The inflammatory reaction induced by the infection may be related to development of complications such as renal insufficiency and death. We have previously demonstrated the presence of bacterial DNA (bactDNA) as surrogated marker of BT in roughly 35% of patients with cirrhosis and ascitic fluid (AF) and showed that it is associated to a marked innate immune response (elevated levels of TNF- α , IFN- γ , IL-12 and nitric oxide (NO)), that reaches similar levels to that observed in patients with fully established SBP. However, the degree of the inflammatory response varies among patients.

Aim

To assess the relevance of different factors that may be involved in the modulation of the intensity of immune response in patients with cirrhosis and ascites presence of bactDNA by studying:

- i) The clinical characteristics of the patients
- ii) The hypothetical presence of more of one translocating bacterial *spp*
- iii) The serum levels of
 - a. BactDNA
 - b. Lipopolysaccharide (LPS)
 - c. Inflammatory cytokine levels (TNF- α , INF- γ and IL-12)
 - d. Nitric oxide

Methods

Prospective study in blood and AF of 77 patients with cirrhosis consecutively included. Identification of bacterial-DNA was evaluated by 16SrRNA gene PCR followed by nucleotide sequencing and by species-specific PCR. Concentration of amplified bacterial-DNA, LPS, TNF- α , INF- γ , IL-12 and NO in serum was evaluated. ANOVA and ANCOVA analyses were performed.

Results

No episodes of multiple bacterial translocation were detected. Serum TNF- α , INF- γ , IL-12 and NOx levels showed a significant correlation with their respective values in ascitic fluid ($r=0.62$; $p=0.001$), ($r=0.84$; $p=0.001$), ($r=0.69$; $p=0.001$) and ($r=0.90$; $p=0.000$), respectively. Serum TNF- α levels significantly correlated with bacterial-DNA concentration ($r=0.87$; $p=0.001$), LPS ($r=0.28$; $p=0.016$) and blood WBC ($r=-0.27$; $p=0.02$). Serum TNF- α levels were significantly different between gram-negative and gram-positive groups (504 ± 120 vs 399 ± 88 pg/mL, $p<0.05$). The best-fitting, significant ANCOVA model included bacterial-DNA concentration, LPS and the interaction of both variables. Serum INF- γ levels significantly correlated with Mean blood pressure ($r=0.39$; $p=0.02$), blood WBC ($r=-0.34$; $p=0.03$) and blood PMNLs ($r=-0.31$; $p=0.003$) but not with bacterial-DNA concentration ($r=0.18$; $p=0.12$) and LPS ($r=0.18$; $p=0.12$). INF- γ levels were not significantly different either between gram-negative and gram-positive groups or when individual bacterial-species were compared. IL-12 levels were significantly different either between gram-negative (553 ± 19 pg/ml) and gram-positive groups (653 ± 32 pg/ml) ($p=0.012$) or when individual bacterial-species were compared; *S. aureus* (707 ± 94), *E. coli* (583 ± 125) ($p<0.05$). Serum IL-12 levels significantly correlated with LPS ($r=-0.24$; $p=0.04$) and prior encephalopathy episodes (672 ± 173 ; $p=0.04$) but not with bacterial-DNA concentration ($r=-0.10$; $p=0.39$). Serum NOx levels significantly correlated with bacterial-DNA concentration ($r=0.76$; $p=0.001$), LPS ($r=0.25$; $p=0.03$), blood WBC ($r=-0.27$; $p=0.04$) and LA PMNLs ($r=-0.27$; $p=0.03$). NOx levels were not significantly different either between gram-negative and gram-positive groups or when individual bacterial-species were compared.

Conclusions

Bacterial-DNA presence in patients with cirrhosis and ascites is due to single-species translocation. Bacterial-DNA concentration is the most influencing variable associated with serum cytokine and NO response.



INTRODUCCIÓN
Introduction

INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS. PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA

Las infecciones bacterianas son una de las complicaciones más importantes y frecuentes que se desarrollan en pacientes con cirrosis descompensada. Estas complicaciones que ocurren en un 20-60% de los pacientes con cirrosis descompensada [1-3], son una causa frecuente de mortalidad y han adquirido por tanto, una gran relevancia clínica [4]. El tipo más frecuente de infección lo representa la peritonitis bacteriana espontánea (PBE) y las infecciones del tracto urinario (ITU), producidas hasta en un 70-80% de los casos por bacilos aerobios gram-negativos (BGN) [1, 3].

En los pacientes cirróticos, las diversas descompensaciones que padecen obligan a su frecuente ingreso hospitalario, adquiriendo la propia hospitalización un papel importante como factor de riesgo del desarrollo de infecciones [5]. Se ha estimado que aproximadamente un 50% de los pacientes cirróticos que ingresan en un hospital presentan una infección bacteriana o la desarrollan durante la hospitalización [6].

La colonización de la flora intestinal por bacterias adquiridas en el hospital y el uso frecuente de norfloxacino como profilaxis primaria o secundaria de la PBE en estos pacientes, así como el aumento en el grado de instrumentalización (accesos vasculares, TIPS, ligadura de varices, tratamiento percutáneo del hepatocarcinoma, etc.) necesario para el control de las complicaciones clínicas, adquieren relevancia a la hora de determinar los posibles focos de infección intrahospitalaria [7, 8]. Este hecho ha adquirido gran importancia dado que se ha observado en los pacientes hospitalizados sometidos a procedimientos invasivos, un aumento en el porcentaje de episodios bacterianos que involucran microorganismos grampositivos [2].

No obstante, no sólo los factores asociados o relacionados con la hospitalización influyen en el desarrollo de las infecciones bacterianas, sino que otros factores como las anomalías inmunitarias, tanto específicas como inespecíficas, la deficiencia funcional del sistema retículo-endotelial (SRE) [6, 9], las hemorragias digestivas [9, 10] y la presencia de ascitis [11, 12] parecen tener una importancia crucial en el desarrollo de infecciones.

La PBE es la complicación infecciosa más característica y relevante que desarrollan los pacientes con cirrosis y presencia de líquido ascítico (LA) [12, 13]. Es una complicación casi exclusiva de los pacientes con cirrosis avanzada y a pesar de la pequeña carga bacteriana que la produce, está asociada a una elevada tasa de mortalidad incluso con tratamiento antibiótico adecuado.

El diagnóstico de la infección del LA se realiza mediante la evaluación del mismo obtenido a través de la paracentesis. Se han descrito diversas variantes de ascitis infectada basadas en los resultados del cultivo del LA y en el recuento de leucocitos polimorfonucleares (PMNs), siendo la PBE el tipo más común de infección del LA. Estas variantes se detallan en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la infección del líquido ascítico.

TIPO DE INFECCIÓN	PMN (por μL)	CULTIVO DE LA
Peritonitis bacteriana espontánea	≥ 250	Positivo o negativo (monomicrobiano)
Peritonitis bacteriana secundaria	≥ 250	Positivo (polimicrobiano)
Bacteriascitis polimicrobiana	< 250	Positivo (polimicrobiano)
Bacteriascitis monomicrobiana	< 250	Positivo (monomicrobiano)

Hasta hace poco tiempo se distinguían dos variantes de PBE de acuerdo con el resultado del cultivo positivo o negativo, de tal forma que se denominaba ascitis neutrocítica con cultivo negativo a aquellos casos con recuento patológico de PMNs ($\geq 250/\mu\text{L}$), sin embargo esta denominación ha dejado de ser utilizada para pasar a denominarse PBE con cultivo negativo. Esta entidad es una variante de PBE con dudas de que el pronóstico asociado a este tipo de infección sea similar a la de cultivo positivo [14], sin embargo debe ser considerada como una verdadera infección del LA y tratarse como una PBE con cultivo positivo de acuerdo con los criterios del Club Internacional de Ascitis [15].

Desde la primera descripción de la PBE por *Conn y Fesell* en 1964 [16], se han investigado diferentes aspectos de la infección tales como su patogenia y presentación clínica, los métodos diagnósticos, así como su tratamiento, profilaxis y pronóstico. Sin embargo, a pesar de que la infección del LA se consideraba una complicación rara, la práctica rutinaria de paracentesis en pacientes con cirrosis y ascitis ingresados en el hospital ha mostrado que la prevalencia real es del 7-31% [12]. Además, debido a la elevada mortalidad observada en estos pacientes con PBE, su aparición se considera un acontecimiento grave en la historia natural del paciente con cirrosis e indicación de trasplante hepático, dado que refleja la existencia de una enfermedad hepática avanzada y el pronóstico después del desarrollo del primer episodio es extremadamente pobre en comparación con aquellos pacientes que no han desarrollado la complicación [17].

De igual modo que para otras infecciones, la supervivencia a corto plazo en casos de PBE ha mejorado, hasta ser prácticamente del 100% en ausencia de otras complicaciones, tal como síndrome hepatorenal, acute-on-chronic liver failure (ACLF) o *shock séptico*. Sin embargo, la aparición de estas complicaciones, incrementa la mortalidad de una forma llamativa. La probabilidad de recidiva de la PBE es superior al 50% anual [17, 18] y una probabilidad de supervivencia en torno a un 20% a los dos años [19].

Por este motivo se considera indicado iniciar una profilaxis secundaria de PBE en los pacientes que han sobrevivido a un primer episodio.

Estos datos resaltan por tanto la necesidad no sólo de conseguir un diagnóstico precoz de estas infecciones bacterianas en pacientes cirróticos sino también de obtener información acerca de qué pacientes presentan un mayor riesgo de infección para instaurar una profilaxis adecuada y cuáles son los mecanismos moduladores para hacer frente a estas vías intermedias.

1.1 Etiología de la PBE

Los episodios de PBE son monomicrobianos y son producidos en su mayoría por bacterias de origen entérico en los casos de adquisición comunitaria. Las BGN están implicadas en un 68% de los episodios con cultivo positivo, siendo *Escherichia coli* el germen aislado con mayor frecuencia y presente en un 45% de estos cultivos [2], seguida de *Klebsiella pneumoniae*. Una infección polimicrobiana es de tipo secundario mientras no se demuestre lo contrario. Por otra parte, las bacterias gram positivas (BGP), principalmente *Streptococcus pneumoniae* o *Enterococcus* [27], son más prevalentes en pacientes con episodios de PBE de origen nosocomial, especialmente en aquellos que están sometidos a múltiples procedimientos invasivos o que son admitidos en una unidad de cuidados intensivos. Además, también se pueden detectar estos gérmenes en episodios de PBE en aquellos pacientes que están recibiendo profilaxis de la PBE, especialmente en pacientes que se encuentran en tratamiento con quinolonas a largo plazo [10, 25].

Por el contrario y aunque los gérmenes anaerobios son predominantes en la flora intestinal en una proporción con relación a los aerobios de 1000/1 en sujetos sanos [23], el desarrollo de un episodio de PBE causado por una bacteria anaerobia es excepcional, y en los casos en que se desarrolla es imprescindible excluir una peritonitis bacteriana secundaria.

La baja incidencia de PBE causada por gérmenes anaerobios es probablemente debido en parte a una saturación alta de oxígeno en la pared intestinal que dificulta la supervivencia de las bacterias anaerobias en este medio [24].

1.2 Patogenia de la PBE

El lumen intestinal es el origen de la mayoría de las bacterias que causan la PBE [11-13]. Esto se ha observado en los resultados obtenidos del cultivo del LA en los pacientes con episodios de PBE, en los que las bacterias más frecuentemente aisladas son BGN [21]. Así mismo se conoce que el sobrecrecimiento bacteriano intestinal es un fenómeno común en pacientes con cirrosis y su prevalencia, mayor en pacientes Child-Pugh C y con ascitis [9, 10], varía entre un 30-70% [35].

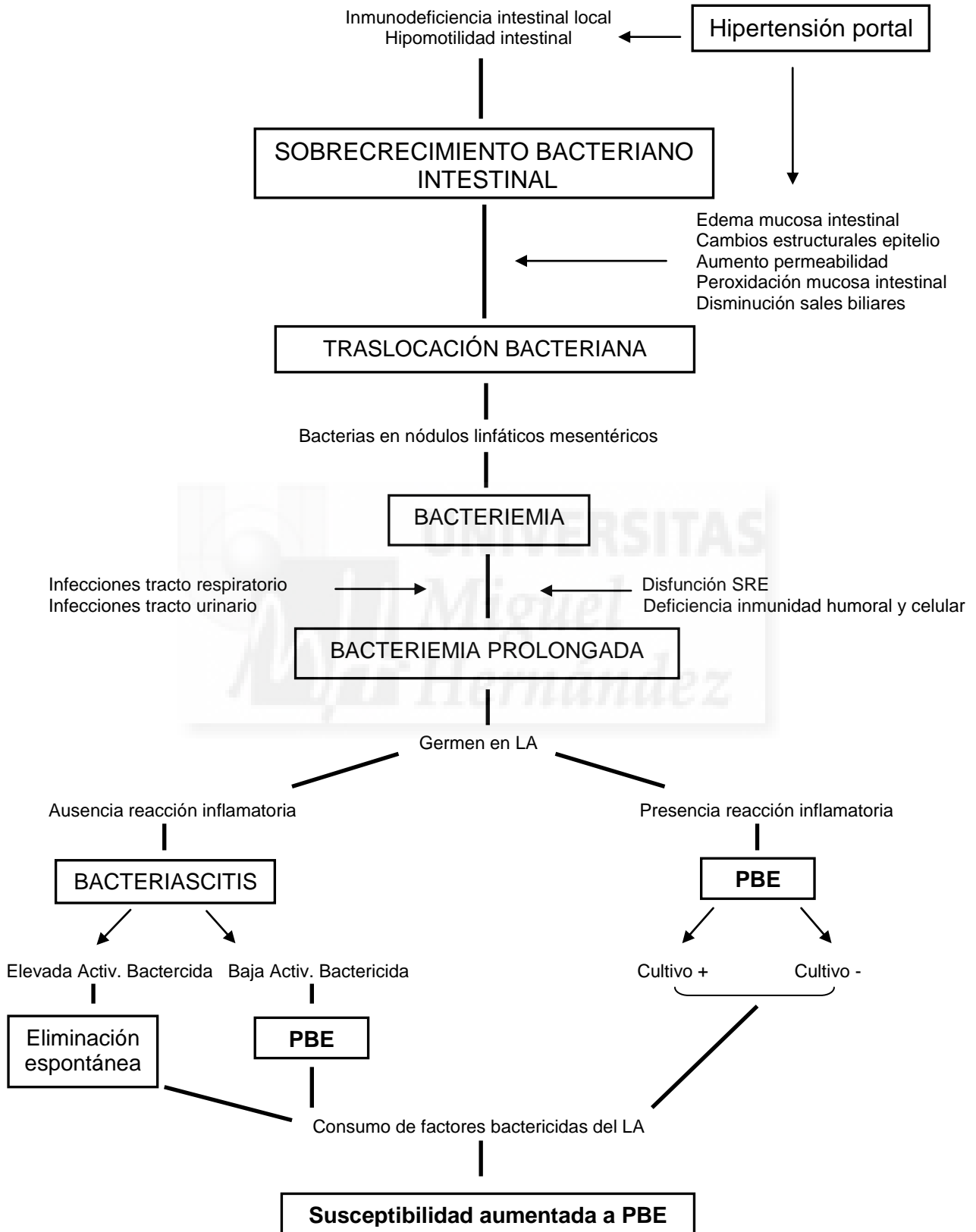
Además se ha observado que la descontaminación de bacterias intestinales mediante la administración de antibióticos orales poco o no absorbibles, producen una reducción significativa en la incidencia de la PBE [25, 26]. Esto se produce sobre todo con fármacos como el norfloxacin que disminuye el paso de BGN de origen gastrointestinal al LA.

La presencia de bacteriemia en aproximadamente la mitad de los casos de PBE y la aparición de casos de bacteriemia aislada en pacientes cirróticos sin un foco de infección primario evidente (bacteriemia espontánea), sugieren que existe un paso previo debido a múltiples mecanismos, que permiten a las bacterias su salida del lumen y así alcanzar la circulación sistémica antes de la colonización del LA. Estos mecanismos implicados en la patogénesis actúan favoreciendo por una parte el sobrecrecimiento intestinal bacteriano y por otra parte producen alteraciones en la morfología y en la permeabilidad intestinal, que lleva como consecuencia la aparición de este fenómeno.

La figura 1 esquematiza los mecanismos patogénicos conocidos que parecen jugar un papel en la patogenia de la PBE (*Such y Runyon, 1998*).

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Figura 1. Mecanismos patogénicos que conducen al desarrollo de una PBE



LA: líquido ascítico. SER: Sistema retículo endotelial. AB: actividad bactericida.
PBE: Peritonitis bacteriana espontánea

TRASLOCACIÓN BACTERIANA

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

La alteración de la flora digestiva y el movimiento de los microorganismos a través de la pared bacteriana han sido aceptados como los principales sucesos en el desarrollo de infecciones bacterianas en los pacientes cirróticos, incluida la PBE [20-22].

Al proceso por el cual las bacterias de la flora intestinal migran a través de la barrera intestinal accediendo a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y desde allí a otros territorios extraintestinales como el LA y la circulación sistémica, se le denomina traslocación bacteriana (TB) [20]. Su diagnóstico requiere la presencia de bacterias viables en GLMs, dado que se considera que la misma está presente cuando, en el cultivo de los GLMs, se demuestra el crecimiento de al menos una especie bacteriana.

2.1 Patogenia de la TB

Se considera a la TB como el mecanismo patogénico principal y el paso previo que da lugar al desarrollo de PBE en algunos casos. Este fenómeno puede ocurrir cuando se dan simultáneamente una serie de factores implicados tales como el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI), alteraciones de las defensas inmunitarias locales o sistémicas del huésped, cambios estructurales de la mucosa y probablemente el aumento de la permeabilidad intestinal.

La TB es un fenómeno que ha sido estudiado y demostrado tanto en modelos experimentales de ratas cirróticas [13], como en humanos. Sin embargo, de acuerdo con el criterio diagnóstico clásico de TB que implica la necesidad de la recogida y el cultivo de GLMs [12], existe una gran dificultad y limitación de estudiar los fenómenos de TB en pacientes con cirrosis salvo en un entorno de investigación muy concreto [31], por lo que la mayor parte de la información disponible de este hecho proviene de los estudios realizados en animales de experimentación [27, 28].

Los primeros estudios realizados en ratas con cirrosis fueron efectuados por Runyon *et al* [29]. Desde entonces se ha demostrado una incidencia de traslocación en ratas cirróticas de aproximadamente un 50%, frente a un 0-10% en ratas sanas, observándose la existencia de identidad genética de las bacterias cultivadas simultáneamente en LA y en los GLM [30], lo que proporciona una gran evidencia de apoyo al concepto de TB en su relación al desarrollo de PBE. Por otra parte, estudios realizados por Cirera *et al* [31] en una serie de pacientes sometidos a laparotomías para trasplante hepático o en la resección de carcinomas hepatocelulares, demuestran la presencia bacteriana viable en ganglios linfáticos mesentéricos en pacientes con cirrosis, lo que confirma la existencia de TB en estos pacientes. Además, comprobaron que la traslocación de organismos entéricos a los GLM en los pacientes con cirrosis avanzada (Child C) era significativamente mayor (30,8%) que la observada en pacientes cirróticos Child A o B y en pacientes no cirróticos.

2.2 Causas de la TB

La TB se produce cuando hay una alteración de uno o más de los mecanismos que hacen de la mucosa intestinal una barrera mecánica e inmunitaria contra las bacterias intestinales [32]. Estos mecanismos tan importantes en el mantenimiento del equilibrio en un sujeto sano son principalmente la presencia de un tránsito intestinal adecuado que impida el sobrecrecimiento bacteriano, la integridad de la barrera intestinal y la del sistema inmunitario local y sistémico.

2.2.1 Alteraciones de la flora local

Los pacientes con cirrosis presentan un SBI de enterobacterias aerobias en tramos altos intestinales en un elevado porcentaje de casos que varía un 30-70% [33] y esta prevalencia es mayor en aquellos con Child-Pugh C y presencia de ascitis. Este hecho ha sido relacionado con la predisposición al desarrollo de TB y de PBE a largo plazo [13, 34], y apoyado en la observación de una menor incidencia de PBE tras la reducción de la flora intestinal con el uso de antibióticos poco o no absorbibles [13, 26, 35], factor que además mejora la supervivencia de los pacientes. Existen diferentes factores relacionados con el enlentecimiento de la motilidad intestinal que explican la presencia de SBI en pacientes con cirrosis, tales como: el abuso de alcohol, la hipocloridia secundaria a uso de fármacos antiseoretos, o una secreción reducida de ácidos biliares. Por otra parte, se ha sugerido que determinados factores de virulencia y susceptibilidad bacterianos tales como, la capacidad de adherencia a los receptores específicos localizados en las células epiteliales promoviendo una colonización inicial, la presencia bacteriana de cápsula o la reducción de la síntesis de IgA en el lumen intestinal facilitan la penetración de la bacteria a través de la mucosa [49], llevando a los BGN a traslocar con mayor facilidad que el resto de gérmenes CGP y anaerobios [36].

2.2.2 Alteraciones de la barrera intestinal

El concepto de incremento de permeabilidad hace referencia a la absorción de macromoléculas, esto es, aquellas que por su tamaño no deberían ser absorbidas. Se ha considerado que cambios anatómicos de la mucosa podrían facilitar el paso de macromoléculas, estudiada mediante la absorción de sustancias tales como la lactulosa o EDTA [37, 38], y que su determinación reflejaría el grado de permeabilidad alterada. Nuestro grupo ha demostrado que los pacientes cirróticos, especialmente aquellos con una enfermedad hepática más grave, presentan un grado de permeabilidad intestinal a macromoléculas mayor que los controles sanos o que los pacientes con cirrosis compensada, estudiado mediante el test de lactulosa/manitol [39].

Este hecho podría ser debido a alteraciones funcionales y/o estructurales de la barrera intestinal, quizás como consecuencia del éstasis vascular secundario a la hipertensión portal [13, 40, 41].

Se ha descrito en relación con la cirrosis la existencia de alteraciones estructurales de la mucosa intestinal (edema, inflamación, cambios vasculares) tanto en ratas [42] como en pacientes [43]. *Such et al* estudiaron las alteraciones ultraestructurales de la mucosa de duodeno distal en pacientes cirróticos [44], observando un incremento en la amplitud de los espacios intercelulares con sellado normal de la zona apical de los enterocitos mediante las *Zonulas Occludens* o *tight junctions*, y un acortamiento de las microvellosidades. No hay estudios, sin embargo, que permitan correlacionar estos fenómenos con incrementos de la permeabilidad.

Se considera que el incremento de permeabilidad a macromoléculas es un fenómeno paracelular, mientras que la traslocación de bacterias que suelen causar las infecciones en la cirrosis es transcelular. No se puede relacionar sin embargo, estos hallazgos con alteraciones de la permeabilidad, ni con la predisposición a la traslocación.

Por tanto, se desconoce si estas alteraciones estructurales podrían provocar anomalías en la función de barrera intestinal aumentando la permeabilidad a determinadas sustancias, las cuales en condiciones normales serían incapaces de atravesar dicha barrera. Estos hallazgos hacen más relevante la importancia de la alteración funcional de la barrera intestinal.

Asimismo, se ha detectado que el daño oxidativo de la mucosa intestinal, probablemente en relación con la hipoxia local debida a la hipertensión portal, es causa de una permeabilidad intestinal alterada, favorecedora de la TB en varios modelos experimentales de hipertensión portal, incluyendo la cirrosis [45-47].

Por último, la endotoxemia, es decir la presencia en sangre periférica de lipopolisacáridos (LPS), constituyentes de la pared bacteriana de BGN, descrita en pacientes cirróticos con ascitis y enfermedad hepática avanzada [48], se relaciona con una capacidad incrementada de dichas bacterias de atravesar la pared intestinal y parece promover la TB por un mecanismo que no está totalmente establecido, aunque se cree que actúa alterando la inmunidad del huésped sobre todo produciendo una alteración linfocitaria y depresión del sistema retículo endotelial (SRE). De esta forma el SBI estaría favorecido, al alterarse la permeabilidad y la perfusión de la mucosa intestinal [49, 50]. Es decir, la endotoxemia estaría inducida por una alteración inicial de permeabilidad, que cerraría el círculo al empeorar aun más la capacidad funcional de barrera de la pared intestinal.

2.2.3 Alteraciones de la inmunidad

2.2.3.1 Alteraciones de la inmunidad local

Además del efecto mecánico protector que posee la mucosa intestinal, el paso de bacterias y endotoxinas a través de la misma depende de mecanismos inmunológicos como son el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, gut associated lymphoid tissue): las placas de Peyer, linfocitos B y T, plasmocitos y macrófagos distribuidos por la lámina propia, linfocitos intraepiteliales secretores de IgA y los ganglios linfáticos mesentéricos [17, 48,162]. Dado que las bacterias intestinales son las responsables de un gran número de infecciones en pacientes inmunodeprimidos [52-54], parece lógico asumir que las disfunciones inmunitarias pueden ser factores potencialmente favorecedores de la TB en la cirrosis, al tratarse en realidad de una forma de inmunodeficiencia adquirida.

De los conocimientos actuales se desarrolla la probable asociación entre alteraciones de la inmunidad local y la TB.

Aunque no hay estudios específicos sobre la integridad de la inmunidad intestinal local o sistema GALT en los pacientes cirróticos, las múltiples alteraciones inmunitarias que presentan sugieren que la eficacia de la barrera inmunitaria intestinal está probablemente poco preservada.

Pelletier et al [55] realizaron un estudio que evidenció el déficit en la secreción intraluminal y biliar de IgA en un grupo de sujetos con cirrosis. Estos hallazgos fueron corroborados posteriormente por *Debure et al* [56] que demostraron además la existencia de una correlación inversa entre el número de células plasmáticas (secretoras de IgA) en la pared intestinal y la incidencia de TB. Este déficit local de IgA, podría facilitar de forma secundaria, la adherencia bacteriana a la superficie intestinal y por tanto su penetración a través de la mucosa [36], lo que constituye el primer paso en el proceso de la TB.

Por otra parte, las alteraciones en el funcionalismo de los macrófagos, principalmente el relacionado con la capacidad de destrucción bacteriana intracelular [6, 57], también se han asociado a la aparición de TB, puesto que los gérmenes que atraviesan el epitelio intestinal no serían destruidos, por lo que podrían acceder de forma viable a los GLMs [58] y posteriormente a la circulación sistémica. Las manipulaciones de la inmunidad, mediante la administración de inmunomoduladores o corticoides, pueden aumentar la colonización de la superficie enterocitaria por BGN, aumentando la permeabilidad intestinal a los mismos [59].

Finalmente, en condiciones normales los GLMs son capaces de eliminar las bacterias traslocadas, pero esta capacidad parece estar disminuida en pacientes con cirrosis, puesto que la estimulación farmacológica de los macrófagos locales permite disminuir la TB [60]. En el caso de los pacientes con cirrosis, las bacterias pueden sortear en algunos casos el filtro que supone los GLM y acceder a la circulación sistémica. La presencia de hipergammaglobulinemia policlonal en muchos de estos pacientes puede ser un reflejo de esta alteración.

2.2.3.2 Alteraciones de la inmunidad sistémica

Una vez que las bacterias cruzan la barrera intestinal, tras conseguir sortear las defensas que permiten su paso a la circulación linfática y alcanzar el torrente sanguíneo, será la capacidad de los mecanismos defensivos de la sangre de eliminarlas la que determine el resultado final de dicha colonización.

La eliminación de bacterias mediante estos mecanismos puede iniciarse a través de un recubrimiento de la pared bacteriana con IgG y/o la opsonización de la misma por parte del sistema del complemento. Este primer paso se completa con la fagocitosis por parte de los macrófagos [61] y el acúmulo de neutrófilos en la zona.

Esta combinación de mecanismos humoral y celular se encuentra alterada en los pacientes con cirrosis, los cuales presentan una actividad quimiotáctica reducida [62], baja síntesis de los factores del sistema del complemento [12] y de la fibronectina [63], haciendo por tanto, menos efectivo este mecanismo inmune de primera línea. En cuanto a la respuesta de los PMNs, tanto su actividad fagocítica como la capacidad de lisis intracelular de las bacterias y su quimiotaxis, se encuentran reducidas en los pacientes con cirrosis [64-66] y se ha visto que mejoran *in vitro* tras la administración de factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos [67]. Otros defectos inmunes que se han relacionado con la función alterada de los neutrófilos incluyen una producción reducida de metabolitos oxidativos [65] y una síntesis disminuida de anión superóxido, factor activador de plaquetas y leucotrieno B4 [68].

Por otra parte, los macrófagos son los agentes celulares de primera línea en la respuesta del huésped a los organismos extraños, debido a su capacidad de reconocer y eliminar a los organismos recubiertos por IgG, y se localizan entre otros sitios en la cavidad peritoneal [69], hígado [70] y bazo [71]. *Gómez et al* describieron una alteración en la función de los receptores Fc-gamma de los macrófagos de pacientes con cirrosis de origen alcohólico [72].

Estas alteraciones, junto con la deficiente actividad fagocítica y función de lisis intracelular observada en los monocitos periféricos [73], podrían predisponer al desarrollo de infecciones bacterianas en pacientes con cirrosis avanzada.

En condiciones normales, aquellas bacterias que han sido capaces de acceder a la circulación sistémica son eliminadas por el SRE, localizado principalmente en el hígado. Sin embargo, la capacidad funcional de este sistema bactericida fundamental está disminuida en pacientes con cirrosis [6, 74] y este mismo hecho puede ser útil como herramienta diagnóstica para detectar la presencia de cirrosis [75].

Así *Rimola et al* [9], en hallazgos posteriormente confirmados por *Bolognesi et al* [76], observaron que la eliminación del coloide azufre-tecnecio^{99m} por el SRE está reducida en pacientes con cirrosis comparada con sujetos sanos, y que los pacientes con una mayor disfunción del SRE desarrollan más episodios de bacteriemia durante el periodo de seguimiento y la supervivencia es menor que en los pacientes con actividad del SRE conservada o menos disminuida. La alteración del SRE probablemente favorece episodios prolongados de bacteriemia, aumentando la probabilidad de una ulterior siembra de las bacterias en el LA y la predisposición a PBE. Probablemente la existencia de shunts portosistémicos debida a la presencia de hipertensión portal condiciona al menos en parte esta disminuida actividad del SRE hepático.

2.2.3.3 Alteraciones de la inmunidad en el LA

Independientemente de la vía por la que las bacterias acceden al LA, la probabilidad de desarrollar una infección es inversamente proporcional a la capacidad bactericida del LA. El exudado peritoneal normal posee una efectiva capacidad bactericida que viene mediada principalmente por el sistema del complemento, similar a la observada en exudados peritoneales neoplásicos [77] y superior a la del LA de pacientes con cirrosis [78]. La llegada de bacterias al LA induce la activación de los mecanismos bactericidas humorales del mismo, especialmente la vía alternativa del sistema del complemento.

De hecho, la presencia de lipopolisacáridos en la pared bacteriana es uno de los principales activadores de dicha vía inmunitaria. Sin embargo, este mecanismo de defensa puede ser evitado por algunas cepas más virulentas de BGN [79]. De esta manera, se ha comprobado como los episodios de PBE debidos a cepas encapsuladas de *E. coli* en pacientes cirróticos desarrollan un mayor número de complicaciones y mortalidad que los debidos a cepas no encapsuladas [80].

Además de lo expuesto anteriormente, hay que tener en cuenta que a pesar de que el intestino es el origen más común de las bacterias que colonizan la sangre y el LA, éste no es el único. *Ho et al* [81] llevaron a cabo un estudio que mostraba una prevalencia de bacteriuria asintomática en el 61.4% de los pacientes con PBE adquirida en la comunidad, lo que podría implicar al tracto urinario como una de las fuentes alternativas de las bacterias responsables de la PBE. Otros orígenes, como la neumonía y las infecciones de tejidos blandos han sido sugeridos como fuente de microorganismos en casos de PBE (y bacteriemia) debidos a gérmenes Gram-positivos (BGP) [82, 83]. Esta posibilidad se ve respaldada por la reciente descripción de la mayor incidencia de episodios de PBE debidos a BGP en pacientes hospitalizados [2].

Estos posibles orígenes y el frecuente hallazgo de hemocultivos positivos en pacientes con PBE cultivo-positivo y cultivo-negativo, sugieren que la peritonitis “espontánea” es probablemente la consecuencia de una bacteriemia con la consiguiente colonización del LA y desarrollo de la infección en el contexto de una pobre actividad bactericida en el LA [21, 22].

2.2.4 Alteraciones clínicas y analíticas de los sujetos

La gran variabilidad descrita sobre la incidencia de PBE en pacientes cirróticos se debe probablemente, a las diferentes características clínicas y analíticas de estos pacientes.

Así, los pacientes con cirrosis que desarrollan una infección del LA habitualmente tienen una enfermedad más avanzada [1] y niveles menores de proteínas totales en el LA de forma que el desarrollo final de un episodio de PBE dependerá básicamente de la concentración en LA de proteínas totales [84], factores del complemento [12] y de su capacidad opsonizante [85].

