



ciberehd



*Universidad Miguel Hernández de Elche
Instituto de Biología Molecular y Celular
CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas*

EFFECTO MODULADOR DE *BIFIDOBACTERIUM*
PSEUDOCATENULATUM CECT 7765 SOBRE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA Y LA TRASLOCACIÓN BACTERIANA EN LA
CIRROSIS

“MODULATING EFFECT OF *BIFIDOBACTERIUM PSEUDOCATENULATUM* CECT 7765
ON THE INFLAMMATORY RESPONSE AND BACTERIAL TRANSLOCATION IN
CIRRHOSIS”

TESIS DOCTORAL
ALBA MORATALLA FERNÁNDEZ

DIRECTORES DE TESIS
Dr. Rubén Francés Guarinos
Dr. José Such Ronda

ALICANTE, 2015



El **Dr. Rubén Francés Guarinos**, Doctor en Biología Molecular y Celular y Profesor Asociado de Inmunología de la Universidad Miguel Hernández, y el **Dr. José Such Ronda**, Doctor en Medicina y Profesor Titular de Medicina de la Universidad Miguel Hernández,

Certifican que el trabajo de investigación titulado “**Efecto modulador de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre la respuesta inflamatoria y la traslocación bacteriana en la cirrosis**”, que conduce a la obtención del grado de Doctor con mención Europea, ha sido realizado bajo su dirección por **Alba Moratalla Fernández** en el laboratorio del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas ubicado en el Hospital General Universitario de Alicante (CIBERehd-HGUA).

Para que conste y surta a los efectos oportunos firman el presente certificado en Alicante, a 14 de Diciembre de 2015.

Los Directores de la Tesis

Fdo. Dr. Rubén Francés Guarinos

Fdo. Dr. José Such Ronda

ciberehd



D. Antonio Ferrer Montiel, Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

Da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral con mención Europea titulada: **“Efecto modulador de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre la respuesta inflamatoria y la traslocación bacteriana en la cirrosis”** presentada por Alba Moratalla Fernández.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Alicante, a 14 de Diciembre de 2015.

Fdo. D. Antonio Ferrer Montiel



A mis padres,

a Miguel,

a toda mi familia.



*“En la vida, no hay nada que temer,
solo hay que comprender”.*

Marie Curie

*“La verdadera ciencia enseña, sobre todo,
a dudar y a ser ignorante”.*

Miguel de Unamuno

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que de alguna forma han contribuido a la realización de esta tesis, sin cada una de ellas no lo habría logrado o simplemente no hubiera sido lo mismo. ¡Muchísimas gracias!

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Rubén y el Dr. Such, la oportunidad de formar parte de su laboratorio y confiar en mí para la realización de este proyecto. Gracias por vuestra ayuda y apoyo, y sobre todo por enseñarme tanto. Ha sido un placer compartir esto con vosotros.

Gracias al resto de compañeros del CIBER, ¡sin vosotros todo esto hubiera sido imposible! Pedro, gracias por aportar siempre tu punto de vista y esas lecciones de estadística tan valiosas; José Manuel, muchísimas gracias por tu apoyo incondicional siempre que lo he necesitado; Pauli, por ser el motor del laboratorio y enseñarme tanto, sobre todo al principio que iba tan perdida; Isabel, por enseñarme todo lo que sé de animalitos; Bea, por dejarme aprender tanto de ti y escucharme cuando lo he necesitado; Irma, fue breve pero me acuerdo perfectamente de cuando aún estabas en el laboratorio, enhorabuena por esa nueva etapa tan bonita; Jessy y Encarni; hace un tiempo ya que tuvisteis que cambiar de trabajo, pero hemos pasado muchos momentos bonitos y divertidos, gracias; Esther, llegaste al final pero ¡cuánto he aprendido contigo!, gracias por hacer todo tan fácil.

Durante estos años muchos estudiantes han pasado por el laboratorio, pero solo algunos ahora son compañeros: Oriol, Vicky, Claudia, Paula y Fran, muchas gracias por vuestro apoyo, espero que consigáis vuestros objetivos. ¡Mucha suerte!

Gracias también a las chicas del CIBER II o “chicas de Esther”, Mariavi, Laura y María, por hacerme un huequito para que escribiera la tesis estos últimos meses. Enhorabuena Mariavi, tú ya la tienes, ánimo al resto.

Gracias a los vecinos de la Unidad de Investigación, sobre todo al grupo de “colon”, y en especial a Carla, mi chica Vali+d. Sin ti seguro que hoy no estaría aquí, siempre te estaré agradecida por esa llamada para que te enviara mi CV. Te deseo lo mejor.

Gracias a todo el personal del animalario del campus de San Juan de la UMH por cuidar de los animales.

No me puedo olvidar de lo afortunada que soy al haber podido hacer dos estancias durante esta etapa pre-doctoral. Quería expresar mi agradecimiento al Dr. Agustín Albillos, de la Universidad de Alcalá de Henares, y al Dr. Rajiv Jalan, de la UCL-Royal Free Hospital de Londres, por la gran oportunidad de haber estado tres meses en sus respectivos laboratorios y haber aprendido tanto de su gente. ¡Han sido experiencias imborrables! En concreto quería agradecer a Leti, María y Marga lo tantísimo que aprendí de ellas y hacerme sentir como una más desde el principio; a Marta e Isi, simplemente por haberlas encontrado, y a Ana y Andreu, por ser mi familia, Londres sin vosotros hubiera sido muy duro.

También quería agradecerles a todos mis amigos su papel para que esta tesis haya llegado a su fin; me han aguantado, aconsejado y ayudado siempre que lo he necesitado. Sois una parte muy importante de mí, ¡muchísimas gracias!

Y por supuesto, a toda mi gran familia, por vuestro apoyo y confianza incondicional. A Miguel, por acompañarme, hacerme ver siempre lo que valgo y empeñarse en que tuviéramos al bichillo que nos alegra los días, Mango. A mis padres, sin vosotros nada hubiera sido posible, todo lo que consiga es vuestro. A todos, os quiero.

ABREVIATURAS

ADNbact: ADN bacteriano.

BDL: Ligadura del Conducto Biliar Común.

BGN: Bacilo Gram-negativo.

CCl₄: Tetracloruro de carbono.

CCR: Chemokine C-C motif Receptor.

CECT7765: *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765.

CGP: Coco Gram-positivo.

CXCR: Chemokine C-X-C motif Receptor.

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño.

DIS: Descontaminación Intestinal Selectiva.

E.coli: *Escherichia coli*.

GALT: Tejido Linfoide Asociado al Intestino.

GLMs: Ganglios Linfáticos Mesentéricos.

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.

HLA-DR: Human Leukocyte Antigen-DR.

IELs: Linfocitos Intraepiteliales.

IL: Interleucina.

IFN: Interferón.

KCs: Células de Kupffer.

LA: Líquido Ascítico.

LBP: LPS-binding protein.

LIs: Linfocitos Intestinales.

LPLs: Linfocitos de la *Lamina Propria*.

LPS: Lipopolisacárido.

M-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos.

MDM: Macrófagos Derivados de Monocitos.

MOs: Macrófagos.

Nflx: Norfloxacino.

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PBE: Peritonitis Bacteriana Espontánea.

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones.

Abreviaturas

SBI: Sobrecrecimiento Bacteriano Intestinal.

SI: Sistema Inmune.

α -SMA: alpha-Smooth Muscle Actin.

SRE: Sistema Retículo Endotelial.

TB: Traslocación Bacteriana.

TBP: TATA box Binding Protein.

TJP: Tight Junction Protein.

TLR: Receptor tipo *Toll*.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.





ÍNDICE

Index



RESUMEN / Summary	25
INTRODUCCIÓN / Introduction	31
1. INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA	33
1.1. Peritonitis Bacteriana Espontánea.	34
1.1.1. <i>Etiología y patogenia de la PBE.</i>	35
1.2. Traslocación Bacteriana.	37
1.2.1. <i>Patogenia de la TB.</i>	39
1.3. Profilaxis de la PBE.	45
1.3.1. <i>Uso del Norfloxacino en pacientes con PBE.</i>	46
2. INFLAMACIÓN ASOCIADA A LA CIRROSIS HEPÁTICA.	48
2.1. Inducción de inflamación sistémica en la cirrosis.	48
2.1.1. <i>Etiopatogénesis de la inflamación sistémica en la cirrosis.</i>	49
2.1.2. <i>Macrófagos.</i>	51
3. MEJORA DE LA HOMEOSTASIS INTESTINAL MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS EN CIRROSIS.	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS / Hypothesis and Objectives	57
HIPÓTESIS	59
OBJETIVOS	61
MÉTODOS / Methods	63
1. PACIENTES	65
2. MODELOS EXPERIMENTALES.	66
2.1. Animales.	66
2.2. Inducción de cirrosis experimental.	67
2.2.1. <i>Administración de CCl₄.</i>	67
2.2.2. <i>Ligadura del Conducto Biliar Común.</i>	67
2.3. Actuaciones sobre los modelos animales.	68

2.3.1. Administración de CECT7765.....	68
2.3.2. Administración de <i>E.coli</i>	68
2.3.3. Administración de FITC-LPS.	69
2.4. Laparotomía y toma de muestras.....	69
3. MANEJO Y CULTIVO DE <i>BIFIDOBACTERIUM PSEUDOCATENULATUM</i>	
CECT 7765.....	70
4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS EMPLEADAS.....	71
4.1. Estudio histopatológico.	71
4.2. Inmunohistoquímica.	72
4.3. Análisis de la expresión génica.	72
4.4. Análisis de la expresión proteica.....	73
4.5. Detección e identificación de ADN bacteriano.	75
4.6. Evaluación de niveles de endotoxina.	77
4.7. Análisis de la composición de la microbiota intestinal mediante PCR cuantitativa.	78
4.8. Aislamiento de linfocitos intestinales.	78
4.9. Cultivo de linfocitos intestinales.	79
4.10. Diferenciación de macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica.	80
4.11. Aislamiento de macrófagos de LA.....	81
4.12. Aislamiento de células de Kupffer de ratas con cirrosis inducida por CCl ₄ o BDL.....	81
4.13. Tratamiento in vitro de los macrófagos.	82
4.14. Capacidad bactericida de macrófagos de LA.....	84
4.15. Análisis de la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo en macrófagos.....	85
4.16. Micrografías de los cultivos de macrófagos.	86
4.17. Análisis estadístico.....	86

RESULTADOS / Results	87
ARTÍCULO 1: “Protective effect of <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis”. <i>Liver Int</i> , 2014.	89
ARTÍCULO 2: “ <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis”. <i>Eur J Nutr</i> , 2015.	101
ARTÍCULO 3: “ <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CECT7765 induces an M2 anti-inflammatory transition in macrophages from patients with cirrhosis”. <i>J Hepatology</i> , 2015.	113
DISCUSIÓN / Discussion	127
CONCLUSIONES / Conclusions	135
BIBLIOGRAFÍA / References	139





RESUMEN
Summary



Antecedentes

La traslocación bacteriana (TB) es un fenómeno frecuente en la cirrosis y es considerada el mecanismo por el que se desarrollan complicaciones graves de la enfermedad, tales como la peritonitis bacteriana espontánea (PBE). Los episodios de TB provocan una estimulación mantenida del Sistema Inmune (SI) y desencadenan un estado de inflamación, tanto a nivel intestinal como sistémico. Este estado favorece la progresión de la enfermedad y la aparición de complicaciones relevantes. La intervención sobre la microbiota intestinal, utilizando diferentes cepas bacterianas, se considera una estrategia suplementaria potencial para tratar la cirrosis y sus complicaciones.

Objetivos

Evaluar los efectos de la cepa *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 (CECT7765) sobre el tejido hepático, la pared intestinal y la tasa de TB en un modelo de cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄); discriminar el mecanismo de interacción entre CECT7765 y los linfocitos intestinales (LIs) utilizando este mismo modelo; y estudiar el efecto de CECT7765 sobre la función de macrófagos (MOs) humanos *in vitro*.

Métodos

Se realizaron dos protocolos de inducción de daño hepático experimental por la administración intragástrica de CCl₄ durante 12 semanas en ratones. En el primero, los animales recibieron CECT7765 a una concentración de 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC)/día o placebo, y a todos los animales se les administró además *Escherichia coli* (*E.coli*) (10⁷ UFC, dosis única) de forma intragástrica 24 horas antes de la laparotomía. En el segundo, recibieron concentraciones crecientes de CECT7765 (10⁷, 10⁹ o 10¹⁰ UFC/día) o placebo intragástricamente. En ambos casos, un grupo de animales que no recibieron tratamiento alguno actuaron como controles. En el tercer estudio, se incluyeron 10 pacientes con cirrosis y ascitis y 10 controles sanos. Se aislaron MOs derivados de monocitos (MDM) de sangre periférica y MOs de líquido ascítico (LA) y se estimularon *in vitro* con factor estimulante de colonias de MOs (M-CSF) (100 ug/ml), lipopolisacárido (LPS) (100 ng/ml) y/o CECT7765 (10⁴

UFC). También se evaluaron células de Kupffer (KCs) procedentes de ratas tratadas con CCl₄ y sometidas a ligadura del conducto biliar (BDL).

Resultados

La tasa de TB y los niveles de endotoxina en suero disminuyeron significativamente en animales tratados con CECT7765, mientras que los marcadores de integridad de la pared intestinal y algunos mediadores anti-inflamatorios en muestras de pared intestinal aumentaron de forma significativa, comparado con animales que solo recibieron CCl₄. Lis procedentes de ratones tratados con CECT7765 mostraron una reducción significativa en la expresión de receptores de quimiocinas pro-inflamatorias y una repolarización hacia un perfil anti-inflamatorio. Dicha modulación inflamatoria involucró al receptor tipo *Toll* (TLR)-2. En estos animales también se observó una reducción en la permeabilidad intestinal, evidenciada por una menor tasa de recuperación de FITC-LPS tras la administración de CECT7765. Por último, la inflamación y la función hepática mejoraron con la administración de CECT7765, aunque sólo a dosis altas (10¹⁰ UFC).

MDM y MOs procedentes de LA estimulados *in vitro* con CECT7765 mostraron cambios significativos a nivel morfológico y en la expresión de marcadores de superficie característicos de MOs tipo M2 (CD206, CD163 y CD16) comparados con la estimulación por LPS. El patrón de secreción de citocinas de MDM, MOs de LA y KCs de rata también fue significativamente modulado por la estimulación con CECT7765 comparado con LPS. CECT7765 aumentó la expresión de genes anti-inflamatorios en MOs de LA de pacientes con cirrosis, incluso tras el pretratamiento con LPS. CECT7765 no redujo la capacidad bactericida de los MOs de LA.

Conclusiones

La administración de CECT7765 se asocia con una mejora en la integridad de la pared intestinal y reduce la TB. Además, mejora la homeostasis intestinal, reduciendo la actividad pro-inflamatoria de los Lis en un modelo experimental de cirrosis. CECT7765 induce una transición morfológica, fenotípica y funcional de MDM de sangre periférica y de MOs de LA de pacientes con cirrosis.

Background

Bacterial translocation is a frequent event related to severe complications in cirrhosis. Bacterial translocation episodes cause a continuous stimulation of the Immune System, perpetuating both intestinal and systemic inflammation. Specific intestinal microbiota intervention, using different bacterial strains, is considered to be a potential supplementary strategy to ameliorate cirrhosis and its complications.

Objectives

The aim of this project was to evaluate the effects of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 strain (CECT7765) on hepatic and intestinal tissues, and its impact on bacterial translocation rate in an experimental model of cirrhosis. Additionally, we aimed to delineate the interaction between CECT7765 and intestinal lymphocytes in this model, as well as to study its effect on the function of human macrophages *in vitro*.

Methods

Two protocols of experimental liver damage were carried out by the intragastric administration of CCl₄ in mice during 12 weeks. In the first protocol, animals received CECT7765 with a concentration of 10⁹ CFU/day or placebo. In addition, all the animals were given *E.coli* (10⁷ CFU, in a single dose) intragastrically 24 hours before laparotomy. In the second protocol, animals received increasing amounts of CECT7765 (10⁷, 10⁹ or 10¹⁰ UFC/ day) or placebo intragastrically. In both cases, a control group of animals didn't receive any treatment. In a separate study, 10 patients with cirrhosis and ascites were included together with 10 healthy controls. Peripheral blood monocyte-derived and ascitic fluid macrophages were isolated and stimulated with M-CSF (100 ug/ml), LPS (100 ng/ml) and/or CECT7765 (10⁴ CFU) *in vitro*. Also, Kupffer cells from rats treated with CCl₄ and subjected to bile duct ligation were evaluated.

Results

Bacterial translocation rate and endotoxin levels were significantly reduced in animals treated with CECT7765, while intestinal wall integrity markers and anti-inflammatory mediators in intestinal wall samples were significantly increased compared with

Summary

animals receiving only CCl₄. Administration of CECT7765 significantly reduced the expression of pro-inflammatory chemokine receptors in intestinal lymphocytes and induced a repolarization towards an anti-inflammatory profile of these cells. TLR-2 was involved in this inflammatory modulation. The intestinal permeability reduction observed was validated by a lower LPS-FITC recovery rate after CECT7765 administration. Inflammation and liver function were improved by the CECT7765 treatment, but only with high doses (10¹⁰ UFC).

CECT7765-treated macrophages showed significant morphological changes and an increase in the expression of the M2-like macrophages surface markers CD206, CD163 and CD16, which was not observed after treatment with LPS. CECT7765 was also able to significantly change the cytokine secretion pattern of blood-derived and ascitic fluid macrophages, as well as of Kupffer cells from BDL and CCl₄ cirrhotic rats, compared with that induced by LPS. Moreover, CECT7765 led to the expression of anti-inflammatory genes in ascitic fluid macrophages even after LPS pretreatment. CECT7765 didn't reduce ascitic fluid macrophage capacity of bacterial killing.

Conclusions

CECT7765 administration is associated with the recovery of the intestinal wall integrity and reduced bacterial translocation rate. Also, it improves intestinal homeostasis reducing the pro-inflammatory activity of intestinal lymphocytes in an experimental model of cirrhosis. CECT7765 induces a morphological, phenotypic and functional transition of peripheral blood monocyte-derived and ascitic fluid macrophages of patients with cirrhosis towards an anti-inflammatory profile.



INTRODUCCIÓN

Introduction



1. INFECCIONES BACTERIANAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA.

Las infecciones bacterianas son una de las complicaciones más frecuentes e importantes que se desarrollan en pacientes con cirrosis hepática descompensada. Su incidencia en el momento del ingreso o durante la hospitalización es superior al 30% y contrasta con la de infecciones intrahospitalarias de la población general que oscila entre el 5 y 7% (1).

El desarrollo de una infección deteriora claramente el pronóstico de estos pacientes, convirtiéndose en causa común de muerte. De hecho, las infecciones bacterianas, o el uso de antibióticos como marcador subrogado de infección, son las variables independientes más importantes asociadas con el fallo en el control de la hemorragia por varices esofágicas (2).

Las infecciones más frecuentes en los pacientes cirróticos son la PBE, las infecciones del tracto urinario y la neumonía. En un 70-80% de los casos están causadas por bacilos aerobios Gram-negativos (BGN), principalmente *E.coli*, sugiriendo que la mayoría de las infecciones en la cirrosis son de origen entérico (3-5).

Las diversas descompensaciones que sufren los pacientes cirróticos obligan a su frecuente ingreso hospitalario, constituyendo la propia hospitalización un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones (6). Se estima que aproximadamente un 50% de los pacientes cirróticos que ingresan en un hospital presentan una infección bacteriana o la desarrollan durante la hospitalización (7).

La colonización de la flora intestinal por bacterias adquiridas en el hospital y el uso frecuente de Norfloxacino (Nflx) como profilaxis primaria o secundaria de la PBE en estos pacientes, así como al aumento en el grado de instrumentalización (accesos vasculares, TIPS, ligaduras de varices, tratamiento percutáneo del hepatocarcinoma, etc.) que suele ser necesario para el control de las complicaciones clínicas, adquieren relevancia a la hora de determinar los posibles focos de infección intrahospitalaria (8, 9). Este hecho ha adquirido gran importancia ya que se ha

observado un aumento en el porcentaje de episodios bacterianos asociados a cocos Gram-positivos (CGP) en pacientes hospitalizados sometidos a procedimientos invasivos (1).

No obstante, no solo los factores asociados o relacionados con la hospitalización influyen en el desarrollo de las infecciones bacterianas. Anomalías inmunitarias, tanto específicas como inespecíficas, la deficiencia funcional del sistema retículo endotelial (SRE) (7, 10-12), las hemorragias digestivas (7, 13) y la presencia de ascitis (10, 11, 14) parecen tener una importancia crucial en el desarrollo concomitante de infecciones.

Por tanto, las infecciones bacterianas en la cirrosis constituyen un problema de relevancia clínica, ya sea por su alta frecuencia como por la alta mortalidad asociada.

1.1. Peritonitis Bacteriana Espontánea.

La PBE es la complicación infecciosa más frecuente que desarrollan pacientes cirróticos con presencia de LA (5, 15). 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.

Se define como la infección bacteriana del LA en ausencia de focos de infección intraperitoneales tales como abscesos o perforación de víscera hueca que la justifiquen (16). Constituye entre un 10-30% de las infecciones bacterianas y se caracteriza por la existencia de un recuento celular en LA ≥ 250 leucocitos polimorfonucleares/mm³ con cultivo microbiológico positivo o negativo (5, 15). La práctica rutinaria de paracentesis en pacientes con cirrosis y ascitis ha mostrado que la prevalencia real de la PBE es de 7-31% (5).

Debido a la elevada mortalidad observada en los 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 pobre en comparación con aquellos que no han desarrollado la complicación (17).

La supervivencia a corto plazo en casos de PBE ha mejorado hasta ser prácticamente del 100% en ausencia de otras complicaciones. Sin embargo, la mortalidad aumenta cuando la PBE se asocia a complicaciones que agravan el estado clínico del paciente, como por ejemplo la insuficiencia renal (18), shock séptico o *acute-on-chronic liver failure* (ACLF). La probabilidad de recidiva de la PBE es superior al 50% durante el siguiente año (17, 19), con una probabilidad de supervivencia en torno al 20% a los dos años (5, 20, 21).

Por tanto, es necesario el diagnóstico precoz en los pacientes cirróticos que desarrollan una PBE e iniciar una profilaxis secundaria con antibióticos en aquellos que han sobrevivido a un primer episodio. De igual forma, sería muy importante prever qué pacientes presentan un mayor riesgo de infección bacteriana para actuar de forma profiláctica antes del desarrollo de la PBE.

1.1.1. Etiología y patogenia de la PBE.

Los episodios de PBE son producidos en su mayoría por bacterias de origen entérico en los casos de adquisición comunitaria. Los BGN están implicados en 68% de los episodios con cultivo positivo, siendo *E.coli* el germen aislado con mayor frecuencia y presente en un 45% de los cultivos (1), seguido de *Klebsiella pneumoniae*. Por otra parte, los CGP, principalmente *Streptococcus pneumoniae* o *Enterococcus* (22), son más prevalentes en pacientes con episodios de PBE de origen nosocomial, especialmente si han sido sometidos a procedimientos invasivos o admitidos en una unidad de cuidados intensivos. También se pueden detectar estos gérmenes en pacientes que reciben tratamiento profiláctico para la PBE, sobre todo en aquellos que reciben tratamiento con quinolonas a largo plazo (13, 23). El

hallazgo de microorganismos anaerobios es, sin embargo, un evento infrecuente y se relaciona con otro tipo de peritonitis secundaria a tratamiento quirúrgico (5).

Por lo tanto, el lumen intestinal es la fuente de la mayoría de las bacterias que desencadenan la PBE (5, 15, 24), como se ha observado en los resultados obtenidos tras el cultivo de LA de pacientes con PBE, en los que las bacterias más frecuentemente aisladas fueron BGN (25). Así mismo, se conoce que el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) es un fenómeno común en pacientes con cirrosis (26). Además, se ha observado que la descontaminación intestinal selectiva (DIS) mediante la administración de antibióticos orales poco o no absorbibles como el Nflx, que disminuye el paso de BGN de origen gastrointestinal al LA, producen una reducción significativa de la incidencia de la PBE (23, 27).

Sin embargo, la neumonía y las infecciones de tejidos blandos también han sido sugeridos como fuente de microorganismos en casos de PBE (y bacteriemia) debidos a CGP (28, 29). Esta posibilidad se ve respaldada por la reciente descripción de la mayor incidencia de episodios de PBE debidos a CGP en pacientes hospitalizados (1).

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 diversos mecanismos, que permite a las bacterias su salida del lumen intestinal y alcanzar la circulación sistémica antes de colonizar el LA.

Sin embargo, la llegada de bacterias al LA no implica necesariamente el desarrollo de una infección ya que este posee capacidad bactericida y opsonizante propias que se relacionan principalmente con el sistema de Complemento y la presencia de anticuerpos específicos y fibronectina. Varios estudios han demostrado que los pacientes cirróticos con niveles bajos de proteínas en LA, niveles bajos de la fracción C3 del Complemento y, por tanto, de la capacidad bactericida, están predispuestos al desarrollo de PBE (5, 10, 11, 14). La insuficiencia hepática es uno de los mecanismos que se asocia a estas alteraciones en la inmunidad humoral, ya que los factores del Complemento son sintetizados en el hígado. La frecuente presencia de

grandes volúmenes de LA en los pacientes cirróticos pueden determinar una disminución por dilución de la concentración de sustancias responsables de la inmunidad humoral (10, 14).

También se han descrito alteraciones de la inmunidad celular y anomalías en la funcionalidad de los neutrófilos (30, 31), que podrían predisponer a estos pacientes cirróticos al desarrollo de una infección bacteriana.

Estos mecanismos implicados en la patogénesis de la PBE actúan favoreciendo el SBI y promoviendo alteraciones en la morfología y en la permeabilidad de la pared intestinal, y en consecuencia la aparición de este fenómeno. En la **figura 1** se esquematizan los mecanismos que podrían estar involucrados en el desarrollo de la PBE.

1.2. Traslocación Bacteriana.

La hipótesis más aceptada en la actualidad para explicar la patogenia de la mayoría de las infecciones bacterianas, entre ellas la PBE, en los pacientes cirróticos es la TB (32). La TB es el fenómeno por el que bacterias viables o sus productos son capaces de atravesar la barrera intestinal y acceder a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y de allí pasar a la circulación sanguínea y otros órganos extraintestinales, como el LA (33, 34).

Se estima que la TB está presente en un 30-35% de los pacientes cirróticos con mala función hepatocelular según los estudios clínicos (35), y hasta en un 50-60% de las ratas con cirrosis inducida con CCl₄ y ascitis, reduciéndose este porcentaje a 0-10% en animales control (36).

La TB es por tanto, un evento común y recurrente que se produce en la cirrosis, y además de ser un fenómeno clave en la patogenia de muchas de las infecciones en pacientes cirróticos (33, 35, 37, 38) juega un papel en las alteraciones hemodinámicas e inmunológicas de la cirrosis.

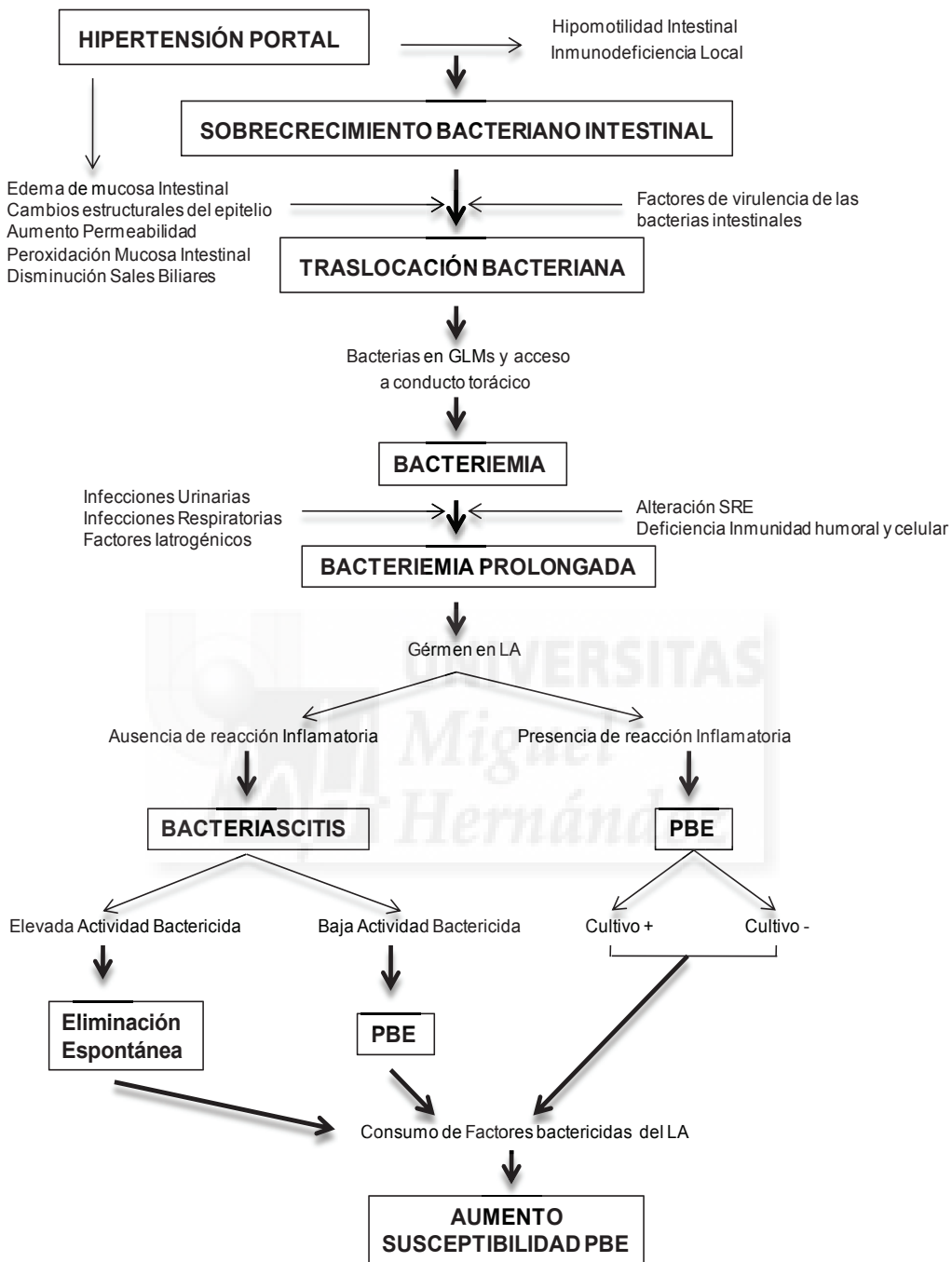


Figura 1. Resumen de los mecanismos patogénicos que conducen al desarrollo de una PBE. Such y Runyon, 1998.

Uno de los experimentos que más claramente demuestran la traslocación de bacterias a GLMs fue descrito por Teltschik *et al.* utilizando *E.coli* marcada con proteína verde fluorescente (GFP) y administrada por vía oral a ratas con cirrosis. Las bacterias podían observarse no sólo en el lumen intestinal, sino también en los GLMs y en LA (39).

Por todo ello, y dado que la TB es un factor clave para el desarrollo de infecciones bacterianas y otras complicaciones de la cirrosis, se han realizado varios estudios encaminados a determinar marcadores indirectos de TB en humanos. Algunos ejemplos son la cuantificación de la proteína transportadora de LPS (LPS-binding protein, LBP) (40) o la detección del ADN bacteriano (ADNbact) (41). La presencia de estos antígenos no se asocian sin embargo a un incremento en el riesgo de desarrollo de infecciones, aunque sí a un deterioro pronóstico (42).