Aproximadamente el 70% de los pacientes con cirrosis muestran una actividad disminuida del sistema del complemento [86], estando C₃, C₄ y la actividad hemolítica total reducidas en pacientes con cirrosis avanzada [12, 87]. En este último estudio, el análisis multivariado mostró que los niveles bajos de C₃ en plasma era un predictor significativo de infección y mortalidad.

Como consecuencia de estos hechos, la probabilidad de desarrollar un primer episodio de PBE también está aumentada en pacientes cirróticos con niveles de proteínas totales en LA menores de 1g/dL en comparación con los pacientes que presentan niveles mayores (24% vs. 4%, respectivamente a los 3 años de seguimiento) [88]. Una vez que las BGN acceden al LA, la activación del sistema del complemento conduce a la opsonización bacteriana y al consecuente consumo de los factores del complemento implicados en dicho proceso. Es probable que la llegada repetida de bacterias al LA acelere el consumo de los factores de este sistema defensivo inespecífico antimicrobiano, conduciendo a un progresivo deterioro de su capacidad funcional [89, 90] predisponiendo, por lo tanto, al desarrollo de la PBE [86].

Los factores relacionados con la gravedad de la enfermedad hepática de base han sido, asimismo, propuestos para predecir la probabilidad de desarrollar una PBE. En un estudio reciente, *Andreu et al* [89] demostraron que el nivel de bilirrubina sérica es un factor predictivo independiente de un primer episodio de PBE en el seguimiento a largo plazo, y *Guarner et al* [91] mostraron que los pacientes con bajo recuento de proteínas en LA, bilirrubina total por encima de 3.2 mg/dL y recuento plaquetario por debajo de 98000/mL presentaban un riesgo mayor de desarrollar un primer episodio de PBE.

Todos estos factores identifican a aquellos pacientes con mayor deterioro de su función hepatocelular, lo que indica que este es probablemente el mayor condicionante para el desarrollo de esta complicación. Como es lógico pensar, el aumento de los niveles de proteínas en LA aumentaría la capacidad bactericida del mismo, lo que podría conseguirse mediante un correcto tratamiento diurético [92, 93], que podría representar, por tanto, un mecanismo efectivo teórico de prevención de la PBE en pacientes cirróticos con ascitis. La paracentesis evacuadora es un procedimiento ampliamente usado actualmente para eliminar el LA de pacientes con cirrosis. A pesar de que implica una pérdida de todos los componentes moleculares del mismo, parece ser que la capacidad bactericida del LA permanece indemne a pesar de llevar a cabo paracentesis repetidas, aparentemente a costa de un descenso en los niveles de complemento sérico [94, 95], no pareciendo aumentar el riesgo de desarrollar una PBE [96].



DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ADN BACTERIANO

La teoría patogénica de la PBE en pacientes con cirrosis y ascitis sugiere que episodios repetidos de TB desde el lumen intestinal a los ganglios mesentéricos y de ahí a la circulación sistémica son los pasos claves para el desarrollo final de eventos infecciosos [44]. Existen evidencias de que las bacterias pueden translocar como microorganismos viables y como microorganismos no viables o fragmentos de los mismos. Si se da lugar a la primera posibilidad, las bacterias podrían crecer si son capaces de sobrevivir a la actividad bactericida del hospedador, colonizar los órganos y por tanto, desarrollarse la infección.

En este contexto, la actividad bactericida del LA puede impedir el desarrollo de la infección a través de la opsonización de la bacteria [20] y por tanto, aquellos pacientes con menor capacidad bactericida y disminución en la actividad del sistema del complemento, estarían predispuestos a desarrollar esta complicación [9]. Además, la persistencia de las bacterias en la circulación sistémica se vería favorecida por la existencia de shunts portosistémicos y por la disminución de la capacidad de aclaramiento hepático que se produce en estos pacientes [9]. Por otra parte, una vez que las bacterias llegan a los GLMs pueden resultar dañadas por la respuesta inmune local [20] y en consecuencia, sólo algunos fragmentos de las mismas podrían llegar finalmente a la linfa y la circulación sistémica.

Sin embargo, aunque la TB y el crecimiento de diferentes especies bacterianas (spp) en GLMs de animales es un fenómeno bien conocido [44], no han sido descritos en pacientes por la dificultad de su estudio. De hecho la TB en los pacientes con cirrosis y ascitis constituye un fenómeno inadvertido, por lo que resulta relevante disponer de marcadores indirectos no invasivos de TB [97] tanto cualitativos como cuantitativos.

Además, ocasionalmente los pacientes con cirrosis y ascitis desarrollan bacteriemias espontáneas, caracterizadas por fiebre, escalofríos, leucocitosis y hemocultivos positivos. La patogenia de estos fenómenos es la misma que la que conduce al desarrollo de PBE, y en una elevada proporción de casos se asocia a episodios de PBE. Sin embargo, la mayoría de los episodios de siembra bacteriana analizados mediante cultivo de sangre y LA permanecen indetectables, incluso en condiciones óptimas [98], parece lógico pensar que algunos de estos episodios no se detectarán mediante cultivo si el inóculo bacteriano es pequeño o bien si las bacterias están opsonizadas, y por tanto incapaces de crecer en el mismo.

Debido a este hecho y con la finalidad de observar el hipotético movimiento bacteriano que se producen en pacientes con cirrosis y ascitis desde un nivel molecular, nuestro grupo consideró necesario disponer de un método más sensible y específico que el cultivo tradicional para la detección de bacterias en los fluidos biológicos, independientemente de su status vital.

Si recordamos la estructura bacteriana, los componentes antigénicos principales son por un lado la pared celular (a través de los lipopolisacáridos (LPS) [99] en el caso de las BGN y en los CGP a través de su capa gruesa de peptidoglicanos) y por otro el ADN bacteriano (ADNbact) [44]. Estos componentes debido a su gran estabilidad en la bacteria han sido estudiados como métodos indirectos de TB. En estudios previos, *Albillos et al* [100] observó en pacientes con cirrosis avanzada y ascitis, un aumento en los niveles de proteínas de unión al lipopolisacárido (LBP) en el 30% de los pacientes con cirrosis avanzada y ascitis no infectada, siendo el LBP un marcador muy preciso en la estimación de la endotoxemia. Esta aproximación al problema es más rentable que la de detección directa de LPS, al no disponer de un método adecuado para su determinación. El hecho de que estas alteraciones fueran revertidas con el uso del norfloxacin como inhibidor selectivo de la flora bacteriana gramnegativa orientó a la posible relación entre los niveles elevados de LBP y la existencia de TB.

Dado que la determinación de LBP detecta únicamente episodios de TB por BGN, al ser los únicos con LPS en su pared, nuestro grupo desarrolló su línea de investigación en la TB a través de la creación de un método de detección e identificación de ADNbact en los líquidos biológicos humanos basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), llevado a cabo por *R. Francés et al* [44], puesto que de este modo era factible detectar la TB tanto por BGN como por CGP.

3.1 Cinética de los fragmentos de ADNbact

Desde el punto de vista cualitativo, gracias al uso de esta metodología basada en la detección de la ADNbact a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), nuestro grupo ha sido capaz de llevar a cabo la búsqueda de fragmentos bacterianos en numerosos pacientes. El primer estudio realizado con la aplicación de esta metodología fue en una serie de 34 pacientes con cirrosis y ascitis estéril ingresados consecutivamente en el hospital [44]. En este estudio inicial se demostró la presencia simultánea de ADNbact en sangre y LA en un 32% de los pacientes con cirrosis y con LA no infectado [44]. Además, nuestro grupo también ha demostrado en sucesivos estudios la presencia simultánea de ADNbact en la sangre y LA en todos los casos de pacientes diagnosticados de PBE, incluso en aquellos con cultivos microbiológicos del LA negativos [102].

La comprobación definitiva de que los fragmentos genómicos bacterianos detectados en suero y LA correspondían a episodios de TB pudiendo ofrecer por tanto una evidencia molecular de este fenómeno [97], se realizó a través de la secuenciación automática de nucleótidos y la comparación de las secuencias con las encontradas en las bases de datos correspondientes. Los resultados mostraron que estos fragmentos de ADNbact detectados procedían en su mayoría de *E. coli* (85.7%), que es la especie bacteriana responsable de la mayoría de episodios de PBE.

Además, la similitud entre el ADNbact aislado en suero y en LA fue en la mayoría de los casos superior al 99,5% [44] lo que indica que la bacteria detectada en LA es la misma que la detectada en suero, por lo que se podría afirmar que estos fragmentos detectados han sido debidos a episodios de traslocación de ADNbact de un clon dominante, coincidente en suero y LA.

En un estudio posterior realizado por *Francés et al* [103], se observó la existencia intermitente de episodios repetidos de TB a través del hallazgo en sangre de secuencias de nucleótidos procedentes de una misma especie bacteriana en los fragmentos de ADNbact detectados en un mismo paciente en diferentes tiempos de muestreo. Con la intención de caracterizar el proceso de la TB, se estudió la dinámica del ADNbact mediante la obtención consecutiva de muestras de sangre de pacientes con cirrosis y ascitis. Se detectó ADNbact en un 41% de los mismos, siendo la bacteria detectada en la primera muestra la misma que la detectada en las siguientes. En 2 de estos pacientes, la desaparición de ADNbact fue seguida de su reaparición 8 horas después. Estos hallazgos sugieren que la TB es un proceso dinámico y repetitivo que parece desarrollarse en un subgrupo de pacientes con cirrosis avanzada.

Además, el hecho de que los fragmentos genómicos de ADNbact pudieran desaparecer y reaparecer en las muestras de suero consecutivas, manteniendo la identidad genética, nos hizo suponer que el principal mecanismo responsable de la presencia de ADNbact en la sangre es debido a episodios repetidos de movimiento bacteriano a través de la pared intestinal, generalmente realizados por una misma cepa bacteriana y probablemente en situación de sobrecrecimiento intestinal [103]. Las consecuencias clínicas de la presencia de ADNbact en nuestros pacientes, con especial atención al desarrollo de episodios de PBE, hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas y mortalidad, ha sido objeto de un estudio multicéntrico.

Los resultados obtenidos indican que los pacientes con presencia de ADNbact muestran un pronóstico significativamente peor a corto y medio plazo (3 meses y 1 año) que los pacientes sin contacto previo con ADNbact [104].

A lo largo este estudio, sin embargo, no se ha encontrado una correlación entre la presencia de ADN_{bact} y el desarrollo de PBE, probablemente debido a que la presencia de fragmentos genómicos bacterianos incrementa la capacidad fagocítica macrofágica [105] y por tanto la capacidad antibacteriana del medio.

3.2. ADN bacteriano y la respuesta inflamatoria

Existen diferentes productos bacterianos tales como el ADN_{bact} o la endotoxina, entre otros, que son potentes activadores de la respuesta celular innata, a través del aumento de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras produciendo finalmente una marcada capacidad proinflamatoria y adyuvante [106]. La activación del sistema inmunitario tiene lugar a través de rutas de señalización y receptores celulares específicos para estas moléculas.

El ADN_{bact} no es una molécula inerte, sino que posee un papel inmunomodulador importante. El ADN_{bact} se caracteriza por la presencia de secuencias cortas repetidas de binucleótidos CpG metilados que se unen a los receptores Toll-like 9 (TLR-9), presente en las células del sistema inmune innato como son los macrófagos, las células dendríticas y los natural killers (NK) [107]. Esta unión induce *in vitro* y en modelos experimentales una marcada respuesta inmunitaria de tipo T_H1, con síntesis y liberación de las citoquinas presentes en esta vía, entre otras IL-12, TNF- α e IFN- γ [108].

Cuando los fragmentos de ADN_{bact} entran en contacto con macrófagos en un modelo murino, éstos incrementan su capacidad para adherir bacterias y posteriormente internalizarlas [105]. Además, mediante la activación de los macrófagos se produce un aumento en la síntesis de TNF- α , IL-6 e IL-12. Estas dos últimas citoquinas activan las células B y T y modulan la producción de INF gamma (INF- γ), contribuyendo a su vez a la activación de las células NK tanto *in vivo* como *in vitro* [109-111].

Del mismo modo, las secuencias CpG estimulan a las células NK para la liberación de INF- γ [112] que a su vez, puede aumentar la toxicidad de otros agentes como el LPS [113] y activa la síntesis de óxido nítrico (NO) a través de la expresión de la forma inducible de la NO sintasa (iNOS) la cual desempeña un papel importante en la respuesta mediada por los macrófagos hacia los agentes infecciosos [48].

Esta reacción inflamatoria que se lleva a cabo, se ha evidenciado tanto en cuanto a presencia intracitoplasmática de citoquinas proinflamatorias [102] como en la liberación al medio de cultivo en modelos *in vitro* [113, 114]. Mediante citometría de flujo, nuestro grupo demostró que los monocito/macrófagos de LA de pacientes con cirrosis y ascitis son capaces de sintetizar citoquinas de tipo T_H1, observando la presencia intracelular de IL-6 y TNF- α en cantidades significativamente superiores a las observadas en pacientes sin evidencias de traslocación molecular, así como un agotamiento de su reserva funcional al ser estimuladas con LPS [102].

Posteriormente, se comprobó cómo las células que habían estado en contacto con ADNbact eran capaces de liberar al medio cantidades significativamente superiores de IL-12, TNF- α e IFN- γ que las células obtenidas del LA de pacientes sin contacto previo con fragmentos genómicos bacterianos [103]. También estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que la respuesta inflamatoria asociada a la presencia de ADNbact en suero y LA en pacientes con ascitis no infectada es similar a la observada en pacientes con PBE y es mayor que la respuesta observada en los pacientes sin fragmentos genómicos bacterianos [115].

Del mismo modo, se ha observado que los macrófagos peritoneales obtenidos del LA de pacientes en presencia de ADNbact están preparados para sintetizar cantidades significativamente mayores de NO *in vitro* que los macrófagos obtenidos de pacientes sin ADNbact [48].

Por otra parte, el sistema del complemento constituye en una primera línea no específica, un rápido mecanismo de defensa humoral contra la invasión bacteriana, activándose también por su vía alternativa a través del LPS. Su activación es significativamente mayor en los pacientes no cirróticos [164]. Sin embargo, cuando analizamos las proteínas activadoras del sistema del complemento, estas eran idénticas en los pacientes con ADNbact y en los que tenían PBE [116].

En un estudio más reciente de nuestro grupo, se observó que la presencia de ADNbact en sangre y LA desencadena la activación de este sistema en pacientes con cirrosis, para hacer frente a la traslocación de los fragmentos genómicos bacterianos, mostrando el mismo perfil de inmunidad específica que en aquellos pacientes con PBE plenamente establecida. Además, los pacientes con concentraciones reducidas de C3 o menor de 1g/dl en LA, podrían asociarse a una opsonización inefectiva de la bacteria [79], permitiendo el crecimiento de las mismas, alterando así la evolución clínica de los pacientes y aumentando la predisposición al desarrollo de PBE en estos pacientes [116].

LA VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

En estudios recientes, se ha observado que las diferencias en el contenido de CpG del ADN_{bact} de distintas especies bacterianas se relacionan con variaciones en la intensidad del proceso inflamatorio *in vivo* [117]. Además, el hallazgo de que los productos de la activación del complemento se incrementen en un grado similar en pacientes no infectados con cirrosis y presencia de DNAbact que en los pacientes con PBE sugiere que la respuesta a la traslocación de ADN_{bact} podría ser dependiente del huésped [115].

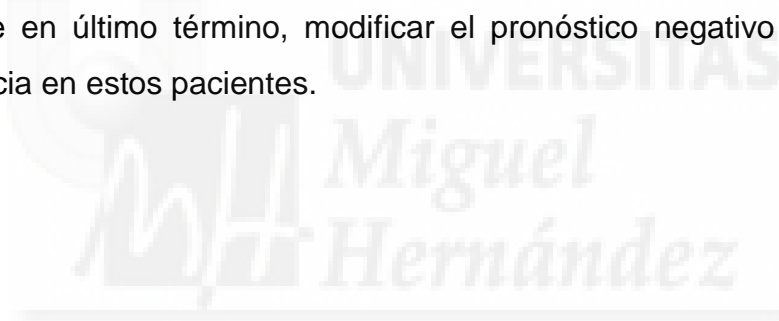
Sin embargo, aunque la presencia de ADN_{bact} se asocia a una marcada respuesta inmune innata, como se muestra por niveles elevados de TNF- α , IFN- γ , IL-12 [4, 102] y moléculas efectoras tales como el óxido nítrico (NO), existe una amplia variabilidad entre los valores de estos [115], que no se explica completamente por el contenido de los fragmentos aislados de ADN_{bact} y por tanto, el tipo de bacterias [117]. Por otra parte varios tipos celulares pueden dar lugar a liberación de citoquinas e incluso dependiendo de la localización del proceso inflamatorio, varias citoquinas pueden ser sintetizados por células que normalmente no lo hacen.

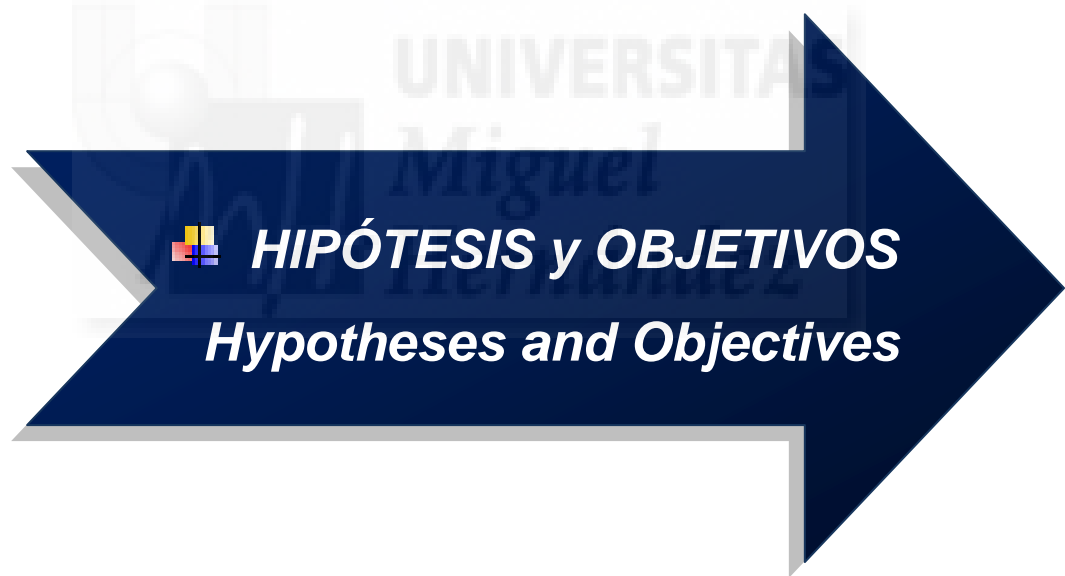
Por ello, es lógico pensar que otros factores, como el tiempo de tránsito intestinal, el SBI, el grado de hipertensión portal y la eficacia del sistema retículo endotelial pueden influir en el paso de bacterias desde la luz intestinal a otros territorios, en el desarrollo de la TB y en la intensidad de la respuesta inmune.

El hecho de que los pacientes con cirrosis y ascitis puedan mantener un estado inflamatorio crónico o continuo, podría constituir un problema clínico relevante, dado que un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α afectan a la hemodinámica de estos pacientes [118]. Niveles elevados de IFN- γ han mostrado facilitar la traslocación bacteriana a través de la inducción de alteraciones en la permeabilidad intestinal [119], con la consiguiente exacerbación del daño hepático y fibrogénesis [104, 120].

El NO que aumenta de forma marcada en presencia de ADN bacteriano produciría un aumento en la vasodilatación arterial esplácnica que resulta en la activación del eje renina-aldosterona afectando por último, a la función renal [48]. *Zapater et al* ha comprobado que la presencia de ADNbact en pacientes con cirrosis avanzada es un factor predictor de mortalidad independiente [104]. Estos pacientes mueren por insuficiencia hepática básicamente y no por patologías infecciosas, lo cual refuerza la hipótesis de que la traslocación pueda ser debida tanto a bacterias viables como no viables.

Por todo ello, es de especial relevancia conocer qué factores son los principales implicados en la activación y mantenimiento de la respuesta inmune-inflamatoria a la presencia de ADN bacteriano en pacientes con cirrosis y ascitis con la finalidad de encontrar mecanismos diana mediante los cuales sea posible en último término, modificar el pronóstico negativo y mejorar la supervivencia en estos pacientes.





 **HIPÓTESIS y OBJETIVOS**
Hypotheses and Objectives

HIPÓTESIS

La respuesta inflamatoria que se produce en los pacientes con cirrosis en presencia de TB molecular (ADN bacteriano) es variable. Esta variabilidad podría deberse tanto a causas dependientes del huésped como del antígeno (Ag).

OBJETIVOS

El objetivo de esta investigación es evaluar los factores que pueden influir en la intensidad y variabilidad de la respuesta inmune inflamatoria en pacientes con cirrosis y ascitis con presencia de TB (ADNbact) en función de las características clínicas del huésped y del Ag.

Este objetivo se realiza mediante el estudio de la relación de la TB, el estado inflamatorio que caracteriza a pacientes con cirrosis descompensada y de todos los factores que pudieran estar contribuyendo al mantenimiento de la misma. Esto se realiza a través del estudio de:

- a. Las características clínicas de los pacientes
- b. La hipotética presencia de traslocación de más de una especie bacteriana
- c. Los niveles séricos de ADNbact
- d. Los niveles de lipopolisacárido (LPS)
- e. Los niveles de las citoquinas inflamatorias TNF- α , INF- γ e IL-12
- f. Los niveles de NO

UNIVERSITAT



PACIENTES y MÉTODOS

Patients and Methods

SELECCIÓN DE PACIENTES

Estudio prospectivo de pacientes con cirrosis y ascitis no infectada, con presencia de fragmentos de ADN_{bact} en sangre y LA, que ingresaron en el *Hospital General Universitario de Alicante* y en el *Klinikum Nordstadt de Hannover* durante el período comprendido entre enero 2008 a diciembre 2009. Un total de **77 pacientes** con cirrosis y ascitis procedentes de ambos hospitales fueron incluidos en el estudio.

CRITERIOS de INCLUSIÓN:

- ✚ Pacientes con presencia de cirrosis y ascitis. La cirrosis fue diagnosticada mediante histología o por hallazgos clínicos, de laboratorio y / o ecográficos compatibles.

CRITERIOS de EXCLUSIÓN:

- ✚ Presencia de un cultivo positivo en LA o en sangre.
- ✚ Presencia en LA de >250 neutrófilos.
- ✚ Pacientes con antecedentes de hemorragia gastrointestinal alta en las últimas 2 semanas.
- ✚ Ingesta de antibióticos en las últimas 2 semanas incluyendo norfloxacin para la profilaxis secundaria de la peritonitis bacteriana.
- ✚ Carcinoma hepatocelular (1 nódulo mayor de 5 cm de diámetro, o tres o más nódulos de 3 cm de diámetro cada uno).
- ✚ Trombosis portal.
- ✚ Trasplante hepático previo.
- ✚ Derivación o shunt transyugular intrahepático portosistémico (TIPS) previo.
- ✚ Hepatitis alcohólica.
- ✚ Edad mayor de 80 años o menor de 18 años.
- ✚ Rechazo del paciente a participar en el estudio.

PROCEDIMIENTO Y VARIABLES

Esta investigación ha sido realizada en las Unidades Hepáticas del Hospital General Universitario de Alicante y el Hospital Klinikum Nordstadt Hannover. Los Comités Éticos de ambos hospitales participantes aprobaron el protocolo del estudio, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado para su participación en el mismo, siguiendo los principios contenidos en la Declaración de Helsinki (DH; www.wma.net/s/helsinki.html) y sucesivas actualizaciones.

Las muestras de sangre y líquido ascítico se obtuvieron en el momento del ingreso del paciente y al mismo tiempo. Todas las determinaciones se realizaron en condiciones de asepsia y esterilidad en cabina de flujo laminar y las paracentesis en condiciones asépticas según los procedimientos habituales [92]

Se obtuvo **muestras de sangre** para estudios hematológicos (recuento de leucocitos y PMN), bioquímico (urea, creatinina, sodio, potasio, AST, ALT, proteínas totales, bilirrubina) y coagulación de rutina.

Se obtuvo **muestras de LA** cuando era necesario la extracción de un gran volumen de LA mediante paracentesis evacuadora como parte del tratamiento del paciente. En caso de que fuera necesario practicar una nueva paracentesis diagnóstica o evacuadora se recogió una muestra para su estudio. Las muestras recogidas se utilizaron para el estudio bioquímico de rutina (proteínas totales, albúmina, leucocitos y conteo de PMN).

Por otra parte, muestras de ambos fluidos fueron recogidas e inoculadas en botes de cultivo en medios aerobios y anaerobios (10 ml cada uno) [124] y en tubos rubber-sealed pyrogen-free (5ml cada uno) (Endo Tube ®; Chromogeix AB, Vienna, Austria).

Por último, se inoculó muestras de sangre y LA en condiciones asépticas, en tubos estériles Vacutainer SST II (BD Diagnostics, Belgium) y sellados. Se centrifugaron a 2300g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez centrifugados, se conservaron a -20°C y nunca fueron expuestas al aire libre. En todas las muestras de LA y sangre del estudio se investigó la presencia de fragmentos genómicos bacterianos, y la determinación de los niveles de TNF- α , INF- γ , IL-12 y metabolitos de NO.

Por tanto, las variables clínicas y analíticas recogidas para todos los pacientes fueron:

VARIABLES CLÍNICAS:

- ✚ Las características clínicas de los pacientes: edad, sexo, etiología de la cirrosis, clasificación y puntuación media de Child-Pugh, antecedentes de ascitis, encefalopatía y sangrado previos, tensión arterial media, frecuencia cardíaca y temperatura.

VARIABLES ANALÍTICAS:

- ✚ Sangre: leucocitos, porcentaje de neutrófilos, urea, creatinina, sodio, potasio, AST, ALT, proteínas totales, albúmina, gammaglobulina, bilirrubina total, índice de Quick
- ✚ LA: proteínas totales, albúmina, leucocitos, porcentaje de PMNs

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ADN BACTERIANO

Para detectar e identificar la presencia de los fragmentos de ADN_{bact} en sangre y LA, se utilizó la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) seguido en su caso de secuenciación automática de nucleótidos según la metodología descrita previamente en *Such et al* [44].

Resumiendo este proceso, primero se aisló el ADN mediante el Mini Kit QIAmp (QIAGEN, Hilden, Alemania) y posteriormente se realizó una amplificación de amplio espectro de una región conservada del gen 16SrRNA de procariotas. Para ello se utilizaron los siguientes primers:

- 5'-TTCCGGTTCATCCTGCCGGA-3' como forward
- 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' como reverso

Los amplicones obtenidos fueron cargados en DNA Lab-on-Chips® (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) y analizados en un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies).

Los amplicones fueron purificados mediante un kit de purificación QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania) y usados para las reacciones de secuenciación parcial de nucleótidos con un Big Dye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). El mismo oligonucleótido utilizado para revertir la amplificación de PCR se utilizó como secuencia de primers. El producto final fue purificado por precipitación con etanol y acetato y analizados en un secuenciador automatizado ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; www.ncbi.nih.gov) utilizando la herramienta de búsqueda avanzada BLAST.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LIPOPOLISACÁRIDO EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO

El test cuantitativo cromogénico cuantitativo Limulus amebocyte lysate (LAL) (BioWhittaker, Nottingham, Reino Unido) se utilizó para evaluar los niveles de LPS en las muestras de sangre y LA, tal como se ha descrito previamente [117]. Las muestras y los reactivos fueron manejados en una cámara de flujo de aire y procesados con materiales libres de pirógenos.

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y leídas a 405 nm en un lector de microplacas Thermomax (molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU).

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS (TNF- α , IFN- γ e IL-12) EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO

La medición cuantitativa de los niveles basales de TNF- α , IFN- γ and IL-12 de las muestras de sangre y LA, se llevó a cabo mediante ensayos ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) según las instrucciones del fabricante (Human Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EEUU).

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y leídas a 490 nm en un lector de microplacas Thermomax (molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). El límite inferior de detección de citoquinas de todos los ensayos fueron entre 5-10 pg/ml. En todos los casos se generaron curvas estándar para cada placa, y se restó el valor de la densidad óptica del banco a las densidades ópticas de cada muestra.

NIVELES DE LOS METABOLITOS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN SUERO y LÍQUIDO ASCÍTICO

La naturaleza transitoria del óxido nítrico (NO), hace que éste sea inadecuado para la mayoría de los métodos de detección del mismo. Sin embargo, ya que la mayoría del NO se oxida a los metabolitos nitrato (NO_3^-), y nitrito (NO_2^-), la suma de las concentraciones de estos productos del NO (NOx) [125] se han utilizado ampliamente como medida cuantitativa de la producción de NO [126].

Por lo tanto, el índice de generación del óxido nítrico, expresado como el nivel de NOx detectado en las muestras del suero, se calculó utilizando el kit de ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EEUU) basado en la reacción de Griess, midiendo de esta forma la conversión del NO_3^- a NO_2^- por la enzima nitrato reductasa, que absorbe la luz visible a 540 nm. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado.

Se generaron curvas de concentración para cada placa, y el valor promedio de densidad óptica del valor 0 de la curva estándar se restó al valor de densidad de cada uno de los controles y las muestras evaluadas para obtener la concentración de NOx corregido.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como medias \pm desviación estándar (SD) para las variables continuas o cuantitativas y como frecuencia o porcentajes para las variables categóricas o cualitativas.

Las diferencias estadísticas entre medias fueron analizadas mediante el test de Análisis de la varianza o prueba de ANOVA, con la corrección de Bonferroni para el ajuste en caso de comparaciones múltiples.

La correlación entre variables cuantitativas se analizó mediante el test de Pearson.

Se realizó un análisis de regresión múltiple para evaluar el efecto de las variables independientes (grupo de estudio, el tiempo de recogida de muestras y cantidad de ADN bacteriano en suero) sobre las concentraciones de TNF- α , IFN- γ , IL-12 y óxido nítrico.

Se empleó un análisis de covarianza (ANCOVA) para explicar la variabilidad de los datos de TNF- α , IFN- γ , IL-12 y óxido nítrico incorporando aquellas variables independientes que hayan resultado significativas en los análisis previos univariado.

Todos los valores de p fueron a 2-colas. En todos los casos, se consideró significación estadística cuando los valores de p eran menores de 0,05 ($p < 0,05$). Todos los cálculos fueron realizados utilizando el software SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU).



RESULTADOS
Results

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE LOS PACIENTES

Se incluyó en el estudio a 77 pacientes con cirrosis y ascitis que cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. La **tabla 2** muestra las características clínicas básicas de los pacientes en la inclusión del estudio.

Tabla 2: Características clínicas de los pacientes en el momento de su admisión en el estudio.

VARIABLES CLÍNICAS	DATOS
EDAD (años)	64 ± 11
SEXO (M/F) (%)	34 /43 (44%/56%)
ETIOLOGÍA de la CIRROSIS (%)	
- Alcohol	30 (39%)
- VHC	24 (31%)
- Alcohol + VHC	16 (21%)
- Otros	7 (9%)
Puntuación CHILD-PUGH (rango)	9 (7-13)
Categoría CHILD-PUGH (%)	
- A	0 (0%)
- B	42 /55,5%)
- C	35 (45,5%)
Episodios de ascitis previa (s/n) (%)	31/46 (40% / 60%)
Episodios de encefalopatía previa (s/n) (%)	9/77 (12% / 88%)
Episodios de sangrado (HDA) previo (s/n) (%)	9/77 (12% / 88%)
TA media a la inclusión (rango)	80 (60-102)
FC (rango)	74 (60-105)
Temperatura	36,4 ± 0,65

VHC: virus Hepatitis C; HDA: hemorragia intestinal alta. TA: tensión arterial.

FC: frecuencia cardíaca.

Se trata de pacientes con una edad media de 64 ± 11 años. Se observó una mayor prevalencia del sexo femenino (56%). La etiología de la cirrosis fue principalmente alcohólica (39%), vírica (31%) o mixta (21%). Todos los pacientes incluidos en el estudio pertenecían a las categorías B o C de Child-Pugh. Un pequeño grupo había presentado previamente complicaciones graves de la cirrosis como ascitis (40%), encefalopatía (20%) y/o sangrado previo (20%). Ninguno había presentado episodios previos de síndrome hepatorenal. Además, todos los pacientes se encontraban hemodinámicamente estable en el momento de su inclusión.

Tabla 3: Características analíticas de los pacientes en suero en el momento de su admisión en el estudio.

ANALÍTICA EN SUERO	DATOS
Na (mEq/l)	$134,4 \pm 4,6$
K (mEq/l)	$4,3 \pm 0,5$
Urea	$44,7 \pm 25,6$
Creatinina (mg/dl)	$1,0 \pm 0,6$
Proteínas Totales (g/dl)	$5,1 \pm 1,3$
Albúmina (g/dl)	$2,7 \pm 0,6$
Gamma Globulina (g/dl)	$2,1 \pm 0,7$
Bilirrubina (mg/dl)	$3,3 \pm 3,6$
ALT (UI/l)	$33,5 \pm 21,3$
AST(UI/l)	$54,2 \pm 24,5$
Leucocitos en Sangre (mm^3)	4384 ± 2814
PMN (mm^3)	45 ± 26
Plaquetas (mm^3)	116 ± 50
Indice QUICK (%)	$60 \pm 15,8$

Na: Sodio. K: Potasio. AST: Aspartato-aminotransferasa. ALT: Alanina-aminotransferasa. PMN: leucocitos polimorfonucleares.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Las **tablas 3 y 4** muestran las características analíticas básicas en suero y LA de los pacientes incluidos en el estudio. La mayoría de los pacientes tenían una función renal y valores de iones en el rango de la normalidad y sin signos de hepatopatía aguda.

Tabla 4: Características analíticas de los pacientes en LA en el momento de su admisión en el estudio.

ANALÍTICA EN LA	DATOS
Proteínas Totales en LA (g/dl)	1,5 ± 0,8
Albúmina LA (g/dl)	0,7 ± 0,4
Leucocitos en LA (mm ³)	161 ± 178
PMN en LA (mm ³)	40 ± 61
Proteínas en LA (g/dl)	1,5 ± 0,7

LA: líquido ascítico. PMN: leucocitos polimorfonucleares.

FRAGMENTOS DE ADN BACTERIANO

Se demostró de forma cualitativa la presencia de ADN_{bact} en todas las muestras de sangre y LA obtenidas. En todos los casos la similitud entre la secuencia de nucleótidos en los fragmentos de ADN_{bact} detectados en sangre y LA en cada paciente fue superior al 99,9%, demostrando de esta forma la detección de la misma bacteria en todas las muestras en cada paciente.

Las **tablas 5 y 6** muestran los resultados de la detección, amplificación e identificación de las especies origen de los fragmentos genómicos detectados en las muestras.

El microorganismo más frecuentemente aislado en las muestras mediante la secuenciación automática de nucleótidos fue *E. coli* (64%), el resto de microorganismos aislados por orden de frecuencia fueron: *S. aureus* (17%), *Klebsiella* (13%) y *Enterococcus* (6%). Se aprecia un predominio del grupo de BGN (77%) frente a CGP (23%).

Tabla 5. Detección e identificación de ADN_{bact}.

SECUENCIA ADN-bact	N= 77
<i>Escherichia coli</i>	49
<i>Klebsiella</i>	10
<i>Enterococcus</i>	5
<i>Stafilococcus aureus</i>	13

N: número pacientes

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Del mismo modo, se cuantificó el ADN_{bact} obtenido. Los fragmentos de ADN_{bact} circulante se presentaron en mayor cantidad con las bacterias aisladas *E. coli* (46 ng/μl) y *Klebsiella* (47 ng/μl) y en menor cantidad cuando la bacteria era *Enterococcus* (37 ng/μl) o *S. aureus* (35 ng/μl), siendo la diferencia entre la cantidad de ADN_{bact} de *E.coli* y *S. aureus* estadísticamente significativa (una cantidad media de ADN inferior en 11 ng/μl en el caso de *Staphylococcus aureus*; $p < 0,05$).

Tabla 6. Amplificación de ADN_{bact}.

ADN AMPLIFICADO $43,5 \pm 13,1$	CANTIDAD (Media \pm Ds) (ng/μl)
<i>Escherichia coli</i>	$45,8 \pm 12,3$
<i>Klebsiella</i>	$46,7 \pm 13,2$
<i>Enterococcus</i>	$37,4 \pm 11,6$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$34,7 \pm 13,6$

Ds: desviación estándar.

* $p < 0,05$ comparado con *E. coli*

LIPOPOLISACÁRIDO

Se cuantificó los niveles de LPS en todas las muestras de sangre obtenidas a lo largo de la investigación obteniéndose una cantidad media de $0,48 \pm 0,21$ ul/ml.

En las muestras en las que se detectó ADNbact de *E. Coli* o *Klebsiella* ($0,58$ μ l/ml y $0,57$ μ l/ml respectivamente), se detectaron niveles de LPS mayores que en los casos de *Enterococcus* ($0,20$) y *S. aureus* ($0,17$) tal y como se muestra en la **tabla 7**.

Estas diferencias fueron significativamente mayores en *E. coli* y *Klebsiella* que en los casos de *Enterococcus* y *S. aureus*.

Tabla 7: Niveles de LPS tras la detección, identificación y amplificación del ADNbact.

ADNbact IDENTIFICADO	NIVELES de LPS (Media \pm Ds) (μ l/ml)
	$0,48 \pm 0,21$
<i>Escherichia coli</i>	$0,58 \pm 0,13$
<i>Klebsiella</i>	$0,57 \pm 0,18$
<i>Enterococcus</i>	$0,20 \pm 0,07$ *#
<i>Staphylococcus aureus</i>	$0,17 \pm 0,72$*#

* $p < 0,05$ comparado con *E. coli*.

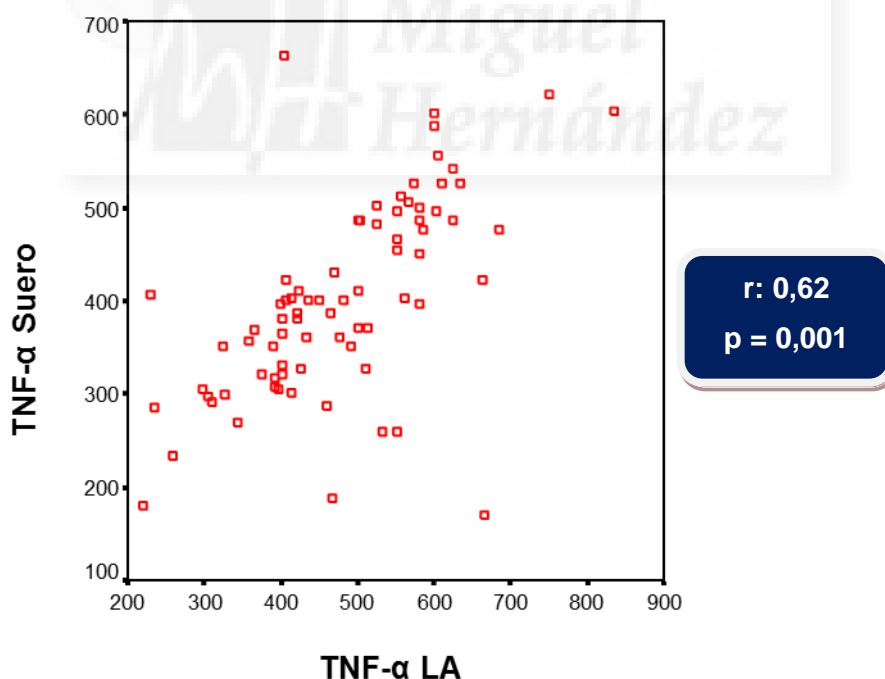
$p < 0,05$ comparado con *Klebsiella*

ESTUDIO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO

4.1 NIVELES DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO

Se cuantificó el TNF- α existente en la muestra basal de cada paciente. Los niveles medios de TNF- α en suero fueron $401,0 \pm 105,0$ pg/ml y en LA fueron $479,3 \pm 121,4$ pg/ml. Se apreció una correlación directa significativa entre los niveles de TNF- α en suero y en LA ($r: 0,62$; $p=0,001$) (**Figura 2**), indicativa de un paralelismo en la respuesta inflamatoria que acontece a nivel sistémico y en el líquido ascítico.

Figura 2. Relación entre los niveles de TNF- α en suero y LA.



Correlación de Pearson: $r: 0,62$; $p=0,001$

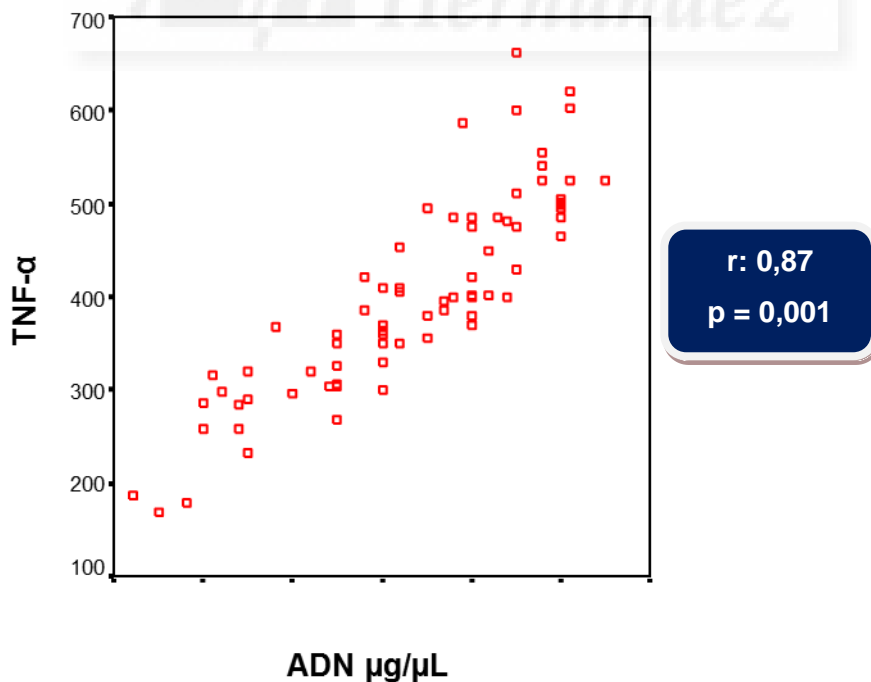
4.2 RELACIÓN ENTRE EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA Y LA CONCENTRACIÓN DE ADN BACTERIANO EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO

En el apartado anterior hemos observado la correlación existente entre los niveles de TNF- α en suero y LA, es decir, que su liberación se produce de forma proporcional en ambos medios tras un estímulo determinado. El paso siguiente es observar si esta respuesta depende de la cantidad de ADN_{bact}, posible estímulo, presente en cada uno de los medios estudiados.

4.2.1. Relación entre los niveles de TNF- α y ADN_{bact} en suero

Se observó una correlación estadísticamente significativa ($r= 0,87$ con $p=0,001$) entre las concentraciones en sangre de TNF- α y ADN_{bact}, como puede apreciarse en la figura siguiente (**Figura 3**):

Figura 3. Relación entre las concentraciones séricas de TNF- α y ADN_{bact}.

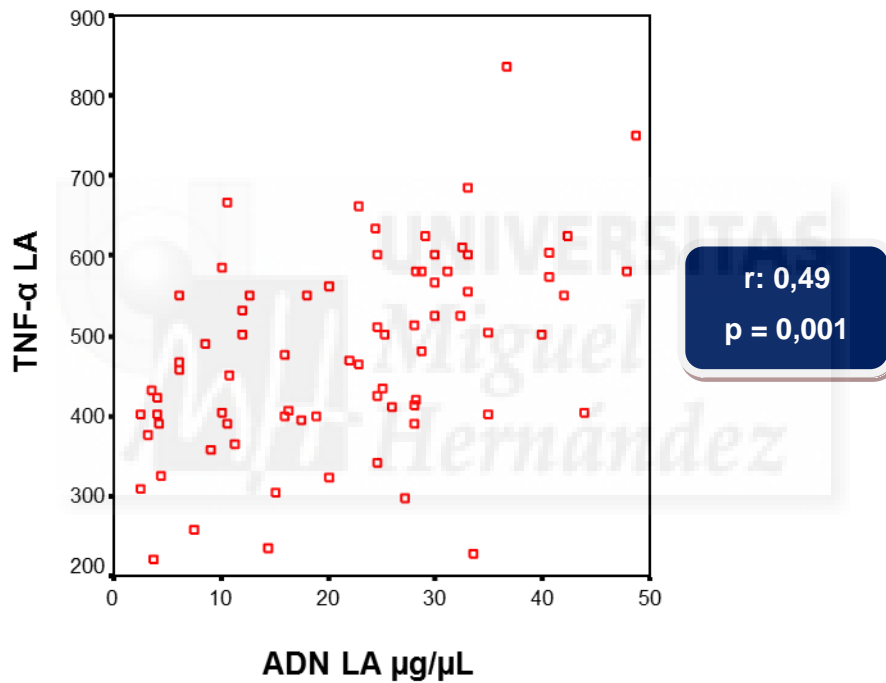


Correlación de Pearson: $r= 0,87$; $p=0,001$

4.2.2. Relación entre los niveles de TNF- α y ADNbact en LA

Del mismo modo, se estudió la asociación de los niveles de TNF- α en LA con respecto a la cantidad de ADNbact presente en el LA y se observó de nuevo una relación estadísticamente significativa ($r= 0,49$; $p=0,001$) aunque menor que la observada en suero, como puede apreciarse en la figura siguiente (**Figura 4**):

Figura 4. Relación entre los niveles en LA de TNF- α y ADNbact.



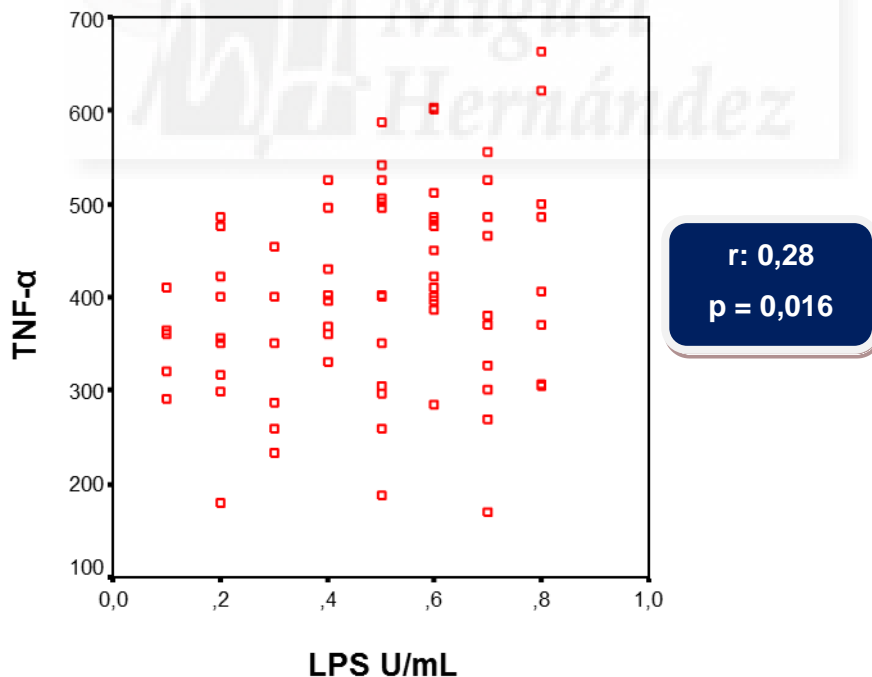
Correlación de Pearson: $r= 0,49$; $p=0,001$

4.3 RELACIÓN ENTRE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA Y LIPOPOLISACÁRIDO EN SUERO

Dado que el LPS es un componente antigénico que forma parte de la pared celular de la bacteria, sobre todo en bacterias gram-negativas, su detección tanto en suero como en LA podría ser un marcador indirecto de la presencia de las bacterias en estos medios, se estudió si existía una asociación con la liberación de TNF- α .

Se observó también una correlación significativa entre los niveles séricos de TNF- α y LPS ($p=0,016$) (**Figura 5**), aunque el coeficiente de correlación ($r=0,28$) fue muy inferior respecto al observado en la correlación de los niveles séricos de TNF- α y ADNbact ($r= 0,87$).

Figura 5. Relación entre los niveles de TNF- α y LPS en suero.



Correlación pearson $r=0,28$ $p=0,016$

4.4. DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TNF ALFA EN FUNCIÓN DE LA ESPECIE BACTERIANA IDENTIFICADA

Hasta aquí hemos observado una correlación entre los niveles de TNF- α , la presencia de ADNbact y de LPS.

Resultados de un estudio previo de *Francés et al* [117] mostraron que el tipo y cantidad de citoquinas que se producen en pacientes cirróticos en respuesta a los fenómenos de traslocación de ADNbact se relacionan de forma directa con el contenido de CpG del ADNbact que difiere entre las distintas especies bacterianas. El hecho que de distintas especies bacterianas puedan tener una respuesta inmune distinta, conlleva al hecho de pensar en que si esta correlación entre los niveles de TNF- α y la presencia de ADNbact y de LPS depende de las diferentes bacterias presentes en los fluidos biológicos o si la respuesta es similar entre los diferentes tipos de bacterias.

4.4.1. Relación entre los niveles de TNF- α en suero y la especie bacteriana

Se apreció una producción media de TNF- α mayor en presencia de ADNbact de especies pertenecientes al grupo de gram-negativos (*E. coli* y *Klebsiella*), aunque esta diferencia no llegó a alcanzar significación estadística ni en global (ANOVA; $p=0,079$) ni entre cada una de las especies.

Esto puede explicarse, al menos parcialmente, por una pérdida de potencia del análisis por el menor tamaño muestral al analizar subgrupos.

A continuación se representan de forma gráfica (**Figura 6**) y numérica (**Tabla 8**) los valores medios y desviación estándar de TNF- α sérica para cada una de las especies bacterianas.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Figura 6. Relación entre los niveles de TNF- α y especie bacteriana en suero.
Representación gráfica de la relación de los niveles de TNF- α sérica para cada una de las especies bacterianas.

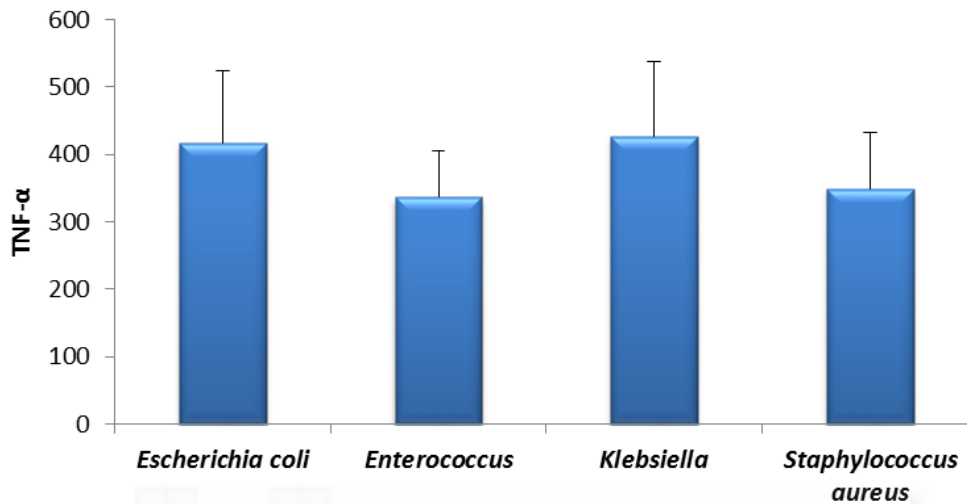


Tabla 8. Relación entre los niveles de TNF- α y especie bacteriana en suero. Valores medios y desviación estándar de TNF- α sérica para cada una de las especies bacterianas.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	48	416,74	107,06
<i>Enterococcus</i>	5	336,74	68,15
<i>Klebsiella</i>	10	425,97	111,83
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	349,15	82,50
Total	76	401,13	104,90

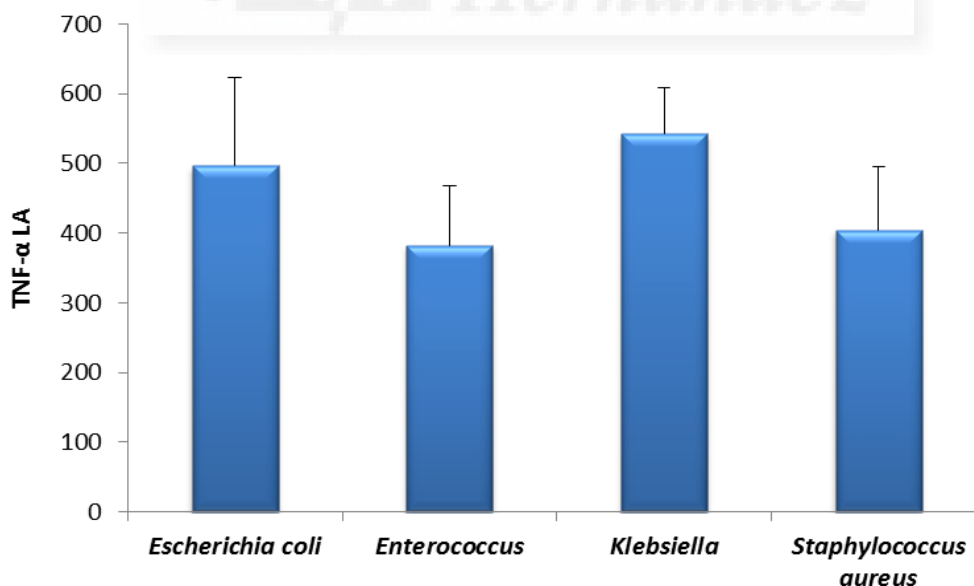
(*) $p > 0,05$. No estadísticamente significativo

4.4.2. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y especie bacteriana

Se estudió igualmente la relación entre la especie bacteriana y los niveles de TNF- α en LA. En este caso el análisis ANOVA sí mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,006$) en los niveles de TNF- α en LA entre las distintas especies bacterianas. Concretamente, existía una diferencia significativa entre los niveles séricos de TNF- α en presencia de ADNbact de *Klebsiella* comparados con *Staphylococcus aureus* ($p= 0,032$).

En la siguiente figura (**Figura 7**) se representan los valores medios y desviación estándar de TNF- α en LA para cada una de las especies bacterianas, con sus correspondientes valores numéricos (**Tabla 9**).

Figura 7. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y especie bacteriana. Representación gráfica de la relación de los niveles de de TNF- α en LA para cada una de las especies bacterianas.



La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Tabla 9. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y especie bacteriana. Valores medios y desviación estándar de TNF- α en LA para cada una de las especies bacterianas.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	49	496,17	127,47
<i>Enterococcus</i>	5	382,56	84,67
<i>Klebsiella</i>	10	542,18	66,50
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	404,75	90,70
Total	77	479,33	121,38

(*) $p > 0,05$. No estadísticamente significativo

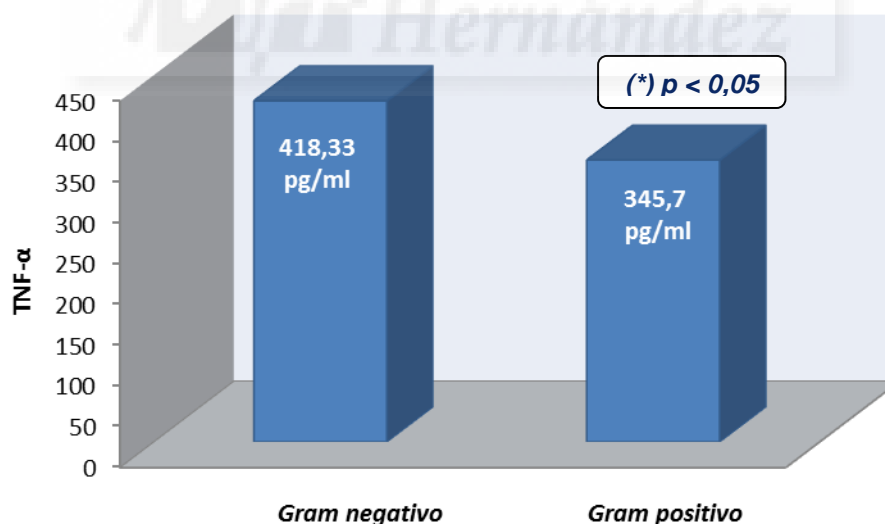


4.5 DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y EN EL LÍQUIDO ASCÍTICO DE TNF ALFA EN FUNCIÓN DE LA TINCIÓN DE GRAM

4.5.1. Relación entre los niveles de TNF- α en suero y tipo de Gram

En la representación siguiente (**Figura 8** y **Tabla 10**), se muestra la relación entre las concentraciones de TNF- α en suero y el tipo de bacteria detectada en función de la tinción de Gram (positiva o negativa). En presencia de ADNbact de especies bacterianas gam-negativas se detectó una mayor cantidad de TNF- α 418,3 pg/ml (80%) frente a la observada ante gram-positivas 345,7 pg/ml (20%). Esas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,009$).

Figura 8 y Tabla 10. Relación entre los niveles de TNF- α en suero y el tipo de Gram. Representación gráfica y numérica de TNF- α en suero para Gram positivos y negativos.



GRAM	N	Media (pg/ml)	Desviación típica
<i>Negativo</i>	58	418,33*	106,95*
<i>Positivo</i>	18	345,70	77,01

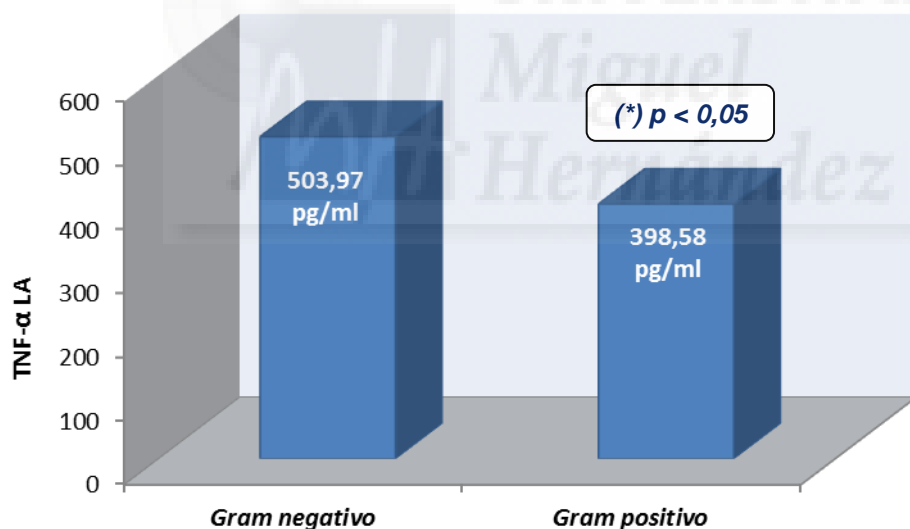
(*) $p < 0,05$. Estadísticamente significativo

4.5.2. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y tinción de Gram

En la tabla y figura siguientes (**Figura 9, Tabla 11**), se muestra la relación entre las concentraciones de TNF- α en suero y el tipo de bacteria detectada en función de la tinción de Gram (positiva o negativa).

Existe una mayor respuesta de TNF- α en LA presencia de BGN en comparación con CGP, como ocurría en el suero. En el análisis se detectó una mayor cantidad de TNF- α en BGN (503,9 pg/ml) frente a CGP (398,58 pg/ml) y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,001$).

Figura 9 y Tabla 11. Relación entre los niveles de TNF- α en LA y el tipo de de Gram. Representación gráfica y numérica de TNF- α en LA para Gram positivos y negativos.



GRAM	N	Media (pg/ml)	Desviación típica
<i>Negativo</i>	59	503,97*	120,16*
<i>Positivo</i>	18	398,58	87,17

(* p < 0,05 Estadísticamente significativo)

4.6 RELACIÓN ENTRE EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA Y OTRAS VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS

Se analizó también si los niveles de TNF- α podrían variar en función de las características clínicas y/o analíticas de los pacientes.

En cuanto a las características clínicas, no se observó una relación estadísticamente significativa entre los niveles de TNF- α y la edad, Child-Pugh o los parámetros que relacionados con la estabilidad hemodinámica (Tensión arterial, frecuencia cardíaca o temperatura) de los pacientes (**tabla 12**).

Tabla 12. Correlación entre el TNF- α y los parámetros clínicos de los pacientes.

VARIABLES	r	p=
Edad	-0,08	0,48
Puntuación CHILD-PUGH	0,05	0,67
TA media	-0,15	0,28
FC (rango)	0,005	0,98
Temperatura	-0.08	0,56

TA: tensión arterial. FC: frecuencia cardíaca

$p < 0,05$. No correlación estadísticamente significativa

Además de las características clínicas que presentan estos pacientes, existen una serie de parámetros analíticos (iones, creatinina, transaminasas proteínas incluida la albúmina o leucocitos) cuyos valores podrían influir en la activación del TNF- α , es por ello que también se estudió la existencia de correlación entre estos parámetros analíticos en suero y el TNF- α tanto su presencia en suero como en LA.

El estudio mostró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de TNF- α y la cantidad de Leucocitos en suero ($r = -0,27$; $p= 0,024$) y de PMN en LA ($r = -0,27$; $p=0,03$) (**tablas 13 y 14**). Esta correlación fue negativa en ambos casos, pero en ambos casos el coeficiente de correlación fue pequeño indicando una correlación débil.

Por otra parte no se observó correlación entre el TNF- α y el resto de parámetros analíticos estudiados (**tabla 13**).

Tabla 13. Correlación entre el TNF- α y los parámetros analíticos en sangre.

VARIABLES	r	p=
Na en Suero (mEq/l)	0,13	0,30
K en Suero (mEq/l)	0,30	0,05
Urea	0,01	0,93
Creatinina (mg/dl)	-0,005	0,97
Albúmina (g/dl)	-0,01	0,98
Gamma Globulina (g/dl)	0,20	0,18
Bilirrubina (mg/dl)	0,01	0,92
ALT	-0,19	0,30
AST	-0,24	0,18
Leucocitos en sangre (mm ³)	-0,27	0,02
PMN (mm ³)	-0,19	0,20
Plaquetas (mm ³)	0,004	0,98
Indice QUICK (%)	-0,01	0,96

Na: Sodio. K: Potasio. AST: Aspartato-aminotransferasa.

ALT: Alanina-aminotransferasa. PMN: leucocitos polimorfonucleares.

Tabla 14. Correlación entre el TNF- α en suero y los parámetros analíticos en LA.

VARIABLES	r	p=
Albúmina LA (g/dl)	0,23	0,86
Leucocitos en LA (mm ³)	-0,22	0,06
PMN en LA (mm ³)	-0,27	0,03
Proteínas en LA (g/dl)	0,07	0,56

LA: Líquido ascítico. PMN: leucocitos polimorfonucleares

Dado que se observó que existía esta relación entre la presencia del TNF- α sérico y los leucocitos en suero y los PMN en LA, la siguiente pregunta era si también podría existir correlación entre los niveles de TNF- α en LA con los parámetros analíticos del LA, especialmente con la presencia de PMN. Sin embargo, no se observó correlación significativa con ninguno de ellos tal y como muestra la siguiente tabla (**tabla 15**):

Tabla 15. Correlación entre el TNF- α en LA y los parámetros analíticos en LA

VARIABLES	r	p=
Albúmina LA (g/dl)	0,07	0,59
Leucocitos en LA (mm ³)	0,07	0,54
PMN en LA (mm ³)	-0,50	0,20
Proteínas en LA (g/dl)	0,15	0,20

LA: Líquido ascítico. PMN: leucocitos polimorfonucleares

Del mismo modo, se estudió la relación de TNF- α en suero y las características demográficas y clínicas del paciente.

Sin embargo, ni el sexo, la etiología de la cirrosis, la puntuación Child-Pugh ni el haber tenido complicaciones previas de la cirrosis mostró una relación con los niveles de TNF- α (*tabla 16*).

Tabla 16. Correlación entre el TNF- α en suero y variables clínicas cualitativas de los pacientes.

VARIABLES	X \pm DS	p=
SEXO (M/F)	384,7 \pm 115,6 414,4 \pm 94,7	0,22
ETIOLOGÍA de la CIRROSIS		
- Alcohol	386,4 \pm 115,0	0,56
- VHC	403,5 \pm 92,3	
- Alcohol + VHC	431,7 \pm 100,3	
- Otros	386,6 \pm 115,5	
Puntuación CHILD-PUGH		
- B	406,9 \pm 94,6	0,59
- C	393,9 \pm 117,4	
Ascitis previa (s/n)	419,1 \pm 85,5 389,4 \pm 115,1	0,23
Encefalopatía previa (s/n)	371,5 \pm 71,3 405,1 \pm 108,4	0,37
Sangrado (HDA) previo (s/n)	429,05 \pm 100,9 397,4 \pm 105,6	0,39

VHC: Virus hepatitis C. HDA: hemorragia digestiva alta

4.7 ANÁLISIS ANCOVA ENTRE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA Y LAS VARIABLES

De todas estas variables que pueden influir en los niveles de TNF- α , el siguiente objetivo es saber cuál de ellos se asocia con más fuerza con el TNF- α , es por ello que se utilizó el análisis ANCOVA.

4.7.1. Variabilidad del TNF- α en el suero

Se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre el TNF- α en suero y los siguientes parámetros: concentración de DNAbact en suero y LA, concentración de LPS, Gram, cifra de leucocitos en el suero, cifra de PMN en LA y de leucocitos en el LA. En el análisis de ANCOVA (**tabla 17**) se muestra una relación significativa del TNF- α con ADNbact tanto en suero ($p = 0,03$) como LA ($p = 0,002$) y con el LPS ($p = 0,007$).

Tabla 17. Análisis ANCOVA entre el TNF- α en suero y el resto de parámetros estadísticamente significativos.