En los pacientes cirróticos con ascitis, la traslocación de productos bacterianos (endotoxina y ADNbact) estimulan de forma mantenida el SI, provocando un aumento de citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , y la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la circulación esplácnica y sistémica (33). Ésta activación sostenida del SI explica en parte la gran respuesta inflamatoria que presentan los pacientes cirróticos descompensados ante las infecciones en comparación con la respuesta en pacientes no cirróticos.

1.2.1. Patogenia de la TB.

Los mecanismos que influyen en la patogenia de la TB son fundamentalmente tres: cambios en la composición de la microbiota intestinal, tanto cuantitativos (SBI) como cualitativos; una alteración en la respuesta inmune local y sistémica; y cambios en la permeabilidad de la barrera intestinal (**Figura 2**).

Todos ellos favorecen el paso de bacterias endógenas desde el intestino a la circulación sistémica y portal, convirtiendo al intestino en la mayor fuente de bacterias causantes de PBE en pacientes con cirrosis (43). Este hecho indica una

posible implicación de la microbiota intestinal en el desarrollo de episodios de TB (Figura 3).

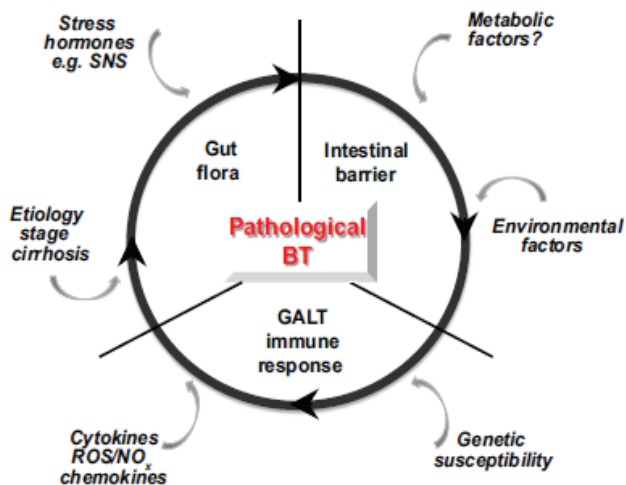


Figura 2. Mecanismos y factores involucrados en la TB patológica en la cirrosis. Wiest *et al*, J.Hepatol. 2014, 60:197-209.

A) Sobrecrecimiento bacteriano intestinal.

En condiciones normales, existen diversos mecanismos que previenen el sobrecrecimiento de las bacterias intestinales como son el peristaltismo, el ácido gástrico, las enzimas proteolíticas del intestino delgado, el moco intestinal, la integridad de la válvula íleocecal y un correcto funcionamiento del SI (44-47).

Si se produce una alteración en alguno de estos factores puede desarrollarse un crecimiento bacteriano excesivo, fenómeno que se denomina SBI y que se caracteriza, como su nombre indica, por un crecimiento de la flora bacteriana intestinal, pudiendo referirse tanto a la población global como a una especie bacteriana en concreto. El SBI ha sido definido de forma arbitraria como $>10^5$ UFC/ml y/o la presencia de bacterias colónicas en aspirado yeyunal superior (48).

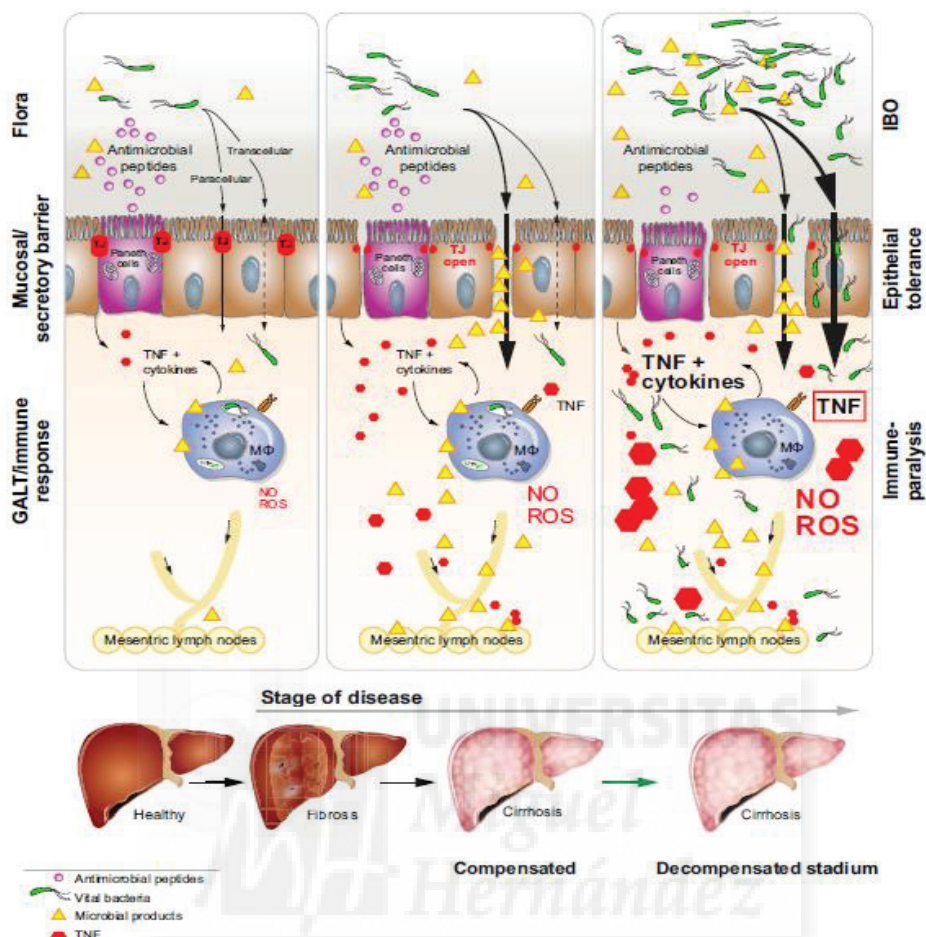


Figura 3. Estadios del daño hepático e hipótesis del desarrollo de la TB. Wiest *et al*, J.Hepatol. 2014, 60: 197-209.

Estudios experimentales han demostrado que las ratas cirróticas con ascitis y TB presentan una tasa de SBI mayor que la de los animales sin TB (49). Por el contrario, en ratas con ausencia de SBI la TB ocurre raramente (0-11%) y es comparable a la observada en ratas control. Sin embargo, el hecho que la TB no esté presente en un 50% de las ratas con SBI sugiere que otros factores, además del SBI, intervienen en la patogénesis de la TB.

Entre el 30% y el 50% de los pacientes con cirrosis avanzada presentan colonización bacteriana en tramos altos intestinales (26), y la prevalencia de SBI varía entre un

30-70% (50), siendo superior en pacientes Child-Pugh C y con ascitis (12, 13). Estudios realizados en pacientes con cirrosis han demostrado que el SBI es más frecuente en pacientes cirróticos que en pacientes control, especialmente en aquellos con mayor grado de insuficiencia hepática (51) y en aquellos con antecedentes de PBE (52). Sin embargo, en estos estudios el SBI se estimó mediante el test de aliento, que no es un método completamente fiable para su diagnóstico. La importancia del SBI en el desarrollo de TB está apoyada 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 (27).

B) Aumento de la permeabilidad intestinal.

La barrera intestinal es una estructura física y funcional formada por un componente mucinoso, secretado por las células epiteliales, y por el epitelio intestinal, que forma una capa con uniones intercelulares estrechas (*tight junctions*) que permiten el paso selectivo de sustancias. En la cirrosis se producen alteraciones estructurales y funcionales en la barrera intestinal, quizás como consecuencia de la estasis vascular secundaria a la hipertensión portal (49, 53), que podrían aumentar la permeabilidad intestinal a bacterias y sus productos, como la endotoxina.

Se han descrito alteraciones estructurales de la mucosa intestinal tales como edema, inflamación y cambios vasculares, en relación a la cirrosis tanto en ratas (54) como en pacientes (55). Nuestro grupo ha podido comprobar la existencia de dilataciones de los espacios intercelulares del duodeno distal, con un sellado completo de las áreas apicales de enterocitos por integridad anatómica de las uniones intercelulares estrechas y un acortamiento de las microvellosidades (56).

En otro estudio, nuestro grupo ha demostrado que los pacientes cirróticos, especialmente aquellos con una enfermedad hepática más grave, presentan un grado de permeabilidad mayor que los controles sanos o que los pacientes con cirrosis compensada, estudiado mediante el test de lactulosa/manitol (57).

Se ha observado que el daño oxidativo de la mucosa intestinal, probablemente relacionado con la hipoxia local debida a la hipertensión portal, se asocia con una permeabilidad intestinal alterada, favoreciendo la TB en varios modelos experimentales de hipertensión portal, incluyendo la cirrosis (58, 59).

Además, nuestro grupo ha demostrado que el bloqueo del TNF- α , una de las citocinas más relevantes implicadas en el fenómeno de la inflamación, disminuye significativamente los episodios de TB en un modelo de cirrosis en ratas (60).

Por último, la endotoxemia (presencia en sangre periférica de LPS, constituyente de la pared bacteriana de BGN), asociada a pacientes con enfermedad hepática avanzada y ascitis (61), se relaciona con una capacidad incrementada de dichas bacterias a atravesar la pared intestinal y parece promover la TB por un mecanismo no totalmente establecido. Se cree que actúa alterando la inmunidad del huésped, produciendo una alteración linfocitaria y depresión de del SRE. De esta forma, quedaría establecida la relación entre SBI y alteración de la permeabilidad intestinal (62, 63).

C) *Alteración de la respuesta inmune local y sistémica.*

Para que la TB sea clínicamente relevante es necesario que haya alteraciones en la inmunidad local y sistémica. La cirrosis se asocia con una respuesta inmune disminuida tanto a nivel local como sistémico, lo cual facilitaría que bacterias trasladadas desde la luz intestinal pudieran alcanzar la circulación sistémica e infectar otros órganos y tejidos.

Además del efecto mecánico protector de la mucosa intestinal, el paso de bacterias y endotoxinas a través de la misma depende del estado del tejido linfóide asociado al intestino (*gut associated lymphoid tissue*, GALT). El GALT representa la mayor masa de tejido linfóide del organismo. Se estima que el intestino contiene el 70-80% del total de las células linfoides y produce más anticuerpos que cualquier otro órgano del cuerpo (64), por lo que constituye un elemento de gran importancia en la capacidad inmunológica total del huésped. El GALT lo integran las Placas de Peyer, los GLMs,

los linfocitos de la *lamina propria* (LPLs) y los linfocitos intraepiteliales (IELs). Estos componentes definen dos compartimentos morfológicos y funcionales según su papel dentro de la respuesta inmune: uno se denomina tejido linfoide organizado y es el lugar donde se induce la respuesta (Placas de Peyer y GLMs); y otro se denomina tejido linfoide difuso y consiste en linfocitos dispersos por el epitelio y la *lamina propria* (IELs y LPLs), constituyendo el lugar de la respuesta inmune efectora (65, 66).

Dado que las bacterias intestinales son las responsables de un gran número de infecciones en pacientes inmunodeprimidos (67-69), 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 (70).

Las múltiples alteraciones inmunitarias sistémicas que presentan los pacientes cirróticos sugieren que la barrera inmunitaria intestinal esté probablemente poco preservada. De hecho se ha demostrado la existencia de una correlación inversa entre el número de células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina A (IgA) en la pared intestinal y la incidencia de TB (71). 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 (72), lo que constituye el primer paso en el proceso de la TB.

Por otra parte, las alteraciones en la funcionalidad de los MOs, principalmente relacionado con su capacidad lítica frente a bacterias (73), también se han asociado a la aparición de TB, puesto que los gérmenes que atraviesan el epitelio intestinal no serían destruidos y podrían en teoría acceder de forma viable a los GLMs (74) y posteriormente acceder a la circulación sistémica. La modulación del SI mediante el uso de corticoides e inmunomoduladores puede aumentar la colonización de los enterocitos con BGN, aumentando la permeabilidad intestinal a los mismos (75).

Además, la capacidad de los GLMs de eliminar las bacterias traslocadas parece estar disminuida en pacientes con cirrosis, puesto que la estimulación farmacológica de los MOs locales permite disminuir la TB (76). En este tipo de pacientes, las

bacterias pueden sortear en algunos casos el filtro que suponen los GLMs y acceder de este modo a la circulación sistémica.

Una vez que las bacterias alcanzan el torrente sanguíneo, será la capacidad de los mecanismos defensivos de la sangre de eliminarlas la que determine el resultado final de dicha colonización, mediante una combinación de los mecanismos humoral y celular. Esta capacidad defensiva se encuentra alterada en los pacientes con cirrosis, que presentan una reducida actividad quimiotáctica (77), baja síntesis de los factores del sistema del Complemento (11) y de la fibronectina (78), haciendo menos efectivo este mecanismo inmune de primera línea.

En condiciones normales, las bacterias que alcanzan la circulación sistémica son eliminadas por el SRE, localizado principalmente en el hígado y representado fundamentalmente por las KCs (79). En cirróticos la capacidad funcional del SRE está disminuida de manera importante respecto a los sujetos sanos (12). Además se ha relacionado una mayor gravedad de la enfermedad hepática con un incremento de la disfunción del SRE, así como con un mayor riesgo de bacteriemia y/o PBE, unido a una disminución en la supervivencia de estos pacientes (80).

En el caso de la PBE, 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 (81) y superior a la del LA de pacientes con cirrosis (82). La llegada de bacterias al LA induce la activación de los mecanismos bactericidas humorales del mismo, especialmente la vía alternativa del sistema del Complemento.

1.3. Profilaxis de la PBE.

Como la PBE está producida fundamentalmente por BGN aerobios facultativos de origen entérico (83, 84), el método profiláctico más utilizado es la administración de antibióticos orales que inhiben selectivamente el crecimiento de dichas bacterias en la flora intestinal (13, 23, 50, 85-88) y disminuyen en lo posible el fenómeno de la TB.

Este proceso de DIS se ha utilizado ampliamente en la prevención de la PBE en cirróticos (23, 50, 87-89).

Aunque se han ensayado diferentes antibióticos (23, 86-88, 90), el uso de Nflx ha demostrado una reducción importante de la incidencia de TB y de PBE por BGN, tanto en modelos experimentales con ratas cirróticas (91, 92) como en pacientes sometidos a DIS con esta fluoroquinolona (13, 23, 85).

1.3.1. Uso del Norfloxacin en pacientes con PBE.

El uso de Nflx está ampliamente aceptado en la práctica clínica. La prevención de los episodios de PBE y de las infecciones bacterianas en general se basa en una profilaxis primaria cuando los pacientes desarrollan una hemorragia digestiva alta (13) y en determinados grupos de riesgo (93). La profilaxis secundaria se aplica en aquellos pacientes que han sobrevivido a un primer episodio de PBE (94).

El Nflx ha demostrado ser un fármaco muy apropiado en la DIS a largo plazo puesto que se absorbe poco en el intestino, es muy activo frente a microorganismos aerobios Gram-negativos, presenta baja actividad frente a gérmenes anaerobios y posee una baja incidencia de reacciones adversas cuando se administra durante largos periodos de tiempo. La DIS con Nflx en pacientes con cirrosis descompensada, reduce de forma importante la flora aerobia Gram-negativa, mientras que no afecta a la flora anaerobia y a la Gram-positiva aerobia (23). En este estudio de Ginés *et. al.*, la presencia constante de niveles bactericidas de Nflx en suero y, supuestamente, en LA, podría explicar al menos en parte la eficacia de este fármaco en la prevención de la PBE.

Sin embargo, el uso prolongado de la DIS con Nflx se puede asociar con el desarrollo de infecciones por BGN resistentes a las quinolonas (1), o por gérmenes Gram-positivos que pueden estar en situación de sobrecrecimiento al encontrar un ecosistema más favorable, tras la reducción de los BGN en la luz intestinal. El problema por tanto de la utilización continuada de quinolonas en la profilaxis de PBE es la posibilidad de seleccionar bacterias resistentes a estos antibióticos y de que los

microorganismos intestinales, inicialmente sensibles, desarrollen resistencias (95, 96). Este hecho se ha asociado con un fallo en el control de la infección por parte de la terapia antibiótica y un aumento en la mortalidad (97). Se ha demostrado que el desarrollo de resistencias puede ocurrir durante los primeros 45 días de tratamiento antibiótico (98).

Para ejercer su efecto citotóxico las quinolonas deben penetrar a través de la membrana bacteriana y alcanzar su diana celular, la topoisomerasa II (DNA girasa) o la topoisomerasa IV, e inducir la muerte de la célula. Por ello, los mecanismos de resistencia a las quinolonas incluyen (99-102): mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV, alteraciones en la permeabilidad de la membrana que disminuyen la penetración intracelular del antibiótico y la actividad de transportadores activos endógenos que provocan la expulsión de los antimicrobianos al medio extracelular.

Aunque la relevancia clínica de este problema no está bien establecida, se ha podido constatar un incremento en la incidencia de episodios de PBE por organismos resistentes a las quinolonas, principalmente *Pseudomonas spp* y bacterias Gram-positivas, en pacientes cirróticos que reciben profilaxis con Nflx (50, 103).

La DIS ocasiona una eliminación masiva de la flora bacteriana intestinal Gram-negativa ocasionando una disbiosis que se relaciona con los problemas asociados a su uso prolongado, tal y como se detalla en este apartado. Existen estudios experimentales que inciden en mecanismos alternativos de prevención de la TB en la cirrosis, evitando el efecto negativo sobre la flora intestinal y la generación de resistencias de los antibióticos. Muchos de estos estudios se centran en la modificación de la microbiota intestinal mediante la administración de cepas bacterianas que restituyan la homeostasis intestinal, tanto en modelos experimentales como en pacientes con PBE.

2. INFLAMACIÓN ASOCIADA A LA CIRROSIS HEPÁTICA.

La cirrosis hepática se caracteriza por una inflamación sistémica como consecuencia de una activación persistente e inadecuada del SI (70). Los cambios estructurales del hígado propios de la enfermedad, el aumento de la tasa de TB y el daño del SI intestinal asociados a la cirrosis intervienen en la patogénesis de dicha inflamación sistémica, caracterizada por un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias y una sobreexpresión de los marcadores de activación de las diferentes células inmunes.

2.1. Inducción de inflamación sistémica en la cirrosis.

En la **tabla 1** se resumen las evidencias existentes que apoyan la asociación entre cirrosis e inflamación sistémica.

Hallazgo	Referencias
Aumento del estallido oxidativo de los neutrófilos.	(104)
Aumento de la expresión de antígenos de superficie de activación/coestimulación en las células del SI en circulación (CD11b en neutrófilos, HLA-DR o CD80/86 en las células presentadoras de antígeno, CD134 en la células T o pérdida de CD62L o CD45RC en células T).	(105-109)
Aumento de la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , INF- γ , IL-17) por parte de células del SI en circulación (monocitos, células T y B).	(106, 107, 110-112)
Aumento de los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ , IL-17, IL-18) o receptores (sTNFR1, IL1sRI, LI1Ra, sCD14, Fas-R) en suero.	(106, 107, 110, 113-118)
Aumento de los niveles de reactantes de fase aguda en suero (LBP, CPR).	(106, 113, 119, 120)
Aumento de los niveles de moléculas de activación endotelial en suero (ICAM-1, VCAM-1, VEGF, nitratos/nitritos).	(106, 113, 118, 120)

Tabla 1: Evidencias de inflamación sistémica persistente en cirrosis. Albillos *et al*, J.Hepatol. 2014, 61(6):1385-96.

A través de estos mecanismos, las células inflamatorias del SI pueden dañar células somáticas e influir en el curso clínico de la cirrosis. De hecho, la severidad de la inflamación sistémica varía paralelamente con la progresión de la cirrosis, evaluada por la escala Child-Pugh (115, 121-123), y es particularmente intensa en cirrosis con ascitis (40, 106, 107).

La capacidad de las citocinas pro-inflamatorias de modular el tono vascular es un ejemplo de las consecuencias de la inflamación sistémica en la evolución clínica de la cirrosis, provocando un empeoramiento de la vasodilatación esplénica y sistémica a través de la sobreproducción de óxido nítrico (124). De hecho, la severidad de la vasodilatación esplénica y periférica es superior cuando se asocia a fenómenos de TB y ascitis tanto en pacientes como modelos animales (40, 116, 125). Además, la DIS reduce los niveles de óxido nítrico y la actividad de la renina en plasma, y mejora la vasodilatación periférica en pacientes con cirrosis, ascitis y niveles altos de LBP en suero (40, 126).

La encefalopatía hepática y la fatiga asociada a la cirrosis también se ven afectadas por la inflamación sistémica. La producción de citocinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de células activadas en el cerebro activan MOs residentes, modificando la función cerebral (127-129).

La inflamación sistémica también puede afectar a la función del riñón (130). La inflamación que media la disfunción microvascular renal puede reducir el filtrado glomerular. Además, el estrés oxidativo inducido por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) puede dañar la función tubular y causar daño renal agudo en pacientes con infección bacteriana severa (131, 132).

2.1.1. Etiopatogénesis de la inflamación sistémica en la cirrosis.

La inflamación sistémica se inicia en el intestino cuando bacterias del lumen intestinal atraviesan el epitelio. No sólo bacterias vivas, sino el flujo de PAMPs, como LPS, lipopeptidos, glicopolímeros, flagelina y ADNbact, a la circulación

hepatoesplácica contribuyen a la respuesta inflamatoria sistémica (40, 61, 133, 134). Los PAMPs procedentes de microorganismos entéricos y/o los DAMPs que se forman en los tejidos tras haber sido dañados, son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) del huésped, como los TLRs y los receptores tipo *NOD*, expresados mayoritariamente en células relacionadas con la inmunidad innata del huésped. En cirrosis, la activación de las células inmunes a través de PRRs ocurre en el GALT, en los GLMs y en sangre periférica. Por lo que, las células ya activadas en GALT y GLMs alcanzarán el torrente sanguíneo y diseminarán sistémicamente la respuesta inflamatoria (107, 109) (**Figura 4**).

Tras la interacción de los PRRs con su ligando, se desencadena una respuesta transcripcional que lleva a la síntesis de un amplio abanico de moléculas, incluyendo receptores de citocinas, moléculas de adhesión (moléculas de activación de superficie en las células inmunes del huésped), citocinas pro- y anti-inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento, modulando de esta forma la respuesta inmune adaptativa. Entre las consecuencias de la activación de células inmunes a través de los PRRs se incluyen: aumento de la actividad fagocítica (104), daño del endotelio vascular (61, 113, 118), síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado (106, 113), quimiotaxis de leucocitos al sitio de inflamación, principalmente al hígado, y activación de los leucocitos a nivel sistémico. La expresión de los diferentes tipos de TLRs es diferente entre las células del SI innato en cirrosis con ascitis (135, 136).

Existen evidencias que apoyan el hecho de que las bacterias y PAMPs procedentes del intestino intervienen en la patogénesis de la inflamación sistémica. El grado de expansión de monocitos, células T CD4⁺ activadas, y células B de memoria en sangre periférica se puede correlacionar con marcadores subrogados de TB, como los niveles LBP o sCD14 en suero (40, 106, 137). Además, la DIS con antibióticos normaliza los niveles de células inmunes activadas en la circulación y disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias en GLMs y sangre en modelos experimentales y pacientes con cirrosis (40, 106, 107).

Por otra parte, los DAMPs y las partículas estériles liberadas por los hepatocitos necróticos también pueden contribuir a la respuesta inflamatoria asociada a la cirrosis (138). Debido al tamaño del hígado y a la extensión de la lesión observada

en cirrosis se puede considerar que una gran cantidad de DAMPs pueden alcanzar la circulación y favorecer la inflamación sistémica (**Figura 4**). De hecho, la inflamación sistémica está presente, aunque en bajo grado, en el estado preascítico de la cirrosis experimental y humana, cuando la BT aún no es crítica (40, 109).

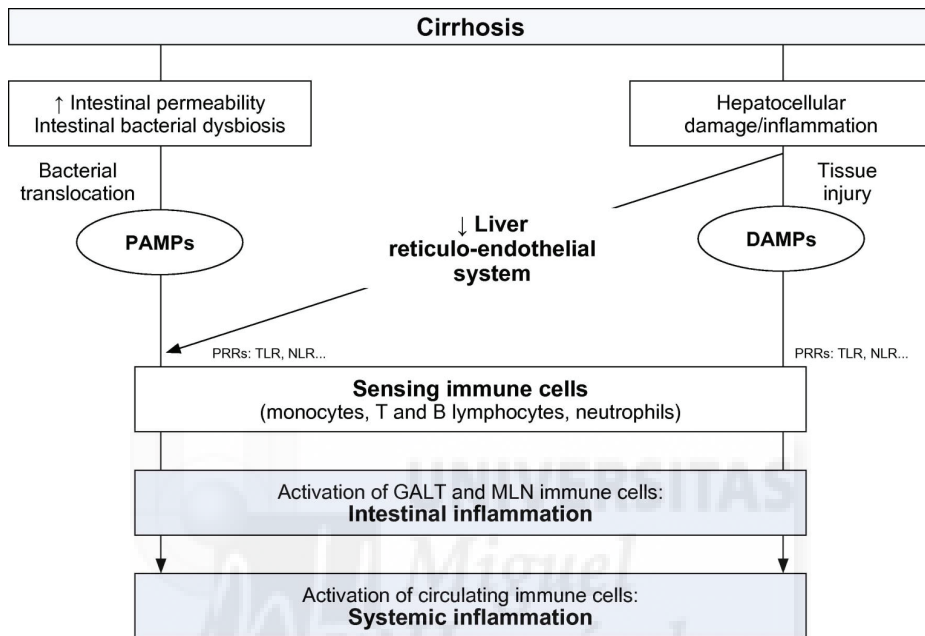


Figura 4. Patogénesis de la inflamación sistémica en la cirrosis. Albillos *et al*, J.Hepatol. 2014, 61(6):1385-96.

2.1.2. Macrófagos.

Entre los diferentes tipos celulares implicados en la respuesta inmunológica, los MOs juegan un papel crítico en la respuesta inflamatoria del SI innato.

Los MOs actúan como primera barrera de defensa, al detectar y eliminar partículas “extrañas” (microorganismos, macromoléculas tóxicas, células propias dañadas o muertas) mediante fagocitosis o secreción de enzimas, citocinas o producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (139). Durante la respuesta inmunitaria adaptativa, los MOs presentan antígenos a los linfocitos T en el contexto de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-II y/o MHC-I, y colaboran con la

respuesta humoral en la eliminación de agentes extraños (140). Además, los MOs tienen un papel importante en procesos de reparación de heridas y resolución de la inflamación, promoviendo el reclutamiento de otras células inflamatorias hacia los focos de inflamación, así como la remodelación de matriz extracelular y angiogénesis. En consecuencia, la finalidad de los MOs es el mantenimiento de la homeostasis y la integridad tisular (141).

Los MOs se originan a partir de HSC (*hematopoietic stem cells*), y derivan en su mayoría de monocitos circulantes que se extravasan a los tejidos en respuesta a citocinas y quimiocinas (142). El fenotipo de los MOs residentes en los tejidos está determinado por el microambiente tisular, la matriz extracelular y los productos de secreción y moléculas de superficie de las células próximas (143).

Las principales citocinas que determinan la supervivencia, diferenciación y quimiotaxis de los MOs son el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), M-CSF y la interleucina (IL)-3 (141, 144). El M-CSF es sintetizado constitutivamente en MOs, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, células del estroma, y otras células, y su concentración en suero oscila entre 3-8 ng/ml (145). Por otro lado, el GM-CSF es producido por linfocitos T y B, MOs, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y células endoteliales (144), y en condiciones fisiológicas se encuentra en suero a una concentración de 20-100 pg/ml (146).

GM-CSF y M-CSF presentan una modulación cruzada de sus respectivas actividades funcionales: mientras que el M-CSF aumenta la generación de MOs en presencia de bajos niveles de GM-CSF (147), altas concentraciones de esta última impiden el desarrollo de MOs mediado por M-CSF, debido a la acción inhibitoria de GM-CSF sobre la expresión del receptor de M-CSF (148, 149). Aunque los MDM humanos diferenciados en presencia de GM-CSF o M-CSF *in vitro* se consideran equivalentes a los MOs residentes en los tejidos en condiciones homeostáticas, ambas citocinas se usan indistintamente en la generación *in vitro* de MDM, dando lugar a poblaciones fenotípica y funcionalmente diferentes (142). Así, en presencia de GM-CSF se generan MOs denominados M1, que producen citocinas pro-inflamatorias (IL-23, IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF α) en respuesta a *Mycobacterium*, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y promueven la inmunidad tipo Th1 (150,

151). Sin embargo, los MOs inducidos por M-CSF o M2 secretan IL-10 en respuesta a estímulos externos, inhiben respuestas Th1, y se han implicado en la inducción de tolerancia (150-152). Los MOs M2 actúan como moduladores de autoinmunidad, ya que inducen células Treg e inhiben la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 (153). La activación clásica de MOs M1 se induce en respuesta a ligandos de TLRs e interferón (IFN)- γ , mientras que la activación alternativa de MOs M2 se induce en respuesta a IL-4/IL-13, IL-10 y complejos inmunes, entre otras señales (154).

Esta plasticidad de los MOs establece la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas basadas en la repolarización de los MOs (154, 155).



3. MEJORA DE LA HOMEOSTASIS INTESTINAL MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS EN CIRROSIS.

El uso de cepas bacterianas como estrategia para la prevención de la TB o la reducción de la inflamación en la cirrosis ha emergido en los últimos años. Las cepas más estudiadas son de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

Aunque no se conocen por completo los mecanismos por los que las cepas bacterianas ejercen su efecto, parecen contribuir en la restauración de las alteraciones de la permeabilidad intestinal, la composición de la microbiota y la respuesta inflamatoria (156).

Algunas cepas de *Bifidobacterium* parecen estar implicadas en la protección del hospedador, previniendo el aumento de la permeabilidad intestinal y promoviendo un ambiente libre de patógenos en los microvilli del intestino (157, 158). Por su parte, las cepas de *Lactobacillus* se relacionan con la mejora de los mecanismos de respuesta inmune (159, 160) y la restauración de la función de los neutrófilos (161). En algunos estudios, el uso de diferentes combinaciones de estas cepas bacterianas dio lugar a la reducción de inflamación hepática y endotoxemia en pacientes con encefalopatía hepática y cirrosis (162), y se asoció con la restauración de la flora intestinal y una mejoría de la lesión hepática inducida por alcohol (163).

Sin embargo, otros estudios no mostraron resultados beneficiosos asociados a la suplementación con cepas bacterianas, poniendo en relieve la controversia existente a cerca de su uso en este contexto. La suplementación con combinaciones de diferentes cepas bacterianas no mostró beneficios en pacientes con cirrosis compensada, de acuerdo a variables clínicas y analíticas (164), y cuando se añadieron al tratamiento de la profilaxis de la PBE con Nflx, no mejoró la eficacia del tratamiento ni redujo la mortalidad en pacientes con cirrosis y ascitis (165).

Estudios previos han investigado la modulación de la fibrosis hepática tras la administración de preparados con diferentes cepas bacterianas. VSL#3 atenuó la fibrosis, aunque no mostró efecto sobre los marcadores hepáticos de inflamación, en

un modelo murino de esteatosis no hepática inducida por la dieta (166). Otro estudio mostró una reducción de la peroxidación lipídica y la secreción de TNF- α por el aumento de la actividad de los MOs en ratones tratados con CCl₄ y *Lactobacillus* enriquecido en selenio (167).

Otros estudios se han centrado en estudiar la relación entre la administración de cepas bacterianas y la tasa de TB, obteniéndose diferentes resultados. La administración de un preparado *simbiótico*, incluyendo varias cepas de *Lactobacillus*, redujo la inflamación hepática y endotoxemia en pacientes con encefalopatía hepática y cirrosis (162), mientras que en modelos experimentales, la endotoxemia y la severidad del daño hepático se redujeron con la administración de *Lactobacillus spp.* (168). Por otra parte, aunque inicialmente la administración de *Lactobacillus johnsonii* junto con antioxidantes se asoció a una reducción de la TB a través de la disminución de SBI y el daño oxidativo intestinal en ratas sometidas a cirrosis experimental (169), recientemente el mismo grupo ha demostrado que sin la combinación con antioxidantes, *Lactobacillus johnsonii* no reduce la TB en estos animales (170). De forma similar, otro grupo demostró que la administración de *Lactobacillus spp.* no previene los episodios de TB en un modelo de cirrosis experimental de rata (171).

Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 (CECT7765) es una cepa que nunca ha sido testada en la cirrosis. Sin embargo, ha mostrado efectos positivos sobre la disfunción metabólica e inmunológica asociada a la obesidad (172), mediante la modificación de la expresión de reguladores clave para el metabolismo lipídico y de la glucosa en el hígado (173) y reduciendo la inflamación asociada a la obesidad, mediante la restauración del equilibrio entre linfocitos y MOs y de la microbiota intestinal (174), utilizando en todos los casos un modelo de dieta rica en grasa en ratón. Estos hallazgos muestran la actividad anti-inflamatoria de CECT7765 y apoyan su uso en otras patologías de carácter inflamatorio.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hypothesis and Objectives



HIPÓTESIS

Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 limita la respuesta inflamatoria y mejora la integridad de la barrera intestinal, reduciendo la tasa de traslocación bacteriana en la cirrosis.



OBJETIVOS

OBJETIVO 1

Evaluar los efectos de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre el tejido hepático, la pared intestinal y la tasa de traslocación bacteriana en un modelo experimental de cirrosis.

Moratalla, A., et al., **“Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis”**. *Liver Int*, 2014. 34(6): p. 850-8.

OBJETIVO 2

Discriminar el mecanismo de interacción entre *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 y los linfocitos intestinales en un modelo experimental de cirrosis.

Moratalla, A., et al., **“*Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis”**. *Eur J Nutr*, 2015. doi: 10.1007/s00394-015-0837-x.

OBJETIVO 3

Valorar la capacidad de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 para inducir la transición de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica y de líquido ascítico de pacientes con cirrosis descompensada hacia un perfil anti-inflamatorio.

Moratalla, A., et al., **“*Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 induces an M2 anti-inflammatory transition in macrophages from patients with cirrhosis”**. *J Hepatology*, 2015. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.020.



MÉTODOS

Methods



1. PACIENTES

Para el estudio sobre muestras humanas, se incluyeron 10 pacientes con cirrosis y ascitis admitidos en la Unidad Hepática del Hospital Universitario de Alicante. También se incluyó un grupo de 10 controles sanos, con una composición de edad y sexo comparable al grupo de pacientes.

La cirrosis se diagnosticó por histología o hallazgos clínicos, de laboratorio y/o ultrasonográficos. Se consideraron los siguientes criterios de exclusión:

- Presencia de cultivo positivo en sangre o LA,
- PBE,
- Presencia de ADN_{bact} en sangre o LA (175) y/o niveles de LPS superiores a trazas en sangre,
- Presencia de signos o síntomas de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (176),
- Hemorragia digestiva alta,
- Toma de antibióticos durante las 2 semanas anteriores a la extracción de muestra,
- Carcinoma hepatocelular,
- Hepatitis alcohólica,
- Trombosis portal,
- Trasplante hepático previo,
- Shunt portosistémico transyugular intrahepático,
- Edad superior a 80 años o inferior a 18 años,
- Rechazo a participar en el estudio.

Se obtuvo sangre periférica para realizar estudios hematológicos, bioquímicos y de coagulación rutinarios. Simultáneamente, se llevó a cabo una paracentesis terapéutica en todos los pacientes, en condiciones asépticas y siguiendo el protocolo establecido (177), para obtener muestras para su análisis bioquímico y de conteo de polimorfonucleares rutinario. Las muestras de sangre periférica y de LA se inocularon separadamente, en condiciones asépticas y en tubos estériles sellados Vacutainer SST II (BD Diagnostics, Aalst, Bélgica).

El protocolo de estudio contó con el informe favorable del Comité Ético del Hospital General Universitario de Alicante y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para formar parte del estudio.

2. MODELOS EXPERIMENTALES.

2.1. Animales.

Los estudios en modelos experimentales incluyeron ratones hembra Balb/c *wild type* (Harlan, Barcelona, España) con un peso inicial de 18-20 gramos y ratas macho *Sprague-Dawley* (Harlan) con un peso inicial de 100-150 gramos. Los animales permanecieron una semana en cuarentena con comida estándar y agua ad libitum para su adaptación a las condiciones experimentales controladas (temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ humedad relativa y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas), las cuales se mantuvieron a lo largo del estudio. Las ratas se alojaron en jaulas individualmente. Durante las siguientes 3 semanas, todos los animales recibieron agua con fenobarbital (Luminal, Kern Pharma, Barcelona, España) (0.25 mmol/L para ratones y 1.5 mmol/L para ratas), que se mantuvo a lo largo de todo el estudio.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas éticas establecidas por la Comunidad Europea (REAL DECRETO 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, BOE núm. 252 de 21 de octubre 2005) y la legislación Española (RD 53/2013 de 1 de febrero, BOE núm. 34 de 8 de febrero de 2013).

Los estudios con animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández (Alicante, España).

2.2. Inducción de cirrosis experimental.

2.2.1. Administración de CCl₄.

Se indujo daño hepático progresivo en ambos modelos experimentales mediante la administración intragástrica de CCl₄ (Sigma Aldrich, Madrid, España).

Tras cuatro semanas alojados en el animalario, los animales recibieron dos dosis (ratones) o una dosis (ratas) de CCl₄ a la semana que fue administrado vía intragástrica usando una jeringa estéril con una guía de alimentación sin anestesia. La primera dosis de CCl₄ en ratones fue 2 µl y en rata 20 µL (100 µL/kg), disuelto en ambos casos en aceite de oliva, y ajustándose a un volumen final de 200 µL en el caso del ratón. Las siguientes dosis se ajustaron basándose en la variación de peso del animal observada en las 48 horas posteriores a la última dosis. Los ajustes de dosis en ratón se hicieron siguiendo el modelo descrito en rata por Runyon *et al.* (178) adaptado al peso 10 veces menor del ratón. Cuando la rata desarrolló ascitis, la dosis de CCl₄ se redujo a 40µL por semana hasta el momento de la laparotomía.

En el modelo de ratón, se utilizó un grupo de animales control que fueron alimentados con comida estándar y tratados con 0.25 mmol/L de fenobarbital en el agua de bebida durante el protocolo de estudio, y recibieron dos dosis semanales de aceite mineral (200 µL), administrado vía intragástrica.

El modelo de ratón se prolongó durante 12 semanas. En el modelo de rata, los animales se sacrificaron cuando mostraban signos severos de enfermedad y la muerte parecía inminente, alrededor de la semana 16. En dichos momentos se realizaron las laparotomías.

2.2.2. Ligadura del Conducto Biliar Común.

Se indujo daño hepático mediante BDL a un grupo de ratas. Tras 4 semanas de alojamiento, se llevó a cabo la cirugía bajo condiciones estériles. Brevemente, el animal se anestesió con una mezcla de ketamina (Ketamidor®, Richter Pharma,

Wels, Austria) (75 mg/Kg) y xilacina (Xilagesic® 20%, Laboratorio Calier, Barcelona, España) (10 mg/Kg). Se retiró el pelo de la zona abdominal con una peladora a batería ISIS GT420 (Aesculap, B.Braun, Alemania), y se desinfectó el abdomen con etanol al 70%. Se realizó una incisión longitudinal en la línea media abdominal, identificando y aislando el conducto biliar común. Se realizó una doble ligadura con sutura no reabsorbible (seda trenzada 5-0) y se seccionó el conducto entre las dos ligaduras. La pared abdominal se suturó con seda trenzada 5-0. El dolor de los animales se controló con Buprenorfina subcutánea (Buprex®, Quintiles, Madrid, España) (0,1 mg/kg/12h) durante 4 días. Los animales se mantuvieron en dichas condiciones durante 4 semanas, transcurrido ese periodo se realizaron las laparotomías.

2.3. Actuaciones sobre los modelos animales.

2.3.1. Administración de CECT7765.

CECT7765 se administró mediante sondaje intragástrico, a una concentración de 10^7 , 10^9 o 10^{10} UFC por día, durante la semana previa a la realización de la laparotomía. Un grupo de animales recibió placebo (vehículo, leche desnatada) también mediante sondaje intragástrico y durante la semana previa a la laparotomía.

2.3.2. Administración de *E.coli*.

Veinticuatro horas antes de la laparotomía, además de CECT7765 o vehículo, todos los animales (con excepción del grupo control) recibieron una dosis de *E.coli* de forma intragástrica y a una concentración de 10^7 UFC/ratón para inducir la TB. La cepa *E.coli* (serotipo 0111:B4) fue cedida por el Grupo de Ecología Microbiana, Nutrición y Salud del IATA-CSIC, Valencia.

2.3.3. Administración de FITC-LPS.

La permeabilidad intestinal se evaluó mediante el sondaje intragástrico de LPS marcado con el fluorocromo FITC. El FITC-LPS (Sigma Aldrich) se resuspendió en 1 mL de PBS y se administraron 100 μ l de la suspensión a cada ratón 2 horas antes del sacrificio. La sangre se recolectó por punción orbital. Se utilizaron diluciones seriadas de FITC-LPS en PBS como curva estándar, y las mediciones se llevaron a cabo en 100 μ l de plasma o estándar en un fluorímetro a 488 nm.

2.4. **Laparotomía y toma de muestras.**

Los **ratones** fueron anestesiados por vía inhalatoria, utilizando un anestésico volátil tipo halogenado isoflurano (IsofloR®, Esteve, Barcelona). La inducción a la anestesia se llevó a cabo utilizando la cámara de inducción para roedores, y el mantenimiento de la misma se realizó con un circuito anestésico conectado al animal por medio de una mascarilla. La monitorización de la anestesia se basó en la comprobación de ausencia o presencia de la respuesta refleja.

Se retiró el pelo de la zona abdominal con una peladora a batería ISIS GT420 y se esterilizó la piel con yodo. Se realizó una incisión longitudinal en la pared abdominal y los GLMs fueron asépticamente escindidos del mesenterio, y recogidos en un tubo estéril con PBS. La eutanasia se realizó mediante punción cardíaca y recolección total de sangre, la cual se almacenó en tubos con EDTA hasta su posterior análisis. El hígado se perfundió *in situ* con 6 ml de HBSS sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} atemperado a 37°C a una velocidad de 1,5 ml/min. Seguidamente, se perfundió con 12 ml de HBSS con CaCl_2 a una concentración de 100 mM a la misma velocidad, y finalmente se extrajo del ratón y se lavó con 3 ml de HBSS. También se recogieron muestras de bazo, pared y contenido intestinal de íleon (10 cm) y ciego.

Se conservó un fragmento de hígado de todos los ratones en formol para su posterior análisis histológico. Los tejidos se congelaron a -20°C hasta su utilización. El almacenamiento y conservación de las muestras se realizó de acuerdo a las

instrucciones de cada fabricante. Se realizaron estudios histopatológicos, microbiológicos y moleculares en las muestras recogidas.

A lo largo de los protocolos de estudio se tuvieron en cuenta datos de mortalidad, así como el peso de los órganos tomados en el momento de la laparotomía, para poder evaluar el daño hepático y el deterioro del animal en general.

En el caso de las **ratas**, el animal se anestesió con una mezcla de ketamina (Ketamidor®) (75 mg/Kg) y xilacina (Xilagesic® 20%) (10 mg/Kg). Se retiró el pelo de la zona abdominal con una peladora a batería ISIS GT420 y se desinfectó el abdomen con etanol al 70%. Se realizó una incisión longitudinal en la línea media abdominal, para identificar y perfundir el hígado como se detalla en el apartado **4.12.** y así aislar KCs.

3. MANEJO Y CULTIVO DE *BIFIDOBACTERIUM PSEUDOCATENULATUM* CECT 7765.

La cepa CECT7765 pertenece a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y fue cedida por el Grupo de Ecología Microbiana, Nutrición y Salud del IATA-CSIC, Valencia, España.

El crecimiento de la cepa se realizó en medio MRS *broth* (Scharlau, Barcelona, España) suplementado con 0,05% (p/v) de cisteína (MRS-C Sigma, St. Louis, MO, USA) e incubada a 37°C durante 22 horas, hasta la fase de crecimiento estacionario, en condiciones anaerobias (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, UK). Una vez obtenida la concentración deseada, las células se recogieron por centrifugación, durante 15 minutos a 6.000 xg, se lavaron dos veces con PBS y fueron resuspendidas en leche desnatada al 10% para su administración intragástrica en ratones o en PBS para experimentos *in vitro*.

Se recogieron alícuotas de estas suspensiones y se congelaron en nitrógeno líquido, quedando almacenadas hasta su uso. Se determinó el número de células vivas

mediante contaje de UFC en placas de agar MRS-C (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) tras 48 horas de incubación a 37°C. Tras la descongelación de las alícuotas, más del 90% de células estaban vivas y no se observaron diferencias durante el tiempo máximo de almacenamiento (2 meses). Se utilizó una nueva alícuota recién descongelada para cada experimento, evitando así variabilidad entre la viabilidad de los cultivos.

4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS EMPLEADAS.

4.1. Estudio histopatológico.

Tras la laparotomía, se realizó una hepatectomía obteniéndose entre 10-15 mm de tejido hepático. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en formol al 10% y posteriormente procesadas y embebidas en parafina líquida, obteniéndose los bloques tisulares.

Se hicieron secciones de 4 micras que fueron posteriormente teñidas con Hematoxilina-Eosina en una máquina de tinción automática (CoverStainer, Dako; Glostrup, Denmark). Se evaluaron los cambios histológicos celulares, la presencia de necrosis, fibrosis y alteración de la arquitectura hepática.

La presencia de fibrosis y distorsión de la arquitectura hepática tras la tinción del tejido conectivo se confirmó aplicando la técnica del Tricrómico de Masson (Masson's Trichrome, Dako). La valoración de la fibrosis se hizo de manera semi-cuantitativa por un patólogo según la escala *Ishak* (179), utilizando un microscopio de luz convencional (Olympus BX50, Barcelona, España). El análisis morfométrico de las áreas fibróticas se llevó a cabo utilizando el *software* ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.2. Inmunohistoquímica.

El estudio inmunohistoquímico se llevó a cabo en secciones consecutivas de 2-4 micras de tejido hepático fijadas con formol y embebidas en parafina. El método de recuperación antigénica se hizo mediante incubación con calor con citrato a pH9 (Dako/Agilent Technologies, Carpinteria, CA, USA). Se utilizó como anticuerpo primario un monoclonal de ratón, *anti-human alpha-smooth muscle actin* (α -SMA); (clone 1A4, Dako/Agilent Technologies). La dilución fue de 1:100 durante un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó como sistema de detección *EnVisionTMFlex* y *Autostainer Link 48* (Dako/Agilent Technologies). Como control externo negativo, el anticuerpo primario fue omitido en una sección de tejido.

4.3. Análisis de la expresión génica.

Se aisló ARN total de 30 mg de tejido hepático y de 1 cm de pared de ileon, ambos de ratón, utilizando el kit comercial *QIAmp RNA Blood Minikit* (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tejidos se disgregaron previamente utilizando un *Tissue Lyser* (Qiagen). También se aisló ARN de LIs previamente separados de pared de intestino delgado de ratón utilizando el mismo kit comercial.

La concentración de ARN fue estimada por absorción a 260 nm en un espectrofotómetro *NanoDropR ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). El ARN obtenido se mantuvo a -80°C para su uso posterior.

Por otra parte, se aisló el ARN total de MOs peritoneales de pacientes utilizando el kit *RNeasy* (Qiagen), se retrotranscribió y el cDNA obtenido se cuantificó utilizando la librería *Universal Human Probe Roche* (Roche Diagnostics, Barcelona, España) y se conservó a -20°C para su uso posterior.

En la **Tabla 2** se muestran los cebadores específicos utilizados para cada gen evaluado. El diseño de los primers se llevó a cabo utilizando la herramienta *Primer-BLAST* de NCBI (National Center for Biotechnology Information, EE.UU. National Library of Medicine) o utilizando el *software* de Roche respectivamente.

El análisis de expresión génica de muestras de origen murino se llevó a cabo en un IQ5 Real-Time PCR (BioRad, Hercules, CA, USA) utilizando *Quantitec SYBR Green* (Qiagen) y la β 2-microglobulina como gen de expresión constitutiva. En cambio, se utilizó un LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) para analizar la expresión génica de muestras de origen humano, utilizando en este caso la *TATA box binding protein* (TBP) como gen de expresión constitutiva.

Los ensayos se hicieron por triplicado y los resultados se normalizaron de acuerdo a la expresión del gen de referencia correspondiente. Los resultados se expresaron utilizando el método de cuantificación $\Delta\Delta$ CT (180).

4.4. Análisis de la expresión proteica.

Western Blot

Se realizó un lisado a partir de homogeneizados de tejido hepático y pared intestinal, y *pellets* de LIs con *RIPA buffer* (CellSignaling, Leiden, Holanda) y 1 mmol/L de fenilmetilsulfonilfluoride. La concentración proteica se determinó mediante un ensayo *Bradford*.

El extracto de proteínas se cargó en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%, y posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF (*Immobilon-P*). Para el bloqueo se utilizó PBS con Tween-20 al 0,05% y BSA al 3%, y se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti- α SMA, anti-Ocludina, anti-tight junction protein (TJP)1, anti-TNF- α , anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti-IL10, anti-IL10R, anti-chemokine C-C motif receptor (CCR)6, anti-CCR9, anti- chemokine CXC motif receptor (CXCR)3, anti-CXCR6 y anti- β actina.

Gen/Microorganismo	Especie	Muestra	Secuencia
β 2-microglobulina	Ratón	Hígado Pared y linfocitos intestinales	ATGGCTCGCTCGGTGACCCT TTCTCCGGTGGGTGGCGTGA
α -SMA	Ratón	Hígado	CAGTCGCTGTGAGGAACCCT GAAAACAGCCCTGGGAGCAT
Collagen- α 1	Ratón	Hígado	GTGTTCCCTACTCAGCCGTC ACTCGAACGGGAATCCATCG
Collagen- α 3	Ratón	Hígado	TGACTGTCCCACGTAAGCAC GAGGGCCATAGTGAACCTGA
MMP-2	Ratón	Hígado	CCGAGGACTATGACCGGATAA CTTGTTGCCAGGAAAGTGAAG
TIMP-1	Ratón	Hígado	TCCTTTGTTGCTATCACTGATAGCTT CGCTGGTATAAGGTGGTCTCGTT
TGF- β 1	Ratón	Hígado	AGAGGTCACCCGCGTCTAA TCCCGAATGTCTGACGTATTGA
IL-10	Ratón	Pared Intestinal Linfocitos Intestinales	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA GAGAAATCGATGACAGCGCC
IL-10R	Ratón	Pared Intestinal Linfocitos Intestinales	AGTGGACGATGCCGCTGTGC GGCTTGGCAGTTCTGTCCCGTA
TNF- α	Ratón	Pared Intestinal Linfocitos Intestinales	TGCCCCAGACCCCTCACTCAG GGTGGTTTGTCTACGACGTGGGC
TNFR1	Ratón	Pared Intestinal Linfocitos Intestinales	GGGCCTACTGGGTGCGAGGT GGCTGCAAGGGACGCACTCA
TNFR2	Ratón	Pared Intestinal Linfocitos Intestinales	ACCAGCATCCTCAGGTGTGCATC TGGTCTAGCCGGTGTGCCG
Ffar3	Ratón	Pared Intestinal	CCTGACGGCGGTGAGCATCG GCACGTAGCTCCGCCAGGAC
Ffar2	Ratón	Pared Intestinal	CCAAGGAGTTCTGGCAGGTGGCT AGCGCGCACACGATCTTTGGT
FolateR	Ratón	Pared Intestinal	TACCCTAAGCAGGGAGTGGAG AAGTCAGTCCGGTTGAAGCA
Occludin	Ratón	Pared Intestinal	GGTTGATCCCCAGGAGGCTA CCGATCCATCTTTCTCGGGT
TJP-1	Ratón	Pared Intestinal	TCAACAGAAAGCAGAAGCCTCA GGGTTGTTTCAGGCGAAAGG
TLR-2	Ratón	Linfocitos Intestinales	GCATCCGAATTGCATCACCG CCTCTGAGATTTGACGCTTTGT
TLR-4	Ratón	Linfocitos Intestinales	TCCCTGCATAGAGGTAGTTCC TCAAGGGGTTGAAGCTCAGA
TLR-5	Ratón	Linfocitos Intestinales	CGCCAGCCATTTCAACCAG ACATGCCATGATCCTGCTGAAG
TLR-9	Ratón	Linfocitos Intestinales	CTCCCAACATGGTTCTCCGTC AGGCTTCAGCTCACAGGGTA
CCR6	Ratón	Linfocitos Intestinales	ATGAGCACTGTGGTTGTGT GACAAGCCAGGAACACGAGA
CCR9	Ratón	Linfocitos Intestinales	ATCTCTGGTCTGCCTTTGCC AATGGCTTGCAAAGTGCCTG
CXCR3	Ratón	Linfocitos Intestinales	ACAGCACCTCTCCCTACGAT AATCTGGGAGGGCAAAGAGC
CXCR6	Ratón	Linfocitos Intestinales	GGGCTTCTCTTCTGATGCCA ATCTCCCTCGTAGTGCCAT
16S rRNA	Ratón	GLMs, Sangre Hígado	AGAGTTTGATCATGGCTCAG ACCGCGACTGCTGCTGGCAC CTCCTGGAACGGGTGG GGTGTCTTCCCGATATCTACA
<i>Bifidobacterium group</i>	Ratón	Contenido de Ciego	CGGCTGTTAACTTCGCTTC CACACGCCAAGAACAGTGA
TBP	Humano	Macrófagos Peritoneales	GGTTGTGCCATACTCATGACC CAGATAGGACATCCAGGGTAGC
SLC2A1	Humano	Macrófagos Peritoneales	CTCGGAGATCATCAGTTTG CCTTGGAAATCTCGAAGTGC
INHBA	Humano	Macrófagos Peritoneales	TGTGGAGACAGGGGCTTTTA ATCCACGATGCTGTCTGA
IGF1	Humano	Macrófagos Peritoneales	GAGAGAGGCCAACTCAGACAC CCAGACCATGTCTTTCTGTC
FolR2	Humano	Macrófagos Peritoneales	

Tabla 2: Lista de Primers utilizados en los estudios.

La membrana se incubó a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario, y finalmente, con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP (horseadish-peroxidasa) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación.

Por último, se detectó la actividad de la membrana usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL), y las bandas proteicas se escanearon y cuantificaron por densitometría. La densidad de las bandas se normalizó con respecto a la densidad total de β actina.

ELISA

Se utilizaron kits comerciales de ELISA (**Tabla 3**).

Los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta el momento del análisis. Los tejidos se lavaron con PBS frío y se pesaron para tener siempre la misma cantidad de partida, y se homogeneizaron utilizando un *Tissue Lyser* (Qiagen). Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Los ELISAs se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas se determinaron utilizando un lector de microplacas Sunrise (Tecan, Männedorf, Switzerland). Se generaron curvas estándar para cada placa, y las medias de las densidades ópticas correspondientes a los valores “cero” fueron restadas al resto de estándares, controles y muestras para obtener la concentración correcta.

4.5. Detección e identificación de ADN bacteriano.

La presencia de ADN_{bact} fue evaluada en GLMs, sangre e hígado.

Inicialmente se aisló el ADN genómico para lo que se utilizó el kit comercial *QIAamp ADN Mini Kit* (Qiagen), y se siguieron las instrucciones del fabricante. Como paso previo, en el caso de los GLMs y el hígado, se homogeneizó el tejido mediante sonicación (Procesador UP100H, Hielcher Ultrasonidos, Teltow, Alemania). Para evitar la contaminación de las muestras durante su manipulación, todas las

extracciones de ADN se realizaron en cabina de flujo laminar vertical (BV-100, Telstar, Terrassa, Barcelona, España).

Citocina/Proteína	Especie	Muestra
Hidroxi prolina	Ratón	Hígado
MDA	Ratón	Hígado
Ocludina	Ratón	Pared intestinal
TJP-1	Ratón	Pared intestinal
ALT	Ratón	Hígado
Bilirrubina total	Ratón	Hígado
IL-6	Ratón	Hígado
TNF- α	Ratón	Hígado /Sobrenadante de cultivo LIs
	Humano	Sobrenadante de cultivo MOs
	Rata	Sobrenadante de cultivo KCs
IL-10	Ratón	Sobrenadante de cultivo LIs
	Humano	Sobrenadante de cultivo MOs
	Rata	Sobrenadante de cultivo KCs
IL-1 α	Humano	Sobrenadante de cultivo MOs
	Rata	Sobrenadante de cultivo KCs
TGF- β	Humano	Sobrenadante de cultivo MOs
	Rata	Sobrenadante de cultivo KCs

Tabla 3: Kits ELISAs utilizados en el estudio. LIs: linfocitos intestinales; MOs: macrófagos; KCs: células de Kupffer.

Los extractos de ADN se amplificaron por PCR utilizando una pareja de oligonucleótidos frente al 16S ARNr y generando un amplicón de 541 pb, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente por nuestro grupo (41). La secuencia de dichos oligonucleótidos es la siguiente: Forward Primer (1F): 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; Reverse Primer (1R): 5'-ACCGCGACTGCTGCTGGCAC-3'. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *MyCycler Thermal Cycler* (Biorad).

Se incluyeron controles negativos y un control positivo con ADN procedente de un *pool* bacteriano compuesto por *E.coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Todas las reacciones de PCR se realizaron en una cabina de flujo laminar

(Mini-V/PCR, Telstar) y en una habitación físicamente separada de la utilizada para la extracción de ADN de las muestras.

El ADN amplificado fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa (BioRad) a una concentración de 2% (p/v) en TBE 0.5X (BioRad), utilizando *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, España). Los fragmentos de ADN se visualizaron en un sistema de foto documentación de geles *Gel Doc XR* (BioRad).

La secuenciación de ADN se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), como se ha descrito previamente (41). El producto de PCR se purificó mediante *QIAquick Spin Columns* (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). El producto purificado se utilizó como molde para la reacción de secuenciación con *Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Applied Biosystems), usando como primer de secuenciación el siguiente oligonucleótido: 5'-TTACGCGGCTGCTGGCACG-3'. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de 16S ARNr disponibles en las bases de datos internacionales (Ribosomal Database Project, GeneBank) usando el *software* de alineamiento y búsqueda avanzada BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Adicionalmente, se utilizaron primers específicos de especie para comprobar la presencia de diferentes especies de manera simultánea en la misma muestra mediante PCR convencional.

4.6. Evaluación de niveles de endotoxina.

Para evaluar los niveles de endotoxina se realizó el test cromogénico de punto final "*Limulus Amebocyte Lysate*" (LAL) (BioWhittaker, Nottingham, UK). Este test es cuantitativo y se utiliza para la detección de endotoxina de bacterias Gram-negativas. Se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y se midió la absorbancia a 405 nm. La correlación entre absorbancia y concentración de endotoxina es lineal en un rango de 0.1 – 1.0 EU/mL.

4.7. Análisis de la composición de la microbiota intestinal mediante PCR cuantitativa.

Las muestras de contenido intestinal de ciego se pesaron en el momento de la laparotomía y se almacenaron inmediatamente a -20°C.

La extracción de ADN se llevó a cabo usando el kit *QIAamp DNA stool Mini kit* (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se midió con un espectrofotómetro ND-1000 basado en absorbancia a 260 nm (NanoDrop, Wilmington, DE, USA).

Se utilizaron primers específicos para el género bacteriano *Bifidobacterium* (**Tabla 2**) y se caracterizó mediante PCR cuantitativa. La amplificación y detección se llevó a cabo en un *LightCyclerH480 Real-Time PCR System* (Roche Diagnostics). La concentración bacteriana de cada muestra se calculó comparando los valores Ct obtenidos de las curvas estándar. Dichas curvas se crearon usando diluciones seriadas de cultivos puros de ADN, correspondientes a 10^2 a 10^9 células de la colección de cultivos, tal y como se determinó por el recuento de microscopía utilizando DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (181).

4.8. Aislamiento de linfocitos intestinales.

El intestino delgado al completo se diseccionó de ratones control y tratados con CCl_4 . Las placas de Peyer, los restos de mesenterio y de grasa se eliminaron. A continuación, el intestino se cortó en trozos de unos 2 centímetros y se lavó con PBS suplementado con un 2% de FBS.

Los IELs se liberaron incubando los trozos de intestino con HBSS (Life Technologies), suplementado con un 5% de FBS y DTT 2mM (dithiotheitol; Sigma Aldrich) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Este paso se repitió dos veces. Para separar las células epiteliales se realizaron tres incubaciones de 30 minutos con 5 mM de EDTA (BioRad) en HBSS sin calcio ni magnesio (GE

Healthcare Europe GmbH, Barcelona, España), a temperatura ambiente y en agitación. Para eliminar completamente las células epiteliales, los segmentos intestinales se lavaron con RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado con FBS al 5% durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, el tejido se incubó en RPMI 1640 suplementado con FBS al 1% y con 2 mg/ml de colagenasa D (Roche Diagnostic) durante 45 minutos a 37°C y agitación, y se pasó a través de un tamiz de acero inoxidable para obtener la suspensión de LPLs. Los IELs y LPLs recolectados se filtraron a través de una columna de fibra de nylon (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Alemania) para eliminar el mucus y las células muertas, y los eritrocitos se lisaron con una solución hipertónica (EasyLyse; Dako).

Los LIs se purificaron mediante selección positiva utilizando anti-CD3 *MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Madrid, España). Siguiendo las instrucciones del fabricante, las células se incubaron con las anti-CD3 *MicroBeads* durante 15 minutos a 4°C, para a continuación pasar la suspensión celular a través de una columna magnética y separar las células CD3⁺. Por último, los LIs se contaron con la cámara de *Neubauer* y se ajustaron a una concentración de 1 millón/mL en DMEM para los experimentos de cultivo.

El rendimiento de la separación de LIs se evaluó por citometría de flujo. Para ello, se marcó una alícuota de células obtenida tras la separación magnética en columna con los siguientes anticuerpos de ratón: anti-CD3 FITC, anti-CD4 PerCP-Cy5.5 y anti-CD14 PE (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Las cantidades utilizadas fueron las recomendadas por la casa comercial y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. A continuación se evaluó la expresión de dichos marcadores utilizando un citómetro FACS Canto operado por el *software DiVa* (Becton Dickinson).

4.9. Cultivo de linfocitos intestinales.

Se utilizaron LIs de 5 ratones, tratados con CCl₄ pero que no recibieron CECT7765, que fueron purificados utilizando el protocolo descrito en el apartado anterior.

Medio millón de LIs por pocillo se incubaron 24 horas a 37°C y 5% de CO₂, y se utilizaron las siguientes condiciones:

- Sin estímulo.
- LPS (0,2 µg/ml, *E.coli* serotipo 0111:B4).
- CECT7765 (10⁷ UFC).
- CECT7765 (10⁹ UFC).

Todas las condiciones se realizaron por duplicado, y la mitad de ellas se trataron con un anticuerpo monoclonal para bloquear TLR-2 (anti-TLR-2, Antibodies Online GmbH, Aachen, Alemania). Tras 24 horas, las células y los sobrenadantes se recolectaron y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Como experimento adicional al anterior, y utilizando otra tanda igual de animales y las mismas condiciones de cultivo, se evaluó el efecto de CECT7765 frente a otras especies de *Bifidobacterium*, que también fueron cedidas por el IATA. Se utilizaron las siguientes condiciones:

- Sin estímulo.
- LPS (0,2 µg/ml, *E.coli* serotipo 0111:B4).
- CECT7765 (10⁹ UFC).
- *B. breve* LMG 11042TB (10⁹ UFC).
- *B. adolescentis* LMG 11037T (10⁹ UFC).
- *B. animalis* LMG 10508T (10⁹ UFC).