Parámetro	B	Error típico	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	255,601	50,607	5,051	,000	153,954	357,247	5,051	,999
ADN Suero	2,925	1,313	2,228	,030	,288	5,562	2,228	,589
ADN LA	8,562	2,590	3,305	,002	3,359	13,765	3,305	,900
LPS U/mL	-359,227	126,723	-2,835	,007	-613,758	-104,696	2,835	,794
Leucos suero	-,001	,002	-,323	,748	-,005	,004	,323	,062
PMN LA	,035	,167	,209	,835	-,301	,371	,209	,055
Leucos LA	-,004	,051	-,075	,940	-,107	,099	,075	,051
Gram negativo	14,924	28,015	,533	,597	-41,346	71,193	,533	,082
Gram positivo	0 (b)

(a) Calculado con $\alpha = ,05$. (b) Parámetro con el valor cero porque es redundante

Además, al analizar mediante el ANCOVA sólo los parámetros con una relación estadísticamente significativa con el TNF- α calculados anteriormente, persiste la relación de estas dos variables (ADNbat LA y suero y LPS) (**tabla 18**).

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Tabla 18. Análisis ANCOVA entre el TNF- α en suero y el resto de parámetros estadísticamente significativos.

Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	236,534	45,974	5,145	,000	144,864	328,205	5,145	,999
ADN LA	7,549	2,229	3,386	,001	3,103	11,994	3,386	,916
ADN suero	3,394	1,137	2,986	,004	1,128	5,661	2,986	,838
LPS U/mL	-302,471	95,850	-3,158	,002	-493,859	-111,622	3,158	,876

(a) Calculado con alfa = ,05

4.7.2. Variabilidad del TNF- α en el LA

Se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre el TNF- α en LA y los siguientes parámetros: ADNbact en suero y LA, LPS, Gram, TNF- α aen suero y especie bacteriana. Tras realizar el análisis de ANCOVA, este muestra una relación significativa con el TNF- α en suero ($p=0,002$) (**tabla 19**).

Tabla 19. Análisis ANCOVA entre el TNF- α en LA y el resto de parámetros estadísticamente significativos.

Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	63,721	123,632	,515	,608	-182,982	310,425	,515	,080
ADN	,650	2,423	,268	,789	-4,185	5,485	,268	,058
ADN LA	-2,849	4,842	-,588	,558	-12,511	6,814	,588	,089
LPS U/mL	93,667	233,770	,401	,690	-372,814	560,148	,401	,068
TNF- α	,738	,230	3,201	,002	,278	1,198	3,201	,884
Secuencia ID	16,829	13,988	1,203	,233	-11,084	44,742	1,203	,220
Gram negativo	100,494	52,080	1,930	,058	-3,429	204,418	1,930	,477
Gram positivo	0 (b)

(a) Calculado con alfa = ,05

(b) Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Eliminando la relación con TNF- α en suero, por si pudiera ser un factor de confusión en este análisis, se obtiene que el TNF- α en LA se relaciona también con el Gram ($p=0,04$) (*tabla 20*).

Tabla 20. Análisis ANCOVA entre el TNF- α en LA y el resto de parámetros estadísticamente significativos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
Modelo corregido	395845,525 (b)	5	79169,105	7,693	,000	38,465	,999
Intersección	65089,156	1	65089,156	6,325	,014	6,325	,698
ADN	4035,502	1	4035,502	,392	,533	,392	,095
ADN LA	15133,624	1	15133,624	1,471	,229	1,471	,223
LPS U/mL	4859,469	1	4859,469	,472	,494	,472	,104
Secuencia ID	14904,263	1	14904,263	1,448	,233	1,448	,221
Gram	45258,540	1	45258,540	4,398	,040	4,398	,543
Error	710087,360	69	10291,121				
Total	18297582,108	75					
Total corregida	1105932,886	74					

(a) Calculado con $\alpha = ,05$

(b) R cuadrado = ,358 (R cuadrado corregida = ,311)

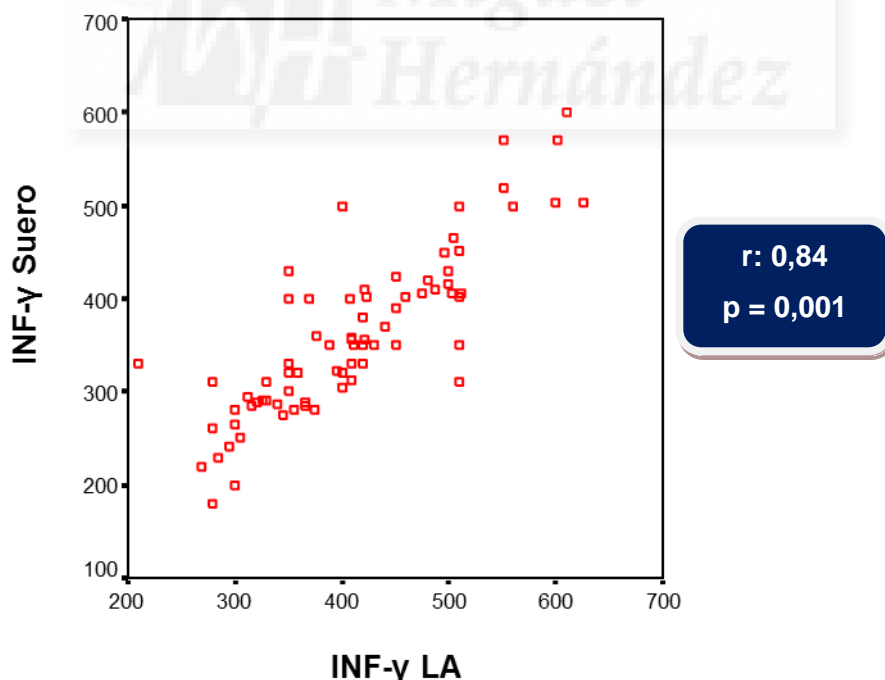
ESTUDIO DE INTERFERON GAMMA (INF- γ) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO

5.1 NIVELES DE INTERFERON GAMMA EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO

Se cuantificó el INF- γ en la muestra basal de cada paciente. Los niveles medios de INF- γ en suero fueron $360,2 \pm 88$ pg/ml y en LA fueron $409,2 \pm 90,8$ pg/ml.

Hubo una relación estadísticamente significativa entre los niveles de INF- γ en suero y en LA ($r = 0,84$ y $p=0,001$). Esta correlación se muestra en la siguiente figura (**figura 10**):

Figura 10. Relación entre los niveles de INF- γ en suero y LA.



Correlación de Pearson: $r = 0,84$; $p=0,001$

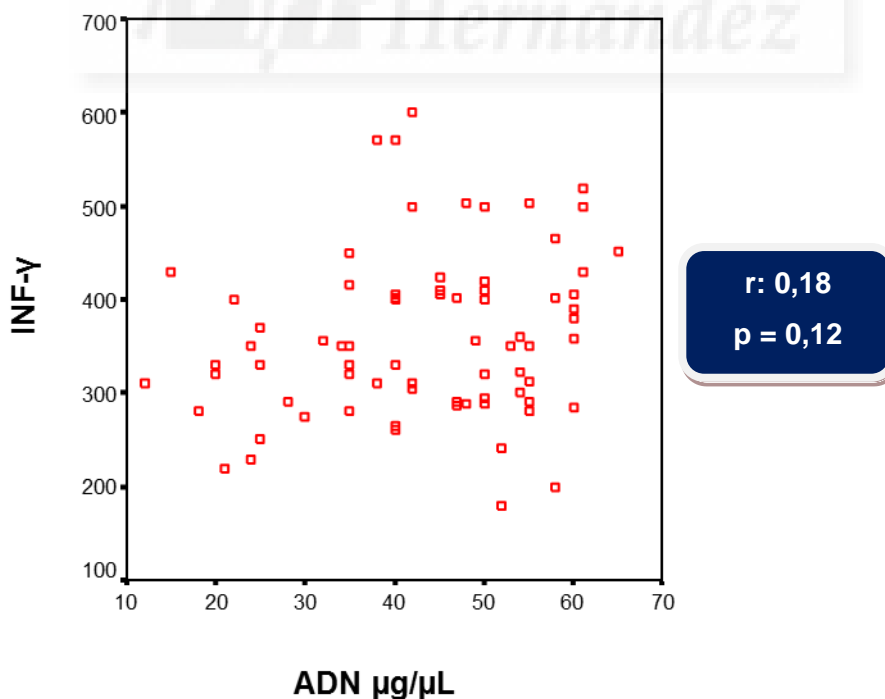
5.2 RELACIÓN ENTRE INTERFERON GAMMA Y ADN BACTERIANO EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO

En el apartado anterior hemos observado la correlación existente entre los niveles de INF- γ en suero y LA, es decir, que su liberación se produce de forma proporcional en ambos medios tras un estímulo determinado. El paso siguiente es observar si esta correlación depende de la concentración de ADNbact y si se da de la misma forma en ambos medios, tanto en suero como en LA.

5.2.1. Relación entre los niveles de INF- γ en suero y ADNbact en suero

No se observó una relación estadísticamente significativa ($r=0,18$ con $p=0,12$) entre los niveles en sangre de INF- γ y la concentración de ADNbact sérico (*figura 11*).

Figura 11. Relación entre los niveles de INF- γ y ADNbact en suero.



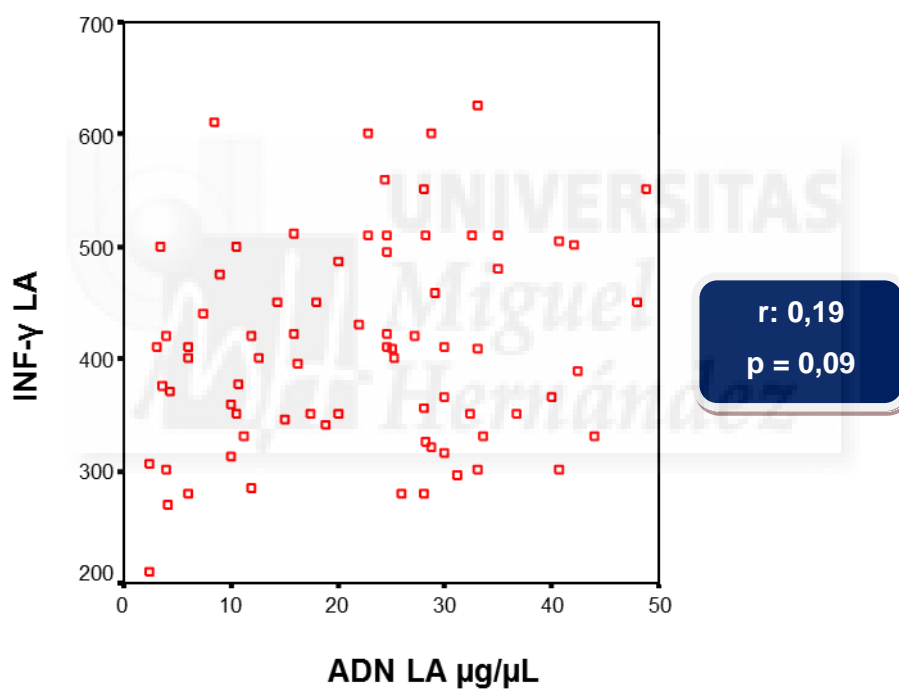
Correlación de Pearson: $r=0,18$
 $p=0,12$ no significativa

5.2.2. Relación entre los niveles de INF- γ y ADNbact en LA

Del mismo modo, se analizó si pudiera haber una relación entre INF- γ y las concentraciones de ADNbact en el LA.

No se observó una correlación estadísticamente significativa ($r= 0,19$ con $p=0,09$), como puede apreciarse en la figura siguiente (**figura 12**):

Figura 12. Relación entre los niveles de INF- γ y ADNbact en LA.



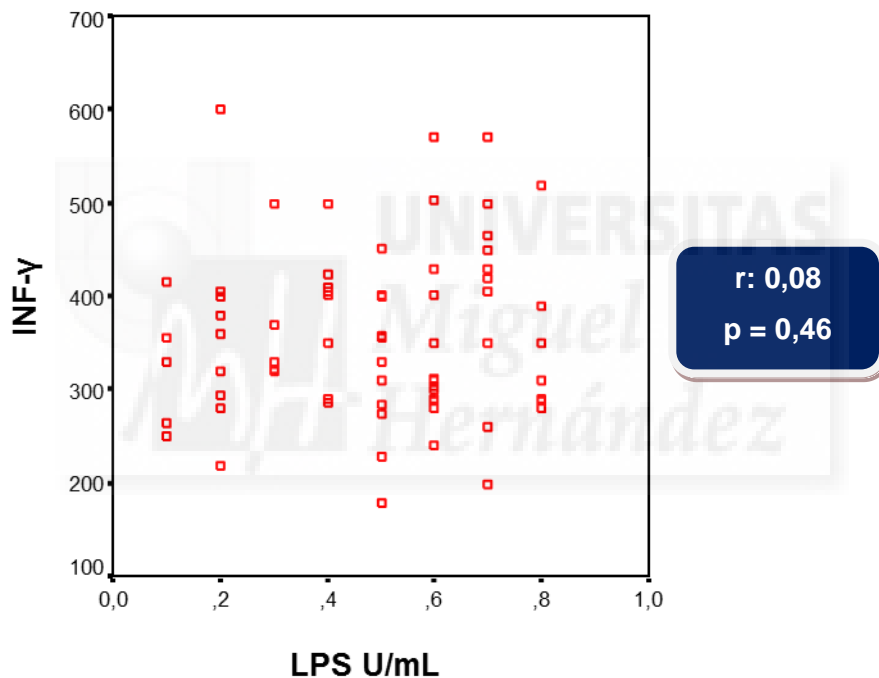
Correlación de Pearson: $r= 0,19$
 $p=0,09$ no significativa

5.3 RELACIÓN ENTRE INTERFERON GAMMA Y LIPOPOLISACÁRIDO

5.3.1. Relación entre los niveles de INF- γ y LPS en suero

No se observó una correlación significativa entre los niveles séricos de INF- γ y LPS ($p=0,46$) (*figura 13*).

Figura 13. Relación entre los niveles de INF- γ y LPS en suero.



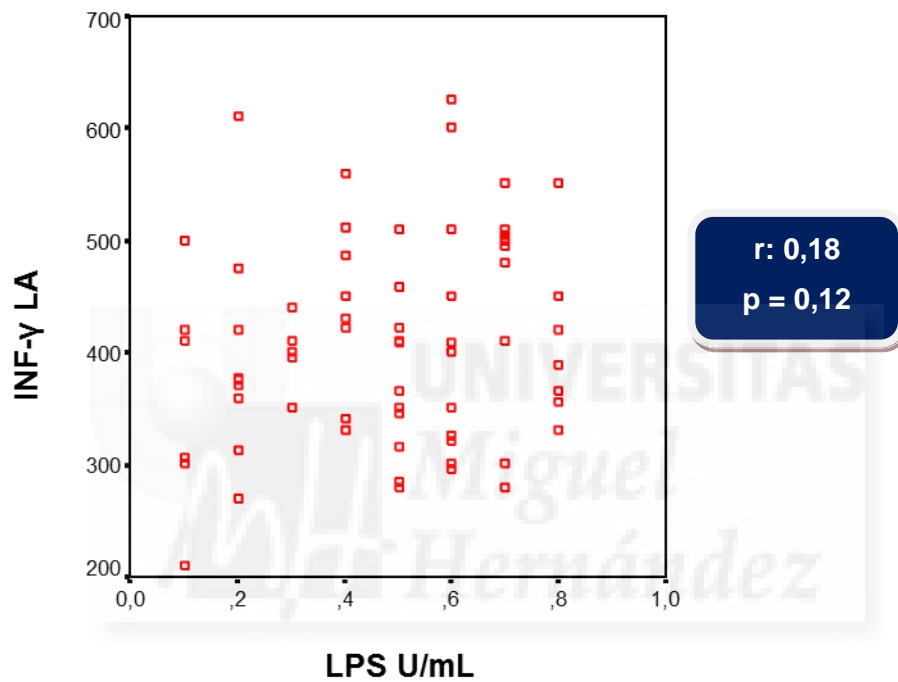
Correlación de pearson: $r=0,087$

$p=0,46$, no estadísticamente significativo

5.3.2. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y LPS en suero

Como se había comprobado previamente, tampoco existe una correlación significativa entre los niveles de INF- γ en LA y de LPS sérico ($p=0,12$), con un coeficiente de correlación ($r= 0,18$) (*figura 14*).

Figura 14. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y LPS en suero.



Correlación de Pearson: $r= 0,18$

$p = 0,12$, no estadísticamente significativo

5.4. DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE INTERFERON GAMMA EN FUNCIÓN DE LA ESPECIE BACTERIANA IDENTIFICADA

5.4.1. Relación entre los niveles de INF- γ en suero y la especie bacteriana

En la siguiente figura y tabla (**figura 15, tabla 21**) se representan los valores medios y desviación estándar de INF- γ sérica para cada una de las especies bacterianas presentes en el medio.

En el análisis ANOVA, no hubo diferencias significativas ($p=0,106$) entre los valores de INF- γ y la especie bacteriana, así como tampoco entre especies.

Figura 15. Relación entre los niveles de INF- γ y especie bacteriana en suero. *Representación gráfica* de la relación de los niveles de INF- γ sérica para cada una de las especies bacterianas.

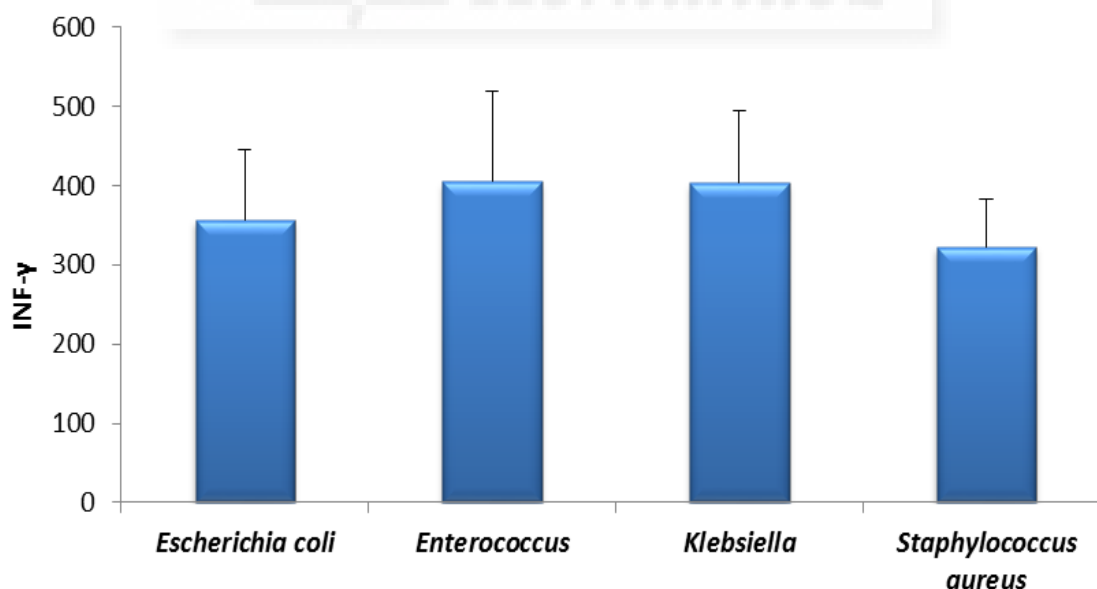


Tabla 21. Relación entre los niveles de INF- γ y especie bacteriana en suero. Valores medios y desviación estándar de INF- γ sérica para cada una de las especies bacterianas.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	48	356,86	87,97
<i>Enterococcus</i>	5	405,04	114,21
<i>Klebsiella</i>	10	402,84	91,84
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	322,64	59,26
Total	76	360,22	88,02

(*) $p > 0,05$. No estadísticamente significativo

5.4.2. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y la especie bacteriana

Aunque no se objetivó relación entre estos parámetros en suero, estudiamos si la especie bacteriana en sí, pudiera tener relación con los niveles de INF- γ en el LA.

Sin embargo, en el análisis ANOVA, no hubo diferencias significativas ($p=0,31$) entre estos valores y tampoco entre especies.

En la siguiente figura (**figura 16**) y tabla (**tabla 22**) se representan los valores medios y desviación estándar de INF- γ en LA para cada una de las especies bacterianas.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Figura 16. Relación entre los niveles de INF- γ y especie bacteriana en LA. **Representación gráfica** de la relación de los niveles de INF- γ en LA para cada una de las especies bacterianas.

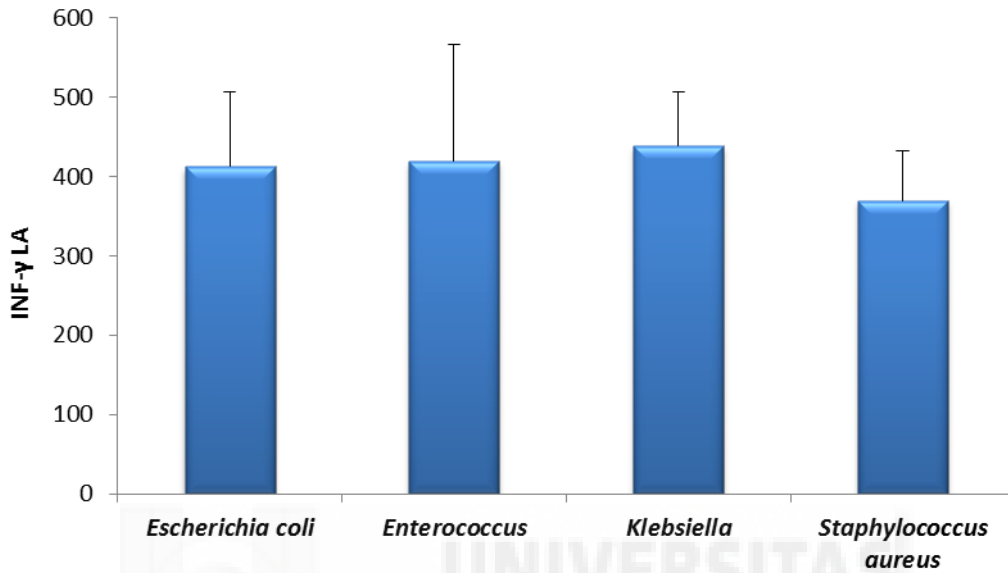


Tabla 22. Relación entre los niveles de INF- γ y especie bacteriana en LA. Valores medios y desviación estándar de INF- γ en LA para cada una de las especies bacterianas.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	49	412,60	93,58
<i>Enterococcus</i>	5	418,80	147,76
<i>Klebsiella</i>	10	438,35	69,18
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	370,10	62,72
Total	77	409,17	90,85

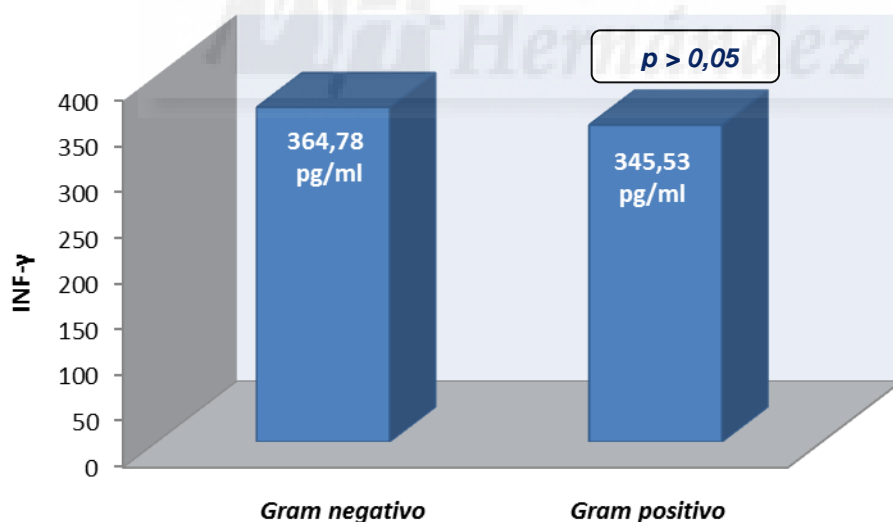
(*) $p > 0,05$. No estadísticamente significativo

5.5. DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y DEL LÍQUIDO ASCÍTICO DE INTERFERON GAMMA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE GRAM

5.5.1. Relación entre los niveles de INF- γ y tipo de Gram en suero

En la siguiente figura y tabla se representan los valores medios y desviación estándar de INF- γ en suero para cada grupo de microorganismos, grampositivos y gramnegativos. No detectamos diferencias significativas entre los niveles de INF- γ en relación a los 2 grupos BGP y BGN ($p= 0,42$), aunque en presencia de BGN se detectó una mayor cantidad de INF- γ 364,8 pg/ml que ante las BGP 345,53 pg/ml. Esto se observa más claramente en la siguiente figura y tabla (**figura 17, tabla 23**).

Figura 17 y Tabla 23. Relación entre los niveles de INF- γ y tipo de gram en suero. Representación gráfica y numérica de INF- γ en suero para Gram positivos y negativos.



GRAM	N	Media (pg/ml)	Desviación típica
<i>Negativo</i>	58	364,78	89,55
<i>Positivo</i>	18	345,53	83,60
Total	76	360,22	88,02

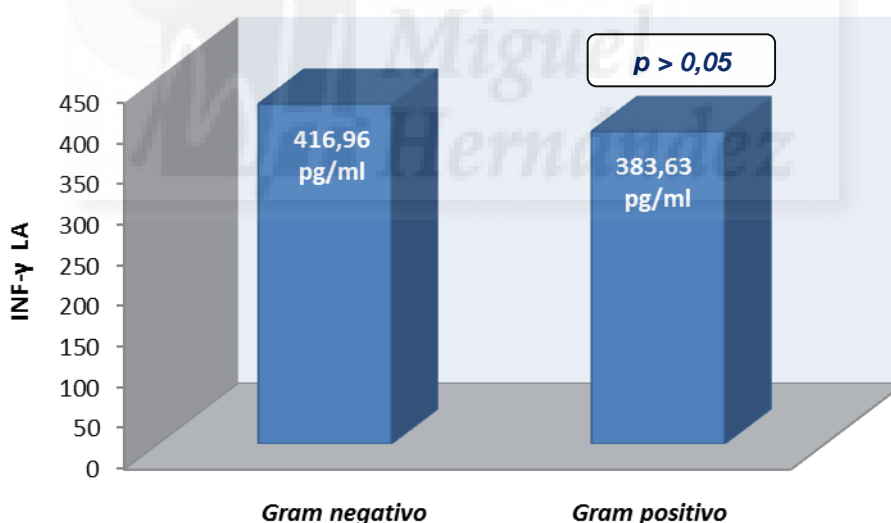
(*) $p > 0,05$ No estadísticamente significativo

5.5.2. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y Gram en suero

En la siguiente figura y tabla (**figura 18, tabla 24**) se representan los valores medios y desviación estándar de INF- γ en LA para cada grupo, gram positivos y gram negativos.

Tampoco existen diferencias significativas entre los niveles de INF- γ en LA en relación a los 2 grupos BGP y BGN ($p= 0,15$), aunque en presencia de BGN se detectó una mayor cantidad de INF- γ (416,96 pg/ml) que en las BGP (383,63 pg/ml).

Figura 18 y Tabla 24. Relación entre los niveles de INF- γ en LA y el tipo de gram en suero. **Representación gráfica y numérica** de INF- γ en LA para Gram positivos y negativos.



GRAM	N	Media	Desviación típica
<i>Negativo</i>	59	416,96	89,91
<i>Positivo</i>	18	383,63	91,75
Total	77	409,17	90,85

(*) $p > 0,05$ No estadísticamente significativo.

5.6 RELACIÓN ENTRE EL INTERFERON GAMMA Y OTRAS VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS

Se analizó también si la presencia de INF- γ podría variar según ciertas características clínicas y analíticas de los pacientes. Las siguientes tablas muestran el resultado de las correlaciones entre el INF- γ y estos parámetros.

Se observó una relación estadísticamente significativa entre los niveles de INF- γ y los valores de TA media ($r=0,31$ $p=0,02$). Por otra parte, no se observó relación estadísticamente significativa entre los niveles de INF- γ , la edad, Chlid-Pugh, Temperatura o Frecuencia cardíaca (**tabla 25**).

Tabla 25. Correlación entre el INF- γ y los parámetros clínicos de los pacientes.

VARIABLES	r	p=
Edad	0,10	0,39
Puntuación CHILD-PUGH	0,16	0,17
TA media	0,31	0,02*
FC (rango)	0,013	0,95
Temperatura	-0,93	0,51

TA tensión arterial. FC: frecuencia cardíaca

* $p < 0,05$. Correlación estadísticamente significativa.

Además de las características clínicas que presentan estos pacientes, existen una serie de parámetros analíticos (iones, creatinina, transaminasas proteínas incluida la albúmina o leucocitos) cuyos valores podrían influir en la activación del INF- γ , es por ello que también se estudió la existencia de correlación entre estos parámetros analíticos en suero y el INF- γ tanto en suero como en LA.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Se observó una correlación negativa significativa entre los niveles de INF- γ y la cantidad de leucocitos ($p= 0,003$) y de PMN ($p=0,03$) en suero. No se observó ninguna otra relación significativa entre el INF- γ y el resto de parámetros analíticos. La siguiente tabla muestra la relación entre los niveles de INF- γ y los parámetros analíticos en sangre (**tabla 26**).

Tabla 26. Correlación entre el INF- γ y los parámetros analíticos en sangre.

VARIABLES	r	p=
Na en Suero (mEq/l)	0,10	0,41
K en Suero (mEq/l)	0,14	0,37
Urea	0,06	0,61
Creatinina (mg/dl)	0,005	0,97
Albúmina (g/dl)	-0,01	0,97
Gamma Globulina (g/dl)	0,13	0,37
Bilirrubina (mg/dl)	0,13	0,33
ALT	-0,14	0,43
AST	-0,12	0,51
Leucocitos en sangre (mm ³)	-0,34	0,003*
PMN (mm ³)	-0,31	0,03*
Plaquetas (mm ³)	0,065	0,69
Indice QUICK (%)	-0,13	0,31

Na: Sodio. K: Potasio. AST: Aspartato-aminotransferasa. ALT: Alanina-aminotransferasa.
PMN: Leucocitos polimorfonucleares.

* $p<0,05$. Correlación estadísticamente significativa.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Al encontrar la existencia de una correlación con los PMN y leucocitos en suero, realizamos la misma observación con respecto a estos parámetros en el LA. Sin embargo al realizar el análisis de correlación de Pearson, no se observaron correlaciones significativas (**tabla 27**).

Tabla 27. Correlación entre el INF- γ en suero y los parámetros analíticos en LA.

VARIABLES	r	p=
Albúmina en LA (g/dl)	0,07	0,59
Leucocitos en LA (mm ³)	0,07	0,54
PMN en LA (mm ³)	-0,05	0,69
Proteínas en LA (g/dl)	-0,15	0,20

LA. Líquido ascítico. PMN: Leucocitos polimorfonucleares.

$p > 0,05$. No relación estadísticamente significativa

Del mismo modo, no se observó correlación entre los niveles de INF- γ del LA con ninguno de los parámetros analíticos en LA (**tabla 28**).

Tabla 28. Correlación entre el INF- γ en LA y los parámetros analíticos en LA.

VARIABLES	r	p=
Albúmina en (g/dl)	-0,09	0,48
Leucocitos en LA (mm ³)	0,09	0,43
PMN en LA (mm ³)	0,13	0,29
Proteínas en LA (g/dl)	-0,20	0,08

LA. Líquido ascítico. PMN: Leucocitos polimorfonucleares.

$p > 0,05$. No relación estadísticamente significativa

Una vez analizados los parámetros cuantitativos de estos pacientes en relación al INF- γ , también era necesario analizar las variables clínicas cualitativas de los mismos. De nuevo, los resultados del análisis mostraron la ausencia de relación significativa entre los niveles de INF- γ y el sexo, la etiología de la cirrosis, la puntuación Child-Pugh o el haber tenido complicaciones previas de la cirrosis (**tabla 29**).

Tabla 29. Correlación entre el INF- γ y las variables clínicas cualitativas de los pacientes.

VARIABLES	X \pm DS	p=
SEXO (M/F)	357,1 \pm 98,3 362,7 \pm 79,8	0,78
ETIOLOGÍA de la CIRROSIS		
- Alcohol	346,3 \pm 82,1	0,62
- VHC	371,6 \pm 103,4	
- Alcohol + VHC	358,1 \pm 84,1	
- Otros	387,5 \pm 71,1	
Puntuación CHILD-PUGH		
- B	352,9 \pm 89,3	0,43
- C	369,1 \pm 86,8	
Ascitis previa (s/n)	360,9 \pm 89,6 359,7 \pm 87,9	0,95
Encefalopatía previa (s/n)	380,1 \pm 120,7 357,6 \pm 83,5	0,47
Sangrado (HDA) previo (s/n)	379,5 \pm 98,3 357,6 \pm 87,0	0,49

VHC: Virus hepatitis C. HDA: Hemorragia digestiva alta

5.7 RELACIÓN ENTRE EL INTERFERON GAMMA Y ANÁLISIS ANCOVA

5.7.1. Variabilidad de los valores de INF- γ en suero

Se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de INF- γ en suero y los siguientes parámetros: INF- γ en LA, TAM, Leucos en suero y PMN en suero.

El análisis de ANCOVA muestra que el INF- γ en suero sólo se relaciona de forma significativa con el INF- γ en LA ($p=0,001$) (*tabla 30*).