4.10. Diferenciación de macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica.

Se aislaron células mononucleares a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos y pacientes con cirrosis hepática mediante centrifugación por gradiente con *Biocoll Separating solution* (Biochrom, Cambridge, UK).

Los monocitos se separaron del resto de células por su expresión de CD14 utilizando unas *MicroBeads* inmunomagnéticas que reconocen dicho marcador (Miltenyi Biotec). A continuación, se sembraron en RPMI 1640 suplementando con L-

glutamina, penicilina-estreptomicina y FBS al 10% a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en placas de 6 pocillos. Se añadió GM-CSF (eBiosciences, San Diego, CA, USA) a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ a día 0, 2 y 4, considerándose MDM diferenciados del subtipo M1 tras 6 días en cultivo suplementado con la citocina. Las células se mantuvieron a 37°C en atmosfera húmeda y un 5% de CO_2 .

4.11. Aislamiento de macrófagos de LA.

Se recogieron entre 6 y 8 litros de LA de cada paciente. La totalidad del volumen se centrifugó en diferentes tandas a 1800 rpm durante 10 minutos. Las células obtenidas se lavaron 2 veces con PBS y los eritrocitos se lisaron con 5 ml de *erythrocyte-lysing reagent Easylyse* (Dako).

Los MOs peritoneales se separaron del resto de células por expresión de CD14 utilizando las mismas *MicroBeads* utilizadas para separar los monocitos de sangre periférica (Miltenyi Biotec) y se sembraron en las mismas condiciones mencionadas en el apartado anterior, pero sin necesidad de añadir citocinas para diferenciar a MOs.

4.12. Aislamiento de células de Kupffer de ratas con cirrosis inducida por CCl_4 o BDL.

Durante la laparotomía, los hígados de ambos grupos de animales fueron perfundidos *in situ* con 50 ml de buffer de perfusión: HBSS con 10% de FBS, 1 mg/ml de colagenasa I (Roche Diagnostics), 0.2 mg/ml de colagenasa IV (Roche Diagnostics), 20 $\mu\text{g/ml}$ de DNasa I (Sigma Aldrich) y 5 mM de MgCl_2 (Sigma Aldrich), previamente atemperado a 37°C . A continuación, se extrajo el hígado y se sumergió en un tubo con RPMI 1640 al 10% de FBS sobre hielo. Tras cortar el órgano con unas tijeras en trozos pequeños, se centrifugó a 1300 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar restos celulares. Se eliminó el sobrenadante con cuidado y se añadió el buffer de digestión: RPMI 1640, 1 mg/ml de colagenasa I, 0.2 mg/ml de colagenasa IV, 20 $\mu\text{g/ml}$ de DNasa I y 5 mM de MgCl_2 , previamente atemperado a

37°C hasta completar 50 ml y se incubó durante 1 hora a 37°C y agitación (400 rpm). Las enzimas estaban previamente alicuotadas y siempre se añadieron en el momento de uso para asegurar su actividad. La mezcla resultante tras la digestión se filtró por una columna de tamices (el superior de 250 μm y el inferior de 150 μm de tamaño de poro), al igual que el *pellet* tras ser completamente digerido mecánicamente, y se lavó todo con RPMI 1640 a 4°C para recuperar el mayor número de células posible. A continuación se llevó a cabo una centrifugación muy suave para eliminar los hepatocitos, 3 minutos a 30 $\times g$ y 4°C. Se descartó el *pellet* y se recogió cuidadosamente el sobrenadante, que se centrifugó a 1300 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se realizó un gradiente con Percoll (Sigma Aldrich), utilizando 27 ml de HBSS sin Ca ni Mg, 13.5 ml de Percoll al 30% y 4.5 ml de heparina (1% solución inyectable; Hospira, Lake Forest, IL, USA). Todos los componentes se atemperaron previamente, se mezclaron en el momento de uso junto con las células, y se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente y sin freno. El *pellet* resultante se lisó con 5 ml de solución de lisado (Red Blood Cell Lysing Buffer, Sigma Aldrich) durante 5 minutos y a 4°C, y se lavó dos veces con PBS y 1300 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se contó el número de células obtenidas con la cámara de *Neubauer*.

Las KCs se aislaron por su expresión del marcador de diferenciación de MOs CD68. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-CD68 marcado con el fluorocromo PE (Miltenyi Biotec), que se incubó a una concentración de 5 μl de anticuerpo por cada millón de células durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. A continuación, el *pool* de células se incubó con unas *MicroBeads* anti-PE (Miltenyi Biotec) que reconocen dicho fluorocromo y se procedió a la purificación y obtención de KCs a través de la separación magnética en columna siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.13. Tratamiento in vitro de los macrófagos.

Se indujo la repolarización de los MDM M1 añadiendo al medio M-CSF a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (eBiosciences) a día 6 de cultivo, repitiendo el estímulo cada dos días hasta día 12 (182). Los MDM M1 también se estimularon a día 6 con

LPS (100 ng/ml) (Sigma Aldrich) y CECT7765 (10^4 UFC) y se dejaron en cultivo hasta día 12. Como control del experimento, MDM M1 continuaron con GM-CSF cada dos días hasta día 12.

Los MOs procedentes de LA y las KCs de rata se estimularon tras 1 día en cultivo con M-CSF (100 μ g/ml), LPS (100 ng/ml) y CECT7765 (10^4 UFC) o sin estímulo durante 48 horas más. En los experimentos indicados, ambos tipos celulares se estimularon con LPS (100 ng/ml) durante 24 horas, y luego con M-CSF (100 μ g/ml) y CECT7765 (10^4 UFC) durante 48 horas adicionales.

Se planteó un experimento adicional para examinar el efecto del plasma de cirrótico sobre la capacidad bactericida de los MOs. Para ello se diferenciaron MDM M1 de controles sanos, como se explicó en el apartado **4.10**. A día 6 se cambió el medio de cultivo por medio sin antibióticos suplementado con un 25% de plasma de donante control o cirrótico y GM-CSF (100 μ g/ml). Transcurridos 30 minutos, la mitad de los pocillos fueron tratados con CECT7765 (10^4 UFC). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

- MDM M1
- MDM M1 + CECT7765
- MDM M1 + plasma control
- MDM M1 + plasma control + CECT7765
- MDM M1 + plasma cirrótico
- MDM M1 + plasma cirrótico + CECT7765

Tras un periodo de incubación de 48 horas con CECT7765, descrito previamente (183), los MOs se sometieron al ensayo de capacidad bactericida que se detalla en el siguiente apartado.

Se realizaron experimentos preliminares de citometría de flujo con MDM M1 tratados con CECT7765 a dos concentraciones diferentes (10^4 y 10^8 UFC) e inactivado o no por calor para establecer las condiciones de cultivo. No se observaron diferencias, por lo que de acuerdo a resultados anteriores publicados por el grupo (172, 184,

185) utilizamos CECT7765 vivo y a una concentración de 10^4 UFC en esta última parte del estudio con muestras de origen humano.

4.14. Capacidad bactericida de macrófagos de LA.

Para medir la actividad bactericida de MOs peritoneales, se aislaron y se cultivaron en las mismas condiciones del apartado **4.11.**, añadiendo o no al medio de cultivo CECT7765 (10^4 UFC) durante 48 horas.

Transcurridas 48 horas, los MOs se despegaron de la placa añadiendo 1 ml de *StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent* (Life Technologies) durante 30 minutos a 37°C. Tras un lavado con PBS, los MOs se contaron en la cámara de *Neubauer* para ajustarlos a una cantidad de 2.5 millones. Los MOs se expusieron a la misma cantidad de *E.coli* (2.5 millones) añadiendo además 50 μ l de suero humano a 4°C y PBS suficiente para completar 1 ml de volumen final. La suspensión resultante se incubó a 37°C en agitación leve (15 rpm) durante 20 minutos (186). Este punto se consideró como T0, ya que aporta información sobre la capacidad de los MOs de fagocitar a las bacterias, en 20 minutos la lisis bacteriana aún no ha ocurrido.

Se eliminaron los restos de *E.coli* mediante un lavado exhaustivo de los tubos. Para ello, se hicieron 3 lavados con 4 ml de PBS frío seguido de una centrifugación de 8 minutos a 250 xg a 4°C y un lavado adicional con sacarosa al 30%. Para este último, el *pellet* se resuspendió en 1 ml de PBS frío y se depositó 1 ml de sacarosa al 30% formando una capa subyacente, y se centrifugó 10 minutos a 250 xg y 4°C. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de PBS con un 5% de FBS. En este momento, se extrajo 100 μ l de cada condición (T0). Los 900 μ l restantes de cada condición continuaron el protocolo para permitir la lisis de las bacterias fagocitadas, incubando las suspensiones celulares durante 2 horas a 37°C y agitación leve (15 rpm). Al finalizar la incubación se extrajeron 100 μ l de cada condición, siendo este punto el tiempo final (TF).

Ambas alícuotas (T0 y TF) de cada condición se utilizaron para hacer diluciones seriadas en agua estéril (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) que se sembraron en placas de agar *MacConkey* (BioMérieux, Madrid, España). El agua lisa los MOs por ósmosis, por lo que las bacterias que no han sido lisadas y están vivas pueden ser cultivadas. Tras 24 horas a 37°C se contaron el número de colonias en cada condición y se calculó el % de lisis bacteriana utilizando la siguiente fórmula: (número de UFC a T0 - número de UFC a TF) / número de UFC a T0 x 100.

4.15. Análisis de la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo en macrófagos.

MDM M1 de controles sanos y pacientes con cirrosis y MOs peritoneales aislados del LA de pacientes se trataron *in vitro* como se ha descrito en el apartado 4.13., y se analizó la expresión de un grupo de marcadores de superficie característicos de MOs y que permite clasificarlos en subgrupos según su fenotipo.

Los MOs se separaron de las placas por raspado con ayuda de un *scraper* (Cell Scraper, Biologix, Lenexa, KN, USA) y se centrifugaron a 1300 rpm durante 10 minutos y 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C para la cuantificación de citocinas por ELISA y el *pellet* se resuspendió en PBS con 2 mM de EDTA y 0,5% de FBS. Los MOs se marcaron con los siguientes anticuerpos de humano: anti-*human leukocyte antigen-DR* (HLA-DR) FITC (Diacclone, Besanzón, Francia), anti-CD14 PE (BioRad), anti-CD163 PE (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-CD16 FITC, anti-CD206 FITC, anti-CD86 PE (BD Biosciencias, Madrid, España). Las cantidades utilizadas se establecieron según las recomendaciones de cada casa comercial y se incubaron durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. A continuación, se lavaron con 2 ml de PBS suplementado con 2 mM de EDTA y 0,5% de FBS, seguido de una centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendió en 300 µl de PBS con 2 mM de EDTA y 0,5% de FBS.

Las muestras se evaluaron en un citómetro de flujo *BD FACScalibur* operado por el *software DiVa* (Becton Dickinson). Los resultados se analizaron y se generaron histogramas utilizando el *software FlowJo*. Los MOs tipo M1 se definieron como

HLA-DR^{high}, CD86^{high}, CD14^{high} y los MOs tipo M2 como CD206^{high}, CD163^{high}, CD16^{high} (187, 188).

4.16. Micrografías de los cultivos de macrófagos.

Se hicieron micrografías a los diferentes tipos de MOs aislados, en todas las condiciones de cultivo testadas, utilizando un microscopio *Nikon Eclipse Ts100* (Melville, NY, USA) y una magnificación de 20X, para comprobar la existencia de diferencias morfológicas entre las condiciones y el origen de los MOs.

4.17. Análisis estadístico.

Las variables discretas se expresaron como frecuencias o porcentajes. Las variables continuas se describieron como media \pm desviación estándar si se ajustaban a una distribución normal, o como medianas y cuartiles si no se distribuían normalmente. La normalidad se verificó utilizando el test de *Kolmogorov-Smirnov* ($p < 0.05$). Las diferencias entre grupos se analizaron utilizando el test de la Chi cuadrado para las variables discretas, aplicando la corrección de *Yates* cuando fuera necesario. Se utilizó el test de la T de *Student* o de la *U de Mann-Whitney* para comparar las variables continuas según se ajustaron o no a una distribución normal. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) o el test de *Kruskal-Wallis* según si los datos seguían o no una distribución normal, seguidos de comparaciones pareadas utilizando la corrección de *Bonferroni*. Las correlaciones entre dos variables se analizaron utilizando el test de *Pearson* para datos con distribución normal o de *Spearman* para datos que no seguían una distribución normal. Todos los P-valores fueron de doble cola y se consideraron significativos los valores inferiores a 0.05. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el *software SPSS 19.0* (Chicago, IL, USA).



RESULTADOS

Results



ARTÍCULO 1

Moratalla, A., *et al.*, “**Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis**”. *Liver Int*, 2014. 34(6): p. 850-8.

OBJETIVO

Evaluar los efectos de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre el tejido hepático, la pared intestinal y la tasa de TB en un modelo experimental de cirrosis.

RESUMEN

Se indujo daño hepático a ratones Balb/C por administración intragástrica de CCl₄ durante 12 semanas. La semana previa al sacrificio y toma de muestras, los animales recibieron CECT7765 (10⁹ UFC/día) o placebo intragástricamente. A todos los animales se les administró además *E.coli* (10⁷ UFC, dosis única), de forma intragástrica 24 horas antes de la laparotomía. Un grupo de animales que no recibieron tratamiento alguno actuaron como controles.

CECT7765 no mostró efecto sobre la fibrosis y el daño oxidativo hepático. Sin embargo, la tasa de TB y los niveles de endotoxina en suero disminuyeron significativamente en animales tratados con CECT7765 frente a los que sólo recibieron CCl₄. Se observó un aumento en la expresión de los marcadores de integridad de la pared intestinal en animales que recibieron CECT7765, observándose además una correlación cuantitativa con las copias de *Bifidobacterium spp.* del contenido intestinal. También se observó un aumento en la expresión génica de algunos mediadores anti-inflamatorios en los animales tratados con CECT7765 comparado con aquellos que recibieron placebo, en muestras de pared intestinal.

CONCLUSIÓN

La administración de CECT7765 se asocia con una mejora en la integridad de la pared intestinal y muestra un efecto beneficioso sobre la TB inducida en un modelo experimental de cirrosis.

CIRRHOSIS AND LIVER FAILURE

Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis

Alba Moratalla^{1,2}, Isabel Gómez-Hurtado^{1,2}, Arlette Santacruz³, Ángela Moya³, Gloria Peiró⁴, Pedro Zapater^{1,5}, José M. González-Navajas^{1,2}, Paula Giménez¹, José Such^{1,2,6}, Yolanda Sanz³ and Rubén Francés^{1,2,6}

1 CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

2 Unidad Hepática, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), Valencia, Spain

3 Ecología Microbiana y Nutrición, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), Valencia, Spain

4 Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

5 Unidad de Farmacología Clínica, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

6 Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Spain

Keywords

B. pseudocatenulatum CECT7765 – bacterial translocation – cirrhosis – inflammation – microbiota

Correspondence

Rubén Francés, PhD., CIBERehd-Liver Unit, Hospital General Universitario de Alicante, Avda. Pintor Baeza 12, 03010 Alicante, Spain
Tel: +34 965 913 928
Fax: +34 965 913 922
e-mail: frances_rub@gva.es

Received 16 July 2013

Accepted 31 October 2013

DOI: 10.1111/liv.12380

Abstract

Background & Aims: Intervention in the gut ecosystem is considered as a potential strategy to treat liver diseases and their complications. We have evaluated the effects of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 on bacterial translocation and the liver status in experimental cirrhosis. **Animals & Methods:** Liver damage was induced in Balb/c mice by weight-controlled oral administration of carbon tetrachloride. Laparotomies were performed at week 12. One week prior to laparotomy, animals received *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (10^9 cfu/daily) or placebo intragastrically. All animals received *Escherichia coli* (10^7 cfu/single dose) intragastrically 24 hours before laparotomy. A group of naïve non-treated animals was included as control. Liver tissue specimens, mesenteric lymph nodes, intestinal content and blood were collected. Liver histology, profibrogenic genes expression, bacterial DNA translocation, serum endotoxaemia and liver cytokine levels were measured. **Results:** *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 showed no significant effect on structural liver damage, as determined by histological evaluation, alpha-smooth muscle actin distribution, profibrogenic gene expression levels, total hydroxyproline levels and malon dialdehyde production compared with mice receiving placebo. Interestingly, bacterial DNA translocation and serum endotoxin levels were significantly decreased in mice receiving the *Bifidobacterium* strain compared with placebo. Gut barrier integrity markers were up-regulated in mice receiving *B. pseudocatenulatum* CECT7765 and quantitatively correlated with intestinal gene copy numbers of the bifidobacterial strain. Gene expression levels of several anti-inflammatory mediators were also increased in mice receiving *B. pseudocatenulatum* CECT7765 compared with placebo. **Conclusion:** Oral administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 is associated with improved gut barrier integrity and shows a beneficial effect against induced bacterial antigen translocation in the CCl₄-model of cirrhosis.

Translocation of bacteria or their products (BT) from the intestinal lumen to the mesenteric lymph nodes (MLNs) has been extensively documented as a frequent complication in cirrhosis, not only at end-stage but also in early stages of disease progression (1, 2). Mechanisms proposed to explain these bacterial translocation episodes include an increased intestinal permeability (3–5), an intestinal bacterial overgrowth (IBO) (6–8) and,

more recently, alterations in the gut microbiota composition (9, 10), which might contribute to increasing the liver exposure to microbial products and inflammatory signals coming from the gut. Therefore, the communication between the gut and the liver, the so-called gut-liver axis, is thought to be involved in cirrhosis, being gut microbiota a key regulator of inflammation and BT in this setting (11). Consequently, probiotics have

emerged as an alternative to antibiotic strategies in the treatment and prevention of infectious complications of cirrhosis.

Although the mechanisms by which probiotics may induce protective effects are not completely understood, they have been acknowledged to contribute to restoring alterations in intestinal permeability, microbiota composition and inflammatory responses. Strains of the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* have been among the most extensively studied microorganisms. Some *Bifidobacterium* strains seem to be implicated in host protection by preventing increased intestinal permeability and promoting a healthier microvillus environment (12, 13) whereas *Lactobacillus* strains have been reported to improve immune defense mechanisms (14, 15). Several studies report the restoration of neutrophilic function (16) or the reduction in liver inflammation and endotoxaemia by probiotics in patients with cirrhosis (17).

However, other studies report non-beneficial effects of probiotic supplementation on clinical or analytical variables of patients with cirrhosis (18, 19) revealing the controversy regarding their protective role in this condition. The primary aim of this study had been to evaluate the effects of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765, a strain that has already shown positive effects on the metabolic and immunological dysfunction associated with obesity in high-fat diet fed mice (20), on reducing MLN bacterial DNA translocation and serum endotoxaemia in the model of toxic-induced liver damage with carbon tetrachloride (CCl_4) exposed to bacterial challenge. Additionally, we have also evaluated the effect of this bacterial strain on the liver structural damage induced by CCl_4 administration in this model.

Methods

Animals and study design

Female Balb/c mice (Harlan, Barcelona, Spain) were included to run a 16-week study protocol, as described below. Mice were caged at a constant room temperature of 21 °C and exposed to a 12:12 light/dark cycle. Mice weighing 18–20 g were fed standard rodent chow and treated with 0.25 mmol/L phenobarbital in tap water along study protocol. Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Animal Research Committee of Universidad Miguel Hernandez (Alicante, Spain).

After a 4-week housing, animals were subjected to an experimental cirrhosis induction with two weekly, weight-controlled doses of CCl_4 intragastrically administered for 12 weeks using a sterile pyrogen free syringe with an attached stainless steel animal feeding tube without anaesthesia as previously described (10). Briefly, the first dose of CCl_4 was 100 $\mu\text{l}/\text{kg}$ (2 $\mu\text{l}/\text{mice}$) in mineral oil, and subsequent doses were adjusted based on

changes in weight 48 h after the last dose, reaching 100 $\mu\text{l}/\text{mice}$. One week prior to laparotomy, animals intragastrically received *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (CECT7765) (10^9 cfu daily) or placebo (vehicle), and 24 h before laparotomy, all animals received *Escherichia coli* (10^7 cfu/intragastrically). A group of naïve non-treated animals was included as control. Laparotomies were performed under anaesthesia with isoflurane at week 12 as previously described (10).

Bacterial strains and culture conditions

The strain CECT7765 and *E. coli* CECT45 were obtained from Spanish Type Culture Collection (CECT). The *Bifidobacterium* strain was grown in MRS broth (Scharlau, Barcelona, Spain) supplemented with 0.05% (w/v) cysteine (MRS-C Sigma, St. Louis, MO, USA), and incubated at 37 °C for 22 h (at stationary growth phase) under anaerobic conditions (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, UK). Cells were harvested by centrifugation (6.000 g for 15 min), washed twice in phosphate buffered saline (PBS, 130 mm sodium chloride, 10 mm sodium phosphate, pH 7.4) and re-suspended in 10% skimmed milk for oral administration to mice. *E. coli* was grown in 0.5 ml of Thioglycolate with Resazurin (Biomerieux, Marzy L'Etoile, France) and incubated at 37 °C for 22 h. Cells were harvested by centrifugation, washed twice in PBS and re-suspended in PBS for oral administration to mice. Aliquots of these suspensions were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until used. The number of live cells after freezing and thawing was determined by colony-forming unit (CFU) counting on MRS-C agar or McConkey agar (Biomerieux), respectively, after 48-h incubation. For the strains tested, more than 90% cells were alive upon thawing and no significant differences were found during storage time (2 months). One fresh aliquot was thawed for every new experiment to avoid variability in the viability of cultures.

Sample collection

After laparotomies, all detectable MLNs were aseptically removed. Animals under anaesthesia were euthanized by heart injection and total blood collection. Liver, spleen, intestinal wall and content from caecum (10 cm) and blood were collected. The liver was perfused *in situ* with 6 ml of Hanks balanced salt solution (HBSS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} at 37 °C at a rate of 1.5 ml/min. This was followed by perfusion with 12 ml of HBSS containing 100 mm CaCl_2 solution at the same perfusion rate. The liver was then removed and rinsed with 3 ml of HBSS.

Histological analysis

Liver biopsy specimens between 10 and 15 mm in size were fixed in buffered formalin and embedded in

paraffin. Histological changes were first evaluated by routine haematoxylin and eosin (H&E) in four-micrometer thick sections. Hepatic fibrosis and architectural distortion were estimated with the connective tissue stain Masson trichrome. The amount of fibrosis was blindly assessed semiquantitatively based on the Ishak score (21) by a senior pathologist (GP), using a conventional light microscope (Olympus BX50, Barcelona, Spain). A morphometric analysis of fibrotic area in liver histological sections (per cent blue area in Mason's trichrome-stained livers) was blindly performed using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical assay was carried out in serial sections of paraffin-embedded liver tissue. We used heat-induced antigen retrieval before exposure to the primary antibody (monoclonal mouse anti-human alpha-smooth muscle actin; clone 1A4; ready-to-use) (Dako/Agilent Technologies; Carpinteria, CA, USA). The staining was performed using the EnVision™ Flex detection system and an Autostainer Link 48 (Dako/Agilent Technologies). As a negative control, staining was carried out in the absence of primary antibody.

Tissue lysates and immunoblotting

Intestinal wall and liver samples were homogenized by sonication. Tissue homogenates were then lysed with RIPA buffer, protein concentration determined by Bradford assay and protein extracts (15 µg protein/lane) handled as previously described (22). The primary antibodies used against alpha-smooth muscle actin (α -SMA), occludin, tight junction protein (TJP)-1, as markers of intestinal barrier dysfunction, tumour necrosis factor alpha (TNF- α), TNF- α receptor I (TNF-RI), TNF-RII, interleukin (IL)-10, IL-10 receptor (IL-10R) and β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany).

Liver hydroxyproline, malonyl dialdehyde, occludin and TJP-1 levels

Quantitative levels of Hydroxyproline (Biomedical Assay, Shanghai, China) and MDA BlueGene Biotech, Shanghai, China) in the liver, and occludin and TJP-1 (Antibodies Online, Aachen, Germany) in the intestinal wall samples were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) according to the manufacturers' instructions after tissue sonication. All samples were tested in duplicate and read in a Sunrise Microplate Reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland). Lower limit of detection for the Hydroxyproline assay was 10 ng/mg tissue, for the MDA assay was 10 pg/mg tissue and for occludin and TJP-1 was 100 pg/mg tissue.

Gene expression analysis

Total cellular RNA was isolated from 20 to 30 mg of liver and 10cm of intestinal wall disrupted by sonication (Hielscher UP100H Ultrasonic Processor, Teltow, Germany) followed by QIAamp RNA Tissue Minikit (QIAGEN, Hilden, Germany). α -SMA, collagen α -1, collagen α -3, tumour growth factor beta (TGF- β)-1, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and matrix metalloproteinase (MMP)-2 genes. Occludin, TJP-1, TNF- α , TNF-RI, TNF-RII, IL-10 and IL-10R gene expression levels were determined in the disrupted intestinal samples. Quantitec SYBR Green (QIAGEN) was used to perform all gene expression analyses in an IQ5 Real-Time PCR (BioRad, Hercules, CA, USA). Primer pair sequences used in this study were designed using Primer-BLAST tool from NCBI (Bethesda, MD, USA) (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) and are listed in Table S1.

Identification of bacterial DNA and serum endotoxin

Bacterial DNA was detected and identified in MLN and blood samples according to the methodology described elsewhere (23, 24). The quantitative chromogenic limulus amoebocyte lysate test (BioWhittaker, Nottingham, UK) was performed to evaluate serum endotoxin levels according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in duplicate and read at 405 nm in a Sunrise Microplate Reader.

Quantification of *Bifidobacterium* in the intestinal content

Samples of intestinal content from caecum were frozen immediately after collection at -20°C and stored until analysed. Samples were weighted and diluted 1:5 (w/v) in phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.2) homogenized and one aliquot of this dilution was used for DNA extraction using the QIAamp DNA stool Mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Specific primers (Table S1) targeting the genus *Bifidobacterium* were used to quantify their total gene copy numbers by qPCR using LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Pleasanton, CA, USA) with an ABI PRISM 7000-PCR sequence detection system (Applied Biosystems, Cheshire, UK), as described previously (25). Data are expressed as log of gene copy numbers per gram of intestinal content.

Statistical analysis

Continuous variables are reported as mean \pm standard deviation and categorical variables as frequency or percentages. Quantitative data were analysed using the Mann-Whitney *U*-test or the Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparisons using the Mann-Whitney *U*-test with the *post hoc* Bonferroni correction

for multiple comparisons. Differences in qualitative variables were analysed using the Chi-square test. Bivariate correlations between continuous variables were calculated using the Spearman test. All reported *P* values are 2-sided, and *P* values lower than 0.05 were considered to indicate significance. All calculations were performed using the IBM SPSS Statistics 19.

Results

Characteristics of animals

A total of 65 animals were included in this study. Thirteen animals died during liver damage induction (20%). Causes of death were CCl₄ toxicity and liver insufficiency. Animals were grouped in basal (naïve) and 12 weeks of CCl₄ administration (cirrhosis). None of the CCl₄-treated animals showed evidence of ascitic fluid at laparotomy. Characteristics of mice in both groups can be followed in Table S2.

Effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 administration on CCl₄-induced liver damage

Figure 1 shows the liver damage after the 12-week experimental protocol either treated or not with the bifidobacterial strain. As can be observed at histological sections and their morphometric analysis, the extent of fibrotic areas were decreased in animals receiving the bifidobacteria compared with placebo, although differences did not reach statistical significance (Ishak scores:

3.8 ± 0.8 vs 4.4 ± 0.6 , *P* = ns) (Fig. 1A). Histological distribution, gene expression and protein quantification (Fig. 1B–D) revealed a non-significant effect of the bifidobacterial strain on alpha-SMA expression in the liver of CCl₄-mice. Table 1 shows Hydroxyproline and MDA levels, as well as gene expression levels of different profibrogenic markers in the liver of animals distributed by the use of *B. Pseudocatenulatum* CECT7765. No significant differences were observed for any of the studied parameters between the bifidobacterial strain and the use of placebo.

B. pseudocatenulatum CECT7765 administration reduces bacterial antigen translocation in CCl₄-treated mice

Escherichia coli administration to cirrhotic mice induced bacterial antigen translocation into MLNs in 18 of 20 (90%) mice treated with placebo. However, only 9 mice of 20 (45%, *P* = 0.01) treated with the bifidobacterial strain showed bacterial DNA in MLNs (Fig. 2A). Spontaneous bacterial antigen translocation was detected in 1 mouse (8%) from the control group. Sequencing analysis identified *E. coli* in all cases. No bacterial DNA from bifidobacteria was identified in MLNs of any included mice.

The administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 also showed a significant reduction in the serum endotoxin levels observed in cirrhotic mice after being exposed to *E. coli* in comparison with mice receiving placebo (Fig. 2B). Figure S1 shows the effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 administration on bacterial translocation in healthy control animals.

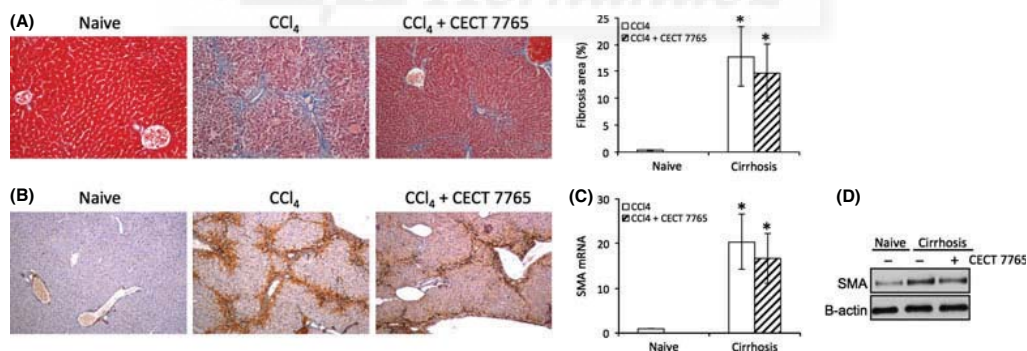


Fig. 1. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 effect on liver damage. (A) Example of histological changes in CCl₄-treated mice receiving or not CECT7765 and morphometric analysis of fibrotic area in liver histological sections (per cent blue area in Mason's trichrome-stained livers). Hepatic sections stained with Masson Trichrome (original magnification $\times 10$), showing light to strong blue staining, as a reflection of the collagen deposition: no histopathological changes (naïve); marked fibrosis in the majority of portal spaces with frequent portal-portal and portal-central bridging and architectural distortion (regenerative nodules). (B) Hepatic sections stained with alpha-SMA (original magnification $\times 100$), showing positive staining in perivascular myoepithelial cells and scattered perisinusoidal spindle cells in a parenchyma without histopathological changes (naïve); moderate to strong expression in areas with complete fibrous septa, as well as in perisinusoidal spindle cells (cirrhosis). (C) Relative gene expression levels of alpha-SMA in study groups. Mean values in CCl₄-treated mice with or without CECT7765 (*n* = 20/group) \pm standard deviation are represented. **P* < 0.01 compared with naïve mice; (D) Representative immunoblot for alpha-SMA expression in the liver of CCl₄-mice with or without CECT7765. SMA, smooth muscle actin.

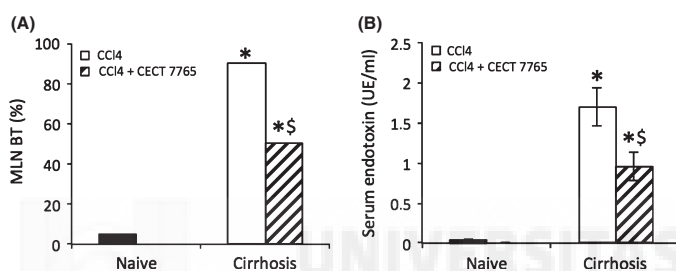
Table 1. Hydroxyproline and MDA levels in the liver of CCl₄-treated mice according to the administration of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765, and relative gene expression levels of different profibrogenic genes

	Naive (n = 12)	CCl ₄ (n = 20)	CCl ₄ + CECT7765 (n = 20)
Hydroxyproline (ug/g liver)	144.4 ± 60.1	668.8 ± 224.6*	527.7 ± 191.4*
MDA (pg/mg liver)	31.5 ± 7.8	61.3 ± 10.6*	53.3 ± 11.7*
Collagen alpha-1 (mRNA)	1	26.5 ± 5.8*	21.7 ± 6.3*
Collagen alpha-3 (mRNA)	1	20.4 ± 6.2*	16.6 ± 5.6*
TGF-B (mRNA)	1	19.1 ± 4.2*	15.6 ± 5.8*
TIMP-1 (mRNA)	1	36.1 ± 7.9*	29.1 ± 8.6*
TIMP-1 (mRNA)	1	33.6 ± 8.2*	28.2 ± 7.2*

Mean values ± standard deviations are represented.

*P < 0.01 compared with naive mice.

MDA, malondyaldehyde; TGF-b, Tumour growth factor beta; TIMP-1, Tissue inhibitor of metalloproteinase 1; MMP-2, Matrix metalloproteinase 2.

**Fig. 2.** *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 effect on bacterial translocation. (A) Bacterial DNA translocation into MLNs in CCl₄-mice either receiving or not *B. pseudocatenulatum* CECT7765; (B) Serum endotoxin levels in CCl₄-mice either receiving or not *B. pseudocatenulatum* CECT7765. *P < 0.01 compared with naive mice; \$P < 0.01 compared with CCl₄-mice without *B. pseudocatenulatum* CECT7765.

B. pseudocatenulatum CECT 7765 administration ameliorates gut barrier integrity and inflammation

In order to elucidate possible mechanisms for the bifidobacterial strain to reduce bacterial antigen translocation in cirrhotic mice, intestinal barrier integrity markers were evaluated. Levels of occludin and TJP-1 in animals receiving weekly doses of CCl₄ were significantly decreased compared with basal levels. Administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 significantly increased occludin (Fig. 3A) and TJP-1 (Fig. 3B) both at gene and protein expression levels.

Total gene copy numbers of *Bifidobacterium* spp. were quantified in all cirrhotic animals and showed a positive correlation with ELISA-measured protein expression levels of occludin (Fig. 3C) and TJP-1 (Fig. 3D).

Gene expression levels of anti-inflammatory free fatty acid and folate receptors Ffar2, Ffar3 and FolR, specifically induced by bifidobacterium spp., were up-regulated in the intestinal wall of animals treated with CCl₄ and the bifidobacterial strain compared with those receiving CCl₄ and placebo (Table 2). Pro-inflammatory cytokine TNF- α and its receptors were significantly increased in cirrhotic mice treated with placebo prior to bacterial challenge with *E. coli*, whereas the expression

of these pro-inflammatory genes was down-regulated in animals receiving *B. pseudocatenulatum* CECT7765. Finally, IL-10 and IL-10R gene expression levels were increased in intestinal wall samples from mice receiving the bifidobacterial strain compared with those receiving placebo (Table 2). Gene expression levels of anti-inflammatory free fatty acid and folate receptors, IL-10 and IL-10R in healthy control mice are shown in Table S3.

No significant differences in the gene expression levels of gut integrity markers or studied inflammatory mediators were observed between bacterial DNA-positive and bacterial DNA-negative mice considering all CCl₄-treated animals, either with or without *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 (data not shown). Figure S2 shows the effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 administration on gut barrier integrity in healthy control animals.

Discussion

In this study, we intended to evaluate the effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 on a well-known experimental model of cirrhosis considering two main outcomes: bacterial translocation and liver damage. Results presented show that bacterial antigen translocation, a

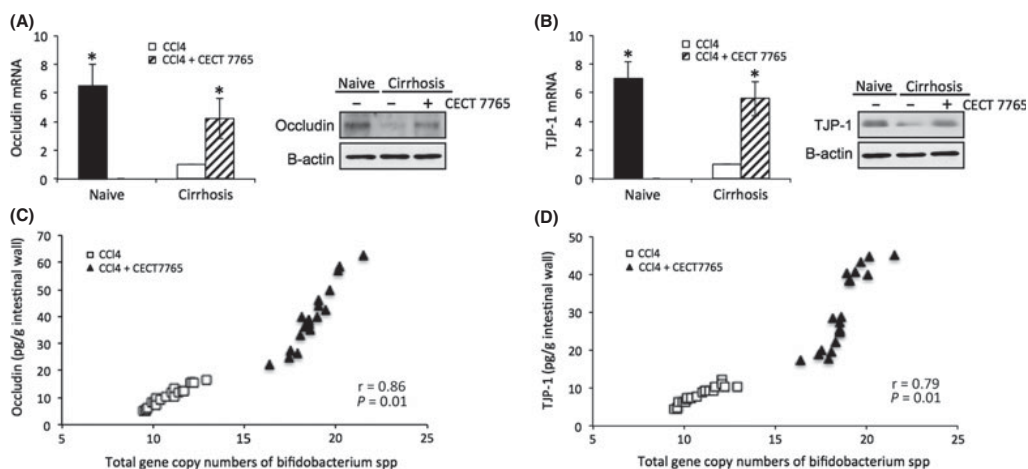


Fig. 3. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 effect on gut barrier integrity markers. (A) Gene and protein expression levels of occludin ($n = 20$ each group). (B) Gene and protein expression levels of tight junction protein-1 (TJP) ($n = 20$ each group). A representative immunoblot for each marker is shown for both groups. * $P < 0.01$ compared with CCl_4 -mice treated with placebo; (C) Correlation between intestinal gene copy numbers of *Bifidobacterium* spp. and occludin protein levels; (D) Correlation between intestinal gene copy numbers of *Bifidobacterium* spp. and TJP-1 protein levels; TJP-1: tight junction protein 1.

Table 2. Gene expression levels of inflammatory markers in intestinal tissue samples

mRNA	CCl_4 ($n = 20$)	$\text{CCl}_4 + \text{CECT7765}$ ($n = 20$)
Ffar 2	$0.70 \pm 0.10^*$	$20.65 \pm 6.60^\dagger$
Ffar 3	$0.60 \pm 0.15^*$	$26.85 \pm 5.12^\dagger$
FolR	$0.76 \pm 0.20^*$	$35.4 \pm 7.42^\dagger$
IL-10	$2.60 \pm 1.12^*$	$15.89 \pm 3.95^\dagger$
IL-10	$2.90 \pm 0.82^*$	$18.59 \pm 7.10^\dagger$
TNF-alpha	$13.15 \pm 3.80^*$	$4.14 \pm 1.06^\dagger$
TNF-RI	$14.12 \pm 4.10^*$	$5.95 \pm 1.30^\dagger$
TNF-RII	$13.05 \pm 4.40^*$	$4.40 \pm 1.62^\dagger$

Mean values \pm standard deviations are represented.

* $P < 0.01$ compared with naive mice.

$^\dagger P < 0.01$ compared with mice receiving *B. pseudocatenulatum* CECT7765.

FFAR, free fatty acid receptor; FolR, folate receptor; IL-10, interleukin 10; IL-10R, interleukin 10 receptor; TNF- α , tumour necrosis factor alpha; TNF-RI, tumour necrosis factor alpha-receptor I; TNF-RII, tumour necrosis factor alpha-receptor II.

frequent complication in cirrhosis, is significantly reduced although not erased after a bacterial challenge with orally administered *E. coli* in mice receiving the bifidobacterial strain compared with placebo whereas no significant effect is induced over the CCl_4 -modified liver architecture.

The use of alternative strategies to antibiotics to restore the intestinal homeostasis and reduce the adverse stimuli reaching the liver via the gut-liver axis is being investigated to improve the inflammatory

condition in chronic diseases such as cirrhosis, but showing controversial results (16–19, 26, 27). In the present investigation, we have used the strain *B. pseudocatenulatum* CECT7765, which was previously reported to exert protective effects in metabolic and immune parameters in an animal model of obesity (20), to evaluate its effects on the translocation of bacterial antigens, which have been related in the past with an increased inflammatory outlook in this setting (28) and, secondly, on fibrosis status in mice with CCl_4 -induced cirrhosis.

As shown in Fig. 1 and Table 1, the effect of the *B. pseudocatenulatum* CECT7765 on fibrosis and oxidative damage was limited. Although all markers showed a slight reduction in mice receiving the bifidobacterial strain, the difference with mice receiving placebo was not statistically significant. However, this trend might justify the evaluation of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 higher doses or for longer periods of time as a strategy to ameliorate the structural liver injury in cirrhosis. In fact, previous studies have investigated the modulation of liver fibrosis after administration of different probiotic preparations. VSL#3, for instance, has been reported to attenuate fibrosis in a diet-induced non-alcoholic steatohepatitis model (29). Although that study reported no effect over liver inflammatory markers, others have shown a reduced lipid peroxidation and TNF- α secretion by an enhanced macrophage function activity in CCl_4 -mice after administration of selenium-enriched lactobacillus (30). Other strains of the species *B. pseudocatenulatum* have been reported to induce

IL-10 production by dendritic cells in previous studies (31). In our study, gene expression levels of IL-10 and its receptor IL-10R are increased in intestinal samples from mice receiving *B. pseudocatenulatum* CECT7765 compared with placebo, suggesting a possible IL-10-mediated anti-inflammatory mechanism as previously shown in cirrhotic patients on norfloxacin as secondary prophylaxis of SBP (22). Accordingly, pro-inflammatory TNF- α , TNF-RI and TNF-RII were down-regulated in the intestinal wall of mice treated with the bifidobacterial strain.

The ability of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 to reduce bacterial translocation, a frequent and severe complication in cirrhosis, was the primary goal of this study. To evaluate this, bacterial translocation was induced by administration of *E. coli* to all animals 24 h before laparotomies. Although the bifidobacterial strain did not completely erase bacterial DNA translocation, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 significantly reduced induced bacterial translocation, as demonstrated by the reduction in the MLN bacterial DNA translocation rate and in the serum endotoxin levels in CCl₄-mice treated with *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (Fig. 2) compared with CCl₄-mice treated with placebo. It is possible that an earlier administration of the bifidobacterial strain, for a longer period of time or at a higher concentration might have reduced bacterial DNA translocation rates even more. Also, spontaneous bacterial DNA translocation has been described in CCl₄-induced experimental models [50–80% in CCl₄-mice (10) and 60–70% of CCl₄-rats (24)]. *E. coli*-induced bacterial translocation was performed to guarantee bacterial translocation in all studied animals and significantly discriminate the effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 on this process. The identification by sequencing analysis confirmed in all BT-positive cases the unique presence of the same bacterial species than that orally administered. Therefore, we consider that spontaneous BT may not be affecting the presented results.

Concerning safety, no bacterial DNA from bifidobacteria was identified in MLNs of bacterial DNA-positive samples in any case. Several studies had already investigated the potential benefit of probiotics in reducing BT rates, obtaining different results. For instance, a symbiotic preparation including several *Lactobacillus* strains reduced hepatic inflammation and endotoxaemia in patients with cirrhosis (17) and, in experimental animal models, endotoxaemia and severity of alcoholic liver disease was reduced by administration of *Lactobacillus* spp. (32). On the other hand, although Guarner et al. reported the effect of *Lactobacillus johnsonii* and antioxidants on ameliorating BT by decreasing intestinal bacterial overgrowth and intestinal oxidative damage in rats with experimental cirrhosis (33), the same group has recently proved that taken antioxidants out, *Lactobacillus johnsonii* fails to reduce BT in these animals (27). Similarly, Bauer et al. reported the failure of

Lactobacillus spp. to prevent BT in a rat model of experimental cirrhosis (34).

Explaining the protective effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 on the translocation of bacterial antigens into MLNs, the administration of the bifidobacterial strain was associated with the improvement of the gut barrier integrity, as evaluated by the occludin and TJP-1 gene and protein expression in homogenized extracts from the intestinal tissue. The expression of these molecules was up-regulated in mice receiving *B. pseudocatenulatum* CECT7765 compared with placebo and quantitatively correlated with the total gene copy numbers of the bifidobacterial strain in cirrhotic mice. Furthermore, the administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 was also associated with an anti-inflammatory environment promoted by the increased production of specific receptors for FFAs and folate (Fig. 3). The ligands for these receptors are produced by certain clostridia and bifidobacterial strains (35–37) and, in agreement with these results, they had already been described to contribute to reduce BT events in experimental cirrhosis in previous studies from our group (10).

In summary, this study shows the beneficial effects of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in the CCl₄-model of cirrhosis and provides rationale for evaluating its role in preventing bacterial complications in other experimental models of liver injury.

Acknowledgements

The authors thank the SEA staff at Universidad Miguel Hernández, San Juan, Spain, for caring of animals, and Cristina Pomares for technical assistance.

Financial support: This work has been supported by grants CP05/0005 and PI10/0340 from the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; AGL2011-25169 and Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063 from the Ministry of Science and Innovation, Spain; AP-026/09 and AP-124/09 from Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, Spain; and C-5 from Fundación FCVI-HGUA, Alicante, Spain. Moratalla A. is recipient of a grant ACIF-2012/015, Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana, Spain. A. Santacruz had a scholarship CONACYT (México) and A. Moya had a scholarship from MICINN (Spain).

Conflict of interest: The authors do not have any disclosures to report.

References

1. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; **23**: 217–44.
2. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005; **41**: 422–33.
3. Campillo B, Pernet P, Bories PN, et al. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; **11**: 755–9.

4. Pascual S, Such J, Esteban A, et al. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 2003; **50**: 1482–6.
5. Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol* 2012; **56**: 1283–92.
6. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; **26**: 1372–8.
7. Chang CS, Yang SS, Kao CH, Yeh HZ, Chen GH. Small intestinal bacterial overgrowth versus antimicrobial capacity in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Gastroenterol* 2001; **36**: 92–6.
8. Bauer TM, Steinbrückner B, Brinkmann FE, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001; **96**: 2962–7.
9. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011; **53**: 96–105.
10. Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl₄-induced fibrosis. *PLoS ONE* 2011; **6**: e23037.
11. Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; **18**: 353–72.
12. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999; **117**: 577–83.
13. Ruseeler-van Embden JG, van Lieshout LM, Gosselink MJ, Marteau P. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand J Gastroenterol* 1995; **30**: 675–80.
14. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995; **78**: 491–7.
15. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; **35**: 483–9.
16. Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, et al. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2008; **48**: 945–51.
17. Liu Q, Duan ZP, Ha DK, et al. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004; **39**: 1441–9.
18. Pande C, Kumar A, Sarin SK. Addition of probiotics to norfloxacin does not improve efficacy in the prevention of spontaneous bacterial peritonitis: a double-blind placebo-controlled randomized-controlled trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; **24**: 831–9.
19. Pereg D, Kotliroff A, Gadoth N, et al. Probiotics for patients with compensated liver cirrhosis: a double-blind placebo-controlled study. *Nutrition* 2011; **27**: 177–81.
20. Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet fed mice. *Obesity*. (Silver.Spring) 2013. In press.
21. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; **22**: 696–9.
22. Gomez-Hurtado I, Zapater P, Bellot P, et al. Interleukin-10-mediated heme oxygenase 1-induced underlying mechanism in inflammatory down-regulation by norfloxacin in cirrhosis. *Hepatology* 2011; **53**: 935–44.
23. Such J, Frances R, Munoz C, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; **36**: 135–41.
24. Guarner C, Gonzalez-Navajas JM, Sanchez E, et al. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl₄-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006; **44**: 633–9.
25. Santacruz A, Collado MC, Garcia-Valdes L, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr* 2010; **104**: 83–92.
26. Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008; **42**: 675–82.
27. Soriano G, Sanchez E, Guarner C, Schiffrin EJ. *Lactobacillus johnsonii* LA1 without antioxidants does not decrease bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 2012; **57**: 1395–6.
28. Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008; **47**: 978–85.
29. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* 2009; **49**: 989–97.
30. Chen L, Pan DD, Zhou J, Jiang YZ. Protective effect of selenium-enriched *Lactobacillus* on CCl₄-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 5795–800.
31. Young SL, Simon MA, Baird MA, et al. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**: 686–90.
32. Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM. *Lactobacillus* feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; **205**: 243–7.
33. Chiva M, Soriano G, Rochat I, et al. Effect of *Lactobacillus johnsonii* LA1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; **37**: 456.
34. Bauer TM, Fernandez J, Navasa M, Vila J, Rodes J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; **36**: 501–6.
35. Segain JP, de la Raingard BD, Bourreille A, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; **47**: 397–403.
36. Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Inhibition of interferon gamma signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Mol Cancer Res* 2003; **1**: 855–62.
37. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 2011; **3**: 118–34.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Primer pair sequences used in this study.

Table S2. Characteristics of animals.

Table S3. Gene expression levels of inflammatory markers in intestinal tissue samples of healthy mice.

Fig. S1. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 effect on bacterial translocation in healthy mice.

Fig. S2. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 effect on gut barrier integrity markers in healthy mice.



ARTÍCULO 2

Moratalla, A., *et al.*, “**Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis**”. *Eur J Nutr*, 2015. doi: 10.1007/s00394-015-0837-x.

OBJETIVO

Discriminar el mecanismo de interacción entre *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 y los LIs en un modelo experimental de cirrosis.

RESUMEN

Se indujo daño hepático a ratones Balb/C por administración intragástrica de CCl₄ durante 12 semanas. La semana previa a la laparotomía, los animales se agruparon en función de la dosis de CECT7765 recibida (10⁷, 10⁹ o 10¹⁰ UFC/día) o placebo intragástricamente. Un grupo de animales que no recibieron tratamiento alguno actuaron como controles.

CECT7765 disminuyó la expresión de receptores de quimiocinas pro-inflamatorios CCR6, CCR9, CXCR3 y CXCR6 y provocó un cambio hacia un perfil anti-inflamatorio en LIs de animales tratados con CCl₄ de forma dependiente de concentración. CECT7765 indujo dicha modulación de la inflamación a través de TLR-2, ya que se observó una disminución en la secreción de IL-10 y un aumento de TNF- α tras el bloqueo de TLR-2 *in vitro*. La administración de CECT7765 también mejoró la integridad de la pared intestinal de animales tratados con CCl₄, evidenciado por una menor tasa de recuperación de FITC-LPS. Esta reducción de la permeabilidad intestinal se asoció con una disminución de la tasa de TB en hígado en los animales que recibieron CECT7765 con respecto a los controles. La inflamación y la función hepática mejoraron con la administración de CECT7765, pero solo a dosis altas (10¹⁰ UFC).

CONCLUSIÓN

La administración de CECT7765 mejora la homeostasis intestinal, reduciendo la actividad pro-inflamatoria de los LIs en un modelo experimental de cirrosis.

***Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis**

Alba Moratalla · Isabel Gómez-Hurtado · Ángela Moya-Pérez · Pedro Zapater · Gloria Peiró · José M. González-Navajas · Eva María Gómez Del Pulgar · José Such · Yolanda Sanz · Rubén Francés

Received: 27 August 2014 / Accepted: 12 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Background Intestinal homeostasis plays an important role in bacteria-derived complications in cirrhosis. Intestinal lymphocytes are responsible for immune effector functions and can be modulated by certain probiotics. We evaluate the interaction between *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 and intestinal lymphocytes in mice with cirrhosis.

Animals and methods Cirrhosis was induced by intragastrical administration of carbon tetrachloride in Balb/C mice. One week prior to laparotomy, animals received *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (10^7 , 10^9 or 10^{10} cfu/daily) or placebo. Chemokine receptor and cytokine expression were evaluated in intestinal lymphocytes. Gut permeability was studied by FITC-LPS recovery in vivo. Luminal antigens, inflammation and functional markers were evaluated in liver samples.

Results *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 decreased the expression of pro-inflammatory chemokine receptors CCR6, CCR9, CXCR3 and CXCR6 in intestinal lymphocytes from cirrhotic mice in a concentration-dependent manner. The bifidobacterial strain induced a shift towards an anti-inflammatory cytokine profile in this cell subset. *B. pseudocatenulatum* CECT7765-induced inflammatory modulation was TLR2-mediated, as in vitro TLR2 blockade inhibited the reduction of TNF-alpha and its receptors and the increase of IL-10 and IL-10 receptor secretion. The recovery rate of administered fluorescence-labelled endotoxin was significantly and dose-dependently lowered with the bifidobacterial strain. The reduced intestinal permeability was associated with a decreased burden of bacterial antigens in the liver of mice treated with *B. pseudocatenulatum* CECT7765. Liver function and inflammation were improved with the use of the bifidobacterial strain at the highest dose tested (10^{10} cfu).

Conclusion *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 improves gut homeostasis and prevents gut-derived complications in experimental chronic liver disease.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00394-015-0837-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Moratalla · I. Gómez-Hurtado · P. Zapater · J. M. González-Navajas · J. Such · R. Francés
CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

A. Moratalla · J. M. González-Navajas · R. Francés
FISABIO, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

Á. Moya-Pérez · E. M. Gómez Del Pulgar · Y. Sanz
Grupo Ecología Microbiana, Nutrición y Salud, IATA-CSIC, Valencia, Spain

P. Zapater
Servicio de Farmacología Clínica, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

G. Peiró
Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

J. Such · R. Francés (✉)
Departamento de Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, San Juan, Spain
e-mail: frances_rub@gva.es

Keywords Cirrhosis · Endotoxin · *B. pseudocatenulatum* CECT7765 · Inflammation · Toll-like receptor 2 · Intestinal lymphocytes

Introduction

Bacteria-derived complications are frequent in cirrhosis [1, 2]. Most episodes of bacterial translocation (BT) are due to endogenous microorganisms coming from the gut. Since alterations in the gut microbiota composition have been described to increase inflammatory signals and the liver exposure to microbial products [3, 4], the possibility of re-shaping gut microbiota composition to improve immune homeostasis and to prevent the translocation of commensal bacteria or their products into mesenteric lymph nodes (MLNs) is of increasing interest in cirrhosis [5–7].

We have recently shown that the oral administration of a bifidobacterial strain (*Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765) to CCl₄-treated mice is associated with a reduced inflammatory environment and lower BT rates compared with animals not receiving the probiotic strain [8]. However, the mechanism by which this strain interacts with intestinal lymphocytes (ILs), responsible for the eventual effector functions after antigen recognition, remains unclear. This crosstalk would help in explaining homeostasis restoration and the reduction of gut permeability by *B. pseudocatenulatum* CECT7765.

The intestinal lamina propria is loaded with pre-activated T-helper cells coming from the MLNs. This expansion into the intestinal mucosa is mediated by cell adhesion molecules present on the T cell surface and plays a central role in chronic intestinal inflammation [9, 10]. One of the main receptors involved in bacterial product recognition and in regulating adaptive immune responses is the Toll-like receptor (TLR) family. For instance, *B. breve* activates intestinal dendritic cells to produce interleukin (IL)-10 and IL-27 in a TLR2-dependent manner and induce IL-10-producing regulatory T cells [11]; *C. butyricum* can suppress TLR-4 expression in intestinal epithelial cells by induction of IL-10-producing macrophages [12, 13]; and *B. fragilis* is able to restore the Th1/Th2 balance by stimulation of IL-10-producing CD4⁺ T cells [14].

In addition, the ability of commensal bacteria to increase TLR expression has been reported [15–17], showing the susceptibility of TLR responses to intestinal microbiota products. With this background, and considering that cirrhosis is associated with a dysbiosis in the microbiota composition, we hypothesise that *B. pseudocatenulatum* CECT7765 will induce its regulatory effect by changing the TLR expression profile in intestinal T cells of mice with chemically induced cirrhosis. To evaluate this, our objective has been to determine the pathway of intestinal immune response modulation by *B. pseudocatenulatum* CECT7765 in experimental cirrhosis.

Animals and methods

Experimental model and design

Female Balb/C (Harlan, Barcelona, Spain) with 18–20 g initial body weight were included in a cirrhosis induction protocol by intragastrical administration of 2 weekly doses of CCl₄ during 12 weeks. Phenobarbital (0.25 mmol/L) was given in drinking water along study protocol. Mice received 2 μ L of CCl₄ in mineral oil at the beginning of the protocol (100 μ L/kg), and the dose was increased based on changes in weight 48 h after the previous dose, reaching 100 μ L/mice. CCl₄ was administered using a sterile pyrogen-free syringe with an attached stainless steel animal feeding tube without anaesthesia as previously described [4]. One week prior to laparotomy, animals received *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (10⁷, 10⁹ or 10¹⁰ cfu administered daily intragastrically) or placebo (vehicle). A group of naïve non-treated animals were included as a control group. Laparotomies were performed under anaesthesia with isoflurane at week 12. After laparotomies, all detectable MLNs were aseptically removed. Animals under anaesthesia were euthanised by heart injection and total blood collection. Liver, spleen, complete small intestine, content from caecum and blood were collected. The liver was perfused in situ with 6 mL of Hanks' balanced salt solution (HBSS) without Ca²⁺ and Mg²⁺ at 37 °C at a rate of 1.5 mL/min as previously described [8]. Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The study was approved by the Animal Research Committee of Universidad Miguel Hernandez (Alicante, Spain).

B. pseudocatenulatum CECT7765 culture conditions

The strain *B. pseudocatenulatum* CECT7765 was obtained from Spanish Type Culture Collection (CECT). The strain was grown in MRS broth (Scharlau, Barcelona, Spain) supplemented with 0.05 % (w/v) cysteine (MRS-C Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C for 22 h (at stationary growth phase) under anaerobic conditions (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, UK). Cells were harvested by centrifugation (6.000g for 15 min), washed twice in phosphate-buffered saline (PBS, 130 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate, pH 7.4) and re-suspended in 10 % skimmed milk for oral administration to mice or in PBS for in vitro/culture experiment. Aliquots of these suspensions were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until used. The number of live cells was determined by colony-forming unit (CFU) counting on MRS-C agar (Biomérieux) after 48-h incubation at 37 °C. For the strains tested, more than 90 % cells were alive upon

thawing and no significant differences were found during storage time (2 months). One fresh aliquot was thawed for every new experiment to avoid variability in the viability of cultures.

Intestinal lymphocytes (IL) isolation and culture

The whole small intestine was removed from naïve and CCl₄-treated mice. Peyer's patches, fatty tissue and mesentery were dissected out. The gut was cut into small pieces (1 cm), cleaned by flushing with a syringe filled with cold phosphate-buffered saline (PBS) calcium and magnesium free (Euroclone, Milano, Italy), supplemented with 2 % foetal bovine serum (FBS; LifeTechnologies, Madrid, Spain) and open longitudinally. Intraepithelial mononuclear cells were liberated by incubating in HBSS supplemented with 5 % FBS, with dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) during 20 min, twice. Epithelial cells were discarded after incubating with EDTA (BioRad, Madrid, Spain) in HBSS calcium and magnesium free (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) and washing with 1,640 medium (LifeTechnologies) supplemented with 5 % FBS. Thereafter, segments were incubated during 45 min at 37 °C in RPMI, containing 2 mg/mL of collagenase D (Roche Diagnostic, Barcelona, Spain) and 1 % FBS, and later passed through a stainless steel sieve to obtain the lamina propria mononuclear cell suspension. Intraepithelial and lamina propria collected mononuclear cells were filtered through a packed nylon wool fibre column (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) to remove mucus and dead cells. Erythrocytes were lysed using a hypertonic solution (EasyLyse; Dako, Barcelona, Spain). Intestinal T cells were positively selected from filtered cells using CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain). IL enrichment was evaluated by flow cytometry using a FACS CANTO (Becton–Dickinson, San Jose, CA) and can be followed in Supplementary Fig. 1. Cells were adjusted to 1×10^6 /mL in DMEM (Euroclone) for culture experiment.

IL cells, obtained as described before, from 5 CCl₄-treated mice not receiving the bifidobacterial strain were used for in vitro assays. Cells (0.5×10^6 /well) were incubated at 37 °C with 5 % CO₂ for 24 h in the following conditions: unstimulated, stimulated with LPS (0.2 ug/mL *E. coli* serotype O111: B4), stimulated with *B. pseudocatenulatum* CECT7765 10^7 cfu/100 uL PBS and stimulated with *B. pseudocatenulatum* CECT7765 10^9 cfu/100 uL PBS. Half of all conditions were also incubated with 10 ug/mL blocking monoclonal antibody anti-TLR-2 (Antibodies Online GmbH, Aachen, Germany). Cells and supernatants were collected for gene expression analyses and cytokine secretion, respectively.

As supporting in vitro experiment, IL cells from an additional batch of CCl₄-treated mice were incubated at 37 °C

with 5 % CO₂ for 24 h in the following conditions: unstimulated, stimulated with LPS (0.2 ug/mL *E. coli* serotype O111: B4), *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. animalis* and *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (in all cases 10^9 cfu/100 uL PBS). Supernatants were collected for cytokine secretion assays.

Chemokine receptor and inflammatory cytokine expression in ILs

Gene expression levels of chemokine receptors CCR6, CCR9, CXCR3 and CXCR6, as well as TNF- α , TNF receptor (TNFR) I, TNFRII, IL-10, IL-10 receptor (IL-10R), and TLRs, were quantified in total RNA from ILs using Quantitec SYBR Green (QIAGEN) in an IQ5 Real-Time PCR (BioRad, Hercules, CA, USA). B2-microglobulin was used as housekeeping gene in all gene expression analyses. Primer pairs used in the study can be followed in Supplementary Table 1.

Western blots were performed in RIPA buffer-lysed cell pellets. The primary antibodies used against CCR6, CCR9, CXCR3 and CXCR6 and β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany).

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) from R&D Systems (Minneapolis, MN, US) were performed according to the manufacturers' instructions for quantitation of IL-secreted TNF- α and IL-10 in vitro. ELISA kits were also used for determining quantitative levels of TNF- α and IL-6 in liver samples. All samples were tested in duplicate and read in a Sunrise Microplate Reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland).

FITC-LPS permeability assay and gut barrier integrity markers analysis

Intestinal permeability was evaluated administering fluorescein isothiocyanate (FITC)-LPS from *E. coli* O111: B4 (Sigma) by gastric gavage 4 h before killing. Whole blood was obtained by retro-orbital puncture at the time of killing. Dilutions of FITC-LPS in PBS were used as a standard curve, and FITC-LPS measurements were performed in 100 μ L of plasma or standard in a fluorometer at 488 nm. Gene expression levels of occludin and tight junction protein (TJP)-1 were evaluated using Quantitec SYBR Green as described above. Primers are detailed in Supplementary Table 1.

Analysis of luminal antigen translocation and liver function

Bacterial DNA was detected and identified by broad-range PCR and partial sequencing analysis in MLNs, blood and liver samples according to the methodology described elsewhere [18, 19]. The quantitative chromogenic limulus

amebocyte lysate test (BioWhittaker, Nottingham, UK) was performed to evaluate endotoxin levels in MLNs, blood and liver samples according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in duplicate and read at 405 nm in a Sunrise Microplate Reader.

Liver function was evaluated by determining ALT and total bilirubin levels by handling ELISA kits from Cloud-Clone Corp (Houston, TX, US) and Cusabio Biotech Ltd. (Wuhan, China), respectively, according to the manufacturers' instructions. All samples were tested in duplicate and read at 450 nm.