Tabla 30. Análisis ANCOVA entre el INF- γ en suero y el resto de parámetros estadísticamente significativos.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
Modelo corregido	219136,090 (b)	4	54784,023	21,434	,000	85,735	1,000
Intersección	1138,700	1	1138,700	,446	,511	,446	,098
TAM	1371,413	1	1371,413	,537	,471	,537	,109
Leucos Suero	12,325	1	12,325	,005	,945	,005	,051
PMNSuero	102,118	1	102,118	,040	,843	,040	,054
INF-γ	190043,691	1	190043,691	74,353	,000	74,353	1,000
Error	63899,290	25	2555,972				
Total	4323492,523	30					
Total corregida	283035,380	29					

(a) Calculado con $\alpha = ,05$

(b) R cuadrado = ,774 (R cuadrado corregida = ,738)

Como el análisis anterior sólo mostró relación en presencia de INF- γ en LA. Se volvió a comprobar si eliminando el INF- γ en LA como posible factor confusional en el análisis ANCOVA.

Sin embargo, no se observó ninguna relación estadísticamente significativa del INF- γ en suero con el resto de parámetros (**tabla 31**). Estos hallazgos se observan en la siguiente tabla.

Tabla 31. Análisis ANCOVA entre el INF- γ en suero y el resto de parámetros estadísticamente significativos.

Parámetro	B	Error típico	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	115,239	180,880	,637	,530	-256,565	487,043	,637	,094
TAM	3,239	2,019	1,604	,121	-,911	7,389	1,604	,339
Leucos suero	-,003	,020	-,156	,878	-,044	,038	,156	,053
PMN suero	,001	,023	,023	,982	-,046	,047	,023	,050

(a) Calculado con $\alpha = ,05$

5.7.2. Relación entre en INF- γ en LA

Además de la relación del INF- γ en LA con el serológico, como se observa en la Tabla 30, no se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre el INF- γ en LA con el resto de los parámetros analizados.

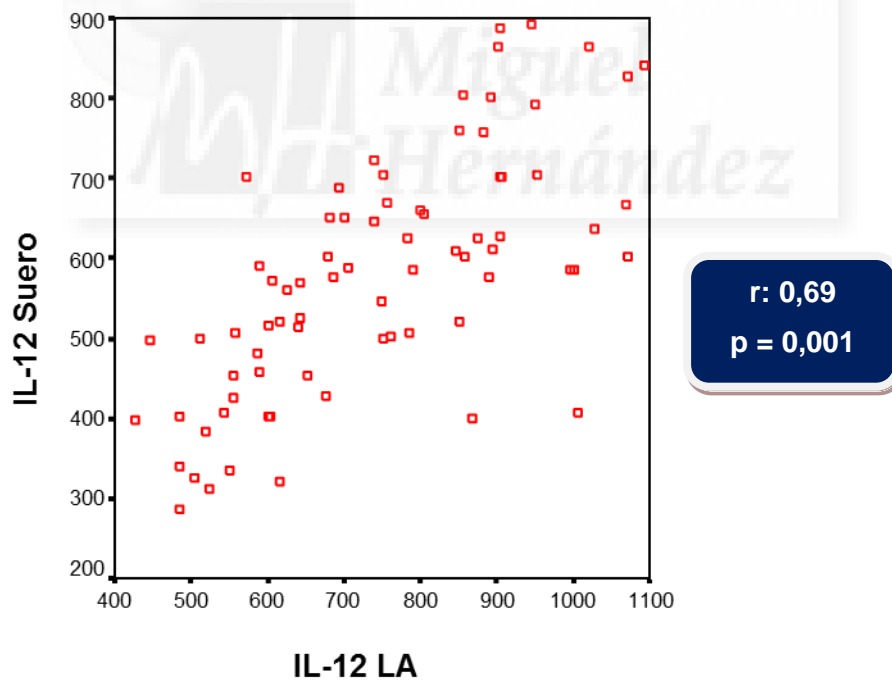
6. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 12 (IL-12) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO

6.1 NIVELES DE INTERLEUCINA 12 EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO

Se cuantificó la IL-12 en la muestra basal de cada paciente. Los niveles medios de IL-12 en suero fueron $576,9 \pm 149$ pg/ml y en LA fueron $746,9 \pm 175,2$ pg/ml.

Hubo una relación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-12 en suero y en LA ($r: 0,69$ y $p=0,001$) (**figura 19**):

Figura 19. Relación entre los niveles de IL-12 en suero y LA.



Correlación de Pearson: $r: 0,69$

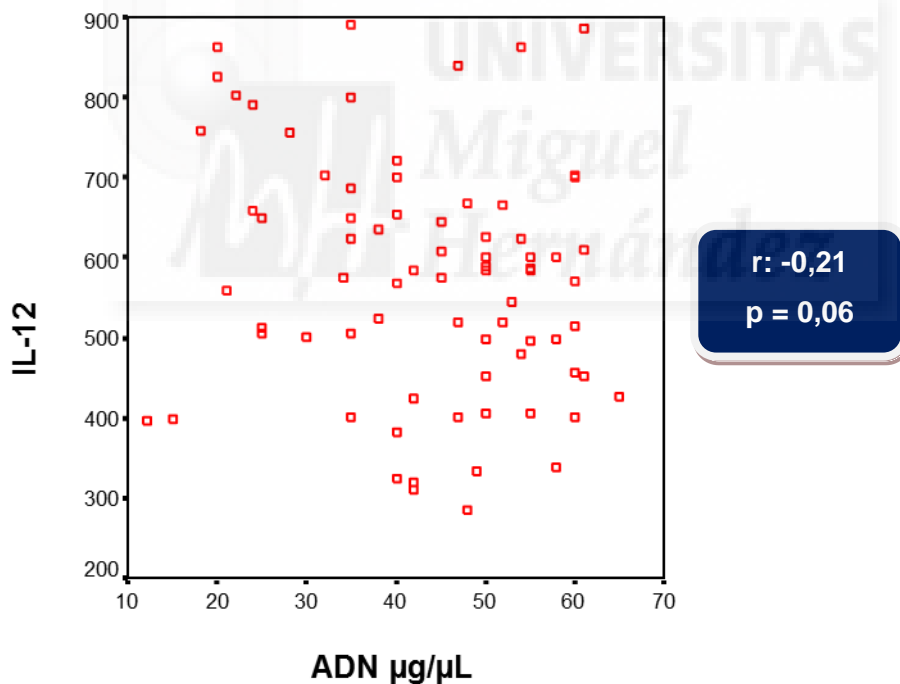
$p=0,001$, estadísticamente significativa

6.2 RELACIÓN ENTRE INTERLEUCINA 12 Y ADN BACTERIANO EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO

6.2.1. Relación entre los niveles de IL-12 en suero y ADNbact en suero

Se observó una correlación negativa no significativa ($r = -0,21$ con $p = 0,06$) entre los niveles en sangre de IL-12 y ADNbact, tal y como se puede apreciar en la figura siguiente (**figura 20**):

Figura 20. Relación entre los niveles de IL-12 en suero y ADNbact en suero.

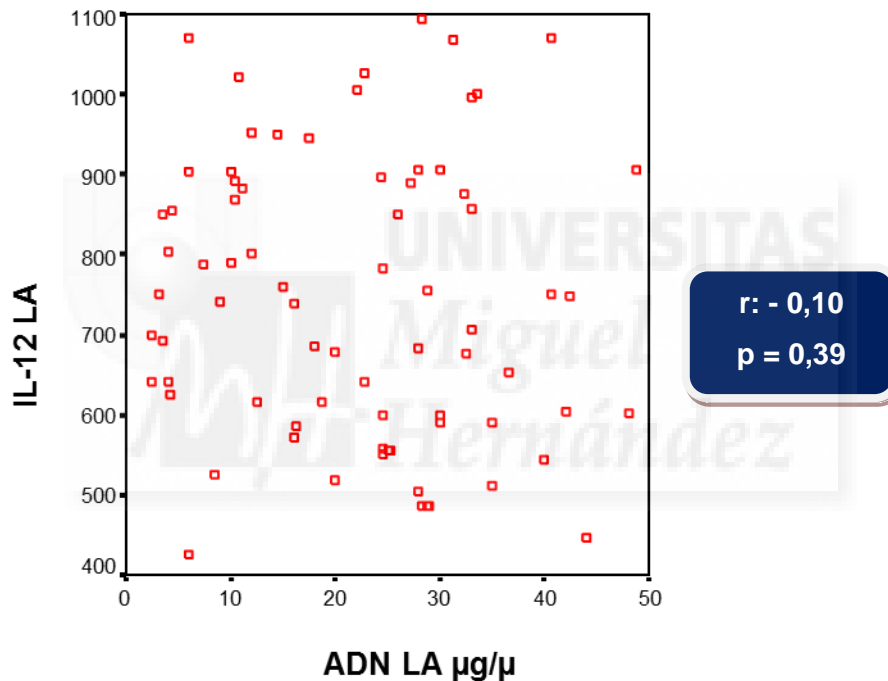


Correlación de Pearson: $r = -0,21$
 $p = 0,06$ no significativa

6.2.2. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y ADNbact en LA

Del mismo modo que en el apartado anterior, se estudió la asociación de los niveles de IL-12 en LA con las concentraciones de ADNbact en LA observándose una correlación negativa no significativa ($r = -0,10$ con $p = 0,39$), como se observa en la figura siguiente (**figura 21**):

Figura 21. Relación entre los niveles de IL-12 y ADNbact en LA.



Correlación de Pearson: $r = - 0,10$ con
 $p = 0,39$ no significativa

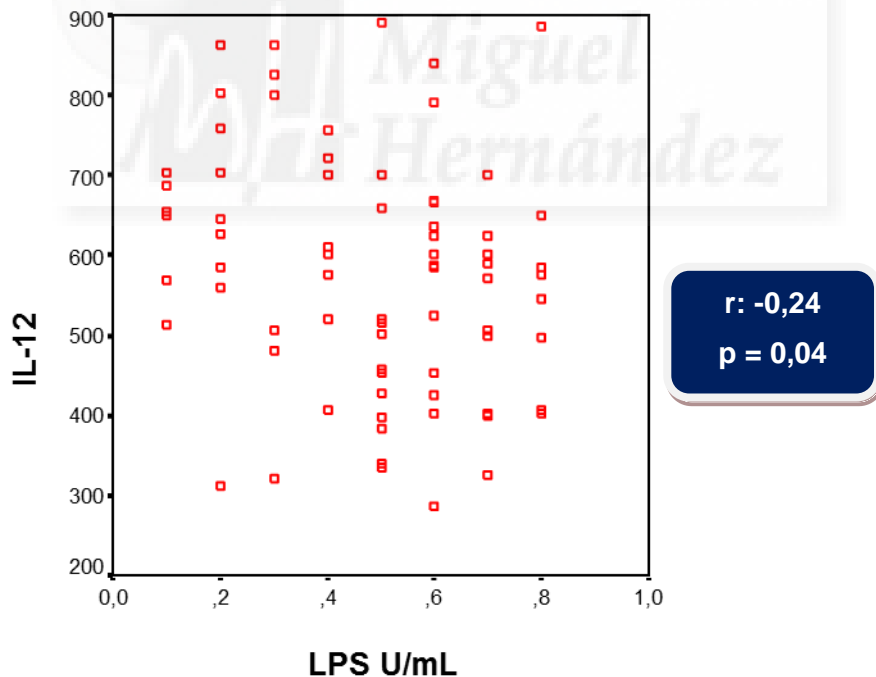
6.3 RELACIÓN ENTRE INTERLEUCINA 12 Y LIPOPOLISACÁRIDO

6.3.1. Relación entre los niveles de IL-12 y LPS en suero

Hemos observado que no existe relación significativa alguna entre la IL-12 y la cantidad de ADNbact, tanto en suero como el LA. Se analizó qué era lo que ocurría en presencia del LPS.

A diferencia de la relación no significativa entre los niveles de IL-12 y ADNbact, los resultados muestran una correlación negativa estadísticamente significativa ($p=0,04$) entre los niveles de IL-12 y LPS ($r= -0,24$) en suero (**figura 22**).

Figura 22. Relación entre los niveles de IL-12 y LPS en suero.



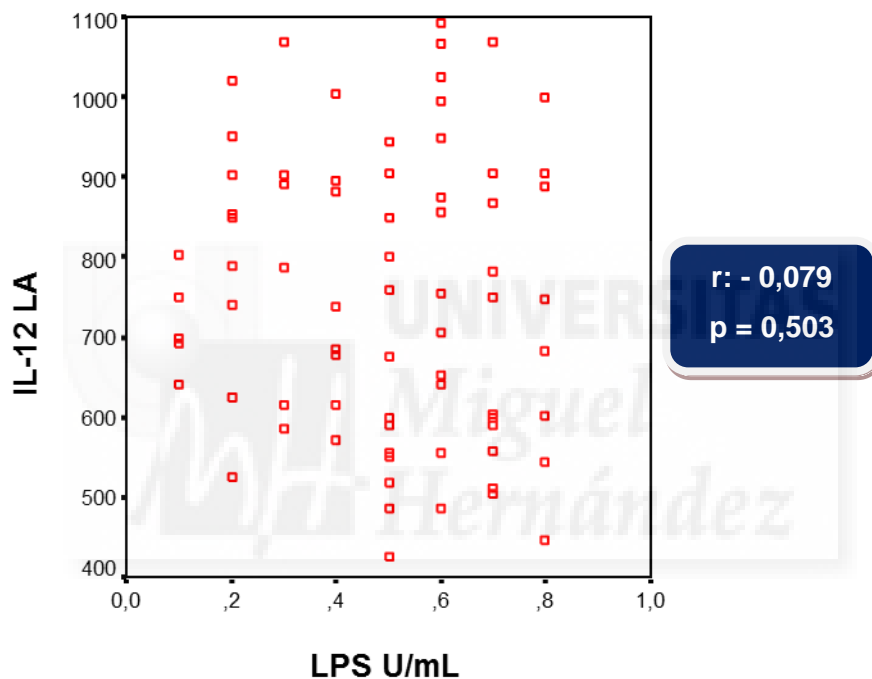
Correlación pearson $r= -0,24$

$p=0,04$ estadísticamente significativo.

6.3.2. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y LPS en suero

Por el contrario, al analizar la posible relación entre la liberación de IL-12 en LA y la presencia de LPS, no se apreció una correlación estadísticamente significativa ($p=0,503$) entre los niveles de IL-12 en LA y LPS en suero (**figura 23**).

Figura 23. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y LPS en suero.



Correlación pearson $r = -0,079$

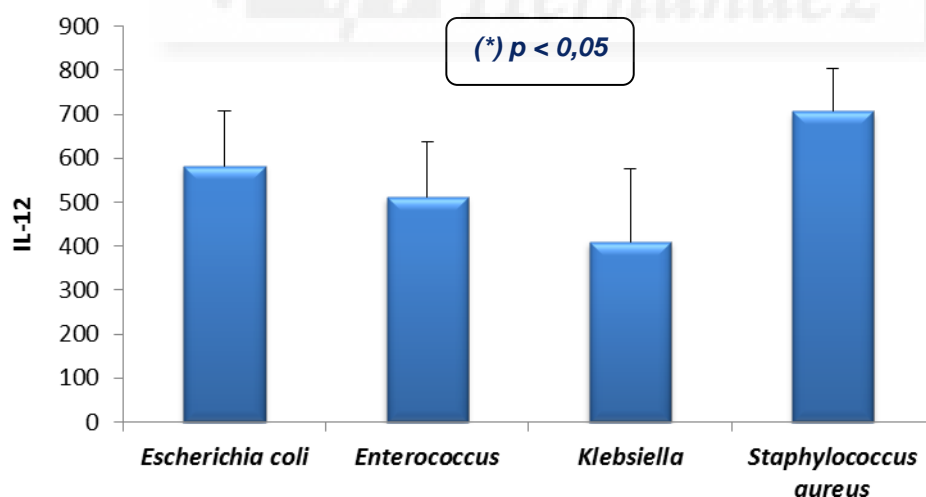
$p = 0,503$, no estadísticamente significativo

6.4 DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y DE LÍQUIDO ASCÍTICO DE INTERLEUCINA 12 EN FUNCIÓN DE LA ESPECIE BACTERIANA IDENTIFICADA

6.4.1. Relación entre los niveles de IL-12 y la especie bacteriana en suero

Observamos que en el análisis ANOVA hubo diferencias significativas ($p=0,001$) entre los valores de IL-12 y la especie bacteriana y entre las distintas especies bacterianas, tal como muestra la siguiente figura (**figura 24**) y tabla (**tabla 32**), en la que se representan los valores medios y desviación estándar de IL-12 sérica para cada una de las especies bacterianas.

Figura 24. Relación entre los niveles de IL-12 y especie bacteriana en suero. Representación gráfica de la relación de los niveles de IL-12 sérica para cada una de las especies bacterianas.



Hubo diferencias estadísticamente significativas entre especies. Destaca una mayor concentración de IL-12 en presencia de ADN de *S. aureus* que con el resto de especies. La respuesta a *E. coli* fue significativamente superior que con *Klebsiella* ($p=0,001$) y menor que con *S. aureus* ($p= 0,015$).

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Tabla 32. Relación entre los niveles de IL-12 y especie bacteriana en suero. Valores medios y desviación estándar de IL-12 sérica para cada una de las especies bacterianas.

	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	48	583,10 *	124,56
<i>Enterococcus</i>	5	512,21	126,24
<i>Klebsiella</i>	10	410,05	165,39
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	707,36 +	96,93
Total	76	576,92	149,41

* $p < 0,05$ comparado con *E. coli*

+ $p < 0,05$ comprado con *Staphylococcus aureus*

6.4.2. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y la especie bacteriana en suero

Ya que observamos una correlación significativa entre los niveles de IL-12 en suero con respecto a la especie bacteriana, el siguiente paso era conocer si este hecho se mantenía en el LA.

De nuevo observamos estas diferencias estadísticamente significativas (**figura 25** y **tabla 33**) entre los valores de IL-12 en LA y la especie bacteriana ($p=0,01$) y además entre especies. Destaca la presencia de IL-12 en LA en presencia de *S. aureus* que es significativamente mayor respecto a *Klebsiella* ($p=0,008$) y también la respuesta a *E. coli* fue significativamente superior comparada con la respuesta a *Klebsiella* ($p=0,032$).

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

En la siguiente figura (**figura 25**) y tabla (**tabla 33**) se representan los valores medios y desviación estándar de IL-12 en LA para cada una de las especies bacterianas.

Figura 25. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y especie bacteriana en suero.
Representación gráfica de la relación de los niveles de IL-12 en LA para cada una de las especies bacterianas.

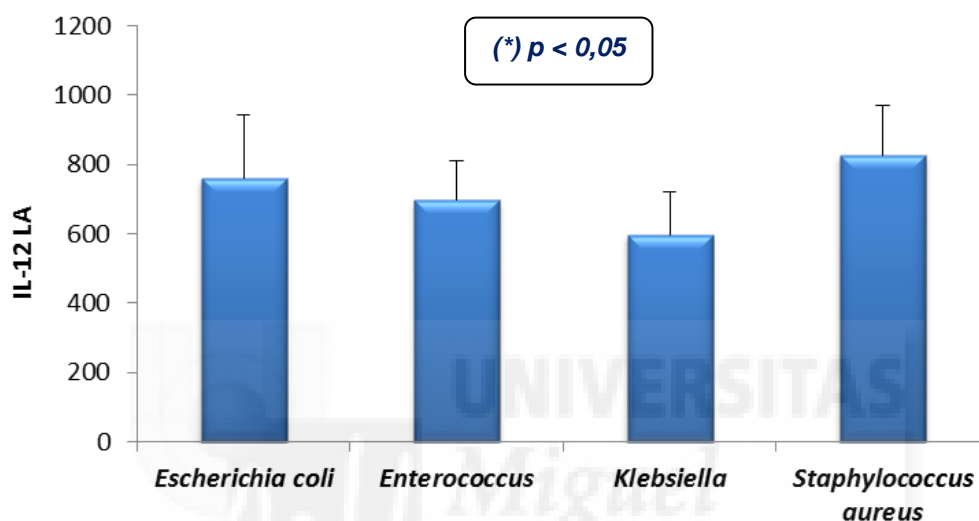


Tabla 33. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y especie bacteriana en suero. Valores medios y desviación estándar de IL-12 en LA para cada una de las especies bacterianas.

	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	49	761,49*	180,89
<i>Enterococcus</i>	5	695,82	113,32
<i>Klebsiella</i>	10	596,42	123,80
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	827,47+	141,19
Total	77	746,93	175,22

* $p < 0,05$ comparado con *E. coli*

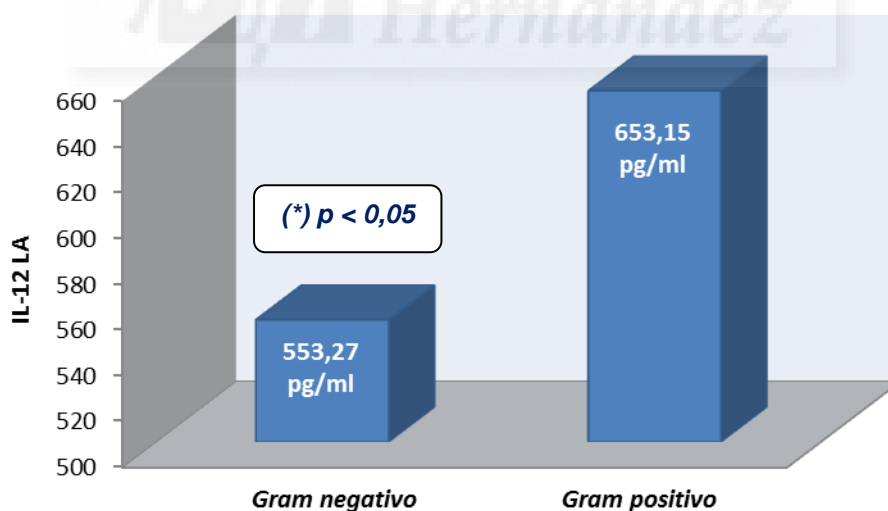
+ $p < 0,05$ comparado con *Staphylococcus aureus*

6.5 DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y DE LÍQUIDO ASCÍTICO DE INTERLEUCINA 12 EN FUNCIÓN DEL TIPO DE GRAM

6.5.1 Relación entre los niveles de IL-12 y el tipo de gram en suero

Puesto que observamos diferencias significativas en cuanto a la respuesta de IL-12 para cada especie bacteriana, sobre todo destaca las BGP respecto a las BGN aunque su liberación es significativa en ambos grupos, el siguiente paso era observar si estas diferencias se mantenían significativas y si eran mayores al agrupar las especies bacterianas según el gram. En presencia de BGP se detectó una mayor cantidad de IL-12 ($653,1 \pm 32$ pg/ml) que en presencia de ADN de BGN ($553,3 \pm 19,2$ pg/ml) ($p = 0,012$). Estas diferencias se muestran en la siguiente figura y tabla (**figura 26** y **tabla 34**).

Figura 26 y Tabla 34. Relación entre los niveles de IL-12 y el tipo de gram en suero. Representación gráfica y numérica de IL-12 en suero para Gram positivos y negativos.



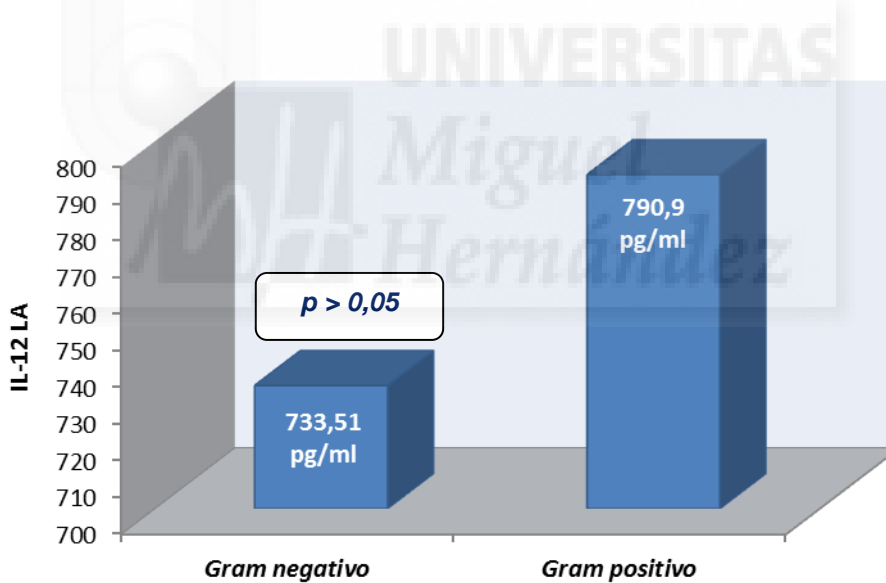
GRAM	N	Media	Desviación típica
Negativo	58	553,27	146,49
Positivo	18	653,15*	135,91*
Total	76	576,92	149,41

(*) $p < 0,05$ comparado con gramnegativos

6.5.2 Relación entre los niveles de IL-12 en LA y el tipo de gram en suero

También observamos si existía algún tipo de correlación entre el IL-12 y el tipo de gram. En la figura siguiente (**figura 27**) y tabla (**tabla 35**), se muestra la relación entre las concentraciones de IL-12 en LA y el tipo de BGP o BGN. En este caso, no se objetivó diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IL-12 en presencia de BGP y BGN ($p=0,236$). Sin embargo, la tendencia de la respuesta frente al grupo de gram-positivas fue mayor ($790,90 \pm 182,65$ pg/ml en BGP y $733,51 \pm 144,13$ pg/ml en BGN).

Figura 27 y Tabla 35. Relación entre los niveles de IL-12 en LA y el tipo de gram en suero. Representación gráfica y numérica de IL-12 en LA para Gram positivos y negativos.



	N	Media	Desviación típica
<i>Negativo</i>	59	733,51	182,65
<i>Positivo</i>	18	790,90	144,13
Total	77	746,93	175,22

$p > 0,05$. No diferencias significativas

6.6 RELACIÓN ENTRE INTERLEUCINA 12 Y OTRAS VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS

Se analizó también si los niveles de IL-12 podrían variar en función de las características clínicas y analíticas de los pacientes. Las siguientes tablas muestran las correlaciones entre el IL-12 y estos parámetros.

En cuanto a los parámetros clínicos de los pacientes, no se observó relación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-12 y la edad, Child-Pugh y los parámetros que midieron la estabilidad hemodinámica (**tabla 36**).

Tabla 36. Correlación entre IL-12 y los parámetros clínicos de los pacientes.

VARIABLES	r	p=
Edad	-0,06	0,62
Puntuación CHILD-PUGH	0,01	0,93
TA media	-0,59	0,68
FC (rango)	-0,32	0,13
Temperatura	-0,18	0,19

TA: Tensión arterial. FC: Frecuencia cardíaca

p<0,05. No correlación estadísticamente significativa

No se observó relación alguna entre los niveles de IL-12 en suero y el resto de parámetros analíticos medidos tanto en suero como en LA, tal y como se observa en las siguientes tablas (**tabla 37 y tabla 38**).

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Tabla 37. Correlación entre IL-12 y los parámetros analíticos en sangre.

VARIABLES	r	p=
Na en Suero (mEq/l)	0,13	0,31
K en Suero (mEq/l)	-0,09	0,56
Urea	-0,01	0,93
Creatinina (mg/dl)	-0,01	0,91
Albúmina (g/dl)	0,06	0,66
Gamma Globulina (g/dl)	0,03	0,83
Bilirrubina (mg/dl)	0,11	0,42
ALT	-0,05	0,78
AST	-0,10	0,58
Leucocitos en sangre (mm ³)	0,06	0,65
PMN (mm ³)	0,09	0,54
Plaquetas (mm ³)	0,11	0,52
Indice QUICK (%)	-0,14	0,29

Na: Sodio. K: Potasio. AST: Aspartato-aminotransferasa. ALT: Alanina-aminotransferasa.

PMN: leucocitos polimorfonucleares.

p<0,05. No correlación estadísticamente significativa

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Tabla 38. Correlación entre IL-12 y los parámetros analíticos en LA.

VARIABLES	r	p=
Albúmina en LA (g/dl)	-0,03	0,79
Leucocitos en LA (mm ³)	-0,03	0,79
PMN en LA (mm ³)	-0,09	0,49
Proteínas en LA (g/dl)	-0,09	0,41

LA: Líquido ascítico. PMN: leucocitos polimorfonucleares
p<0,05. No correlación estadísticamente significativa

Además, analizamos estas mismas variables con el IL-12 en el LA. No se observó correlación estadísticamente significativa entre IL-12 en LA y los parámetros analíticos en LA, tal como muestra la siguiente tabla (**tabla 39**):

Tabla 39. Correlación entre IL-12 en LA y los parámetros analíticos en LA.

VARIABLES	r	p=
Albúmina en LA (g/dl)	-0,16	0,21
Leucocitos en LA (mm ³)	0,01	0,91
PMN en LA (mm ³)	-0,09	0,49
Proteínas en LA (g/dl)	-0,04	0,70

LA: Líquido ascítico. PMN: leucocitos polimorfonucleares
p<0,05. No correlación estadísticamente significativa

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

No hubo relación entre los niveles de IL-12 y el sexo, la etiología de la cirrosis, la puntuación Child-Pugh (**tabla 40**). Sin embargo hubo una relación significativa entre los niveles de IL-12 y el haber presentado episodios de encefalopatía previa.

Tabla 40. Correlación entre IL-12 y variables clínicas cualitativas de los pacientes.

VARIABLES	X ± DS	p=
SEXO (M/F)	567,4 ± 153,2 584,6 ± 147,7	0,62
ETIOLOGÍA de la CIRROSIS		
- Alcohol	590,7 ± 156,6	0,30
- VHC	580,7 ± 155,5	
- Alcohol + VHC	519,9 ± 132,4	
- Otros	635,6 ± 120,3	
Puntuación CHILD-PUGH		
- B	573,6 ± 154,4	0,83
- C	581,1 ± 145,2	
Ascitis previa (s/n)	573,6 ± 154,1 579,1 ± 147,1	0,88
Encefalopatía previa (s/n)	671,6 ± 173,1 564,2 ± 142,6	0,04
Sangrado (HDA) previo (s/n)	654,4 ± 175,9 566,5 ± 143,8	0,09

HC: Virus hepatitis C. HDA: hemorragia digestiva alta
p<0,05. Correlación estadísticamente significativa

6.7 RELACIÓN ENTRE INTERLEUCINA 12 Y ANÁLISIS ANCOVA

6.7.1. Variabilidad en las concentraciones de IL-12 en suero

Se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre la IL12 en suero y los siguientes parámetros: IL-12 LA, ADN LA, LPS, especie bacteriana, gram y encefalopatía previa. Tras realizar el análisis de ANCOVA, se muestra una correlación estadísticamente significativa con los niveles de IL-12 en LA ($p=0.001$). Además, al eliminar esta relación en el análisis ANCOVA, no se aprecia ninguna otra relación estadísticamente significativa (*tabla 41*).

Tabla 41. Análisis ANCOVA entre IL-12 y las variables estadísticamente significativas.

Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	307,997	114,748	2,684	,009	78,958	537,035	2,684	,753
IL-12 LA	,547	,076	7,202	,000	,395	,699	7,202	1,000
ADN LA	-,938	1,998	-,469	,640	-4,927	3,051	,469	,075
LPS U/mL	-31,701	138,269	-,229	,819	-307,687	244,286	,229	,056
Secuencia ID	-10,495	16,067	-,653	,516	-42,565	21,575	,653	,099
Gram negativo	-80,630	91,063	-,885	,379	-262,392	101,131	,885	,141
Grampositivo	0 (b)
No Encefalopatía previa	-47,352	69,896	-,677	,500	-186,865	92,160	,677	,102
Encefalopatía previa	0 (b)
Gram negativo sin encefalopatía	29,321	84,057	,349	,728	-138,459	197,100	,349	,064
Gram negativo y encefalopatía	0 (b)
Gram positivo sin encefalopatía	0 (b)
Gram positivo y encefalopatía	0 (b)

(a) Calculado con $\alpha = ,05$

(b) Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Al eliminar IL-12 en LA al realizar el análisis mediante ANCOVA no se observa relación con el resto de parámetros (**tabla 42**).

Tabla 42. Análisis ANCOVA entre IL-12 y las variables estadísticamente significativas tras la retirada de la IL-12 en LA.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
Modelo corregido	191701,725 (b)	4	47925,431	2,264	,071	9,057	,633
Intersección	1677815,738	1	1677815,738	79,266	,000	79,266	1,000
DNA LA	8536,328	1	8536,328	,403	,527	,403	,096
LPS U/mL	2157,905	1	2157,905	,102	,750	,102	,061
Secuencia ID	41544,727	1	41544,727	1,963	,166	1,963	,282
GRAM	80820,777	1	80820,777	3,818	,055	3,818	,487
Error	1481678,647	70	21166,838				
Total	26600802,243	75					
Total corregida	1673380,372	74					

(a) Calculado con alfa = ,05

(b) R cuadrado = ,115 (R cuadrado corregida = ,064)

6.7.2. Relación entre IL-12 en LA

Se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre IL-12 en LA y los siguientes parámetros: IL-12 sérico y la secuencia bacteriana. Tras realizar el análisis de ANCOVA (**tablas 43 y 44**), este muestra que existe relación estadísticamente significativa con los niveles de IL-12 en suero ($p=0.001$). No existe relación significativa con cada secuencia bacteriana de forma individual.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Tabla 43. Análisis ANCOVA entre IL-12 en LA y las variables estadísticamente significativas.

Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	241,785	92,723	2,608	,011	56,900	426,670	2,608	,730
IL-12 suero	,828	,121	6,853	,000	,587	1,069	6,853	1,000
<i>E. coli</i>	34,328	43,234	,794	,430	-51,879	120,535	,794	,123
<i>Enterococo</i>	29,929	72,198	,415	,680	-114,030	173,888	,415	,069
<i>Klebsiella</i>	15,113	65,310	,231	,818	-115,112	145,337	,231	,056
<i>S. aureus</i>	0 (b)

Variable dependiente: IL-12 en LA

(a) Calculado con alfa = ,05

(b) Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

Tabla 44. Análisis ANCOVA entre IL-12 en LA y las variables estadísticamente significativas.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
Modelo corregido	1120329,899 (b)	4	280082,475	16,656	,000	66,624	1,000
Intersección	235617,863	1	235617,863	14,012	,000	14,012	,958
IL-12 suero	789743,711	1	789743,711	46,965	,000	46,965	1,000
Secuencia ID	13004,350	3	4334,783	,258	,856	,773	,097
Error	1193910,695	71	16815,644				
Total	44509104,590	76					
Total corregida	2314240,594	75					

(a) Calculado con alfa = ,05

(b) R cuadrado = ,484 (R cuadrado corregida = ,455)

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Al eliminar la relación estadísticamente significativa que se muestra entre IL-12 en LA e IL-12 sérico en el análisis ANCOVA. Se confirma la no existencia de relación estadísticamente significativa con el resto de parámetros (**tabla 45**).

Tabla 45. Análisis ANCOVA entre IL-12 en LA y las variables estadísticamente significativas.

Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%.		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	749,026	36,917	20,289	,000	675,484	822,569	20,289	1,000
Secuencia ID	-1,144	16,910	-,068	,946	-34,830	32,542	,068	,051

Variable dependiente: IL_12_LA

(a) Calculado con alfa = ,05

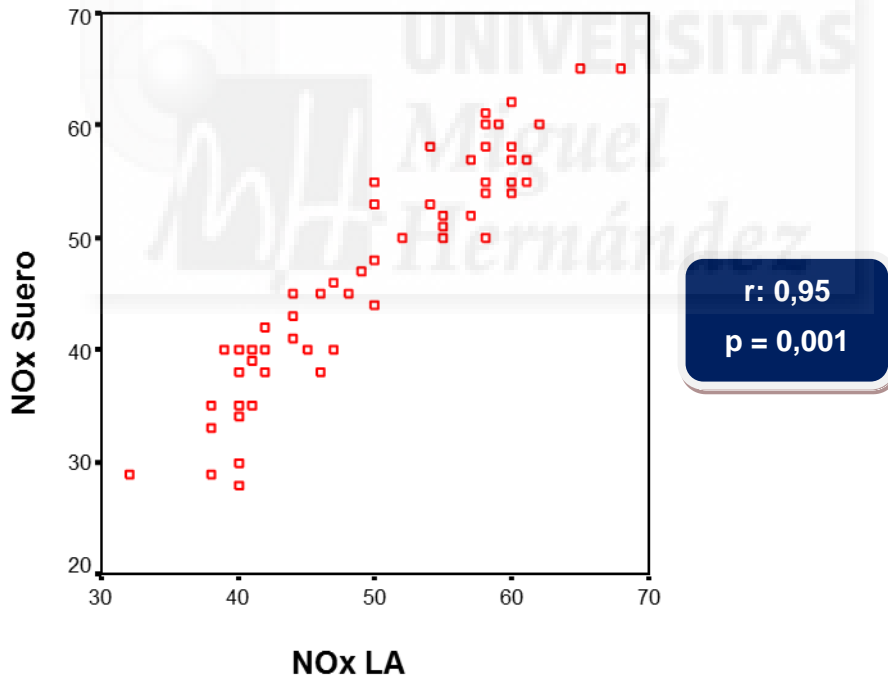


ESTUDIO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO_x) EN SUERO Y LÍQUIDO ASCÍTICO

7.1 NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO

Se cuantificó el NO_x en la muestra basal de cada paciente. Los niveles medios de NO_x en suero fueron $48,6 \pm 9,4$ nmol/l y en LA fueron $50,9 \pm 8,2$ nmol/l. Hubo una relación estadísticamente significativa entre los niveles de NO_x en suero y en LA ($r: 0,95$ y $p=0,001$), como muestra la siguiente figura (**figura 28**).

Figura 28. Relación entre los niveles de NO_x en suero y LA.



Correlación de pearson: $r= 0,95$

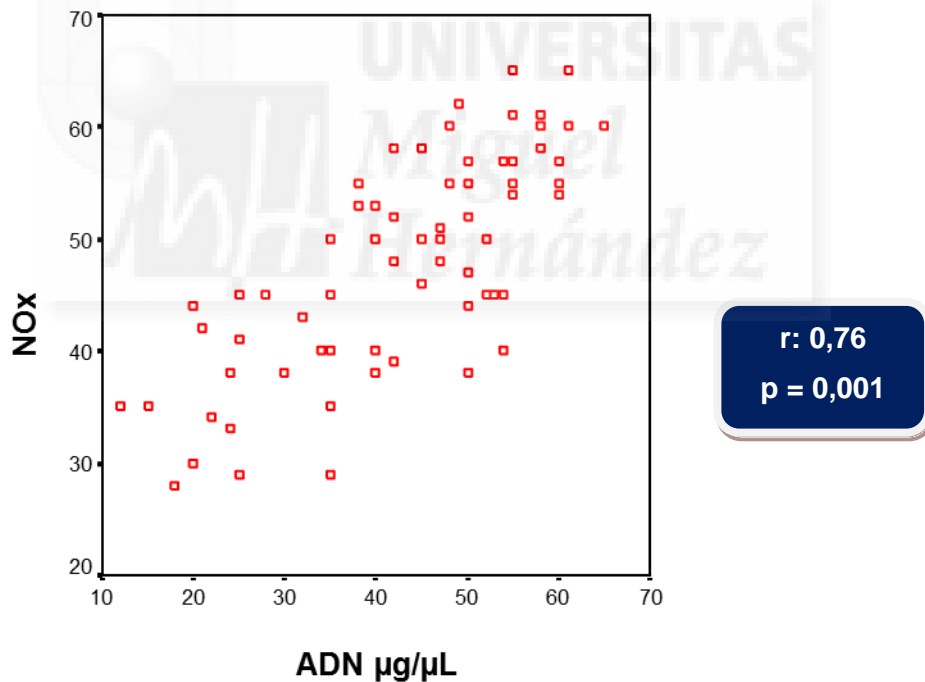
$p=0,001$ estadísticamente significativo

7.2 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO Y ADN BACTERIANO EN SANGRE Y LÍQUIDO ASCÍTICO

7.2.1 Relación entre los niveles de NOx y ADNbact en suero

Tras observar la correlación de NOx tanto en suero como en LA, siendo mayores los niveles obtenidos en el LA, se analizó la posible relación con la presencia de ADNbact. Se observó una relación positiva estadísticamente significativa ($r= 0,76$ con $p=0,001$) entre los niveles en sangre de NOx y ADNbact, como puede apreciarse en la figura siguiente (**figura 29**):

Figura 29. Relación entre los niveles de NOx en suero y ADNbact en suero.



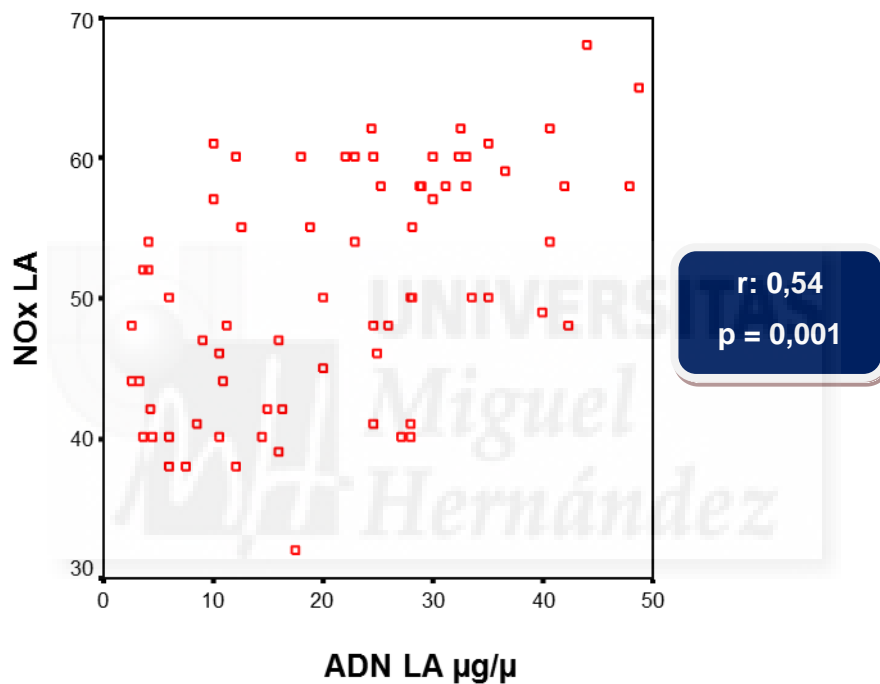
Correlación de pearson: $r= 0,76$

$p=0,001$ estadísticamente significativo

7.2.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y ADNbact en LA

Al igual que lo observado en el suero, se observó una relación estadísticamente significativa ($r= 0,54$ con $p= 0,001$) entre los niveles de NOx en LA y la concentración de ADNbact en el LA, como puede apreciarse en la siguiente figura (*figura 30*).

Figura 30. Relación entre los niveles de NOx y ADNbact en LA.



Correlación de pearson: $r= 0,54$

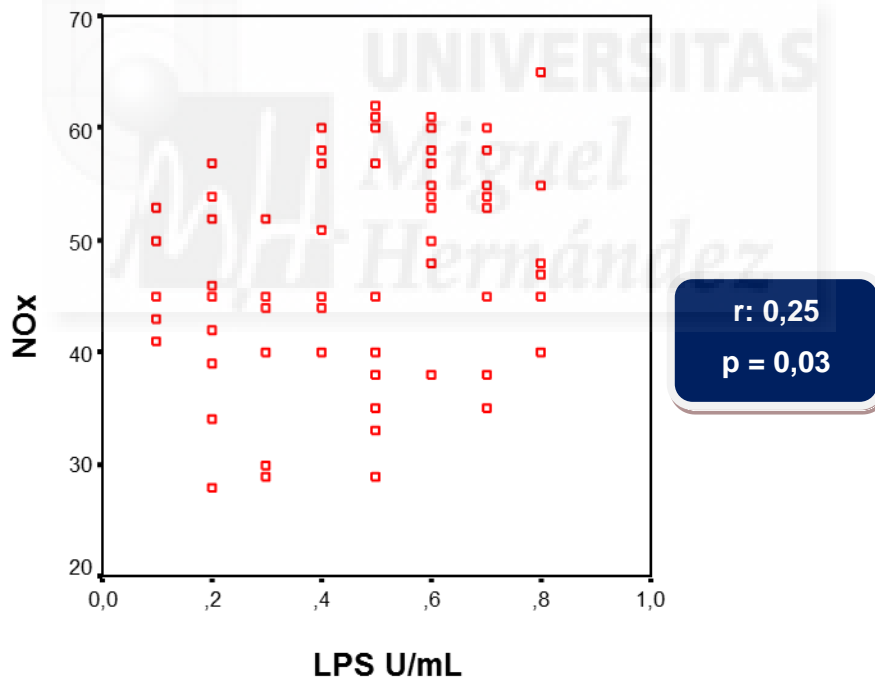
$p=0,001$ estadísticamente significativo

7.3 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO Y LIPOPOLISACÁRIDO

7.3.1 Relación entre los niveles de NOx y LPS en suero

Al igual que lo ocurrido con el ADNbact, se estudio la posible relación con la presencia de LPS, descrito también como marcador en el fenómeno de la TB. Se observó también una correlación significativa entre los niveles séricos de NOx y LPS ($p=0,03$) (**figura 31**). El coeficiente de correlación de Pearson ($r=0,25$) fue similar al observado con los niveles de ADNbact.

Figura 31. Relación entre los niveles de NOx y LPS en suero.

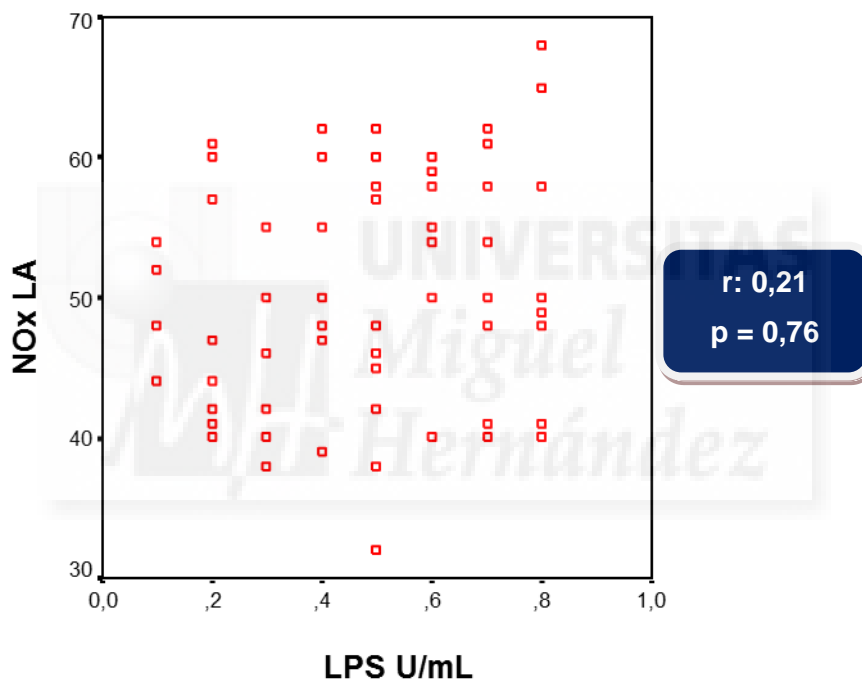


Correlación pearson $r=0,25$
 $p=0,03$ estadísticamente significativo

7.3.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y LPS en suero

Por otra parte, estudiamos si la presencia de LPS se podría relacionar con la liberación de NOx en el LA. Sin embargo, al realizar el análisis de correlación de Pearson, no se observó una relación significativa entre los niveles en LA de NOx y LPS ($p=0,76$), el coeficiente de correlación fue $r=0,21$. La siguiente figura muestra esta correlación (**figura 32**).

Figura 32. Relación entre los niveles de NOx en LA y LPS en suero.



Correlación de Pearson: $r= 0,206$

$p=0,76$ no estadísticamente significativo

7.4 DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y EN LÍQUIDO ASCÍTICO DE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN FUNCIÓN DE LA ESPECIE BACTERIANA IDENTIFICADA

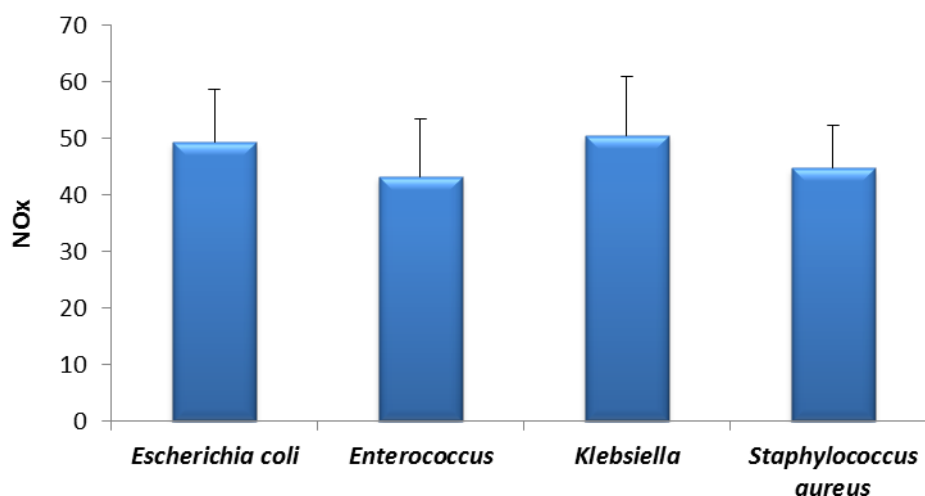
Hasta aquí hemos observado una correlación entre los niveles de NOx, la presencia de ADNbact y de LPS.

El siguiente paso es observar si esta correlación depende de las diferentes bacterias presentes en los fluidos biológicos o si la respuesta es similar entre diferentes tipos de bacterias.

7.4.1 Relación entre los niveles de NOx y la especie bacteriana en suero

En la siguiente figura y tabla (**figura 33, tabla 46**) se representan los valores medios y desviación estándar de NOx sérico para cada una de las especies bacterianas.

Figura 33. Relación entre los niveles de NOx y la especie bacteriana en suero. Representación gráfica de la relación de los niveles de NOx sérica para cada una de las especies bacterianas.



La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Tabla 46. Relación entre los niveles de NOx y especie bacteriana en suero. Valores medios y desviación estándar de NOx sérica para cada una de las especies bacterianas.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	48	49,29	9,35
<i>Enterococcus</i>	5	43,20	10,25
<i>Klebsiella</i>	10	50,50	10,51
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	44,69	7,54
Total	76	48,26	9,38

(*) $p > 0,05$. No estadísticamente significativo

En el análisis ANOVA no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de NOx en suero y la especie bacteriana ($p=0,215$), aunque los valores medios de NOx en las especies de gram-negativos (*E. coli* y *Klebsiella*) fueron superiores, es decir, hubo una tendencia a una respuesta mayor en las especies pertenecientes al grupo de BGN.

Tampoco se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas especies bacterianas.

7.4.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y la especie bacteriana en suero

En el análisis ANOVA no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de NOx en LA y la especie bacteriana aunque es mayor la respuesta con ADN de *E. coli* y *Klebsiella*, es decir en presencia de gramnegativos. En la siguiente figura y tabla (**figura 34, tabla 47**) se representan los valores medios y desviación estándar de NOx en LA para cada una de las especies bacterianas.

Figura 34. Relación entre los niveles de NOx en LA y la especie bacteriana en suero. Representación gráfica de la relación de los niveles de NOx en LA para cada una de las especies bacterianas

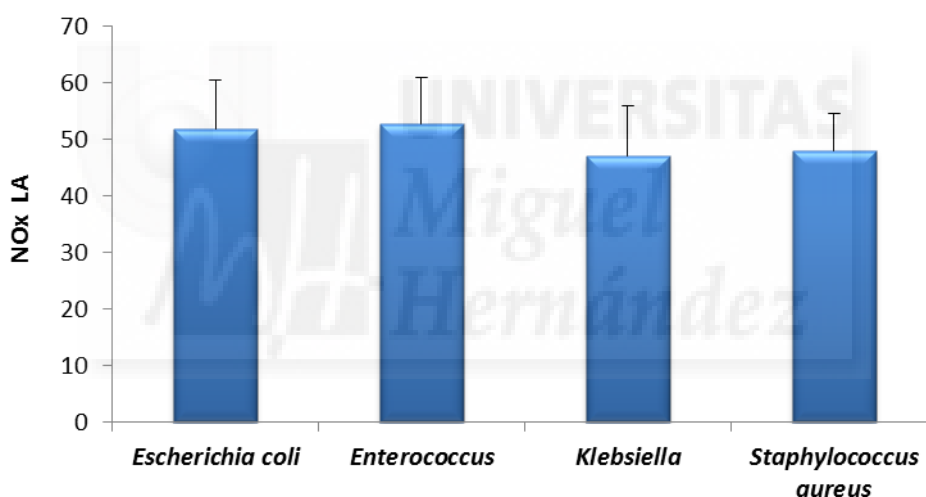


Tabla 47. Relación entre los niveles de NOx en LA y especie bacteriana en suero. Valores medios y desviación estándar de NOx en LA para cada una de las especies bacterianas.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	N	Media	Desviación típica
<i>Escherichia coli</i>	48	51,77	8,62
<i>Enterococcus</i>	5	52,80	8,08
<i>Klebsiella</i>	10	47,00	8,86
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	48,08	6,53
Total	76	50,96	8,29

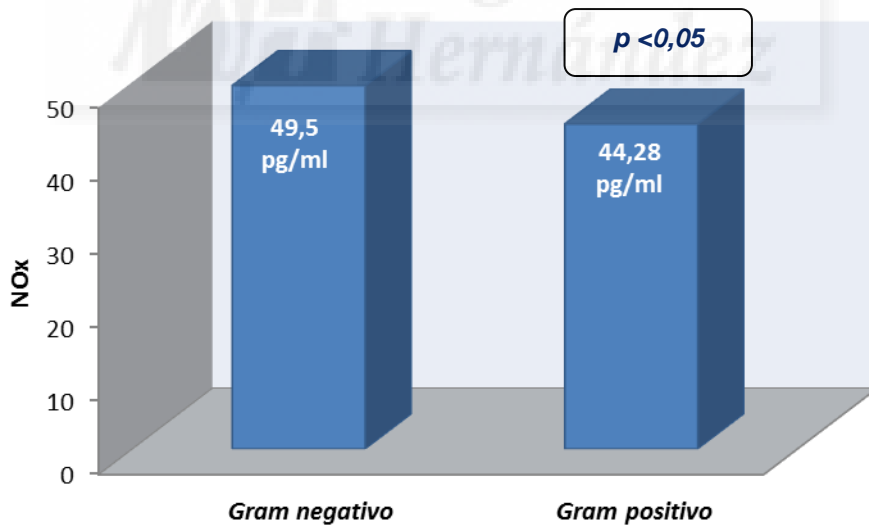
(*) $p > 0,05$. No estadísticamente significativo

7.5 DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS Y EN LÍQUIDO ASCÍTICO DE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE GRAM

7.5.1 Relación entre los niveles de NOx y el tipo de gram en suero

En la figura y tabla siguientes (**figura 35, tabla 48**), se muestra la relación entre las concentraciones de IL-12 en suero y el tipo de bacteria agrupado por el tipo de gram: gram-positiva o gram-negativa. En presencia de BGN se detectó una mayor cantidad de NOx $49,5 \pm 9,5$ nmol/l frente a cantidad en BGP $44,3 \pm 8,1$ nmol/l ($p= 0,04$).

Figura 35 y Tabla 48. Relación entre los niveles de NOx en suero y el tipo de bacteria. **Representación gráfica y numérica** de NOx en suero para Gram positivos y negativos.



GRAM	N	Media	Desviación típica
<i>Negativo</i>	58	49,50*	9,40*
<i>Positivo</i>	18	44,28	8,08
Total	76	48,26	9,38

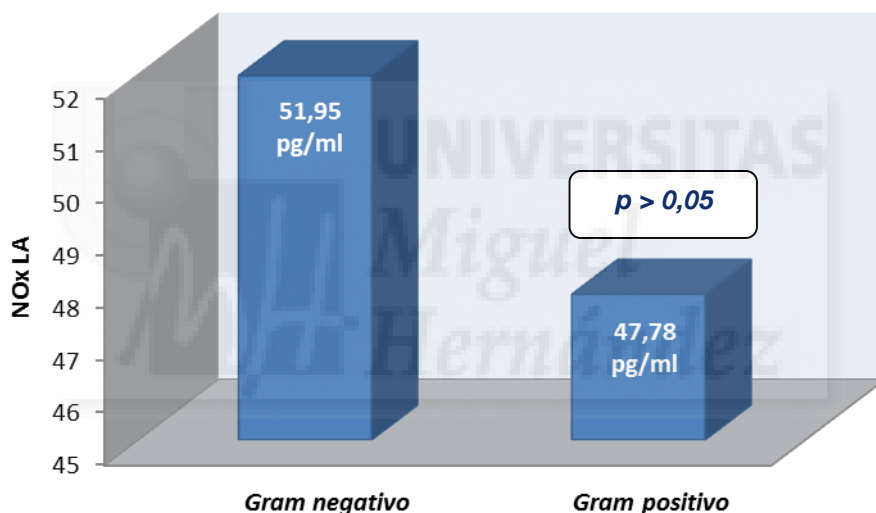
(*) $p < 0,05$ comparado con gramnegativos

7.5.2 Relación entre los niveles de NOx en LA y el tipo de gram

En la figura y tabla siguientes (**figura 36, tabla 49**), se muestra la relación entre las concentraciones de NOx en LA y el tipo de BGP o BGN.

En presencia de bacterias gam-negativas se detectó una mayor cantidad de NOx $51,95 \pm 8,47$ frente a cantidad en gam-positivas $47,78 \pm 6,99$, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0,062$).

Figura 36 y Tabla 49. Relación entre los niveles de NOx en LA y el tipo de bacteria. Representación gráfica y numérica de NOx en LA para Gram positivos y negativos.



GRAM	N	Media	Desviación típica
<i>Negativo</i>	58	51,95*	8,47*
<i>Positivo</i>	18	47,78	6,99
Total	76	50,96	8,29

(*) $p > 0,05$ comparado con gramnegativos

7.6 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO Y OTRAS VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS

Se analizó también si los niveles de NOx podrían variar entre las características clínicas y analíticas de los pacientes. Las siguientes tablas muestran las correlaciones entre el NOx y estos parámetros.

No se observó relación estadísticamente significativa alguna entre los niveles de NOx con la edad, Child-Pugh y los parámetros que midieron la estabilidad hemodinámica (*tabla 50*).

Tabla 50. Correlación entre el NOx y los parámetros clínicos de los pacientes.

VARIABLES	r	p=
Edad	-0,05	0,67
Puntuación CHILD-PUGH	0,52	0,65
TA media	-0,22	0,11
FC (rango)	-0,14	0,53
Temperatura	0,19	0,89

TA: Tensión arterial. FC: Frecuencia cardíaca

$p < 0,05$. No correlación estadísticamente significativa

Por otra parte, se estudió si existía una correlación entre los parámetros analíticos en suero y NOx en suero. Se observó una relación significativa (*tabla 51*) entre los niveles de NOx con la cantidad de Leucocitos en suero ($p = 0,04$) y las cifras de K sérico ($p = 0,02$). Esta correlación fue negativa para Leucocitos y positiva para las cifras de K, sin embargo en ninguno de los casos el coeficiente de correlación fue superior a 0,5. No se observó relación entre el NOx y el resto de parámetros analíticos.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

La siguiente tabla (**tabla 51**) muestra esta correlación entre el NOx en suero y los parámetros analíticos en sangre:

Tabla 51. Correlación entre el NOx y los parámetros analíticos en sangre.

VARIABLES	r	p=
Na en Suero (mEq/l)	-0,01	0,95
K en Suero (mEq/l)	0,35	0,02
Urea	0,07	0,55
Creatinina (mg/dl)	0,07	0,58
Albúmina (g/dl)	-0,01	0,98
Gamma Globulina (g/dl)	0,11	0,45
Bilirrubina (mg/dl)	-0,03	0,88
ALT	-0,13	0,49
AST	0,01	0,98
Leucocitos en sangre (mm ³)	-0,24	0,04
PMN (mm ³)	-0,11	0,47
Plaquetas (mm ³)	-0,103	0,54
Indice QUICK (%)	0,05	0,69

Na: Sodio. K: Potasio.

AST: Aspartato-aminotransferasa. ALT: Alanina-aminotransferasa.

PMN: leucocitos polimorfonucleares.

En el análisis del NOx respecto a los parámetros analíticos en LA, se observó una correlación negativa significativa entre los niveles de NOx y la cantidad de PMN en LA ($p= 0,03$). El coeficiente de correlación fue menor de 0,5 (**tabla 52**).

Tabla 52. Correlación entre el NOx y los parámetros analíticos en LA.

VARIABLES	r	p=
Albúmina en LA (g/dL)	-0,23	0,86
Leucocitos en LA (mm ³)	-0,13	0,26
PMN en LA (mm ³)	-0,27	0,03
Proteínas en LA (g/dL)	0,06	0,63

LA: Líquido ascítico. PMN: leucocitos polimorfonucleares

No existían correlaciones estadísticamente significativas entre el NOx en LA y los parámetros analíticos en LA. Esto se muestra en la siguiente tabla (**tabla 53**):

Tabla 53. Correlación entre el NOx en LA y los parámetros analíticos en LA.

VARIABLES	r	p=
Albúmina en LA (g/dl)	-0,07	0,55
Leucocitos en LA (mm ³)	-0,14	0,22
PMN en LA (mm ³)	-0,21	0,09
Proteínas en LA (g/dl)	0,05	0,65

LA: Líquido ascítico. PMN: leucocitos polimorfonucleares
 $p < 0,05$. No correlación estadísticamente significativa

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

No hubo relación entre los niveles de NOx y el sexo, la etiología de la cirrosis, la puntuación Child-Pugh ni el haber tenido complicaciones previas de la cirrosis (**tabla 54**).

Tabla 54. Correlación entre el NOx y las variables clínicas cualitativas de los pacientes.

VARIABLES	X ± DS	p=
SEXO (M/F)	46,4 ± 9,5	0,12
	49,8 ± 9,1	
ETIOLOGÍA de la CIRROSIS		
- Alcohol	46,5 ± 9,6	0,48
- VHC	48,6 ± 9,4	
- Alcohol + VHC	51,1 ± 8,8	
- Otros	48,1 ± 9,9	
Puntuación CHILD-PUGH		
- B	48,8 ± 8,4	0,58
- C	47,6 ± 10,5	
Ascitis previa (s/n)	49,3 ± 9,1	0,44
	47,6 ± 9,6	
Encefalopatía previa (s/n)	45,8 ± 9,7	0,40
	48,6 ± 9,4	
Sangrado (HDA) previo (s/n)	49,3 ± 10,8	0,72
	48,1 ± 9,2	

HC: Virus hepatitis C. HDA: hemorragia digestiva alta

7.7 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO Y ANÁLISIS ANCOVA

7.7.1. Variabilidad en las concentraciones de NOx en suero

Se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre el NOx en suero y los siguientes parámetros: NOx LA, ADNbact en suero y LA, LPS, gram, K sérico, leucocitos sérico y PMN en LA.

Tras realizar el análisis de ANCOVA, este muestra que existe una relación entre el NOx en suero y en LA ($p=0,001$) y los niveles de ADN en suero ($p=0,011$) (**tabla 55**).

Tabla 55. Análisis ANCOVA entre el NO en suero y el resto de parámetros estadísticamente significativos.

Parámetro	B	Error típ.	t	Significación	Intervalo de confianza al 95%		Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
					Límite inferior	Límite superior		
Intersección	-10,881	6,075	-1,791	,086	-23,448	1,686	1,791	,404
NOx LA	,910	,079	11,489	,000	,747	1,074	11,489	1,000
ADN	,334	,121	2,768	,011	,084	,584	2,768	,755
ADN LA	-,423	,232	-1,821	,082	-,904	,058	1,821	,415
LPS U/mL	15,501	11,681	1,327	,198	-8,663	39,666	1,327	,246
Potasio	-,446	1,090	-,409	,686	-2,702	1,810	,409	,068
Leucos suero	6,995E-05	,000	,406	,688	,000	,000	,406	,068
PMN LA	,005	,010	,498	,623	-,016	,026	,498	,077
Gram negativo	1,657	2,225	,745	,464	-2,946	6,261	,745	,110
Gram positivo	0 (b)

(a) Calculado con $\alpha = ,05$

(b) Al parámetro se le ha asignado el valor cero porque es redundante.

La reacción inflamatoria en pacientes cirróticos y traslocación bacteriana es variable por causas dependientes del huésped y del antígeno bacteriano

Si eliminamos el NOx en LA en el análisis ANCOVA, no existen otras relaciones estadísticamente significativas con el resto de parámetros estudiados (*tabla 56*).

Tabla 56. Análisis ANCOVA entre el NO en suero tras eliminar su relación con el NOx en LA.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
Modelo corregido	1201,459 (b)	6	200,243	4,809	,002	28,853	,965
Intersección	150,317	1	150,317	3,610	,069	3,610	,447
ADN	49,539	1	49,539	1,190	,286	1,190	,183
ADN LA	14,161	1	14,161	,340	,565	,340	,087
LPS U/mL	9,692	1	9,692	,233	,634	,233	,075
Potasio suero	22,752	1	22,752	,546	,467	,546	,110
Leucos suero	,104	1	,104	,002	,961	,002	,050
PMN LA	6,450	1	6,450	,155	,697	,155	,067
Error	1041,010	25	41,640				
Total	75109,000	32					
Total corregida	2242,469	31					

(a) Calculado con $\alpha = ,05$

(b) $R^2 = ,536$ (R^2 corregida = $,424$)

7.7.2. Variabilidad en las concentraciones de NOx en LA

Se ha objetivado una relación estadísticamente significativa entre NOx en LA y los siguientes parámetros: NOx sérico y la secuencia bacteriana. Tras realizar el análisis de ANCOVA, este muestra que existe una relación significativa entre las concentraciones de NOx sérico y la presencia de ADNbact tanto en suero como en LA ($p=0,001$) (*tabla 57*).