Statistical analysis

Continuous variables are reported as mean \pm SD and categorical variables as frequency or percentages. Statistical differences were analysed using the Chi-squared test for categorical data applying the Yates correction when required. The Kolmogorov–Smirnov test was used to identify normal distribution of the data. Differences in quantitative data were analysed using the Student's *t* test for variables with normal distribution and the Mann–Whitney *U* test for quantitative data without normal distribution. Multiple comparisons were analysed using analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal–Wallis test for data with and without normal distribution, respectively, followed by pairwise comparisons using the post hoc Bonferroni correction. Bivariate correlations were calculated using the Pearson or Spearman test according to data distribution. All reported *p* values are two-sided. *p* values lower than 0.01 were considered significant. All calculations were performed using the R-2.14.1 2011 (The R Foundation for Statistical Computing)

Results

Study groups and characteristics of animals

Cirrhosis was induced by oral administration of CCl₄ in a starting series of 70 mice. Seventeen mice died during the cirrhosis induction protocol (24 %), with no statistically significant differences between groups. Causes of death were CCl₄ toxicity and liver insufficiency. Finally, 10 naïve mice, 12 mice in the CCl₄ group, 12 mice in the CCl₄ + CECT7765 1×10^7 cfu/daily, 10 mice in the CCl₄ + CECT7765 1×10^9 cfu/daily and 11 mice in the CCl₄ + CECT7765 1×10^{10} cfu/daily were subjected to laparotomy. Cirrhosis was histologically confirmed by collagen deposition and regenerative nodules in all CCl₄-treated animals, with no significant differences according to the administration of the bifidobacterial strain. Neither CCl₄ induction of cirrhosis nor *B. pseudocatenulatum*

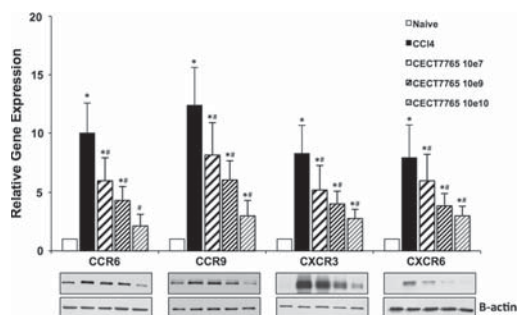


Fig. 1 Relative gene expression levels of chemokine receptors CCR6, CCR9, CXCR3 and CXCR6 in ILs from naïve and CCl₄ mice, either receiving or not *B. pseudocatenulatum* CECT7765 at different concentrations. ILs intestinal lymphocytes, CCR C-C chemokine receptor, CXCR C-X-C chemokine receptor. **p* < 0.01 compared with naïve mice; #*p* < 0.01 compared with CCl₄ mice without *B. pseudocatenulatum* CECT7765 and/or the previous bifidobacterial strain concentration

CECT7765 administration had any visual effect on intestinal wall morphology (Supplementary Fig. 2). Body and spleen weights in animals from all groups are detailed in Supplementary Table 2. Liver and spleen weights in all CCl₄ animals were significantly higher compared with naïve mice.

IL chemokine receptors and cytokine response are regulated by *B. pseudocatenulatum* CECT7765

The expression of an array of chemokine receptors involved in the inflammatory balance and T cell migration from MLNs was evaluated in ILs from cirrhotic mice, either treated or not with the bifidobacterial strain. The administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 significantly reduced both the gene and protein expression of all studied chemokine receptors in a dose-dependent fashion (Fig. 1).

Soluble mediators of inflammation TNF-alpha and IL-10 were also evaluated in ILs from the different study groups. Gene expression levels of TNF-alpha and its receptors TNF-RI and TNF-RII significantly decreased with the administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 compared with mice not receiving the bacterial strain. In addition, this inflammatory inhibition was dependent on the *B. pseudocatenulatum* CECT7765 concentration administered (Fig. 2a). Inversely, gene expression levels of IL-10 and IL-10R were significantly increased in mice with *B. pseudocatenulatum* CECT7765, and these increments were also dependent on the bifidobacterial concentration administered (Fig. 2b). These results clearly show the IL response to *B. pseudocatenulatum* CECT7765 administration.

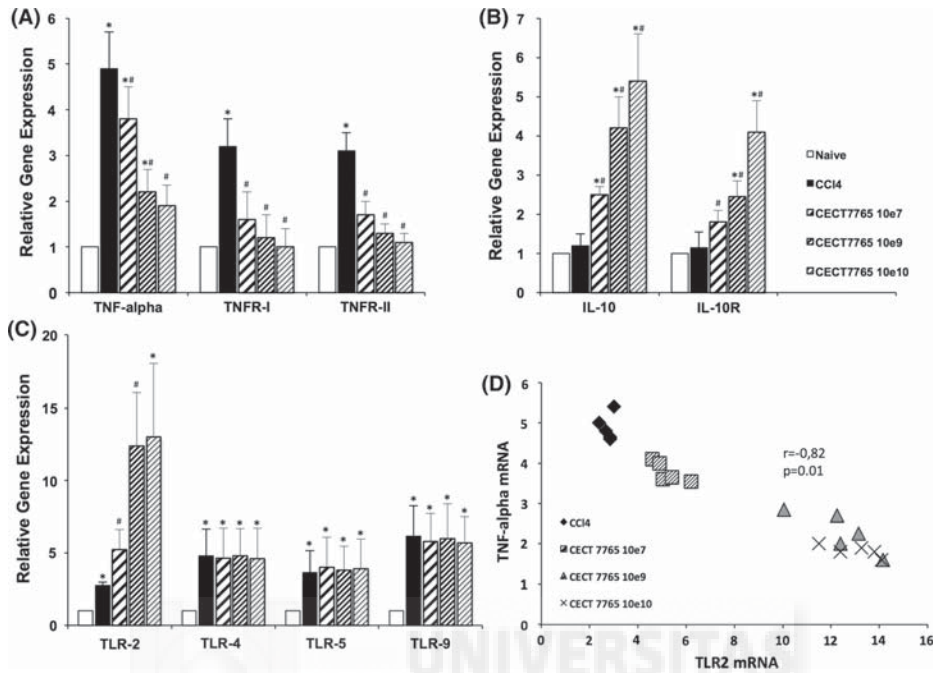


Fig. 2 Relative gene expression levels of TNF-alpha and TNF-alpha receptors (a), IL-10 and IL-10 receptor (b) and TLRs (c) in ILs from naïve and CCl₄ mice either receiving or not *B. pseudocatenulatum* CECT7765 at different concentrations. **d** Correlation between TNF-alpha and TLR-2 gene expression levels in ILs from naïve and CCl₄ mice either receiving or not *B. pseudocatenulatum* CECT7765 at different concentrations. *ILs* intestinal lymphocytes, *TNF-alpha* tumour

necrosis factor alpha, *TNF-RI* tumour necrosis factor alpha-receptor I, *TNF-RII* tumour necrosis factor alpha-receptor II, *IL-10* interleukin 10, *IL-10R* interleukin 10 receptor; *TLRs* Toll-like receptors. * $p < 0.01$ compared with naïve mice; # $p < 0.01$ compared with CCl₄-mice without *B. pseudocatenulatum* CECT7765 and/or the previous bifidobacterial strain concentration

After evaluating the homeostatic effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 in ILs, we aimed at delineating the mechanism by which *B. pseudocatenulatum* CECT7765 might interact with this cell population. Gene expression levels of TLRs in ILs were measured to determine the signalling pathway for *B. pseudocatenulatum* CECT7765 to induce cytokine secretion. Only TLR-2 was significantly upregulated with increasing concentrations of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (Fig. 2c), and its expression inversely correlated with the TNF-alpha gene expression levels shown in the different groups of animals (Fig. 2d). The rest of TLRs tested showed a *B. pseudocatenulatum* CECT7765-independent expression.

B. pseudocatenulatum CECT7765 promotes a TLR-2-dependent modulation of IL cell-secreted cytokine profile

To confirm the relevance of TLR-2 signalling in the bifidobacterial strain regulatory mechanism, ILs from

CCl₄-treated mice were isolated and cultured with LPS and *B. pseudocatenulatum* CECT7765 in the presence/absence of an anti-TLR-2 antibody. As can be followed in Fig. 3a, TNF-alpha secretion by cultured cells was significantly increased after 24-h stimulation with LPS, whereas stimulation with two concentrations of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 did not induce TNF-alpha secretion in vitro. However, the inhibition of TLR-2 signalling significantly induced TNF-alpha secretion by ILs in the presence of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 to the levels observed in cells from unstimulated CCl₄-treated mice.

On the other hand, stimulation with *B. pseudocatenulatum* CECT7765 induced significantly increased levels of IL-10 in cell supernatants compared with levels induced by LPS or in unstimulated cells (Fig. 3b). When TLR-2 was blocked, secreted IL-10 significantly decreased in *B. pseudocatenulatum* CECT7765-stimulated cells to levels observed in unstimulated cells. These data demonstrate a TLR-2-mediated anti-inflammatory effect of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 in ILs from cirrhotic mice.

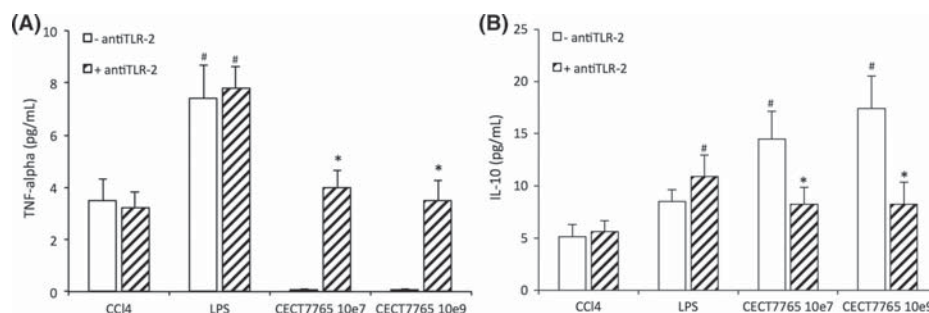


Fig. 3 TNF-alpha (a) and IL-10 (b) levels secreted by isolated ILs cultured in unstimulated conditions and after stimulation with LPS and *B. pseudocatenulatum* CECT7765 at different concentrations in the presence/absence of a blocking monoclonal antibody anti-TLR-2.

Mean values \pm SD from three different experiments are represented. # $p < 0.01$ compared with cells from unstimulated CCl₄ mice; * $p < 0.01$ compared with cells not receiving the blocking anti-TLR-2; TLR Toll-like receptor, LPS lipopolysaccharide

As all commensal bacteria are expected to stimulate TLR-2 at some degree, we ran an in vitro experiment to determine the relative sensitivity of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 to TLR-2-dependent proinflammatory reduction compared with other bifidobacterial strains obtained from collections. The results are shown in Supplementary Fig. 3. Although all the bifidobacterial strains showed an increment in TNF-alpha and IL-6 after TLR-2 blockade compared with unstimulated conditions, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 showed a significantly higher increment in both cytokine secreted levels after TLR-2 blockade compared with the rest of bifidobacterial strains.

B. pseudocatenulatum CECT7765 reduces intestinal permeability

The reduction in the intestinal inflammatory environment was significantly associated with a dose-dependent reduction of gut permeability. As can be observed in Fig. 4a, the administration of the bifidobacterial strain significantly reduced FITC-LPS recovery rates among cirrhotic animals, restoring permeability to values similar to those observed in naïve mice. Accordingly, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 was associated with improved gut barrier integrity markers in CCl₄-treated mice, providing a possible explanation for the observed reduction in gut permeability assay (Fig. 4b). Despite these results, as commented before, no visual effects of gut barrier morphology could be observed (Supplementary Fig. 1).

B. pseudocatenulatum CECT7765 reduces liver inflammation and improves liver function

We were interested in testing whether a reduction in intestinal permeability might improve liver inflammation. Spontaneous bacterial antigen translocation into liver was

significantly reduced after administration of increasing concentrations of *B. pseudocatenulatum* CECT7765. As shown in Fig. 4c, d, the oral administration of 1×10^{10} cfu/daily for a week significantly reduced the translocation rate of bactDNA and endotoxin in the liver to levels present in naïve control mice. No *B. pseudocatenulatum* CECT7765 DNA was identified in any of the bactDNA-positive samples. Translocating bacterial species belonged to the family *Enterobacteriaceae* in all cases: *E. coli* ($n = 9$), *K. pneumoniae* ($n = 4$), *E. cloacae* ($n = 2$), *S. marcescens* ($n = 1$). Liver endotoxin levels inversely correlated with the concentration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 administered ($r = -0.72$; $p = 0.001$).

The reduced bacterial antigen translocation rates were associated with the statistically significant downregulation of TNF-alpha (Fig. 5a) and IL-6 (Fig. 5b) levels in the liver. Also, an improved liver function was significantly associated with the administration of the bifidobacterial strain at 1×10^{10} cfu/daily, as can be observed for ALT and total bilirubin levels in Fig. 5d, respectively. Both parameters were significantly decreased compared with CCl₄-treated mice without the bifidobacterial strain, although levels remained higher than those observed in naïve mice, even after administration of the highest dose of *Bifidobacteria*.

Discussion

Intestinal homeostasis is fundamental in preventing bacterial complications, frequently present in cirrhosis. A balanced immunological response at the edge between a vast luminal commensal microbiota population and the rest of host's territories guarantees a reduced permeability environment for bacteria or their products to translocate. In the present study, we demonstrate that ILs, responsible for the local immune effector functions, are modulated by *B.*

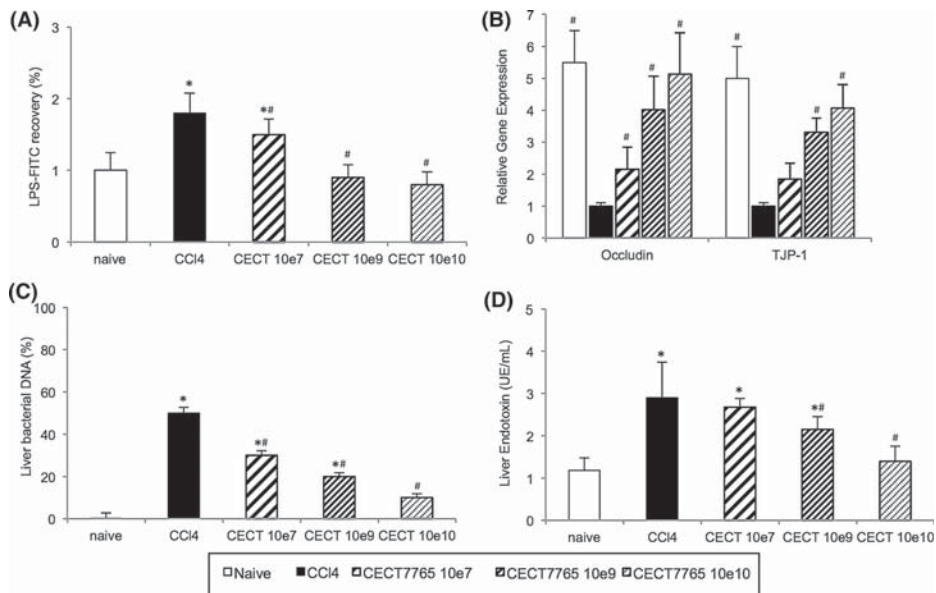


Fig. 4 a FITC-LPS recovery rates after LPS oral administration in naïve and cirrhotic mice with different concentrations of *B. pseudocatenulatum* CECT7765. Mean values \pm SD from five different experiments are represented. Bacterial DNA translocation **b** and endotoxin levels **c** into liver samples from all naïve and CCl₄ mice either receiving or not *B. pseudocatenulatum* CECT7765 at different

concentrations. Mean values \pm SD are represented. * $p < 0.01$ compared with naïve mice; # $p < 0.05$ compared with CCl₄ mice without *B. pseudocatenulatum* CECT7765 and/or with the previous dose of the bifidobacterial strain. FITC fluorescein isothiocyanate, LPS lipopolysaccharide

pseudocatenulatum CECT7765, reducing their pro-inflammatory chemokine receptors expression and inducing a shift in their cytokine profile. In vitro assays demonstrate that the IL reduced pro-inflammatory cytokine secretion induced by the bifidobacterial strain is dependent on TLR2 expression.

The gut-associated lymphoid tissue (GALT), where effector CD4⁺ T cells reside after priming at MLNs, constitutes a central element in maintaining intestinal homeostasis and host's immunity against the translocation of bacterial antigens [20, 21]. The homing signals for ILs to migrate back to the LP are chemokine receptors expressed in their surface, mainly CCR6, CCR9, CXCR3 and CXCR6 among others [22], that also account for the host defence and repair processes. We here report the *B. pseudocatenulatum* CECT7765 dose-dependent reduction of these chemokine receptors in ILs from mice with cirrhosis compared with animals not receiving the bifidobacterial strain (Fig. 1). In fact, it has been recently reported that CCR9 is increased in mononuclear cells and activated hepatic stellate cells during liver fibrosis and that CCR9 deficiency reduces liver inflammation in CCl₄-treated mice [23]. Similarly, CCR6 has been shown to stay upregulated in

CD4⁺ cells in experimental fibrosis and intrahepatically in patients with chronic liver diseases [24].

The reduced pro-inflammatory IL expansion was confirmed by the shift observed in the profile of cytokine production with the administration of the probiotic strain. Whereas IL TNF- α and TNFRs were significantly decreased, IL-10 and IL-10R expression was increased after the probiotic treatment in a bifidobacterial strain concentration-dependent manner. We further identified TLR2 as the IL receptor for the bifidobacterial strain-induced immune modulation (Figs. 2, 3). TLRs have been shown to induce downstream intracellular signalling and subsequent cytokine secretion in response to specific probiotics [25, 26]. In our study, the inhibition of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 capacity to change the cytokine secretion pattern by blocking TLR-2 reveals the central role for this receptor in the bifidobacterial recognition and induction of the host's cytokine response. In fact, similar results had been obtained in the past showing the anti-inflammatory properties of TLR-2 [27–29] and the induction of a pro-inflammatory cytokine response by *B. breve* after blocking TLR-2 [30]. In contrast to this and the previously mentioned studies, an inflammatory downregulation

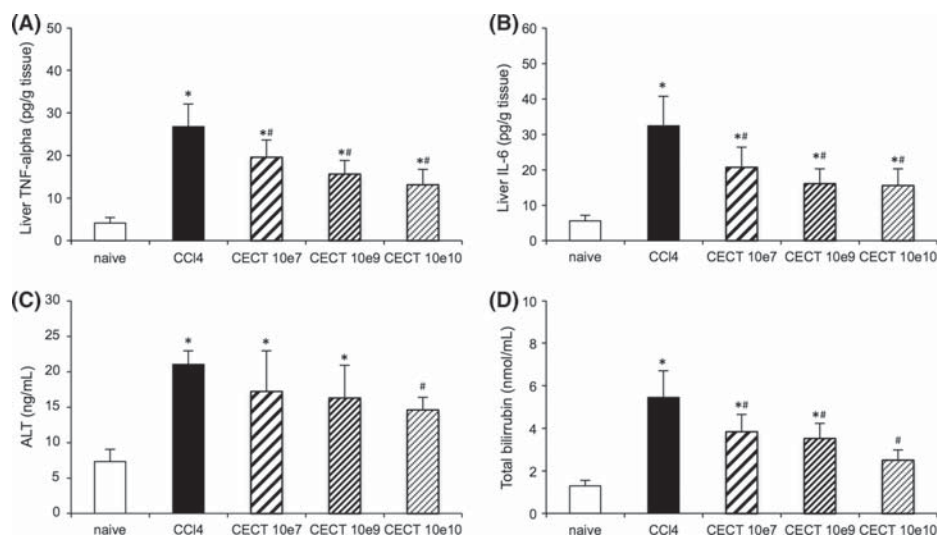


Fig. 5 Serum ALT (a) and total bilirubin levels (b) in naive and CCl₄-treated mice receiving or not *B. pseudocatenulatum* CECT7765 at different concentrations. Mean values \pm SD are represented. * $p < 0.01$ compared with naive mice; # $p < 0.05$ compared with CCl₄

mice not receiving *B. pseudocatenulatum* CECT7765 and/or with the previous dose of the bifidobacterial strain. ALT alanine aminotransferase

in monocytes from lamina propria in TLR2-deficient mice with bile duct ligation has been reported [31]. Several aspects, such as the distinct experimental model used and the intestinal monocyte population used rather than ILS, may explain this difference. Anyhow, considering the increment in pro-inflammatory mediators that comes along with fibrosis progression and cirrhosis [4, 32], the possibility of an immune response repolarisation by *B. pseudocatenulatum* CECT7765 becomes an appealing strategy to self-limit inflammation and derived complications that should be further pursued and confirmed in human immune cell subsets.

The bifidobacterial strain induction of a reduced inflammatory environment had an impact on gut permeability, as evaluated in vivo by measuring FITC-LPS recovery after oral administration in cirrhotic mice with different concentrations of *B. pseudocatenulatum* CECT7765. Several studies have shown the improvement in gut barrier integrity markers with the use of probiotic strains [33–37]. However, although a distorted gut barrier may facilitate BT, the study of integrity markers cannot confirm the actual passage of bacterial products. In the present study, besides an increased expression of tight junction proteins, the permeability assay demonstrates the decreased rate of LPS translocation through the gut barrier with increasing amounts of the bifidobacterial strain. Accordingly, the rate of bacterial antigens reaching the liver is also significantly reduced, as shown in Fig. 3.

Regarding liver damage, the administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 did not show any significant effect on histology architecture, despite a significant reduction in the profibrogenic TIMP-1 and MMP-2 gene expression levels (Supplementary Fig. 1). Despite one study showed fibrosis amelioration with the administration of VSL#3 in an experimental model of NASH [38], results presented herein are consistent with previous findings from our group working on this bifidobacterial strain [8] and with results obtained with VSL#3 in the rat model of cirrhosis [37]. However, an interesting result of the study is that the administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 at 10¹⁰ cfu/daily to CCl₄-treated mice significantly reduced liver TNF-alpha and IL-6 levels together with ALT and total bilirubin levels, suggesting an improvement in liver function also dependent on *B. pseudocatenulatum* CECT7765 concentration. Although these results have to be considered with caution and confirmed with further specifically designed studies on the bifidobacterial strain effect on liver function, the possibility of reducing liver inflammation and ameliorating functional markers such as ALT had already been reported in ob/ob mice treated with VSL#3 [39].

In summary, the present study shows that chemokine receptors expression and cytokine profile of ILS in mice with cirrhosis are modulated by the oral administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765. This homeostatic effect favours a reduced intestinal permeability that lowers

the burden of bacterial antigens reaching the liver. These promising results encourage further studies on the bifido-bacterial interaction with different immune cell subsets from patients with cirrhosis aimed at eventually testing *B. pseudocatenulatum* CECT7765 supplementation in patients with cirrhosis.

Acknowledgments This work has been supported by grants PI13/1443 from the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, and AGL2011-25169 from MINECO, Spain; Moratalla A. is recipient of a grant ACIF-2012/015, Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana, Spain. A. Moya is recipient of a FPU scholarship from MINECO, Spain.

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- Berg RD (1992) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 23:217–244
- Wiest R, Garcia-Tsao G (2005) Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 41:422–433
- Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E et al (2011) Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 53:96–105
- Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, Zapater P, Gutierrez A, Perez-Mateo M et al (2011) Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl4-induced fibrosis. *PLoS One* 6:e23037
- Kirpich IA, McClain CJ (2012) Probiotics in the treatment of the liver diseases. *J Am Coll Nutr* 31:14–23
- Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R (2008) Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 48:945–951
- Pereg D, Kotliroff A, Gadot N, Hadary R, Lishner M, Kitay-Cohen Y (2011) Probiotics for patients with compensated liver cirrhosis: a double-blind placebo-controlled study. *Nutrition* 27:177–181
- Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Moya A, Peiro G, Zapater P, et al. (2014) Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int* 34:850–858
- Agace WW (2006) Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:682–692
- de Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL (2014) Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: implications for pro- and prebiotics. *Front Immunol* 5:60
- Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H et al (2012) Probiotic *Bifidobacterium* breve induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog* 8:e1002714
- Isono A, Katsuno T, Sato T, Nakagawa T, Kato Y, Sato N et al (2007) *Clostridium butyricum* TO-A culture supernatant down-regulates TLR4 in human colonic epithelial cells. *Dig Dis Sci* 52:2963–2971
- Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T et al (2013) A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe* 13:711–722
- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453:620–625
- Vizoso Pinto MG, Rodriguez Gomez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM (2009) *Lactobacilli* stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int J Food Microbiol* 133:86–93
- Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT, Microbiology and Gut Biology Group et al (2005) Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115:565–574
- Kingma SD, Li N, Sun F, Valladares RB, Neu J, Lorca GL (2011) *Lactobacillus johnsonii* N6.2 stimulates the innate immune response through Toll-like receptor 9 in Caco-2 cells and increases intestinal crypt Paneth cell number in biobreeding diabetes-prone rats. *J Nutr* 141:1023–1028
- Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A et al (2002) Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 36:135–141
- Guarner C, Gonzalez-Navajas JM, Sanchez E, Soriano G, Frances R, Chiva M et al (2006) The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 44:633–639
- Gautreaux MD, Gelder FB, Deitch EA, Berg RD (1995) Adoptive transfer of T lymphocytes to T-cell-depleted mice inhibits *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 63:3827–3834
- Choudhry MA, Fazal N, Goto M, Gamelli RL, Sayeed MM (2002) Gut-associated lymphoid T cell suppression enhances bacterial translocation in alcohol and burn injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G937–G947
- Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, Svensson M, Marsal J, Mack M et al (2006) Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4 + T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* 107:3447–3454
- Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Usui S, Saeki K, Matsumoto A et al (2013) C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice. *Hepatology* 58:337–350
- Hammerich L, Bangen JM, Govaere O, Zimmermann HW, Gassler N, Huss S et al (2014) Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of gammadelta T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis. *Hepatology* 59:630–642
- Helwig U, Lammers KM, Rizzello F, Brigidi P, Rohleder V, Caramelli E et al (2006) *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* 12:5978–5986
- Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y (2007) Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium* logum strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 150:531–538
- Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T et al (2003) Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 171:4984–4989
- Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A et al (2004) A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 172:4733–4743
- Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH et al (2004) Cutting edge: activation of Toll-like receptor

- 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 172:2739–2743
30. Plantinga TS, van Maren WW, van Berghenhegouwen J, Hameetman M, Nierkens S, Jacobs C et al (2011) Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus* strains of probiotics. *Clin Vaccine Immunol* 18:621–628
31. Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, Brenner DA, Schnabl B (2012) Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 143(1330–1340):e1331
32. Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, Cano R, Moreu R et al (2008) Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 47:978–985
33. Moorthy G, Murali MR, Devaraj SN (2009) *Lactobacilli* facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during *Shigella dysenteriae* 1 infection in rats. *Nutrition* 25:350–358
34. Khailova L, Dvorak K, Arganbright KM, Halpern MD, Kinouchi T, Yajima M et al (2009) *Bifidobacterium bifidum* improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:G940–G949
35. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N et al (2009) Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G1140–G1149
36. Zhou YK, Qin HL, Zhang M, Shen TY, Chen HQ, Ma YL et al (2012) Effects of *Lactobacillus plantarum* on gut barrier function in experimental obstructive jaundice. *World J Gastroenterol* 18:3977–3991
37. Sanchez E, Nieto JC, Boulosa A, Vidal S, Sancho FJ, Rossi G, et al. (2014) VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Liver Int* 34:1504–1512
38. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P et al (2009) VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* 49:989–997
39. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB et al (2003) Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37:343–350



ARTÍCULO 3

Moratalla, A., *et al.*, “**Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 induces an M2 anti-inflammatory transition in macrophages from patients with cirrhosis**”. **J Hepatology**, 2015. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.020.

OBJETIVO

Valorar la capacidad de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 para inducir la transición de MDM de sangre periférica y de MOs de LA de pacientes con cirrosis descompensada hacia un perfil anti-inflamatorio.

RESUMEN

Se incluyeron 10 pacientes con cirrosis y ascitis y 10 controles sanos. Se aislaron MDM de sangre periférica y MOs de LA y se estimularon *in vitro* con M-CSF (100 µg/ml), LPS (100 ng/ml) y/o CECT7765 (10⁴ UFC). También se evaluaron KCs procedentes de ratas tratadas con CCl₄ y sometidas a BDL.

La estimulación de MDM de sangre periférica y MOs de LA con CECT7765 generó cambios morfológicos, evidenciados por microscopía óptica, y un aumento en la expresión de los marcadores de superficie CD206, CD163 y CD16 característicos de MOs tipo M2, en comparación con LPS. CECT7765 cambió significativamente el patrón de secreción de citocinas de MDM de sangre periférica, MOs de LA y KCs de rata, modificándolo hacia un perfil anti-inflamatorio. CECT7765 también indujo la expresión de genes anti-inflamatorios relacionados con MOs tipo M2 en MOs de LA de pacientes con cirrosis, incluso tras el pretratamiento con LPS. CECT7765 no redujo la capacidad bactericida de los MOs de LA.

CONCLUSIÓN

CECT7765 induce una transición morfológica, fenotípica y funcional de MDM de sangre periférica y de MOs de LA de pacientes con cirrosis descompensada hacia un perfil anti-inflamatorio.

***Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 induces an M2 anti-inflammatory transition in macrophages from patients with cirrhosis**

Alba Moratalla^{1,†}, Esther Caparrós^{1,2,†}, Oriol Juanola¹, Kevin Portune³, Amaya Puig-Kröger⁴, Lizbeth Estrada-Capetillo⁴, Pablo Bellot^{1,5}, Isabel Gómez-Hurtado¹, Paula Piñero², Pedro Zapater^{1,6}, José M. González-Navajas¹, José Such^{1,7}, Yolanda Sanz³, Rubén Francés^{1,2,*}

¹CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ²Dpto. Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, San Juan, Spain; ³Microbial Ecology, Nutrition & Health Research Group, Institute of Agrochemistry and Food Technology, National Research Council (IATA-CSIC), Valencia, Spain; ⁴Laboratorio Inmuno-Metabolismo, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁵Unidad Hepática, Hospital General Universitario, Alicante, Spain; ⁶Servicio de Farmacología Clínica, Hospital General Universitario, Alicante, Spain; ⁷Digestive Disease Institute, Cleveland Clinic Abu Dhabi, Abu Dhabi, United Arab Emirates

Background & Aims: Patients with cirrhosis show recurrent access of bacterial products into the bloodstream inducing a multi-altered immunological status leading to relevant complications. We aimed at evaluating *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 effect on the host's macrophage function.

Patients & methods: Patients with cirrhosis and ascites were included. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) monocyte-derived and ascitic fluid (AF) macrophages were cultured with M-CSF, lipopolysaccharide (LPS) and/or the bifidobacterial strain. Pellets and supernatants were evaluated for gene expression of M1 and M2-related genes and cytokine secretion. Cell surface expression molecules were evaluated by flow cytometry. Kupffer cells from bile duct ligated and CCL₄ rats were also evaluated.

Results: Experiments were run on GM-CSF blood-derived and AF macrophages from 10 patients with cirrhosis and 10 healthy donors. Different macrophage morphology was observed by optical microscopy in cells stimulated with bifidobacteria vs. LPS. M2-like expression of CD206, CD163 and CD16 was significantly increased in macrophages after stimulation with the bifidobacterial strain vs. LPS. *B. pseudocatenulatum* CECT7765 was able to significantly change the cytokine secretion pattern of blood-derived and AF macrophages and Kupffer cells from bile duct ligated and CCL₄ cirrhotic rats compared to that induced by LPS. *B. pseudocatenulatum* CECT7765 was also effective in inducing a phenotype transition and a functional change from an M1- to an M2-related gene expression and cytokine secretion pattern in AF

macrophages even after LPS-pretreatment. *B. pseudocatenulatum* CECT7765 did not reduce AF macrophage bacterial killing capacity.

Conclusion: *B. pseudocatenulatum* CECT7765 induces a morphologic, phenotypic and functional transition towards an anti-inflammatory profile in GM-CSF monocyte-derived and AF macrophages from patients with cirrhosis that may help in controlling sustained inflammation in decompensated cirrhosis.

© 2015 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Patients with cirrhosis show a multiple alterations in immunological status that plays a key role in the development of clinically relevant complications. In addition to liver immune surveillance impairment, cirrhosis contributes to the activation of the gut associated immune response, not only increasing local pro-inflammatory cytokine production but also promoting the development of a persistent systemic inflammation, detected in these patients by enhanced serum cytokine levels and cell activation markers [1,2].