Tabla 57. Análisis ANCOVA entre el NO en suero tras eliminar su relación con el NOx en LA.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Parámetro de no centralidad	Potencia observada (a)
Modelo corregido	2859,750 (b)	2	1429,875	44,722	,000	89,443	1,000
Intersección	5642,946	1	5642,946	176,492	,000	176,492	1,000
ADN	1329,268	1	1329,268	41,575	,000	41,575	1,000
ADN LA	2,805	1	2,805	,088	,768	,088	,060
Error	2302,037	72	31,973				
Total	199829,000	75					
Total corregida	5161,787	74					

(a) Calculado con $\alpha = ,05$

(b) $R^2 = ,554$ (R^2 corregida = ,542)

UNIVERSITAS



DISCUSIÓN
Discussion

El desarrollo de infecciones bacterianas en los pacientes con cirrosis y ascitis es una complicación frecuente y grave [1], siendo la peritonitis bacteriana espontánea (PBE) la complicación infecciosa más característica y más estudiada [2, 12, 13].

Diversos estudios han demostrado que la PBE, producida como consecuencia de accesos repetidos de bacterias al LA desde el lumen intestinal a través de una ruta hematógica en un fenómeno conocido como traslocación bacteriana (TB) [20], tiene un mal pronóstico a largo plazo. La TB se define en la actualidad como la presencia de un cultivo positivo de ganglios linfáticos mesentéricos (GLMNs), por lo que parece obvia la dificultad de estudiar este fenómeno en pacientes, y también por ello la mayoría de la información disponible procede de modelos experimentales.

Se ha hecho necesario identificar marcadores biológicos indirectos de TB que permitieran detectar la TB de una forma no cruenta en pacientes y poder estimar de este modo el riesgo de desarrollo de PBE en un paciente concreto. Con este objetivo, nuestro grupo desarrolló en su día un método propio de detección de fragmentos genómicos bacterianos en sangre mediante PCR, y con su aplicación pudimos demostrar que el 35-40% de los pacientes con cirrosis y ascitis mostraban evidencias moleculares de TB. La presencia de estos fragmentos de ADN_{bact} en este subgrupo de pacientes se ha interpretado como una prueba de la existencia de fenómenos de TB a nivel molecular, entendiendo como TB molecular a la TB que se manifiesta por la presencia de una molécula bacteriana en líquidos biológicos pero no es posible identificar la bacteria por métodos convencionales como el cultivo [4, 44].

En estudios previos de nuestro grupo hemos podido demostrar que la presencia de ADN_{bact} puede corresponder a una bacteria viva o a fragmentos de la misma. En el primer supuesto acuñamos el término **traslocación viable**, puesto que estas bacterias son teóricamente capaces de provocar infecciones espontáneas.

En el segundo supuesto hablamos de **traslocación no viable**, puesto que a pesar de nos ser capaz de desarrollar una infección, sí que induce una importante respuesta inflamatoria que tiene a su vez consecuencias hemodinámicas y pronósticas.

En la patogénesis de la TB, el efecto protector de la mucosa intestinal juega un papel fundamental ya que la mayoría de las bacterias que causan la PBE tienen su origen en el lumen intestinal y su eliminación mediante antibioterapia que produzca una descontaminación intestinal selectiva disminuye significativamente la incidencia de estas infecciones bacterianas [10, 25].

Diversos estudios experimentales han demostrado un papel inmunomodulador del ADNbact [128, 129], que se comportaría como un potente activador de las células del sistema inmune innato, células NK, macrófagos y células dendríticas, a través de su unión al receptor Toll-like 9 (TLR9) mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) consistentes en series repetidas de motivos CpG no metilados [108]. Esta activación de la respuesta inmune de tipo I en los macrófagos peritoneales se asocia a una mayor síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , INF- γ , IL-12 e IL-6) *in vitro* [130, 131] y a la liberación de moléculas efectoras como NOx [4, 123], los cuales podrían constituir marcadores indirectos de la presencia de bacterias o de sus productos en el suero o en el LA. En estos estudios se observó que la activación de las células inmunes secundarias a la unión del ADNbact con el TLR9, y la ulterior liberación de NOx desencadena una intensa respuesta inflamatoria, tanto a nivel celular [4, 102] como sistémico [115]. El aumento del TNF- α sérico e INF- γ , que son algunos de los factores relacionados con la activación de la respuesta inmune innata, se asocian con alteraciones en la regulación de la permeabilidad intestinal y un incremento de la TB [51, 119]. Como consecuencia de todo ello, el daño hepático y los fenómenos de fibrogénesis se ven agravados [120] y se produce un compromiso mayor de las funciones hepáticas, todo lo cual hace que esta respuesta inflamatoria incrementada pueda comprometer el pronóstico de los pacientes cirróticos.

Además del ADNbact, otras moléculas como el LPS, principal constituyente de la pared de las BGN, se ha mostrado como un marcador biológico de TB y como uno de los activadores más potentes de la cascada de citoquinas y de la síntesis de NOx.

El reconocimiento del LPS por las células del sistema inmune es un proceso complejo en el que intervienen moléculas que fijan a los LPS (LBP y CD14) y posteriormente por la fijación de los LPS al TLR4. En el caso de bacterias gram positivas son los componentes de la pared celular, incluyendo los peptidoglicanos y los ácidos lipoteicoicos, los activadores dominantes de la inmunidad innata y esta activación la llevan a cabo fundamentalmente actuando sobre el receptor TLR2, asociado con frecuencia al TLR1 o al TLR6.

Nuestro grupo ha demostrado que en pacientes con cirrosis y presencia de ADNbact se produce una respuesta inmunológica e inflamatoria que se traduce en una elevación en suero y en LA, de citoquinas y NOx en una magnitud similar a la observada en los pacientes con PBE [116], sugiriendo que la traslocación del ADNbact activa una respuesta inmune innata. Esto es relevante ya que el grado de la respuesta inflamatoria tiene implicaciones pronósticas en estos pacientes [104, 133].

Sin embargo, aunque el ADNbact posee una potente actividad proinflamatoria *in vitro* [103] y en animales de experimentación [129, 134], la existencia de otros productos de origen bacteriano como la endotoxina (LPS), peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos, [48], presentes también en concentraciones elevadas tanto en el suero como en el LA de los pacientes con cirrosis descompensada, también podrían participar en la reacción inflamatoria observada en estos pacientes.

Sin embargo, no hay datos al respecto, probablemente por la dificultad de detección y cuantificación de estos componentes bacterianos.

El objetivo del presente estudio ha consistido en evaluar los factores, tanto del huésped como del antígeno, que pueden influir en la intensidad y variabilidad de la respuesta inmune inflamatoria que ocurre en pacientes con cirrosis y ascitis con presencia de TB (ADNbact). Para ello, hemos analizado las concentraciones de TNF- α , INF- γ , IL-12, y NOx en suero y en LA, su relación con las características basales clínicas y analíticas de los pacientes con cirrosis y ascitis estéril en el momento de su ingreso en el hospital, así como su relación con la cantidad de ADNbact y LPS presente y la especie bacteriana origen de estas moléculas.

En primer lugar, este estudio muestra que la traslocación del ADNbact es un fenómeno frecuente en pacientes con cirrosis y ascitis, tal y como se ha observado en otros estudios previos de nuestro grupo, con una prevalencia del 34% [115, 135].

Todos nuestros pacientes presentaban los fragmentos de ADNbact simultáneamente en sangre y en LA y en todos los casos la equivalencia entre la secuencia de nucleótidos de ADNbact detectado en suero con la detectada en LA fue superior al 99.9%, sugiriendo que son dos manifestaciones distintas del mismo fenómeno.

Igualmente, observamos que la traslocación del ADNbact en nuestros pacientes con cirrosis y ascitis no infectados, se asociaba con una intensa reacción inflamatoria consistente en un aumento significativo de todas las citoquinas estudiadas (TNF- α , INF- γ , IL-12) y los metabolitos de NOx tanto de sus niveles séricos circulantes como de su concentración en el LA. Del mismo modo, estas moléculas se vieron alteradas en algunos casos por otros fenómenos que se describen a continuación de forma más específica para cada citoquina y Nox.

La respuesta del Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α)

El **TNF- α** es una citoquina derivada de los macrófagos que se libera en grandes cantidades en respuesta a la endotoxina [136], por lo que es una de las citoquinas más relevantes relacionadas con el fenómeno de la TB y ha sido ampliamente relacionada con la susceptibilidad a la infección bacteriana y los trastornos hemodinámicos en los pacientes con cirrosis [100, 118]. Trabajos experimentales muestran que la inyección de endotoxina a animales de experimentación induce significativamente la TB y el aumento de las concentraciones séricas de TNF- α [49] y que el bloqueo de TNF- α en un modelo de cirrosis en ratas sometidas a shock hemorrágico disminuye significativamente los episodios de TB [51, 160]. Otro estudio realizado en animales de experimentación demostró que si se administra sulfato de polimixina B durante siete días se logra reducir significativamente las concentraciones séricas de endotoxina y TNF- α [138]. En pacientes cirróticos los niveles de TNF- α obtenidos al diagnóstico de la PBE se relacionan directamente con el desarrollo de complicaciones y muerte [118, 123, 132].

En este estudio hemos observado altos niveles séricos y en el LA de TNF- α en valores similares a los descritos previamente en pacientes con cirrosis y PBE [123, 137]. Una observación especialmente interesante de este estudio ha sido el hallazgo de que la elevación de las cifras de TNF- α es directamente proporcional a la concentración de ADNbact, sugiriendo una respuesta inmune cuya intensidad dependería de la carga de ADNbact presente en un episodio de TB.

Hay una mejor correlación entre los niveles séricos de TNF- α y de ADNbact que la que tiene lugar en el LA lo que podría explicarse por las diferencias funcionales entre macrófagos y células productoras de TNF- α del suero y del LA. En el LA predominan los macrófagos de clase M2 que controlan la reacción inflamatoria, frente a los activadores de clase M1 séricas que estimulan la liberación de grandes cantidades de citoquinas [139, 140].

Del mismo modo, nuestro estudio muestra la existencia de una relación significativa entre las concentraciones de TNF- α en suero y los niveles de LPS. Este hecho, considerando que el LPS es un marcador indirecto del proceso de la TB [97, 100, 121] y que los niveles plasmáticos elevados de LPS asocian un riesgo aumentado de padecer un episodio de PBE [135], nos sugiere la existencia en estos pacientes de un estado de activación inmune en respuesta a la presencia de la endotoxina (LPS) similar a la desencadenada por el ADNbact. Cuando analizamos en un análisis multivariado la respuesta del TNF- α en función de los dos factores, las concentraciones de ADNbact y LPS, observamos que las variaciones en las concentraciones del TNF- α están fundamentalmente influenciadas por las concentraciones de ADNbact y en menor medida por las concentraciones de LPS. Podría explicarse esta observación por la presencia de un grupo de bacterias gram positivas con mínimas concentraciones de LPS que sesgara los resultados del análisis.

Un estudio previo realizado por *González-Navajas et al* [101], demostró que entre los pacientes en los que el ADNbact detectado procedía de bacterias Gram-positivas se producía un marcado aumento de las concentraciones séricas de TNF- α e IL-6 sin que se apreciaran, como es de esperar, variaciones en las concentraciones, mínimas, de LPS. Sin embargo, el análisis diferencial entre BGN y CGP de la relación entre las concentraciones de ADNbact y LPS y los niveles de TNF- α muestra una relación más estrecha y ajustada con el ADNbact. En este sentido, nuestro estudio muestra una importante liberación de TNF- α en respuesta a especies pertenecientes al grupo de gram-negativos (*E. coli* y *Klebsiella*) frente al grupo de gram-positivos.

La presencia o ausencia de bacterias en el LA es un proceso muy dinámico. Esta colonización bacteriana se puede resolver de forma espontánea y silente o progresar hacia la aparición de infección clínicamente evidente. Los pacientes con riesgo de infección del LA podrían haber sufrido múltiples episodios de colonización con su correspondiente resolución antes de padecer una infección clínicamente aparente.

Dado que la mayoría de las infecciones del LA comunitarias son causadas por bacterias gram-negativas, se ha considerado la hipótesis de que se produzcan frecuentes episodios autolimitados de traslocación de BGN al LA en un subgrupo de pacientes cirróticos que posteriormente pueden desarrollar una infección del LA. Estos fenómenos reiterados de TB se asociarían a un estado de activación subclínica de la cascada de citocinas y efectores hemodinámicos como el NOx [141].

Como se ha indicado previamente, en nuestro estudio se observó una importante actividad del TNF- α en respuesta a la presencia de ADNbact del grupo de CGP, similar con cada una de las bacterias de este grupo bacteriano analizadas. Esto concuerda con los hallazgos obtenidos por *Riordan et al* [143] en pacientes cirróticos en los que se demostró la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de los receptores tipo Toll 2 (TLR-2) por las células mononucleares del suero en respuesta a estímulos por gérmenes gram-positivos y los niveles de TNF- α .

Estudios previos han descrito que pacientes que ingresan en el hospital con una ascitis estéril y que, posteriormente, desarrollan un episodio de PBE mostraban en el momento de su ingreso unos niveles séricos de TNF- α significativamente mayores que los mostrados por los pacientes que mantuvieron la ascitis estéril durante todo el período de admisión en el hospital [132]. Por tanto, la observación de la elevación del TNF- α en presencia de los productos bacterianos en sangre y LA podría ser un marcador que sirva para identificar un subgrupo de pacientes con un riesgo aumentado de desarrollar un episodio de PBE, y apoya la hipótesis de la existencia de diversos episodios de TB ya sea por bacterias viables o no viables, que activan de forma asintomática la respuesta inflamatoria.

Por otra parte, la posibilidad de que esta respuesta inflamatoria pudiera estar relacionada con otros parámetros como las características clínicas de cada paciente, no se observó en este estudio.

En estudios previos realizados por *Such et al* se ha descrito que la puntuación de Child-Pugh es un factor predictivo importante de la mayor predisposición de los pacientes con enfermedad hepática avanzada para el desarrollo de la infección del LA, puesto que los pacientes con cirrosis clase C de Child-Pugh con un mayor deterioro de la función hepática presentan mayores niveles séricos de TNF- α y mayor riesgo de complicaciones, entre ellas infecciones, que aquellos con Child-Pugh de clase B [132]. Sin embargo, en el presente estudio no se aprecia que la respuesta inmune, medida mediante el TNF- α , a la presencia de ADNbact y LPS sin que se manifieste un cuadro clínico de infección esté condicionada por la función hepática del paciente.

Sin embargo, un estudio publicado por *Cirera et al* [121]. demostró que el grado de función hepatocelular estaba significativamente relacionado con la incidencia de TB. Probablemente son necesarios más estudios para clarificar estos aspectos.

Si un mayor deterioro de la función hepática condiciona una mayor riesgo de desarrollar una infección clínicamente manifiesta del LA en el curso o inmediatamente después de padecer un episodio asintomático de traslocación molecular es algo que no puede responderse con los datos de este estudio. Trabajos previos de nuestro grupo sugieren que en los pacientes que han padecido algún episodio de traslocación molecular y fueron seguidos durante 1 año no se produce un incremento notable de la incidencia de episodios de PBE aunque sí se incrementa la mortalidad de forma significativa por causas distintas de las infecciones, fundamentalmente insuficiencia hepática [161].

En un estudio realizado por *Bellot et al* [151] se ha descrito que la presencia de ADNbact en pacientes con ascitis e hipertensión portal agrava la disfunción circulatoria sistémica, exacerbando aún más la vasodilatación periférica, que está relacionada con el aumento de los niveles de TNF- α . En nuestro estudio no encontramos que existieran relaciones significativas entre la cantidad de TNF- α liberada y los diferentes parámetros hemodinámicos estudiados (TAS, TAD, TAM, FC).

En el estudio de *Bellot y cols.* el análisis de los cambios hemodinámicos se realizó mediante la determinación de gradientes de presión portal-sistémicos y el estudio de los cambios del flujo sanguíneo portal que serían marcadores mucho más específicos y sensibles de las variaciones hemodinámicas que parámetros como la TAM.

Diferentes trabajos han descrito que los pacientes cirróticos con concentraciones bajas de proteínas en el LA están predispuestos al desarrollo de la PBE [3], siendo probable que este hecho refleje, al menos en parte, una capacidad bactericida del LA disminuida [4, 27, 28]. En nuestro trabajo no se apreció la existencia de una relación significativa entre las concentraciones de proteínas y/o albúmina y la respuesta humoral a la presencia de ADN_{bact} y LPS lo que nos muestra que los fenómenos de TB molecular ocurren independientemente de la concentración de proteínas en LA y suero a diferencia de lo que ocurre con el desarrollo de infecciones clínicamente manifiestas del LA apoyando la diferencia e independencia entre estos dos fenómenos.

En nuestro estudio hemos observado la existencia de una correlación significativa inversa entre los niveles de TNF- α y la cantidad de leucocitos en suero y de PMN en LA. En estudios previos se ha observado una elevación de los niveles séricos de TNF- α y una mayor proporción de leucocitos PMN en el LA estéril de pacientes que posteriormente desarrollaron la infección [132]. En un estudio previo por *Such et al* se observó que el número total de leucocitos en el LA fue similar tanto en el grupo de pacientes cirróticos que desarrollaron infección del LA como los que no se infectaron. No obstante, los pacientes que desarrollaron PBE tuvieron una mayor proporción de leucocitos PMN en la muestra basal de LA comparada con la cifra de los pacientes que no se infectaron [32]. En conjunto, estos datos sugieren que la elevación de concentraciones de TNF- α consecuencia de la activación de los macrófagos tisulares y circulantes es previa a la leucocitosis que acompaña a la infección clínicamente manifiesta.

A su vez, el TNF- α actuaría facilitando la difusión de los leucocitos circulantes a los tejidos en los que tiene lugar una reacción inflamatoria. Por todo ello es plausible un escenario en el que la presencia del material bacteriano (ADNbact, LPS) incremente la actividad de los macrófagos y la producción de TNF- α que facilitaría la activación y difusión de los leucocitos circulantes hacia los tejidos mientras que al no tratarse de una infección franca o ser autolimitada (por ejemplo si es controlada por la capacidad bactericida del LA) no tendría lugar un aumento significativo de la cifra total de leucocitos siendo el resultado neto de todo el proceso una disminución de las cifras de leucocitos circulantes y/o en el LA.

En resumen, en los pacientes cirróticos con ascitis no infectada en los que se detecta en suero y LA la presencia de fragmentos de ADNbact la respuesta inmune medida por la producción de TNF- α depende directamente tanto cualitativa como cuantitativamente de la cantidad presente de ADNbact. Y a su vez, y como se pone de manifiesto en el análisis multivariante (ANCOVA), esta respuesta manifestada por la elevación de los niveles de TNF- α puede explicarse preferentemente por la presencia del ADNbact y del LPS presentes tanto en suero como en LA. Finalmente, cabe destacar que los niveles de TNF- α alcanzados en respuesta a la presencia de ADNbact en suero son mayores que los observados en el LA, lo que puede ser una consecuencia de las diferencias en la capacidad de activación inmune sistémica frente a las respuestas locales o bien ser la expresión de una importante activación inmune a nivel sistémico que tendría lugar en las primeras fases de la TB antes que los productos bacterianos alcanzaran el LA.

La respuesta del Interferon gamma (INF- γ)

El **INF- γ** es una citoquina que participa en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria y se ha demostrado en los pacientes con cirrosis y ascitis que el aumento en los niveles de INF- γ facilita los fenómenos de TB a través de un incremento de permeabilidad intestinal [119] causando un agravamiento del daño hepático y un aumento de la fibrogénesis [120]. Esto concuerda con los hallazgos observados en nuestro estudio en el que se han medido altas concentraciones de INF- γ en respuesta a la presencia de ADNbact si se compara con las cifras de esta citoquina medidas en trabajos previos en pacientes similares sin presencia de ADNbact en sangre ni en LA [4]. Este incremento se produce de forma paralela tanto en suero como en LA.

Existe una relación directa significativa y proporcional entre los niveles de INF- γ en el suero y el LA, pudiendo ser un reflejo de la activación de la respuesta inmune en respuesta al fenómeno de la TB a su paso por la circulación sistémica hasta llegar al LA. En el análisis ANCOVA se observó una buena relación entre la liberación del INF- γ en estos dos medios.

Por otra parte, en nuestro estudio no encontramos una relación significativa entre los niveles de INF- γ y la concentración de ADNbact ni en el suero, ni en el LA. Es importante recordar que los efectos antibacterianos de INF- γ son débiles, ya que su acción básica es evitar la replicación vírica en células sanas y favorecer la destrucción de las células ya infectadas mediante la activación de los linfocitos NK. Por otra parte, debe tenerse en cuenta el hecho de que la liberación del INF- γ es secundaria a la activación previa de otros moduladores que forman parte de la respuesta inflamatoria de primera línea. La liberación del INF- γ se produce por las células T activadas y en la mayoría de casos esta producción de INF- γ es inducida por otras citoquinas, como por ejemplo, IL-1, IL-2 y TNF- α , por lo que su activación depende probablemente de la activación inicial de estos componentes.

Por otro lado, la producción de INF- γ está controlada también por citoquinas secretadas por las células presentadoras de antígenos (APCs), especialmente la IL-12 y la IL-18 y se ha descrito que los motivos CpG del ADN_{bact} que se unen a los TLR9 estimulan las células NK hacia la síntesis de INF- γ [112]. En este sentido, *Francés et al* [4] demostraron la existencia de una correlación significativa entre las cifras de células NK y las concentraciones de INF- γ .

En un estudio realizado por *Muñoz et al* [144] se analizó el estado de las subpoblaciones celulares inmunes en los ganglios mesentéricos, periféricos y en el suero de ratas cirróticas para definir la respuesta inmune en el sitio de iniciación. Observaron que la descontaminación intestinal redujo el número de células Th y monocitos activados, y como consecuencia se produjo la normalización de la producción de INF- γ por las células Th y de la producción del TNF- α por los monocitos de los ganglios mesentéricos y el suero. Esto sugiere que en pacientes cirróticos en los que se dan fenómenos de TB, la respuesta inmunitaria desencadenada por las bacterias entéricas que traslocan se iniciaría en los ganglios mesentéricos, con la participación de la polarización de los linfocitos Th1 y la activación de los monocitos hacia la producción de TNF- α . Más tarde, la recirculación de estas células efectoras inmunes activadas en la sangre favorecería la inflamación sistémica [103].

De forma similar a lo observado con el ADN_{bact}, tampoco se observó en nuestro estudio una relación significativa entre los niveles de INF- γ y las concentraciones de LPS. También en este caso la explicación puede radicar en la necesidad de un paso previo en la activación de la respuesta inmune ante el fenómeno de TB. En trabajos previos se ha observado que otras citoquinas del LA, como el TNF- α y IL-6 aumentan la síntesis, liberación y aumento en la producción del INF- γ en respuesta a la presencia de LPS de los patógenos bacterianos [112, 123, 145].

No hubo diferencias en la liberación del INF- γ según el microorganismo o la especie bacteriana aislada lo que no es de extrañar en una molécula cuya producción es dependiente de todo un proceso previo de activación convirtiéndose, quizás en un lugar común e inespecífico de la respuesta reservándose la especificidad de la respuesta a las fases iniciales de la activación.

Por otra parte se observó una correlación significativa entre las concentraciones de INF- γ y los valores de TAM ($r=0,31$ $p=0,02$). Dado que, en pacientes con cirrosis y ascitis que padecen el fenómeno de la TB, se ha observado cambios hemodinámicos, fundamentalmente un aumento de la vasodilatación arterial y especialmente esplácnica [146, 147], parece lógico pensar que durante este fenómeno de TB los cambios hemodinámicos sean un reflejo del estado inflamatorio y de la acción de las sustancias proinflamatorias y en este sentido las concentraciones elevadas de INF- γ podrían actuar como un marcador biológico de un estado inflamatorio marcado.

En nuestro estudio se observa, a semejanza de lo que ocurre con el TNF- α , una correlación negativa significativa entre los niveles de INF- γ y el número de leucocitos ($p= 0,003$) y PMN ($p=0,03$) en el suero, recordando de nuevo la acción del ADNbact sobre los macrófagos, activándolos con el consiguiente incremento de la síntesis de TNF- α , IL-6 e IL-12 [130, 131]. Estas dos últimas citoquinas activan a su vez a las células B y T [109, 148] y modulan la producción de INF- γ a través de la activación de las células NK [110-112]. En toda esta red, la función del INF- γ se centra en organizar la respuesta de los macrófagos y también favorece la atracción de los leucocitos, así como el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, refuerza la actividad de las células NK y regula la función de las células B. De acuerdo con todas estas funciones, la correlación negativa que se observa en nuestro estudio podría ser la consecuencia de un efecto inmunomodulador del INF- γ , especialmente importante en suero ya que dicho efecto no se aprecia en el LA.

La respuesta de la Interleucina 12 (IL-12)

IL-12 es una citoquina proinflamatoria producida por las APCs y los macrófagos en respuesta a diversos estímulos, uno de ellos sería el TNF- α [132]. La citoquina IL-12 está aumentada en pacientes con cirrosis [145, 149] y especialmente en los pacientes que desarrollan un episodio de PBE [123]. Su liberación por parte de los macrófagos en respuesta a la presencia de ADNbact [130, 131], activa a las células B y T [109, 148], ejerciendo al mismo tiempo un papel modulador en la producción de IFN- γ [110-112]. Estudios realizados por *Francés et al* muestran que la producción elevada de IFN- γ tras la activación de las células NK en respuesta a los CpG del ADN, es mediada por la IL-12 [150].

En nuestro estudio hemos constatado que los niveles de IL-12 en suero se correlacionan con los del LA, tal y como ocurre con el resto de citoquinas estudiadas, fenómeno en posible relación con el proceso de paso de las bacterias desde el tracto gastrointestinal al LA. En estudios previos de nuestro grupo se ha observado que los pacientes con presencia de ADNbact, presentan una marcada respuesta inflamatoria, reflejado en un aumento de los niveles tanto de TNF- α como de IL-12 [101, 115, 151]. Sin embargo, un hallazgo sorprendente del presente estudio es la relación negativa entre las concentraciones de IL-12 y las del ADNbact en LA y en suero, aunque en este último caso la correlación no fuera estadísticamente significativa. Este hallazgo también se observa con el LPS con una correlación negativa significativa entre los niveles séricos de IL-12 y de LPS.

En este contexto cabe recordar que las citocinas son polipéptidos que poseen un amplio espectro de propiedades inflamatorias, metabólicas, hematopoyéticas y de regulación inmunológica siendo una de sus principales características el carácter extremadamente pleiotrópico de sus acciones [16]. Existen más de un centenar de células distintas implicadas en la producción de citoquinas entre las que se incluyen las células del sistema monocito-macrófagos, linfocitos, neutrófilos, células endoteliales y queratinocitos.

Por otro lado, cabe recordar que aunque la presencia de niveles elevados de citoquinas como el TNF- α , IL-1 e IL-6 e IFN- γ en cirrosis está bien documentada [17,18], su significado funcional no está del todo esclarecido [19] y obliga a ser cauto al interpretar correlaciones como la encontrada en este estudio. Ahora bien, se observó que los niveles de IL-12 se correlacionaban significativamente con la especie bacteriana a la que correspondía el ADNbact identificado siendo esta correlación diferente en función de la especie bacteriana. En este sentido destaca la cantidad de IL-12 producida en presencia de *S. aureus* siendo significativamente mayor que la generada en respuesta al resto de especies bacterianas. Al agrupar las especies según la tinción gram se apreció una mayor cantidad de IL-12 en presencia de BGP ($653,1 \pm 32$ pg/ml) que ante las BGN ($553,3 \pm 19,2$ pg/ml), estadísticamente significativo ($p=0,012$). El mismo fenómeno se apreció en el LA.

Diferentes estudios realizados han mostrado que aproximadamente el 35% de los episodios de TB en los pacientes cirróticos se deben a microorganismos gram-positivos [44, 103]. Este hecho puede estar cambiando si se tiene en cuenta el manejo que actualmente se hace del paciente cirrótico hospitalizado en el que, cada vez más, se usan procedimientos invasivos que se asocian a un aumento de infecciones por los microorganismos gram-positivos [2].

En nuestro estudio, la IL-12 se ha comportado como un marcador biológico relacionado en mayor medida con la presencia de fenómenos de TB molecular por BGP, a diferencia de las otras citoquinas estudiadas que presentaban una mayor respuesta ante la presencia de BGN.

Resultados de un estudio previo de *Francés et al* [117] mostraron que el tipo y cantidad de citoquinas que se producen en pacientes cirróticos en respuesta a los fenómenos de traslocación de ADNbact se relacionan de forma directa con el contenido de CpG del ADNbact que difiere entre las distintas especies bacterianas.

El hallazgo en nuestro estudio del diferente comportamiento de la IL12 en presencia de ADNbact de BGP podría, en este sentido explicarse por el diferente contenido de CG y respaldar la noción de que los fenómenos de TB molecular difieren dependiendo de la especie bacteriana a la que corresponda el ADNbact detectado.

Por otro lado, observamos la existencia de una relación significativa entre los niveles de IL-12 y el hecho de haber padecido episodios de encefalopatía previos al episodio en que se identificó el ADNbact. En estudios previos de nuestro grupo se demostró que factores como el haber padecido episodios de encefalopatía previa, y la edad [161] se relacionaban con la probabilidad de presentar en algún momento de la evolución de estos pacientes episodios de TB molecular. Los datos del presente estudio sugieren la posibilidad de que pacientes con una enfermedad hepática mas evolucionada, como sugiere el hecho de tener mayor edad y haber padecido episodios previos de encefalopatía, podrían responder de forma diferenciada en una respuesta en la que IL12 tuviera mayor relevancia o bien que el balance entre BGP y BGN difiriera del que presentan los pacientes que no han desarrollado previamente episodios de encefalopatía. No podemos excluir otras razones que pudieran relacionar la predisposición de la TB y los episodios previos de EH, tal como los cortocircuitos portosistémicos que permitirían la pervivencia de antígenos de origen bacteriano en la circulación sistémica con sus efectos asociados.

La respuesta del Óxido Nítrico (NO)

El **NO** ha sido reconocido como un mediador biológico pleiotrópico, que regula las diversas actividades que van desde la función neuronal a la regulación del sistema inmune. Se trata de un radical gaseoso libre con una vida media corta in vivo de unos pocos segundos o menos. Por lo tanto, los niveles de los metabolitos del NO, el nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻), que son más estables, se han utilizado en la medición indirecta de NO (NO_x) en los fluidos biológicos.

El NO actúa como potente agente vasodilatador y desempeña un papel clave en la patogénesis de la vasodilatación arterial periférica y esplácnica que se encuentran en la cirrosis [152]. La hipótesis original de que el NO_x juega un papel en las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis proviene de *Vallance y Moncada* [153], quienes propusieron que la endotoxemia, posiblemente originada por episodios de TB de origen intestinal, causa la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que lleva a un aumento de la producción de NO_x vascular. Por otro lado, se ha demostrado que el NO_x en LA ejerce una actividad bactericida [152].

En estudios previos se ha observado una elevación importante de las concentraciones séricas y en LA del NO_x en pacientes con infecciones peritoneales [154] y se ha postulado que este factor podría desempeñar un papel protector contra las infecciones bacterianas en pacientes con cirrosis [155]. En el estudio realizado por *Morales et al* se observó que la inhibición de la síntesis de NO_x fue seguida por el desarrollo generalizado de la infección del LA en un modelo animal de cirrosis [155].

Sin embargo, en un estudio reciente de *García Tsao et al* [133] se concluyó que los niveles de NO_x en el LA de pacientes cirróticos no son buenos marcadores para diagnosticar o para determinar la predisposición de un paciente concreto para desarrollar un episodio de PBE.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por el grupo de *Such et al* [132], que tampoco observaron diferencias significativas en los niveles basales de NOx en LA o suero en un grupo de pacientes que posteriormente desarrollaron infección del LA en comparación con el grupo de los pacientes que no se infectaron. Por lo tanto, es necesario la realización de otros estudios para concluir que la presencia del NOx en el LA juega un papel protector contra la infección del mismo.

En nuestro estudio, se cuantificaron los niveles de NOx tanto en suero como en el LA en las muestras basales de cada uno de los pacientes observándose la existencia de una correlación significativa entre los niveles de NOx en el suero y en el LA (correlación de Pearson; $r=0,95$ y $p=0,001$). Estos datos corroboran observaciones previas de nuestro grupo [132].

Las concentraciones de NOx fueron más elevadas en el LA que en el suero. Diversos estudios han mostrado que los niveles de NOx en LA son más altos en los pacientes cirróticos con enfermedad hepática más severa, especialmente en el subgrupo de pacientes con disfunción renal más avanzada, por lo que se ha propuesto al NOx como un marcador pronóstico potencialmente útil en los pacientes cirróticos [133, 48].