The translocation rate of intestinal bacteria or their products into blood is also increased in patients with advanced cirrhosis. This is considered to occur as a consequence of a leaky gut, intestinal dysbiosis due to bacterial overgrowth and a deficient immune surveillance derived from cirrhosis progression [3–5]. Macrophages are a critical cell population in the host's innate inflammatory response against these episodes.

A classical macrophage (M1) activation is induced in response to Toll-like receptor ligands and interferon (IFN)-gamma, whereas an alternative (M2) activation is induced in response to interleukin (IL)-4/IL-13, IL-10 and immune complexes, among other signals [6]. For instance, human macrophages generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating

Keywords: Cirrhosis; *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765; Macrophages; Cytokines.

Received 17 April 2015; received in revised form 17 August 2015; accepted 19 August 2015

* Corresponding author. Address: CIBERehd – Hospital General Universitario, Avda. Pintor Baeza 12, 03010 Alicante, Spain. Tel.: +34 965 913 928; fax: +34 965 913 922.

E-mail address: frances_rub@gva.es (R. Francés).

[†] Joint first authors have contributed equally to this work.



ELSEVIER

Journal of Hepatology 2015 vol. xxx | xxx–xxx

Research Article

factor (GM-CSF) or macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) are considered as pro-inflammatory or anti-inflammatory, respectively [7–9]. In the first case, a range of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen and nitrogen species are produced while a Th1 response is promoted. On the other hand, M2 polarized macrophages are associated with immunomodulatory functions, increased expression of scavenging and mannose receptors and products from the arginase pathway. This macrophage plasticity has brought the attention into the development of therapeutic strategies based on macrophage repolarization [6,10].

Alternative strategies to modulate inflammation in cirrhosis are of great interest. In this regard, our group has described that *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 reduces bacterial translocation and downregulates inflammation in the mouse model of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhosis [11]. This bifidobacterial strain has also been reported to improve metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice [12]. However, the interaction between this bifidobacterial strain and first-line innate immune cells in humans remains to be elucidated. In the present investigation we have aimed at evaluating the capability of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 to induce an M2 repolarization of peripheral blood monocyte-derived macrophages, as well as ascitic fluid (AF) macrophages, from patients with decompensated cirrhosis.

Patients and methods

Patients

We conducted a prospective study in blood and AF samples from patients with cirrhosis and ascites admitted to the Liver Unit of Hospital General Universitario de Alicante. Cirrhosis was diagnosed by histology or by clinical, laboratory, and/or ultrasonographic findings. Exclusion criteria were the presence of a culture-positive blood or AF, spontaneous bacterial peritonitis, bacterial DNA presence and/or LPS levels greater than traces in blood, signs or symptoms of systemic inflammatory response syndrome [13], upper gastrointestinal bleeding or intake of antibiotics in the preceding two weeks, evidence of bacterial DNA translocation in blood or AF [14], hepatocellular carcinoma and/or portal thrombosis, previous liver transplantation, transjugular intrahepatic portosystemic shunt, alcoholic hepatitis, age older than 80 years or younger than 18 years, and refusal to participate in the study. A group of age- and sex-matched healthy donors was also included in the study. The Ethics Committee of the Hospital General Universitario de Alicante approved the study protocol, and all patients provided their informed consent before being included in the study.

Blood was obtained for routine haematological, biochemical and coagulation studies. Simultaneously, a therapeutic paracentesis was performed in all patients at admission in aseptic conditions following the usual procedures [15], and samples for routine biochemical study and polymorphonuclear cell count were obtained. Total protein, leukocyte count and polymorphonuclear cell count were performed in all AF specimens. Blood and AF were inoculated at bedside in aerobic and anaerobic blood culture bottles, 10 ml each [16]. Separate blood and AF samples were inoculated, under aseptic conditions, in rubber sealed sterile Vacutainer SST II tubes (BD Diagnostics, Belgium) that were never exposed to free air.

Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 growth conditions

B. pseudocatenulatum CECT7765 was obtained from Spanish Type Culture Collection (CECT). The bacterial strain was grown in MRS broth (Scharlau, Barcelona, Spain) supplemented with 0.05% (w/v) cysteine (MRS-C Sigma, St. Louis, MO, USA), and incubated at 37 °C for 22 h (at stationary growth phase) under anaerobic conditions (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, UK). Cells were harvested and stored as previously described [11,17]. The number of live cells after freezing and thawing was determined by colony-forming unit (CFU) counting on MRS-C

agar or McConkey agar (Biomerieux), respectively, after 48 h incubation. One fresh aliquot was thawed for every new experiment to avoid variability in the viability of cultures.

Macrophage differentiation from blood monocytes and AF macrophage isolation

Human peripheral mononuclear cells were isolated from healthy donors or cirrhotic patients by Biocoll Separating solution (Biochrom). Monocytes were separated from PMBC by CD14 immunomagnetic labeling (Miltenyi Biotec) and seeded in advanced RPMI 1640 supplemented with L-glutamine, antibiotics and 10% FBS at a concentration of 0.5×10^6 cells/ml in 6-well plates. GM-CSF and M-CSF were added both at 100 ng/ml (eBiosciences) and cell culture supplemented every two days in the case indicated. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

AF macrophages were also isolated by CD14 immunomagnetic labeling and seeded in the same previously described conditions. Cells were left untreated or stimulated with M-CSF, lipopolysaccharide (LPS) or the bifidobacterial strain.

Macrophage in vitro treatment

Day 6-GM-CSF generated macrophages (M1) were induced to repolarization with M-CSF until day 12 [18]. *B. pseudocatenulatum* CECT7765 (10^8 CFU) and/or LPS (100 ng/ml) (Sigma) stimuli were also added at day 6 to M1 macrophages, and also incubated until day 12. In the experiments indicated, M1 macrophages or AF macrophages were pulsed with LPS during 24 h and then incubated with M-CSF or *B. pseudocatenulatum* CECT7765 for an additional 48 h period. *In vitro* study design can be followed in Supplementary Fig. 1.

To examine the effect of cirrhotic plasma in the macrophage bactericidal capacity, M1 cells medium was replaced by RPMI without antibiotics and 25% plasma from a cirrhotic patient or control donor, and incubated for 30 min before a 48 h period of treatment with *B. pseudocatenulatum* CECT7765 as previously described [19]. Cells were then subjected to *E. coli* killing assay as described below.

Preliminary flow cytometry assays with the bifidobacterial strain at two different concentrations (10^8 UFC and 10^8 UFC) in either heat-inactivated or not, were performed to select culture conditions. No significant differences were observed (data not shown). According to these preliminary results and to previously published results from the group in mice [11,12,17], we used the live bifidobacterial strain at 10^8 UFC.

AF macrophage killing assays

To measure AF macrophage bactericidal activity, cells were isolated and seeded left untreated or treated with *Bifidobacterium* CECT7765 for a 48 h period. Following this incubation, 2.5×10^6 cells were washed and exposed to the same amount of *E. coli* in the presence of 50 μ l of human serum and up to 1 ml of PBS. This killing assay was performed at 37 °C in a shaker at 15 rpm for 20 min to measure the basal capacity of macrophages to ingest bacteria before killing occurred (T0), or 2 h to measure the real macrophagic killing ability (T2). Extracellular *E. coli* were thoroughly washed and finally subjected to a 30% sucrose centrifugation to better eliminate bacteria. Cells were resuspended in PBS 5% serum and then diluted in sterile water, to be seeded in agar plates at the estimated dilution ratio. Plates were left 24 h at 37 °C and CFUs counted afterwards.

Micrographs of cultured macrophages

Micrographs of macrophages in the different culture conditions were taken using a Nikon Eclipse Ts100 microscopy (Melville, NY). All represented panels are shown at original magnification 20 \times .

Flow cytometry analysis of macrophage surface molecule expression

Cells were detached from the plastic by thorough scraping (Cell Scraper, Biologix), centrifuged and resuspended in PBS, 0.5% FBS, 2 mM EDTA. Cell culture supernatants were kept at –80 °C for cytokine quantification. Macrophages were labeled with FITC or PE conjugated antibodies against human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) (Diacclone), anti-CD14 (BioRad), anti-CD163 (Novus Biologicals), anti-CD16, anti-CD206 and anti-CD86 (BD Pharmingen). Cells were subjected to flow cytometry in a BD FACScalibur (BD Biosciences), and histograms generated with FlowJo cell analysis software. M1-like macrophages were defined as HLA-DR^{high}, CD86^{high}, CD14^{high} and M2-like macrophages were defined as CD206^{high}, CD163^{high}, CD16^{high} [20,21].

Table 1. Clinical and analytical characteristics of patients and healthy donors. Values are expressed as mean standard deviation. * $p < 0.05$ compared with healthy donors. MELD, model for end-stage liver disease; WBC, white blood cells; PMN, polymorphnuclear cells; AF, ascitic fluid.

	Donors (n = 10)	Patients (n = 10)
Age (yr)	56 ± 9 (30-60)	58 ± 11 (32-36)
Male sex, n (%)	6 (60)	7 (70)
Alcohol ethiology, n (%)	-	6 (60)
Previous episodes of ascites, n (%)	-	7 (70)
Child-Pugh A/B/C (n)	-	0/0/10
MELD mean score	-	12.6 ± 4.0
Mean arterial pressure (mmHg)	-	85.0 ± 13.8
Bilirubin (mg/dl)	0.6 ± 0.3	32.0 ± 2.0*
Albumin (g/dl)	-	2.9 ± 0.5
Quick (%)	89 ± 8	60.8 ± 13.8*
Serum creatinine (mg/dl)	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.5
Serum sodium (mEq/L)	142 ± 2.5	132.8 ± 6.5*
Blood WBC (/mm ³)	5528 ± 1682	5426 ± 2141
Total blood PMNs (/mm ³)	3450 ± 1650	4848 ± 2860
Total AF proteins (g/dl)	-	1.6 ± 0.7
AF WBC (/mm ³)	-	204 ± 162
Total AF PMNs (/mm ³)	-	38 ± 42

Cytokine determination by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

ELISAs were carried out according to the manufacturers' instructions to measure the levels of tumour necrosis factor α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 α (IL-1 α) and transforming growth factor β (TGF- β) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). All samples were tested in triplicate and read in a Sunrise Microplate Reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The detection limit for each cytokine assay varied between 2 and 5 pg/ml.

Quantitative real-time RT-PCR for M1 and M2-subset specific genes

Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen), retro-transcribed, and cDNA were quantified using the Universal Human Probe Roche library (Roche Diagnostics). Oligonucleotides for selected genes were designed according to the Roche software. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on a LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics). Assays were made in triplicate and results normalized according to the expression level of the reference gene TATA box binding protein; *TBP*. Results were expressed using the $\Delta\Delta CT$ method for quantitation. Genes determined were solute carrier family 2 member 1 (*SLC2A1*) and inhibin beta A (*INHBA*) as M1-related genes, and insulin-like growth factor 1 (*IGF-1*) and Folate receptor 2 (*FolR2*) as M2-related genes.

Cell isolation from ascitic fluid

AF from cirrhotic patients was collected and centrifuged for 10 minutes at 1800 rpm. Cells were rinsed twice with PBS, and pellet resuspended in 5 ml of erythrocyte-lysing reagent Easylyse (DAKO). After 10 minutes, cells were rinsed with PBS and resuspended in cell culture media. One million cells/well were seeded and then treated with M-CSF, LPS and *B. pseudocatenulatum* CECT7765 for 48 h, and then subjected to flow cytometry. In the case of pretreated samples with LPS, cells were incubated for 24 h and then treated with M-CSF or *B. pseudocatenulatum* CECT7765 for an additional 24 h period. Samples were then analyzed by flow cytometry for the specified cell markers.

Kupffer cell isolation from bile duct ligated (BDL) and CCl₄-induced cirrhotic rats

Male Sprague-Dawley rats (Harlan, Barcelona, Spain) weighing 100–150 g were included in this study. Rats were individually caged at a constant room temperature of 21 °C and exposed to a 12:12 light/dark cycle. The animals were fed standard rodent chow and treated with 1.5 mmol/L phenobarbital in tap water along the study protocol. After 4 weeks, animals were subjected to experimental cirrhosis induction either with a weekly, weight-controlled dose of CCl₄ intragastrically

administered as previously described [22], performing laparotomies under anaesthesia with isoflurane at week 16, or with BDL surgery, performing laparotomies 4 weeks after BDL. In this second model, rats were anesthetized with ketamine and xylazine. After midline laparotomy, we ligated the common bile duct at two different levels with 5-0 silk sutures, and sectioned the duct between the ligatures. Abdominal wall was closed with 5-0 silk sutures. The study was approved by the Animal Research Committee of Universidad Miguel Hernández (Alicante, Spain).

For laparotomies, livers were perfused through the portal vein with HBSS containing 10% FBS, collagenase I and IV and DNase I. Then, livers were dissected and placed in RPMI 10% FBS. The debris were removed by slow-speed centrifugation (300 g for 10 minutes). The pellet was resuspended in RPMI containing collagenase I and IV, DNase I and Mg²⁺, and incubated at 37 °C in agitation (400 rpm, 1 h). The remaining tissue was mechanically digested and the suspension was filtered through a stainless steel sieve. After a centrifugation to eliminate hepatocytes (30 g, 3 minutes), a Percoll 30% gradient was performed. The pellet was then lysed with Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma), and washed with PBS.

Kupffer cells (KCs) were selected by using the macrophage differentiation marker CD68-PE and anti-PE MicroBeads (Milteny Biotec, Madrid, Spain). The bead-containing KCs were then purified by passage through a magnetic separation column following manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Discrete variables were expressed as counts (percentage) and continuous variables that follow a normal distribution are reported as mean \pm standard deviation otherwise are reported as median and quartiles. To verify the normality of continuous variables, the Kolmogorov-Smirnov test ($p < 0.05$) was used. Differences between groups were analyzed using the Chi square test for categorical data and the Student's *t* test or the Mann-Whitney *U* test for continuous variables with or without a normal distribution, respectively. Multiple comparisons were analyzed according to Bonferroni correction. All reported *p* values are two-sided, and *p* values lower than 0.05 are considered to indicate significance. All calculations were performed using the SPSS 19.0 software (Chicago, IL).

Results

Patient characteristics

Ten patients with cirrhosis and AF, and 10 healthy donors were included in the study. Main clinical and analytical characteristics of patients are resumed in Table 1. Briefly, all patients were Child-Pugh C with a mean MELD score of 12.6 \pm 4.0. Etiology was alcohol in six patients and HCV in four patients. Seven patients had a previous episode of AF. Mean age of donors was 56 \pm 9 and six were male.

Macrophages from cirrhotic patients repolarize from an M1 to M2-like phenotype in response to *B. pseudocatenulatum* CECT7765

The morphologic phenotype of *in vitro* differentiated macrophages from healthy donors and patients was evaluated in response to LPS and the bifidobacterial strain. Fig. 1A and B show representative images of GM-CSF-treated cells after a six day treatment with the stimuli. As evidenced, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 exposed monocyte-derived macrophages resemble the phenotype induced by M-CSF and is morphologically different from that triggered by GM-CSF-treated cells, either alone or stimulated with LPS. More importantly, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 also induced this phenotype in peritoneal macrophages directly obtained from patients' AF (Fig. 1C), showing an adherent morphology.

The expression of an array of cell surface markers was measured in blood-derived and AF macrophages in the different culture conditions. In our system, the expression of CD163 was significantly induced in the presence of the bifidobacteria

Research Article

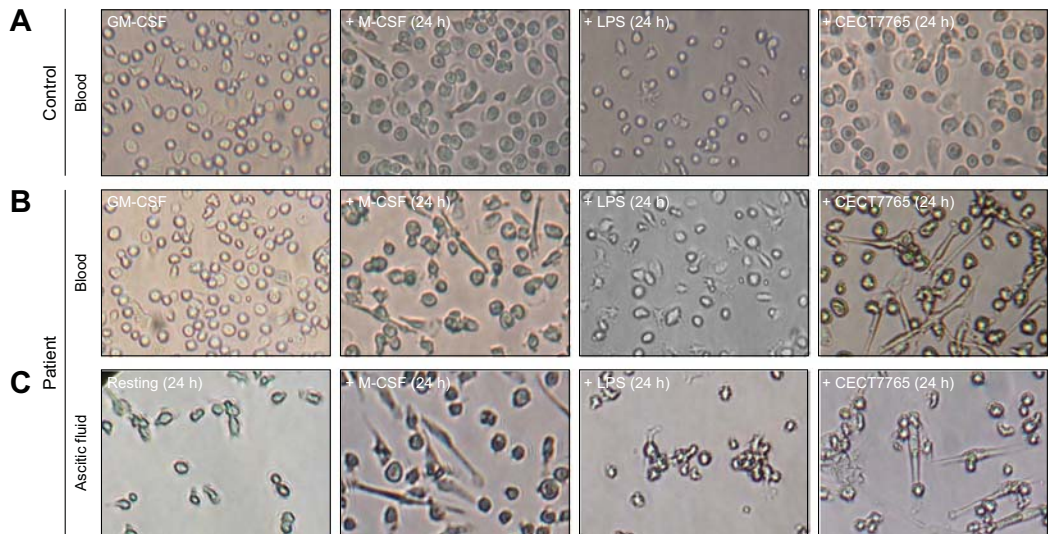


Fig. 1. Morphology of *in vitro* differentiated blood-derived and AF macrophages. Six day GM-CSF differentiated blood-derived macrophages and 6 day unstimulated AF macrophages were cultured for an additional 6 day period with M-CSF, LPS or *B. pseudocatenulatum* CECT7765. (A) Peripheral blood GM-CSF differentiated monocyte-derived macrophages from healthy donors. (B) Peripheral blood GM-CSF differentiated monocyte-derived macrophages from patients with cirrhosis. (C) AF macrophages from patients with cirrhosis. **p* = 0.01 compared with LPS. GM-CSF, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; LPS, lipopolysaccharide; AF, ascitic fluid.

compared with LPS, especially in AF macrophages of cirrhotic patients (Fig. 2). Also, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 induced the expression of the scavenger receptor CD206 and the F_c gamma receptor CD16 in macrophages of these patients as M-CSF did. Coexpression of these three markers defines an anti-inflammatory M2 subpopulation that is also present in blood-derived macrophages from healthy donors.

In the presence of LPS, macrophages undergo a statistically significant change in different membrane markers and they adopt a maturation profile similar to that induced by GM-CSF, with the elevated expression of HLA-DR, CD86 and CD14 compared with the expression induced after culture with *B. pseudocatenulatum* CECT7765. No differences in the immunophenotype were observed between differentiated macrophages from healthy donors and cirrhotic patients (Fig. 2). These results indicate that M1 macrophages in the presence of *B. pseudocatenulatum* CECT7765, either in patients or healthy donors, initiate repolarization to an M2 anti-inflammatory phenotype similar to the phenotype unveiled with M-CSF in contrast to the profile induced by LPS.

Cytokine production profile is sensitive to B. pseudocatenulatum CECT7765 and opposed to LPS-induced response

Functional ability to produce soluble pro- and anti-inflammatory mediators was evaluated in cultured blood-derived and AF isolated macrophages. Cells from cirrhotic patients showed, as expected, a significantly elevated *in vitro* secretion of TNF- α and IL-1 α in response to LPS compared with the response to both M-CSF and the bifidobacterial strain. On the other hand, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 stimulated macrophages to secrete

IL-10 and TGF- β , representative cytokines of an anti-inflammatory response compared to LPS (Fig. 3).

B. pseudocatenulatum CECT7765 brings LPS-activated AF macrophages back to an M2-like milieu

We were interested in evaluating whether the bifidobacterial strain was also able to induce a phenotype modification in macrophages exposed to a previous bacterial antigen challenge to mimic the response and the probiotic effect on macrophages from patients with previous BT episodes. *B. pseudocatenulatum* CECT7765 exposition induced a significant morphologic change in LPS-pretreated AF macrophages compared with macrophages that were continually exposed to LPS only (Fig. 4A).

Cell surface markers in LPS-pretreated AF macrophages are shown in Fig. 4B. As can be observed, the expression levels of CD206, CD163 and CD16 are significantly increased in macrophages exposed to the bifidobacterial strain even in the presence of LPS. On the contrary, M1-like cell surface markers HLA-DR, CD86 and CD14 expression in blood-derived and AF macrophages from cirrhotic patients are significantly reduced *in vitro* by *B. pseudocatenulatum* CECT7765.

Cytokine production in the supernatants of blood-derived and AF macrophages revealed the statistically significant reduction of IL-1 α and TNF- α in LPS-pretreated macrophages exposed to the bifidobacterial strain, whereas IL-10 and TGF- β were significantly induced compared with LPS-pretreated macrophages that did not receive *B. pseudocatenulatum* CECT7765. These results can be followed in Fig. 4C and confirm the ability of the bifidobacterial strain to redirect macrophage functional characteristics even after being exposed to a previous bacterial insult.

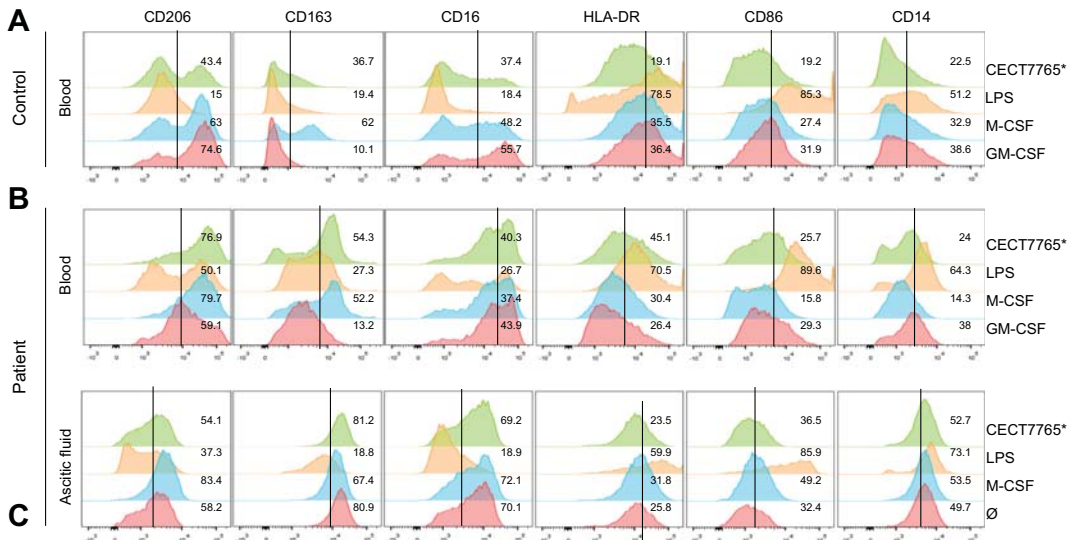


Fig. 2. Cell surface marker expression of *in vitro* GM-CSF differentiated blood-derived and AF macrophages. Anti-inflammatory M2-related CD163, CD206 and CD16 and pro-inflammatory M1-related CD86, HLA-DR and CD14 were evaluated in 6 day GM-CSF differentiated blood-derived macrophages and 6 day unstimulated AF macrophages. Both were then cultured for an additional 6 day period with M-CSF, LPS or *B. pseudocatenulatum* CECT7765. (A) Peripheral blood GM-CSF differentiated monocyte-derived macrophages from healthy donors. (B) Peripheral blood GM-CSF differentiated monocyte-derived macrophages from patients with cirrhosis. (C) AF macrophages from patients with cirrhosis. * $p = 0.01$ compared with LPS. GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; M-CSF, macrophage colony stimulating factor; LPS, lipopolysaccharide; AF, ascitic fluid.

In the same line of evidence, the gene expression levels of M1-related SLC2A1 and INHBA genes were significantly decreased in AF macrophages cultured with *B. pseudocatenulatum* CECT7765 compared with the effect induced by LPS and this reduction was also evident in LPS-pretreated AF macrophages. On the other hand, relative gene expression of M2-like *IGF-1* and *FolR2* was significantly increased after AF macrophage exposure to the bifidobacterial strain in both naïve and LPS-pretreated cells (Fig. 4D).

B. pseudocatenulatum CECT7765 does not decrease AF macrophage bactericidal capacity

We investigated the bactericidal capacity of *B. pseudocatenulatum* CECT7765-treated AF macrophages to kill *E. coli*. Results are represented in Fig. 5A. As shown, addition of the bifidobacterial strain did not reduce differentiated AF macrophage bactericidal activity. We also tested the killing properties of monocyte-derived macrophages from healthy subjects and the effect of the bifidobacterial strain when cultured in cirrhotic plasma-enriched medium. Fig. 5B shows that cirrhotic plasma significantly reduces bactericidal activity of monocyte-derived macrophages from healthy subjects compared with control plasma and with control GM-CSF treatment. In these plasma-enriched conditions, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 does not reduce either the bacterial killing ability compared with untreated cells.

Cirrhotic rat liver Kupffer cells are sensitive to *B. pseudocatenulatum* CECT7765

We also wanted to evaluate the effect of the bifidobacterial strain on naturally differentiated macrophages from the cirrhotic liver.

To do so, we induced cirrhosis by BDL and by CCl_4 on rats and purified KCs. As can be followed in Fig. 6, and similar to what can be observed in Figs. 1 and 3, KCs show significantly different morphologies according to the stimulus received in both models of liver damage. While naïve KCs resemble the phenotype shown by LPS-treated cells suggesting their natural polarization towards an M1 phenotype, the stimulation with *B. pseudocatenulatum* CECT7765 induces an adherent morphology similar to that induced by M-CSF. This effect is also evident even after LPS-pretreatment (Fig. 6A, B).

KCs also show a functional change as observed by their *in vitro* cytokine production. Regardless of differences in the cytokine profile between cirrhosis models, the synthesis of $\text{IL-1}\alpha$ and $\text{TNF-}\alpha$ by KCs is upregulated after stimulation with LPS but not with the bifidobacterial strain, which in turn, is able to lower pro-inflammatory cytokine levels even in the presence of LPS in both BDL- and CCl_4 -rats. On the other hand, the bifidobacterial strain significantly increases the secreted $\text{TGF-}\beta$ levels in comparison to the response established against LPS (Fig. 6C, D).

Discussion

The present study delineates the mechanism by which *B. pseudocatenulatum* CECT7765 exerts an anti-inflammatory effect on monocyte/macrophages from patients with cirrhosis and ascites. The interaction of the bifidobacteria with macrophages first, reprograms the pro-inflammatory phenotype of peripheral blood monocyte-derived and AF macrophages from patients with cirrhosis and ascites towards an anti-inflammatory phenotype while preserving their bactericidal capacity and, second, restrains

Research Article

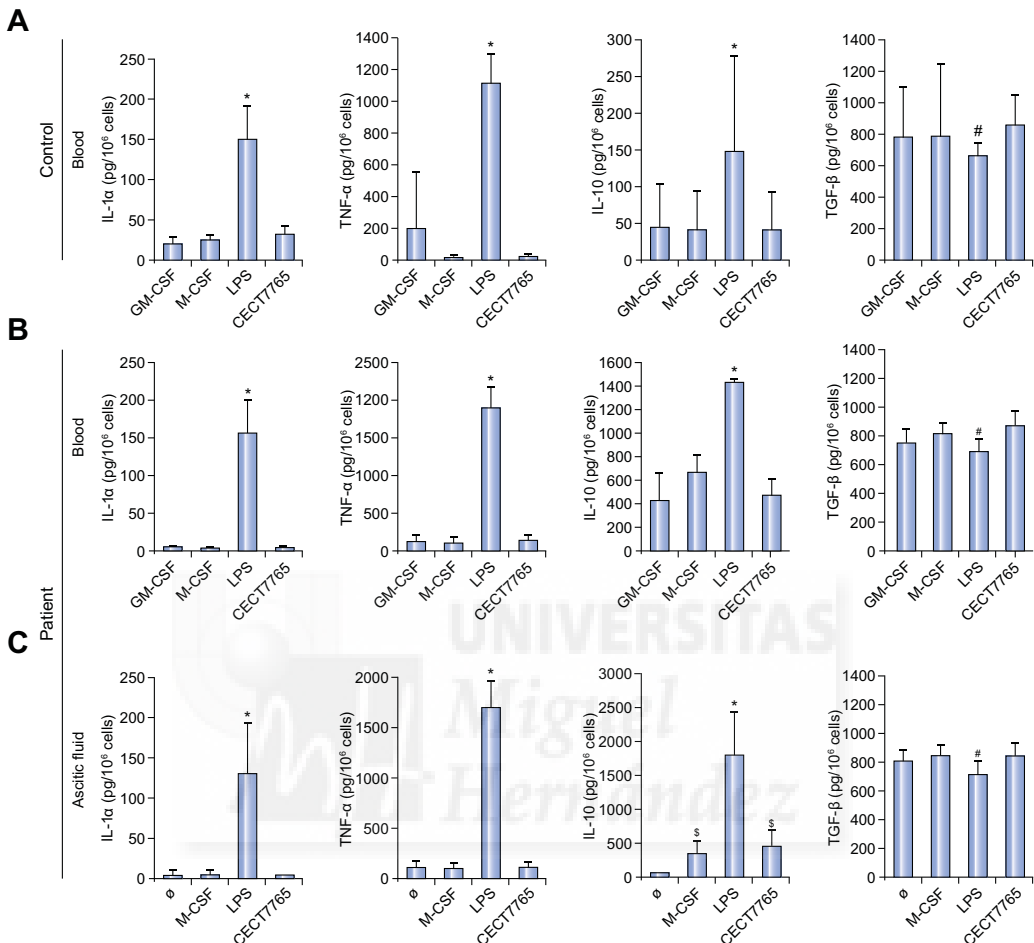


Fig. 3. In vitro cytokine production in GM-CSF differentiated blood-derived and AF isolated macrophages. Inflammatory cytokines IL-1 α , TNF- α , IL-10 and TGF- β were measured in the cell culture supernatant of 6 day GM-CSF differentiated blood-derived macrophages and 6 day unstimulated AF macrophages. Both were then cultured for an additional 6 day period with M-CSF, LPS or *B. pseudocatenulatum* CECT7765. (A) Peripheral blood GM-CSF differentiated monocyte-derived macrophages from healthy donors. (B) Peripheral blood GM-CSF differentiated monocyte-derived macrophages from patients with cirrhosis. (C) AF macrophages from patients with cirrhosis. * $p = 0.01$ compared with the rest of groups; # $p = 0.01$ compared with naive cells; # $p = 0.01$ compared with M-CSF and *B. pseudocatenulatum* CECT7765. IL, interleukin; TNF- α , tumour necrosis factor alpha; TGF- β , transforming growth factor beta.

the LPS-induced production of TNF- α and IL-1 α . These results have also been confirmed in liver-isolated KCs from two rat models of liver damage.

Recurrent endogenous bacterial antigen translocation into the bloodstream is a well-described event in cirrhosis that accounts for several complications leading to poor prognosis [4,23]. A combination of two inflammatory signals is probably present in these patients. On the one hand, immune cell-receptors sense these bacterial antigens and induce the secretion of pro-inflammatory mediators [24]. On the other hand, progression of fibrosis and development of portal hypertension induces secondary pro-inflammatory cytokine secretion from gut-derived activated

immune cells [25]. In these conditions, the pathological translocation of bacterial antigens through a distorted gut barrier is perpetuated, thus promoting a sustained systemic inflammation. In fact, increased intestinal permeability and altered expression of tight-junction proteins have been correlated with increased numbers of activated macrophages at lamina propria in patients with decompensated cirrhosis [26], and TNF- α blockade in an animal model of cirrhosis prevents bacterial translocation [27].