En nuestro estudio hemos observado que existe una correlación significativa entre los niveles de NOx tanto en el LA como en el suero con las concentraciones de ADNbact. Además, tras realizar el análisis multivariante esta relación se mantiene. Diversos estudios han demostrado que en presencia de ADNbact se produce una mayor síntesis de NOx tanto en el sobrenadante del cultivo de células peritoneales [4] como en pacientes cirróticos [115]. Nuestro grupo ha comprobado la persistencia días después de iniciar la administración de cefotaxima de niveles de ADNbact y paralelamente de concentraciones elevadas de NOx en el suero de pacientes con PBE [163]. Se ha postulado que este fenómeno sea consecuencia de un mínimo efecto de la cefotaxima sobre repetidos fenómenos de TB molecular que mantendrían en el tiempo los fenómenos inflamatorios.

El LPS, constituyente principal de las BGN, es uno de los activadores más potentes que se conoce de la síntesis del NOx [132]. En nuestro estudio se objetivó una relación significativa entre los niveles de NOx en suero y las concentraciones de LPS. Tras el análisis ANOVA, no se objetivó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones medias de NOx tanto en suero como en LA en función de la especie bacteriana. Esta observación concuerda con un estudio reciente de *Bellot et al* [151] en el que estas alteraciones son independientes de las especies bacterianas detectadas.

Sin embargo cuando se agrupan las diferentes especies bacterianas identificadas según el gram se detectó una cantidad significativamente mayor de NOx en presencia de BGN que frente a CGP. Estos resultados difieren de los encontrados por otros estudios en los que los pacientes con presencia de ADNbact procedente de BGN mostraban una respuesta inflamatoria similar a la de aquellos con ADNbact de CGP. Un estudio realizado por *Gonzalez-Navajas et al* mostró que los niveles de NOx aumentaban en pacientes con cirrosis y presencia de ADNbact en el suero, tanto si los fragmentos de ADNbact procedían de un microorganismo gram-negativo como de un microorganismo gram-positivo. Todos estos datos sugieren que la producción de NOx no depende exclusivamente de la presencia de un producto bacteriano específico, ya sea LPS o bactDNA [101], sino probablemente de su concentración en el medio.

En teoría, una mayor respuesta inflamatoria se asocia con el desarrollo de las alteraciones hemodinámicas, síndrome hepatorenal o la muerte, como se ha demostrado en pacientes con PBE, incluso después que la infección ha sido curada [133]. Por ello, sería de esperar que los fenómenos de traslocación de ANDbact asociados a un incremento en las concentraciones de NOx alterarían la hemodinámica esplácnica y sistémica de estos pacientes. En este sentido, un estudio reciente realizado por *Caño et al.* muestra que los pacientes cirróticos con presencia de ADNbact tienen valores de TA media significativamente reducidos con respecto a la de pacientes sin presencia de este antígeno.

Este fenómeno se ha comprobado en modelos animales de cirrosis y ascitis [6,7] en los que los fenómenos de TB se asociaban a un empeoramiento tanto de la vasodilatación arterial como esplácnica. Sin embargo, en nuestro trabajo no se ha objetivado esta misma relación, quizás porque los pacientes incluidos estaban hemodinámicamente estables y con cifras normales de TA y los cambios hemodinámicos que hayan ocurrido fueran de una intensidad menor no disponiendo en el presente estudio de un poder estadístico suficiente para diferenciar estos pequeños efectos por la variabilidad inherente a esta variable.

Los macrófagos peritoneales juegan un papel esencial en la liberación del NOx. Estudios previos han demostrado que los macrófagos peritoneales de pacientes cirróticos con ascitis que han sufrido un episodio previo de PBE, se encuentran activados, con sobreproducción de NOx [4]. En estudios realizados por *Frances et al* [4] se describe una situación similar de altos niveles de NOx en pacientes con evidencia molecular de TB como consecuencia de la activación de la enzima iNOS de los macrófagos [157, 158]. Por otro lado, se conoce que el NOx regula la liberación de citoquinas por los macrófagos y viceversa [159]. En nuestro estudio hemos observado la existencia de una correlación inversa entre los niveles de NOx y el número de leucocitos en suero aunque el coeficiente de correlación no superó el valor de 0,5, lo que apoya la existencia de otros factores que interferirían, como otras citoquinas, en la relación entre estos dos factores.



CONCLUSIÓN
Conclusion

ESPECÍFICAS DE LA RESPUESTA INMUNE:

- La traslocación del ADNbact en pacientes con cirrosis y ascitis no infectados, se asocia con una intensa reacción inflamatoria consistente en un aumento significativo las citoquinas (TNF- α , INF- γ , IL-12) y los metabolitos de NOx tanto de sus niveles séricos circulantes como de su concentración en el LA.
- La liberación del TNF- α es directamente proporcional a la concentración de ADNbact, sugiriendo esto, que la intensidad de la respuesta inmune depende de la carga de ADNbact presente en un episodio de TB.
- La correlación entre los niveles de TNF- α y de ADNbact LA es menor que en suero. Esto puede ser debido a la existencia de diferencias funcionales en respuesta a un mismo estímulo de los macrófagos y células productoras de TNF- α cuando estos se encuentran en el LA respecto a su función cuando se encuentran en el suero.
- La existencia de una relación significativa entre las concentraciones de TNF- α en suero y los niveles de LPS, considerando que el LPS es un marcador indirecto del proceso de la TB y que los niveles plasmáticos elevados de LPS asocian un riesgo aumentado de padecer un episodio de PBE, nos sugiere la existencia en estos pacientes de un estado de activación inmune en respuesta a la presencia de la endotoxina (LPS) de BGN similar a la desencadenada por el ADNbact.
- La elevación del TNF- α en presencia de los productos bacterianos en sangre y LA podría ser un marcador que sirva para identificar un subgrupo de pacientes con un riesgo aumentado de desarrollar un episodio de PBE.

- La posibilidad que la respuesta inflamatoria pudiera estar relacionada con otros parámetros, como las características clínicas de cada paciente, no se observó en este estudio. Probablemente son necesarios más estudios para clarificar estos aspectos.
- En nuestro estudio no encontramos que existieran relaciones significativas entre la cantidad de TNF- α liberada y los diferentes parámetros hemodinámicos estudiados (TAS, TAD, TAM, FC). Probablemente debido a que serían necesarios marcadores mucho más específicos y sensibles de las variaciones hemodinámicas.
- En nuestro trabajo, a diferencia de otros, no se apreció la existencia de una relación significativa entre las concentraciones de proteínas y/o albúmina y la respuesta humoral a la presencia de ADNbact y LPS. Lo que nos muestra que los fenómenos de TB molecular ocurren independientemente de la concentración de proteínas en LA y suero a diferencia de lo que ocurre con el desarrollo de infecciones clínicamente manifiestas del LA apoyando la diferencia e independencia entre estos dos fenómenos.
- El papel de la liberación del INF- γ en la activación de la respuesta inmune ante el fenómeno de TB probablemente es secundaria a la activación previa de otros moduladores que forman parte de la respuesta inflamatoria de primera línea.
- La IL-12 podría comportarse como un marcador biológico relacionado en mayor medida con la presencia de fenómenos de TB molecular por BGP, a diferencia de las otras citoquinas estudiadas que presentan una mayor respuesta ante la presencia de BGN.

- En estudios previos se ha postulado que la presencia del NOx en suero y LA de pacientes con cirrosis podría desempeñar un papel protector contra las infecciones bacterianas. Esta observación, sin embargo, requiere de futuras investigaciones.
- El LPS, constituyente principal de las BGN, es uno de los activadores más potentes que se conoce de la síntesis del NOx. Sin embargo, nuestros hallazgos sugieren que la producción de NOx no depende exclusivamente de la presencia de un producto bacteriano específico, ya sea LPS o bactDNA, sino probablemente de su concentración en el medio.

CONCLUSIONES FINALES:

- Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la respuesta inflamatoria inmune que se activa en los pacientes cirróticos en respuesta a la presencia de ADNbact en sangre y LA guarda una relación directa con la carga de ADN y la concentración de LPS.
- La presencia de ADNbact se ha relacionado con el peor pronóstico de estos pacientes, aunque no sabemos si la concentración de ADNbact puede tener implicaciones pronósticas. Los datos del presente estudio sugieren el interés de esta pregunta que habrá que plantear en estudios específicamente diseñados a tal efecto.
- Una consecuencia importante de la observación de una estrecha relación entre la concentración de ADNbact y la respuesta inmune desencadenada estriba en las consecuencias de actuar directamente sobre el ADNbact y sus productos a través de la descontaminación intestinal selectiva en estos pacientes, el posible papel modulador de la inflamación asociada y las repercusiones pronósticas de esta terapia. Todo ello debe ser objeto de nuevos estudios en pacientes con TB molecular.

SPECIFIC OF THE IMMUNE RESPONSE:

- Bacterial translocation in patients with cirrhosis and non-infected ascites is associated with an intense inflammatory reaction consisting in a significant increase of serum and AF cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-12) and NOx.
- The release of TNF- α is directly proportional to the bactDNA concentration, which suggests that in an episode of TB, the intensity of the immune response is associated with the load of bactDNA.
- The correlation between the levels of TNF- α and bactDNA is less evident in AF. This may be due to functional differences between macrophages and cells producing TNF- α in AF and serum.
- There is a significant relationship between TNF- α and LPS in serum. As LPS is a surrogate marker for BT, this suggests a state of immune activation in response to LPS similar to the response triggered by bactDNA.
- TNF- α is increased in the presence of bacterial products in blood and AF. Therefore the levels of TNF- α might be used as a surrogated marker of molecular events of bacterial translocation. Although this is not entirely clear, these facts might identify a subgroup of patients with an increased risk of developing an episode of SBP (nosotros nunca hemos comprobado una asociación entre DNA e incidencia de infecciones, pero hay un artículo de Albillos en Lancet que relaciona los niveles de LBP con la incidencia de infecciones, búscalo).
- In this study, no relationship was observed among inflammatory response and the clinical characteristics of patients. Further studies are needed to clarify these issues.

- We found no significant relationship between TNF- α response and hemodynamic parameters (SBP, DBP, TAM, FC). This is probably due to the multifactorial nature of these parameters.
- No significant relationship was observed between serum albumin and the factors of the humoral response. This suggests that bacterial translocation is not associated with the degree of liver insufficiency.
- The role of IFN- γ in the activation of the immune response against BT is probably secondary to a prior activation of other modulators that are part of the first line-inflammatory response.
- Our results suggest that IL12, but not the remaining cytokines investigated, might be related with translocation of GPC. Indeed, both serum and AF IL12 values were significantly higher in patients with GPC-related BT vs patients with presence of GNB genetic fragments.
- LPS is the main constituent of the BGN wall. It is one of the most powerful activators of the NOx synthesis. However, our findings suggest that the production of NOx does not depend solely on the presence of LPS or bactDNA, but probably on their concentrations.

FINAL CONCLUSIONS:

- Our results support the hypothesis that the immune inflammatory response is closely related to the absolute amount of the most powerful bacterial-driven immune stimulants: bacterial DNA and LPS.
- The presence of bactDNA has been associated with poor prognosis in cirrhotic patients. We do not know though if bactDNA concentration may have also prognostic implications. This possibility should be addressed in specifically designed studies.

- An important consequence of the relationship between bactDNA and the immune response reinforces the relevance of selective intestinal decontamination in these patients, not only to decrease infections but also to reduce the immune status.



UNIVERSITAT
Miguel



BIBLIOGRAFÍA
References

1. Caly, W.R. and E. Strauss, *A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis*. J Hepatol, 1993. **18**(3): p. 353-8.
2. Fernandez, J., et al., *Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis*. Hepatology, 2002. **35**(1): p. 140-8.
3. Yoshida, H., et al., *Bacterial infection in cirrhosis, with and without hepatocellular carcinoma*. Am J Gastroenterol, 1993. **88**(12): p. 2067-71.
4. Frances, R., et al., *Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites*. Gut, 2004. **53**(6): p. 860-4.
5. Deschenes, M. and J.P. Villeneuve, *Risk factors for the development of bacterial infections in hospitalized patients with cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(8): p. 2193-7.
6. Wyke, R.J., *Problems of bacterial infection in patients with liver disease*. Gut, 1987. **28**(5): p. 623-41.
7. Greig, P.D., et al., *Complications after peritoneovenous shunting for ascites*. Am J Surg, 1980. **139**(1): p. 125-31.
8. Shrake, P.D., F. Troiano, and D.K. Rex, *Peritonitis following colonoscopy in a cirrhotic with ascites*. Am J Gastroenterol, 1989. **84**(4): p. 453-4.
9. Rimola, A., et al., *Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis*. Hepatology, 1984. **4**(1): p. 53-8.
10. Soriano, G., et al., *Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage*. Gastroenterology, 1992. **103**(4): p. 1267-72.
11. Runyon, B.A., *Spontaneous bacterial peritonitis: an explosion of information*. Hepatology, 1988. **8**(1): p. 171-5.
12. Such, J. and B.A. Runyon, *Spontaneous bacterial peritonitis*. Clin Infect Dis, 1998. **27**(4): p. 669-74; quiz 675-6.
13. Guarner, C. and G. Soriano, *Spontaneous bacterial peritonitis*. Semin Liver Dis, 1997. **17**(3): p. 203-17.
14. Terg, R., et al., *Analysis of clinical course and prognosis of culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and neutrocytic ascites. Evidence of the same disease*. Dig Dis Sci, 1992. **37**(10): p. 1499-504.
15. Rimola, A., et al., *Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club*. J Hepatol, 2000. **32**(1): p. 142-53.

16. Conn, H.O., *Spontaneous peritonitis and bacteremia in laennec's cirrhosis caused by enteric organisms. A relatively common but rarely recognized syndrome.* Ann Intern Med, 1964. **60**: p. 568-80.
17. Van Thiel, D.H., et al., *Liver transplantation after an acute episode of spontaneous bacterial peritonitis.* Hepatogastroenterology, 1996. **43**(12): p. 1584-8.
18. Tito, L., et al., *Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors.* Hepatology, 1988. **8**(1): p. 27-31.
19. Silvain, C., et al., *Prognosis and long-term recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis.* J Hepatol, 1993. **19**(1): p. 188-9.
20. Berg, R.D., *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract.* Adv Exp Med Biol, 1999. **473**: p. 11-30.
21. Garcia-Tsao, G., *Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis?* J Hepatol, 2001. **34**(1): p. 150-5.
22. Wiest, R. and G. Garcia-Tsao, *Bacterial translocation (BT) in cirrhosis.* Hepatology, 2005. **41**(3): p. 422-33.
23. Simon, G.L. and S.L. Gorbach, *Intestinal flora in health and disease.* Gastroenterology, 1984. **86**(1): p. 174-93.
24. Schekman, R., *Translocation gets a push.* Cell, 1994. **78**(6): p. 911-3.
25. Gines, P., et al., *Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial.* Hepatology, 1990. **12**(4 Pt 1): p. 716-24.
26. Rimola, A., et al., *Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage.* Hepatology, 1985. **5**(3): p. 463-7.
27. Guarner, C. and B.A. Runyon, *Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, and management.* Gastroenterologist, 1995. **3**(4): p. 311-28.
28. Llovet, J.M., et al., *Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis.* Gut, 1994. **35**(11): p. 1648-52.
29. Runyon, B.A., S. Squier, and M. Borzio, *Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis.* J Hepatol, 1994. **21**(5): p. 792-6.
30. Llovet, J.M., et al., *Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence.* J Hepatol, 1998. **28**(2): p. 307-13.
31. Cirera, I., et al., *Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis.* J Hepatol, 2001. **34**(1): p. 32-7.

32. Llovet, J.M., et al., *Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock*. Hepatology, 1996. **23**(4): p. 781-7.
33. Lai, D., S.L. Gorbach, and R. Levitan, *Intestinal microflora in patients with alcoholic cirrhosis: urea-splitting bacteria and neomycin resistance*. Gastroenterology, 1972. **62**(2): p. 275-9.
34. Martin, L., et al., *[Development of spontaneous bacterial peritonitis in an experimental model in cirrhotic rats. Relationship with intestinal bacterial translocation]*. Rev Esp Enferm Dig, 1995. **87**(9): p. 632-6.
35. Novella, M., et al., *Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 532-6.
36. Steffen, E.K., R.D. Berg, and E.A. Deitch, *Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node*. J Infect Dis, 1988. **157**(5): p. 1032-8.
37. Akram, S., et al., *Assessment of intestinal permeability with a two-hour urine collection*. Dig Dis Sci, 1998. **43**(9): p. 1946-50.
38. Blomquist, E., U. Brunk, and A. Macieira-Coelho, *The influence of cell cooperation, nutrients and surface area on cell division*. Cell Prolif, 1993. **26**(1): p. 37-43.
39. Pascual, S., et al., *Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis*. Hepatogastroenterology, 2003. **50**(53): p. 1482-6.
40. Campillo, B., et al., *Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. **11**(7): p. 755-9.
41. Perez-Paramo, M., et al., *Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 43-8.
42. Llovet, J.M., R. Bartoli, and R. Planas, *[Intestinal bacterial translocation]*. Gastroenterol Hepatol, 1996. **19**(7): p. 374-82.
43. Astaldi, G. and E. Strosselli, *Peroral biopsy of the intestinal mucosa in hepatic cirrhosis*. Am J Dig Dis, 1960. **5**: p. 603-12.
44. Such, J., et al., *Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites*. Hepatology, 2002. **36**(1): p. 135-41.
45. Schimpl, G., et al., *The effect of vitamin C and vitamin E supplementation on bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common-bile-duct-ligated rats*. Eur Surg Res, 1997. **29**(3): p. 187-94.

46. Schimpl, G., et al., *Allopurinol reduces bacterial translocation, intestinal mucosal lipid peroxidation, and neutrophil-derived myeloperoxidase activity in chronic portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats*. *Pediatr Res*, 1996. **40**(3): p. 422-8.
47. Schimpl, G., et al., *Allopurinol and glutamine attenuate bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct ligated growing rats*. *Gut*, 1996. **39**(1): p. 48-53.
48. Guarner, C., et al., *Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia*. *Hepatology*, 1993. **18**(5): p. 1139-43.
49. Deitch, E.A. and R. Berg, *Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection*. *J Burn Care Rehabil*, 1987. **8**(6): p. 475-82.
50. Van Leeuwen, J.E., et al., *Relationship between patterns of engraftment in peripheral blood and immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation for (severe) combined immunodeficiency*. *Blood*, 1994. **84**(11): p. 3936-47.
51. Frances, R., et al., *Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites*. *J Hepatol*, 2007. **46**(5): p. 797-803.
52. Bodey, G.P., *Antibiotic prophylaxis in cancer patients: regimens of oral, nonabsorbable antibiotics for prevention of infection during induction of remission*. *Rev Infect Dis*, 1981. **3 suppl**: p. S259-68.
53. Kreger, B.E., et al., *Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients*. *Am J Med*, 1980. **68**(3): p. 332-43.
54. Kreger, B.E., D.E. Craven, and W.R. McCabe, *Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients*. *Am J Med*, 1980. **68**(3): p. 344-55.
55. Pelletier, M., et al., *Immunopathology of BCG infection in genetically resistant and susceptible mouse strains*. *J Immunol*, 1982. **129**(5): p. 2179-85.
56. Debure, A., et al., *[Role of the digestive tract immune system in the control of bacterial translocation in gnotoxenic mice]*. *Gastroenterol Clin Biol*, 1986. **10**(11): p. 712-7.
57. Rajkovic, I.A. and R. Williams, *Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis*. *Hepatology*, 1986. **6**(2): p. 252-62.
58. Wells, C.L., et al., *Ability of intestinal Escherichia coli to survive within mesenteric lymph nodes*. *Infect Immun*, 1987. **55**(11): p. 2834-7.

59. Spitz, J., et al., *The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence*. Gastroenterology, 1994. **106**(1): p. 35-41.
60. Ding, J.W., et al., *Inhibition of bacterial translocation in obstructive jaundice by muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in the rat*. J Hepatol, 1994. **20**(6): p. 720-8.
61. Young, L.S., et al., *Gram-negative rod bacteremia: microbiologic, immunologic, and therapeutic considerations*. Ann Intern Med, 1977. **86**(4): p. 456-71.
62. Yousif-Kadaru, A.G., et al., *Defects in serum attractant activity in different types of chronic liver disease*. Gut, 1984. **25**(1): p. 79-84.
63. Naveau, S., et al., *Prognostic value of serum fibronectin concentration in alcoholic cirrhotic patients*. Hepatology, 1985. **5**(5): p. 819-23.
64. Feliu, E., et al., *Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis*. Eur J Clin Invest, 1977. **7**(6): p. 571-7.
65. Lebrun, L., et al., *Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid*. J Hepatol, 1992. **16**(1-2): p. 98-101.
66. Rajkovic, I.A. and R. Williams, *Mechanisms of abnormalities in host defences against bacterial infection in liver disease*. Clin Sci (Lond), 1985. **68**(3): p. 247-53.
67. Garcia-Gonzalez, M., et al., *Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis*. Gastroenterology, 1993. **105**(2): p. 527-31.
68. Laffi, G., et al., *Impaired superoxide anion, platelet-activating factor, and leukotriene B4 synthesis by neutrophils in cirrhosis*. Gastroenterology, 1993. **105**(1): p. 170-7.
69. Dunn, D.L. and R.L. Simmons, *Mechanisms of clearance from the peritoneal cavity*. Am J Surg, 1986. **151**(4): p. 446-7.
70. Schifferli, J.A., Y.C. Ng, and D.K. Peters, *The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes*. N Engl J Med, 1986. **315**(8): p. 488-95.
71. Cornacoff, J.B., et al., *Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism*. J Clin Invest, 1983. **71**(2): p. 236-47.
72. Gomez, F., P. Ruiz, and A.D. Schreiber, *Impaired function of macrophage Fc gamma receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis*. N Engl J Med, 1994. **331**(17): p. 1122-8.
73. Hassner, A., et al., *Impaired monocyte function in liver cirrhosis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1981. **282**(6272): p. 1262-3.

74. Chang, C.S., et al., *Small intestinal bacterial overgrowth versus antimicrobial capacity in patients with spontaneous bacterial peritonitis*. Scand J Gastroenterol, 2001. **36**(1): p. 92-6.
75. DeNardo, S.J., et al., *Diagnosis of cirrhosis and hepatitis by quantitative hepatic and other reticuloendothelial clearance rates*. J Nucl Med, 1976. **17**(6): p. 449-59.
76. Bolognesi, M., et al., *Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis*. Hepatology, 1994. **19**(3): p. 628-34.
77. Mal, F., et al., *Chemoattractant and opsonic activity in ascitic fluid. A study in 47 patients with cirrhosis or malignant peritonitis*. J Hepatol, 1991. **12**(1): p. 45-9.
78. Akalin, H.E., Y. Laleli, and H. Telatar, *Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients*. J Infect Dis, 1983. **147**(6): p. 1011-7.
79. Stevens, P., L.S. Young, and S. Adamu, *Opsonization of various capsular (K) E. coli by the alternative complement pathway*. Immunology, 1983. **50**(3): p. 497-502.
80. Soriano, G., et al., *Escherichia coli capsular polysaccharide and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis*. Hepatology, 1995. **21**(3): p. 668-73.
81. Ho, H., et al., *Prevalence of associated infections in community-acquired spontaneous bacterial peritonitis*. Am J Gastroenterol, 1996. **91**(4): p. 735-42.
82. Barnes, P.F., et al., *A prospective evaluation of bacteremic patients with chronic liver disease*. Hepatology, 1988. **8**(5): p. 1099-103.
83. Conn, H.O. and J.M. Fessel, *Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme*. Medicine (Baltimore), 1971. **50**(3): p. 161-97.
84. Runyon, B.A., *Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis*. Gastroenterology, 1986. **91**(6): p. 1343-6.
85. Runyon, B.A. and J.C. Hoefs, *Ascitic fluid chemical analysis before, during and after spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 1985. **5**(2): p. 257-9.
86. Runyon, B.A., et al., *Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 1985. **5**(4): p. 634-7.
87. Homann, C., et al., *Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality*. Gut, 1997. **40**(4): p. 544-9.
88. Llach, J., 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): p. 724-7.

89. Andreu, M., et al., *Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites*. Gastroenterology, 1993. **104**(4): p. 1133-8.
90. Fromkes, J.J., F.B. Thomas, and E.H. Kraut, *Activation of the alternative complement pathway in ascitic fluid during spontaneous bacterial peritonitis*. J Clin Gastroenterol, 1982. **4**(4): p. 347-50.
91. Guarner, C., et al., *Risk of a first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels*. Gastroenterology, 1999. **117**(2): p. 414-9.
92. Runyon, B.A., *Paracentesis of ascitic fluid. A safe procedure*. Arch Intern Med, 1986. **146**(11): p. 2259-61.
93. Runyon, B.A., M.R. Antillon, and J.G. McHutchison, *Diuresis increases ascitic fluid opsonic activity in patients who survive spontaneous bacterial peritonitis*. J Hepatol, 1992. **14**(2-3): p. 249-52.
94. Ljubicic, N., A. Bilic, and B. Kopjar, *Diuretics vs. paracentesis followed by diuretics in cirrhosis: effect on ascites opsonic activity and immunoglobulin and complement concentrations*. Hepatology, 1994. **19**(2): p. 346-53.
95. Runyon, B.A., M.R. Antillon, and A.A. Montano, *Effect of diuresis versus therapeutic paracentesis on ascitic fluid opsonic activity and serum complement*. Gastroenterology, 1989. **97**(1): p. 158-62.
96. Sola, R., et al., *Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients treated using paracentesis or diuretics: results of a randomized study*. Hepatology, 1995. **21**(2): p. 340-4.
97. Guarner, C., et al., *The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl₄-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation*. Hepatology, 2006. **44**(3): p. 633-9.
98. Runyon, B.A., H.N. Canawati, and E.A. Akriviadis, *Optimization of ascitic fluid culture technique*. Gastroenterology, 1988. **95**(5): p. 1351-5.
99. Albillos, A., A. de La Hera, and M. Alvarez-Mon, *[Pathogenic effects of bacterial translocation in liver cirrhosis]*. Gastroenterol Hepatol, 2001. **24**(9): p. 450-3.
100. Albillos, A., et al., *Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement*. Hepatology, 2003. **37**(1): p. 208-17.
101. Gonzalez-Navajas, J.M., et al., *Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin*. J Hepatol, 2008. **48**(1): p. 61-7.

102. Frances, R., et al., *Intracellular cytokine expression in peritoneal monocyte/macrophages obtained from patients with cirrhosis and presence of bacterial DNA*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(1): p. 45-51.
103. Frances, R., et al., *A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites*. Hepatology, 2004. **39**(2): p. 484-91.
104. Zapater, P., et al., *Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1924-31.
105. Utaisincharoen, P., et al., *CpG ODN enhances uptake of bacteria by mouse macrophages*. Clin Exp Immunol, 2003. **132**(1): p. 70-5.
106. Uematsu, S., et al., *Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 915-23.
107. Chuang, T.H., et al., *Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 538-44.
108. Wagner, G.S., C.J. Miller, and M.B. McChesney, *CD4+ T cells and monocytes elicited by immunization of rhesus monkeys with antigen-pulsed dendritic cells control SIV replication*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2002. **18**(2): p. 143-8.
109. Le, J.M. and J. Vilcek, *Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response*. Lab Invest, 1989. **61**(6): p. 588-602.
110. Manetti, R., et al., *Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1273-83.
111. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4008-27.
112. Cowdery, J.S., et al., *Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4570-5.
113. Sweet, M.J., et al., *IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA*. J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(4): p. 263-71.
114. Gao, J.J., et al., *Cutting edge: bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4095-9.

115. Frances, R., et al., *Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 2008. **47**(3): p. 978-85.
116. Frances, R., et al., *Bacterial DNA induces the complement system activation in serum and ascitic fluid from patients with advanced cirrhosis*. J Clin Immunol, 2007. **27**(4): p. 438-44.
117. Frances, R., et al., *Translocation of bacterial DNA from Gram-positive microorganisms is associated with a species-specific inflammatory response in serum and ascitic fluid of patients with cirrhosis*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(2): p. 230-7.
118. Lopez-Talavera, J.C., W.W. Merrill, and R.J. Groszmann, *Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats*. Gastroenterology, 1995. **108**(3): p. 761-7.
119. Ferrier, L., et al., *Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 795-804.
120. Knight, B., et al., *Interferon-gamma exacerbates liver damage, the hepatic progenitor cell response and fibrosis in a mouse model of chronic liver injury*. J Hepatol, 2007. **47**(6): p. 826-33.
121. Tandon, P. and G. Garcia-Tsao, *Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(1): p. 26-42.
122. Roberts, T.L., et al., *Differences in macrophage activation by bacterial DNA and CpG-containing oligonucleotides*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3569-76.
123. Navasa, M., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality*. Hepatology, 1998. **27**(5): p. 1227-32.
124. Runyon, B.A., et al., *Bedside inoculation of blood culture bottles with ascitic fluid is superior to delayed inoculation in the detection of spontaneous bacterial peritonitis*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(12): p. 2811-2.
125. Wennmalm, A., et al., *Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study*. Circ Res, 1993. **73**(6): p. 1121-7.
126. Wennmalm, A., G. Benthin, and A.S. Petersson, *Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin*. Br J Pharmacol, 1992. **106**(3): p. 507-8.
127. Such, J., et al., *Selective intestinal decontamination increases serum and ascitic fluid C3 levels in cirrhosis*. Hepatology, 1990. **12**(5): p. 1175-8.

128. Klinman, D.M., et al., *CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 2879-83.
129. Lipford, G.B., et al., *CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2340-4.
130. Lipford, G.B., et al., *Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3420-6.
131. Sparwasser, T., et al., *Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock*. Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1671-9.
132. Such, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and nitric oxide in sterile ascitic fluid and serum from patients with cirrhosis who subsequently develop ascitic fluid infection*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(11): p. 2360-6.
133. Garcia-Tsao, G., et al., *The diagnostic and predictive value of ascites nitric oxide levels in patients with spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 1998. **28**(1): p. 17-21.
134. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 709-60.
135. Albillos, A., A. de-la-Hera, and M. Alvarez-Mon, *Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites*. Lancet, 2004. **363**(9421): p. 1608-10.
136. Beutler, B., et al., *Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance*. Science, 1986. **232**(4753): p. 977-80.
137. Deviere, J., et al., *Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis*. Hepatology, 1990. **11**(4): p. 628-34.
138. Arai, M., et al., *Selective bowel decontamination of recipients for prevention against liver injury following orthotopic liver transplantation: evaluation with rat models*. Hepatology, 1998. **27**(1): p. 123-7.
139. Sierra-Filardi, E., et al., *Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release*. Immunobiology, 2010. **215**(9-10): p. 788-95.
140. Wendelsdorf, K., et al., *Model of colonic inflammation: immune modulatory mechanisms in inflammatory bowel disease*. J Theor Biol, 2010. **264**(4): p. 1225-39.

141. Mizuhara, H., et al., *T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6*. J Exp Med, 1994. **179**(5): p. 1529-37.
142. Cano, R., et al., *Proteomic evidence of bacterial peptide translocation in afebrile patients with cirrhosis and ascites*. J Mol Med, 2010. **88**(5): p. 487-95.
143. Riordan, S.M., et al., *Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1154-64.
144. Munoz, L., et al., *Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis*. Hepatology, 2005. **42**(2): p. 411-9.
145. Genesca, J., et al., *Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(1): p. 169-77.
146. Wiest, R., et al., *Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats*. Hepatology, 2003. **38**(6): p. 1508-15.
147. Wiest, R., et al., *Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1223-33.
148. Hirano, T., et al., *Biological and clinical aspects of interleukin 6*. Immunol Today, 1990. **11**(12): p. 443-9.
149. Tung, K.H., et al., *Serum interleukin-12 levels in alcoholic liver disease*. J Chin Med Assoc, 2010. **73**(2): p. 67-71.
150. Chace, J.H., et al., *Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **84**(2): p. 185-93.
151. Bellot, P., et al., *Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis*. Hepatology. **52**(6): p. 2044-52.
152. MacMicking, J.D., et al., *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Cell, 1995. **81**(4): p. 641-50.
153. Vallance, P. and S. Moncada, *Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?* Lancet, 1991. **337**(8744): p. 776-8.
154. Bories, P.N., et al., *Long-lasting NO overproduction in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 1997. **25**(6): p. 1328-33.

155. Morales-Ruiz, M., et al., *Nitric oxide production by peritoneal macrophages of cirrhotic rats: a host response against bacterial peritonitis*. Gastroenterology, 1997. **112**(6): p. 2056-64.
156. Martin, P.Y., P. Gines, and R.W. Schrier, *Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis*. N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 533-41.
157. Fang, F.C., *Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity*. J Clin Invest, 1997. **99**(12): p. 2818-25.
158. Nathan, C., *Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?* J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2417-23.
159. Obermeier, F., et al., *Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 829-36.
160. Francés R, et al., *Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites*. J Hepatol. 2007. **46**(5): p. 797-803.
161. Zapater P, et al., *Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis*. Hepatology. 2008. **48**(6): p. 1924-31.
162. García de Lorenzo, et al., *Clinical importance of bacterial translocation*. Nutr Hosp. 2007. **22**(2): p. 50-5.
163. Bellot P, Francés R, Such J. *Bacterial translocation in cirrhosis*. Gastroenterol Hepatol. 2008.**31**(8):508-14.
164. Akalin HE, et al., *Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients*. J Infect Dis. 1983. **147**: p. 1011–1017.