Macrophages are leading cells in the first-line of defense against bacterial antigens and bring a number of functions together in response to their challenge [10]. Macrophage plasticity contributes to maintaining homeostasis by polarizing their

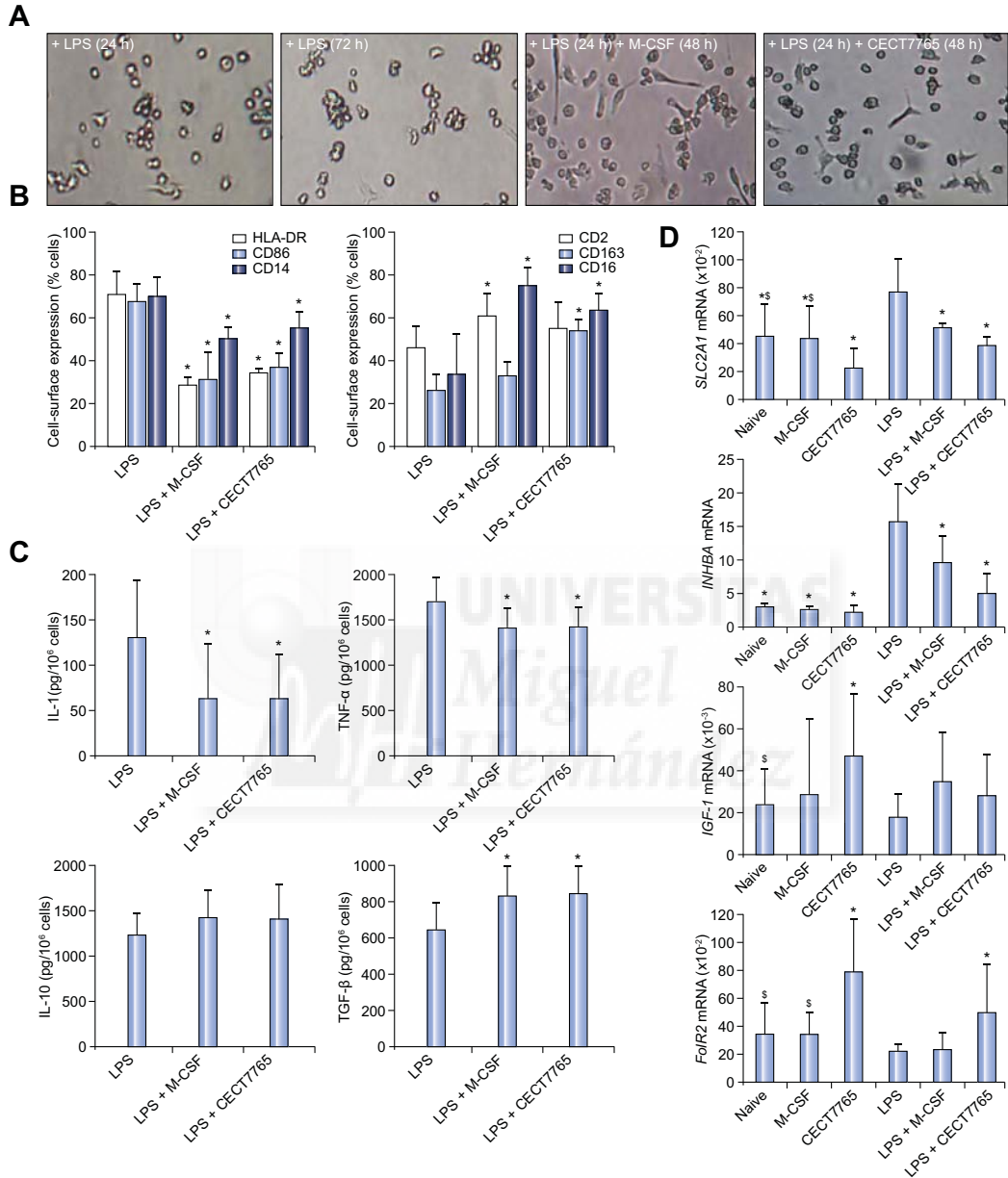


Fig. 4. *B. pseudocatenulatum* CECT7765 effect on LPS-pretreated AF macrophages. Freshly isolated AF macrophages were incubated with LPS for a 24 h period after which cells were co-cultured with M-CSF or *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 for an additional 24 h and 48 h period. (A) Morphology. (B) M1- and M2-like cell surface marker expression. (C) *In vitro* cytokine production, and (D) M1- and M2-like gene expression levels of LPS-pretreated AF macrophages cultured in different conditions. * $p = 0.01$ compared with LPS; † $p = 0.01$ compared with *B. pseudocatenulatum* CECT 7765. SLC2A1, solute carrier family 2 A1; INHBA, Inhibin beta A; IGF-1, insulin-like growth factor 1; FcR2, Folate receptor 2.

Research Article

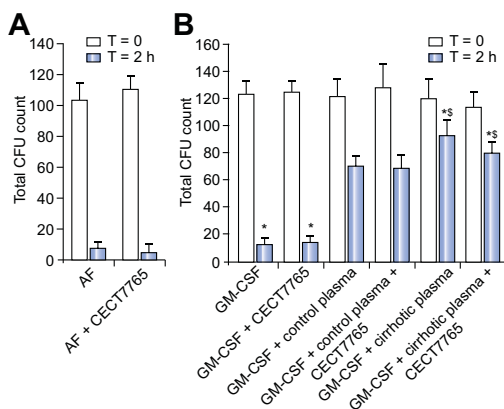


Fig. 5. *E. coli* killing assays on AF and blood monocyte-derived macrophages. (A) Bacterial killing in AF macrophages from patients with decompensated cirrhosis either treated or not with *B. pseudocatenulatum* CECT7765. (B) Bacterial killing in blood monocyte-derived macrophages from healthy controls in medium and plasma-enriched medium either with or without *B. pseudocatenulatum* CECT7765. Total CFUs before ($T=0$) and 2 h after *E. coli* exposure ($T=2$) are represented. * $p < 0.01$ compared with all plasma conditions; † $p < 0.01$ compared with control plasma conditions. CFUs, colony-forming units; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; LPS, lipopolysaccharide; AF, ascitic fluid.

function through the activation of different transcription factors. Therefore, bacterial antigen interaction with the host macrophages may induce a range of soluble mediators in between classical M1 pro-inflammatory and alternative M2 anti-inflammatory phenotypes, at least in healthy individuals [6,10]. In the setting of cirrhosis, in which an associated immune dysfunction is developed along with disease progression and different monocyte/macrophage subsets have been described [21], molecular markers of bacterial translocation have been associated with a pro-inflammatory phenotype of monocytes in serum of patients with cirrhosis and AF [1,28,29]. Also, the intestinal bowel decontamination with antibiotics has shown to reduce activated monocyte expansion and pro-inflammatory cytokine production both in patients and experimental models of cirrhosis and ascites [1,2,14,29–31].

The use of alternative strategies to antibiotics that selectively favor the dominance of protective bacteria in the gut microbiota rather than provoke a general depletion of bacteria to achieve intestinal homeostasis has been investigated. In this regard, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 had proven to reduce bacterial DNA translocation episodes and intestinal permeability in mice with CCl_4 -induced cirrhosis [11,17], but this is the first study that investigates the direct effect of the bifidobacterial strain on human blood-derived and AF macrophages to support possible future human studies.

Our first observation is, as expected, that both GM-CSF blood-derived and AF macrophages from patients with cirrhosis show an M1-like morphology, more similar to that induced by LPS than to that induced by M-CSF characteristic of an anti-inflammatory phenotype. The adherent fibroblast-like morphology observed in macrophages upon *B. pseudocatenulatum* CECT7765 stimulation has been described as an M2-like phenotype [32–34]

and also documented after stimulation with other probiotic compounds such as VSL#3 in macrophages from patients with ulcerative colitis [35]. The expression of cell surface markers studied in GM-CSF blood-derived and AF macrophages confirm an opposite profile in LPS- vs. *B. pseudocatenulatum* CECT7765-stimulated macrophages (Fig. 2). The coexpression of both receptors has been defined for a subtype of M2 macrophages [20]. Similarly, CD163 has been proposed as an anti-inflammatory marker for macrophages [36]. Macrophage stimulation in cirrhotic patients with the bifidobacterial strain significantly increased all three of these surface markers expression in comparison with LPS stimulation.

B. pseudocatenulatum CECT7765 has also revealed its ability to functionally change blood-derived and AF macrophages from cirrhotic patients. Stimulation with the bifidobacterial strain does not induce *in vitro* macrophage secretion of pro-inflammatory TNF- α or IL-1 while significantly increasing secreted TGF- β , showing levels similar to those induced by M-CSF stimulation and opposite to those of LPS-pretreated cells. These results were reproduced in purified KCs from BDL-induced cirrhotic rats. Secretion of pro-inflammatory cytokines has been associated with progression of fibrosis and increased gut barrier distortion secondary to the establishment of portal hypertension [25]. It is tempting to speculate that the anti-inflammatory environment induced by the bifidobacterial strain may reduce gut permeability and therefore may also reduce bacterial antigen translocation in cirrhosis. In fact, the administration of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 has been associated with; (i) a trend in the reduction of fibrosis and oxidative damage markers; (ii) a significantly increase in gut barrier integrity markers [11]; and (iii) increased production of free fatty acids and folate receptors [37], which have been described to reduce bacterial translocation in the CCl_4 -cirrhotic mouse model.

Most importantly, *B. pseudocatenulatum* CECT7765 was also shown effective in inducing a transition phenotype and a functional change in inflammatory-related gene expression and cytokine secretion pattern in AF macrophages even after LPS-pretreatment was performed to significantly skew their pro-inflammatory profile. This capacity is highly relevant in the setting of cirrhosis, as bacterial products such as LPS or DNA, constantly translocate from the gut and macrophages in these patients which show an evident M1 pro-inflammatory status [1,2,38]. Also relevant is the anti-inflammatory phenotype transition induced by the bifidobacterial strain which shows no negative effect on the bactericidal capacity of AF differentiated macrophages or blood monocyte-derived macrophages, not even in decompensated cirrhotic plasma-enriched culture conditions, which has been previously shown to reduce macrophage ability to kill bacteria [19].

We also acknowledge study limitations. Further studies on other immunologically active cell-subsets are pending and, of relevance, findings obtained herein cannot be extrapolated to other resident macrophages, as environment has been proven to indirectly shape tissue-specific macrophage phenotype [39]. Nevertheless, our results suggest that patients with cirrhosis and ascites could benefit from the immunomodulatory effects of *B. pseudocatenulatum* CECT7765 on the macrophage milieu, shifting their pro-inflammatory cytokine secreting profile into an anti-inflammatory one that might help reduce the sustained inflammatory state in these patients without compromising their macrophage bacterial killing function.

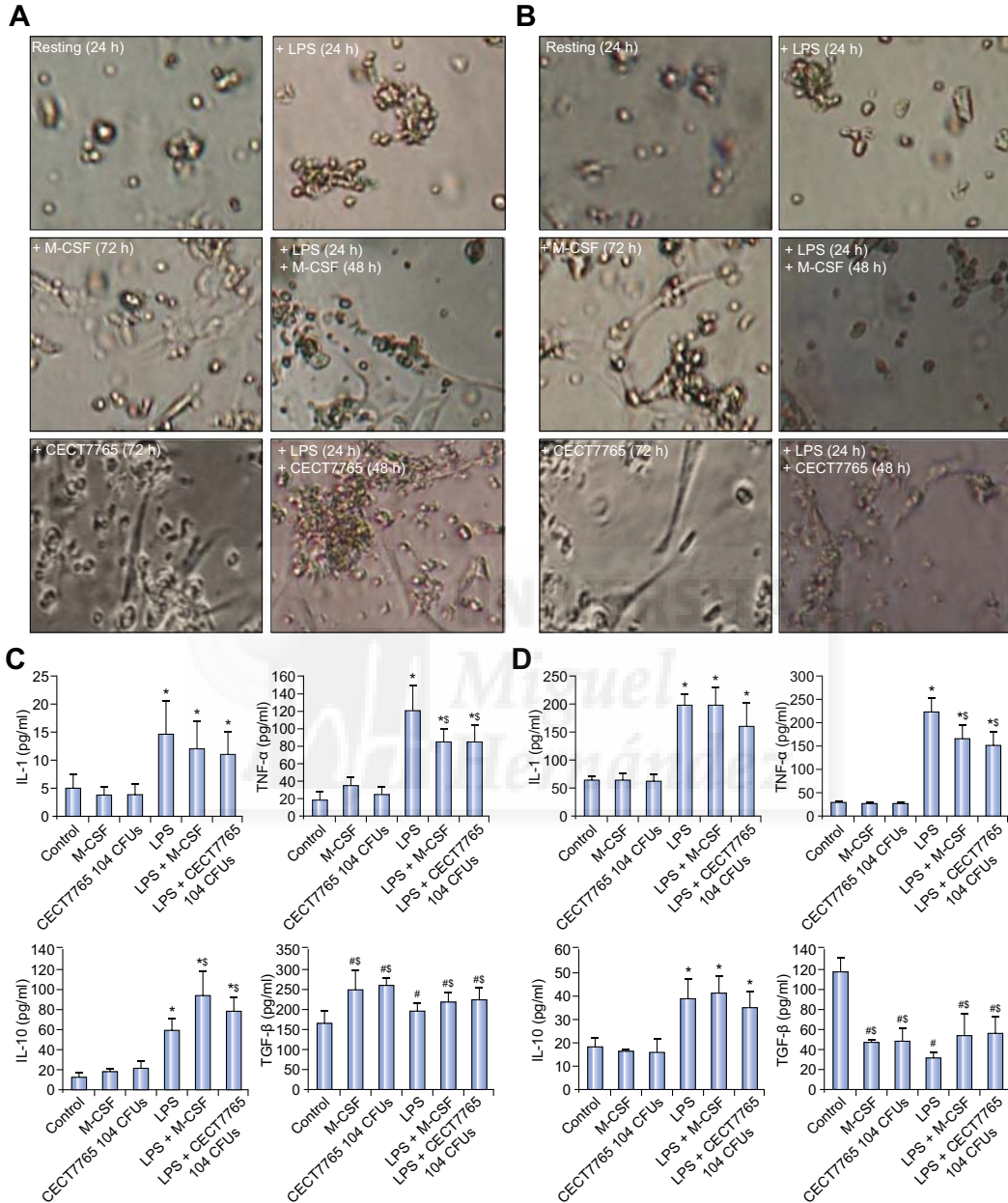


Fig. 6. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 effect on isolated Kupffer cells from BDL and CCl₄-induced cirrhotic rats. (A, B) Morphology, and (C, D) *in vitro* cytokine production of purified KCs cultured in different conditions. **p* = 0.01 compared with non-LPS-pretreated conditions; #*p* = 0.01 compared with LPS; *#*p* = 0.01 compared with resting KCs.

Research Article

In summary, the present study demonstrates that *B. pseudocatenulatum* CECT7765 induces a morphologic, phenotypic and functional transitional change towards an anti-inflammatory profile in blood-derived and AF macrophages from patients with cirrhosis, as well as with KCs from BDL-induced cirrhotic rats. These findings support the future evaluation of this bifidobacterial strain to control inflammation and bacterial translocation episodes in this setting and may open new avenues for improving disease management.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgements

This work has been supported by grants PI13/1443 from the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, AGL2011-25169 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and EC Project no. 613979 (MyNewGut) from the 7th Framework Program. Moratalla A. is recipient of a grant ACIF-2012/015, Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana, Spain.

Supplementary data

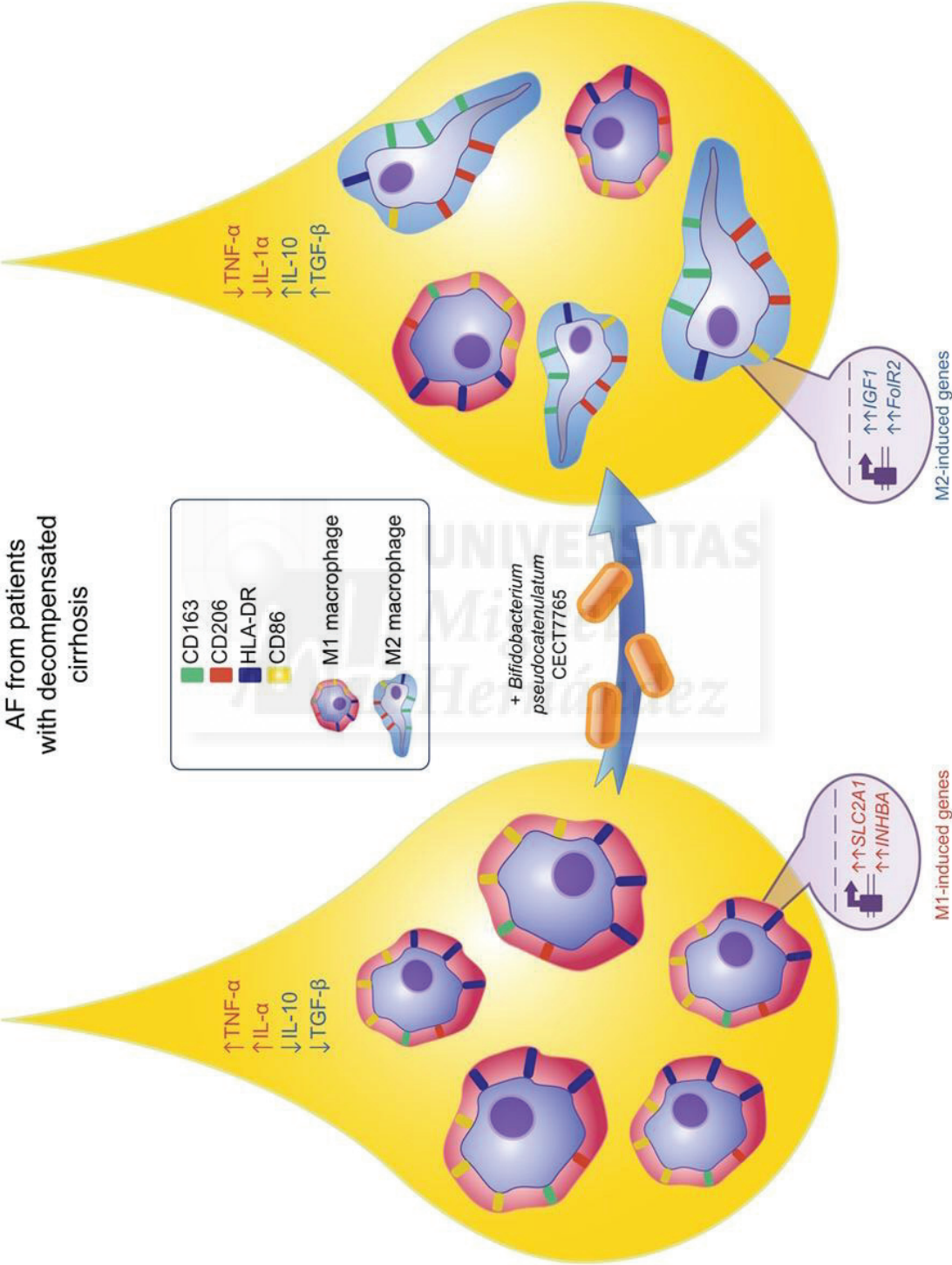
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.020>.

References

- Albillos A, Hera AD Al, Reyes E, Monserrat J, Munoz L, Nieto M, et al. Tumour necrosis factor- α expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624–631.
- Munoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledo L, Monserrat J, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF- α production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:411–419.
- Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, et al. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000;31:43–48.
- Wiest R, Lawson M, Geulking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60:197–209.
- Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Píera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984;4:53–58.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787–795.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4560–4565.
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 2007;178:5245–5252.
- Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 2011;117:5092–5101.
- Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 2014;59:2034–2042.
- Moratalla A, Gómez-Hurtado I, Santacruz A, Moya Á, Peiró G, Zapater P, et al. Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2014;34:850–858.
- Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet fed mice. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:2310–2321.
- Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995;273:117–123.
- Zapater P, Cano R, Llanos L, Ruiz-Alcaraz AJ, Pascual S, Barquero C, et al. Norfloxacin modulates the inflammatory response and directly affects neutrophils in patients with decompensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:1669–1679.
- Runyon BA. Paracentesis of ascitic fluid: a safe procedure. *Arch Intern Med* 1986;146:2259–2261.
- Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988;95:1351–1355.
- Moratalla A, Gómez-Hurtado I, Moya-Pérez A, Zapater P, Peiró G, González-Navajas JM, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis. *Eur J Nutr* 2015. [Epub ahead of print].
- Xu W, Zhao X, Daha MR, van Kooten C. Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol* 2013;53:179–186.
- O'Brien AJ, Fullerton JN, Massey KA, Auld G, Sewell G, James S, et al. Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. *Nat Med* 2014;20:518–523.
- Labonte AC, Tosello-Trampont AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells* 2014;37:275–285.
- Liaskou E, Zimmermann HW, Li KK, Oo YH, Suresh S, Stamataki Z, et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* 2013;57:385–398.
- Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:489–493.
- Wiest R, García-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422–433.
- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782–787.
- Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385–1396.
- Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CE, Roos L, Slavik T, Stivaktas PI, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol* 2013;58:1125–1132.
- Frances R, Chiva M, Sanchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, et al. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF- α monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007;46:797–803.
- Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang KM, Vonderheide RH, et al. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology* 2012;55:709–719.
- Albillos A, de La HA, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208–217.
- Frances R, Gonzalez-Navajas JM, Zapater P, Munoz C, Cano R, Pascual S, et al. Bacterial DNA induces the complement system activation in serum and ascitic fluid from patients with advanced cirrhosis. *J Clin Immunol* 2007;27:438–444.
- Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, Cano R, Moreu R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008;47:978–985.
- Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 2012;7:e42656.
- Edin S, Wikberg ML, Rutegard J, Oldenberg PA, Palmqvist R. Phenotypic skewing of macrophages in vitro by secreted factors from colorectal cancer cells. *PLoS One* 2013;8:e74982.

- [34] McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:17253–17258.
- [35] Isidro RA, Bonilla FJ, Pagan H, Cruz ML, Lopez P, Godoy L, et al. The probiotic mixture VSL#3 alters the morphology and secretion profile of both polarized and unpolarized human macrophages in a polarization-dependent manner. *J Clin Cell Immunol* 2014;5:1000227.
- [36] Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 2010;47:1650–1660.
- [37] Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, Zapater P, Gutierrez A, Perez-Mateo M, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl₄-induced fibrosis. *PLoS One* 2011;6:e23037.
- [38] Frances R, Munoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, Pascual S, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004;53:860–864.
- [39] Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 2014;159:1327–1340.







DISCUSIÓN

Discussion



Los estudios descritos muestran el efecto modulador de CECT7765 sobre la respuesta inflamatoria y los episodios de TB en el ámbito de la cirrosis. Entre los distintos aspectos evaluados destacan la capacidad de CECT7765 para mejorar la integridad de la barrera intestinal, disminuyendo su permeabilidad, aumentar la síntesis de citocinas anti-inflamatorias, disminuir la tasa de TB y modificar morfológica, fenotípica y funcionalmente la respuesta celular en la cirrosis sin reducir su capacidad bactericida.

La PBE es probablemente la complicación infecciosa más importante en la cirrosis. Debido a que estas infecciones están producidas fundamentalmente por bacterias Gram-negativas aerobias de origen entérico, el método profiláctico más utilizado es la administración de antibióticos orales que inhiban selectivamente el crecimiento de dichas bacterias en la flora intestinal y disminuyan en lo posible el fenómeno de la TB. No obstante, el uso prolongado de antibióticos, Nflx en el caso de la PBE, se asocia con la generación de cepas resistentes y disbiosis intestinal, disminuyendo por lo tanto la eficacia del tratamiento.

Existen estudios experimentales que inciden en mecanismos más selectivos de prevención de la TB en la cirrosis. Muchos de estos estudios se centran en la modificación de la microbiota intestinal mediante la administración de cepas bacterianas que restituyan la homeostasis intestinal, tanto en modelos experimentales como en pacientes con PBE, mostrando resultados controvertidos (161, 162, 164, 165).

El primer trabajo de esta tesis describe los efectos de CECT7765 sobre el daño hepático, la barrera intestinal y la tasa de TB en un modelo de daño hepático inducido por CCl₄ en ratón. El efecto de CECT7765 sobre la fibrosis y el daño oxidativo fue limitado, aunque se observó una ligera disminución en los animales que recibieron CECT7765, sin obtenerse resultados significativos. Esta tendencia podría justificar la evaluación de CECT7765 a dosis más altas o periodos más prolongados como estrategia para disminuir los daños de la arquitectura hepática asociados a la cirrosis. De hecho, otros estudios han investigado la modulación de la fibrosis hepática tras la administración de preparados con diferentes cepas bacterianas. VSL#3 atenuó la fibrosis, aunque no mostró efecto sobre los

marcadores hepáticos de inflamación, en un modelo murino de esteatosis no hepática inducida por la dieta (166). Otro estudio mostró una reducción de la peroxidación lipídica y la secreción de TNF- α por el aumento de la actividad de los MOs en ratones tratados con CCl₄ y *Lactobacillus* enriquecido en selenio (167).

Los resultados sobre inflamación intestinal y TB fueron más evidentes. Así, en nuestro estudio, los niveles de IL-10 y su receptor estaban aumentados en el intestino de animales que recibieron CECT7765 comparado con los que no lo recibieron, sugiriendo que su efecto anti-inflamatorio puede estar mediado por IL-10. Esto apoyaría el hecho de que IL-10 esté aumentada en pacientes con cirrosis en tratamiento con Nflx como profilaxis secundaria a la PBE (189). Otros estudios han mostrado, además, que el uso combinado de cepas de *Bifidobacterium* induce la secreción de IL-10 por parte de las células dendríticas (190). La mejora en la integridad de la barrera intestinal se tradujo en un aumento de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas del intestino (TJP-1 y ocludina) y de los receptores de ácidos grasos de cadena corta y folato (Ffar2, Ffar3 y FolateR), responsables de favorecer un ambiente anti-inflamatorio en la zona. Se ha descrito que los ligandos para estos receptores son producidos por cepas del género *Clostridia* y *Bifidobacterium* (191-193), y además, de acuerdo con un estudio previo de nuestro grupo, se asocian a la reducción de episodios de TB en cirrosis experimental (194).

La tasa de TB, seguramente como consecuencia del efecto beneficioso en la barrera intestinal, también se redujo significativamente en los animales tratados con CECT7765. Otros estudios se han centrado en estudiar la relación entre la administración de cepas bacterianas y la tasa de TB, obteniéndose diferentes resultados. La administración de un preparado *simbiótico*, incluyendo varias cepas de *Lactobacillus*, redujo la inflamación hepática y endotoxemia en pacientes con encefalopatía hepática y cirrosis (162), mientras que en modelos experimentales, la endotoxemia y la severidad del daño hepático se redujeron con la administración de *Lactobacillus spp.* (168). Por otra parte, aunque inicialmente la administración de *Lactobacillus johnsonii* junto con antioxidantes se asoció a una reducción de la TB, a través de la disminución de SBI y el daño oxidativo intestinal en ratas sometidas a cirrosis experimental (169), el mismo grupo demostró más tarde que sin la

combinación con antioxidantes, *Lactobacillus johnsonii* no reducía la TB en estos animales (170).

En el intento de averiguar el mecanismo por el que CECT7765 interacciona con los LIs desarrollamos el segundo estudio utilizando el mismo modelo de cirrosis experimental con CCl₄. En este estudio demostramos que los LIs están modulados por CECT7765, reduciendo la expresión de los receptores de quimiocinas pro-inflamatorias e induciendo un cambio en el perfil de expresión de citocinas. Ensayos *in vitro* demostraron que la disminución de la secreción de citocinas pro-inflamatorias inducida por CECT7765 es dependiente de la expresión de TLR-2. Estos efectos homeostáticos favorecen la disminución de la permeabilidad intestinal lo que disminuye la carga de antígenos bacterianos que llegan al hígado.

Tras ser activadas en los GLMs, las células T migran a la *lamina propria* a través de una serie de receptores de quimiocinas que expresan en superficie, principalmente CCR6, CCR9, CXCR3 y CXCR6, para ejercer su efecto frente a antígenos bacterianos, aunque también parece que intervienen en la defensa del hospedador y en procesos de reparación (195). Recientemente, se ha demostrado un aumento en la expresión de CCR9 en células mononucleares y células hepáticas estrelladas asociado a la fibrosis hepática y que su deficiencia reduce la inflamación hepática en ratones tratados con CCl₄ (196). De forma similar, se ha demostrado que CCR6 se encuentra sobreexpresado en células CD4⁺ durante la fibrosis hepática e intrahepáticamente en pacientes con enfermedad crónica hepática (197).

Los TLRs inducen una cascada de señalización intracelular y la subsiguiente secreción de citocinas en respuesta a cepas bacterianas específicas (198, 199). En nuestro estudio, la capacidad de CECT7765 de cambiar el patrón de secreción de citocinas fue dependiente de TLR-2, lo cual revela el importante papel de este receptor en el reconocimiento de CECT7765 y la inducción de la respuesta de citocinas del hospedador. Se han obtenido resultados similares en el pasado que muestran las propiedades anti-inflamatorias de TLR-2 (200-202) y la inducción de una respuesta de citocinas pro-inflamatorias por parte de *B.breve* tras el bloqueo de TLR-2 (203). Sin embargo, también se ha observado una disminución de la inflamación en monocitos de *lamina propria* en ratones deficientes de TLR-2

sometidos a BDL (204). Esta contradicción se podría explicar por la población celular analizada y por el diferente modelo animal utilizado. En este sentido, es importante señalar que aunque la expresión mayoritaria de receptores TLR corresponde a las células presentadoras de antígeno, se ha descrito en diferentes trabajos una expresión reducida aunque funcional de receptores TLR también en linfocitos (205, 206).

La reducción del ambiente inflamatorio por parte de CECT7765 tiene un impacto beneficioso sobre la permeabilidad intestinal, como muestra la disminución de LPS, marcado con un fluorocromo, traslocado a través del intestino con el tratamiento con CECT7765. Varios estudios muestran la mejora de la integridad intestinal con el uso de cepas bacterianas (207-209).

En este segundo trabajo observamos, nuevamente, una reducción en la tasa de TB. Al igual que en el estudio anterior, no se produjo traslocación de CECT7765, apoyando la seguridad en su uso. También es importante señalar que en este segundo estudio, donde se utilizaron diferentes dosis de CECT7765, los resultados fueron dosis-respuesta, apoyando la asociación de los resultados obtenidos con el efecto de CECT7765.

Para apoyar posibles futuros estudios en humanos, en el tercer trabajo decidimos investigar el efecto directo de CECT7765 sobre MDM de sangre periférica y MOs de LA de pacientes con cirrosis y ascitis. La interacción de CECT7765 con los MOs reprograma el fenotipo pro-inflamatorio de MDM de sangre periférica y MOs peritoneales de pacientes con cirrosis y ascitis hacia un perfil anti-inflamatorio, preservando su capacidad bactericida, y además restringe la producción de TNF- α e IL-1 α . Estos resultados también han sido confirmados en KCs de ratas sometidas a BDL y tratadas con CCl₄.

Los MOs forman parte de la primera línea de defensa del organismo frente a antígenos bacterianos y poseen variedad de funciones según el contexto. La plasticidad de los MOs contribuye al mantenimiento de la homeostasis, polarizando su función a través de la activación de diferentes factores de transcripción. Por lo tanto, la interacción de los antígenos bacterianos con los MOs del hospedador

puede producir un amplio abanico de mediadores solubles, al menos en humanos sanos, incluyendo el fenotipo pro-inflamatorio clásico tipo M1 y el fenotipo alternativo anti-inflamatorio tipo M2 (154, 155). En el contexto de la cirrosis, donde existe una disfunción inmune asociada a la progresión de la enfermedad, se han descrito diferentes poblaciones de monocitos/MOs (188) y determinados marcadores moleculares de la TB se han asociado con un fenotipo de monocitos pro-inflamatorio en suero de pacientes con cirrosis y ascitis (40, 106, 137).

La morfología tipo fibroblasto adherente observada en los MOs tras el tratamiento con CECT7765 ha sido descrita previamente como la morfología característica del fenotipo M2 (210-212), y también se ha observado tras la estimulación con otras cepas bacterianas como VSL#3 en MOs de pacientes con colitis ulcerativa (213). La expresión de los marcadores de superficie estudiados en MDM de sangre periférica y MOs de LA confirman un perfil opuesto entre los MOs estimulados con LPS y CECT7765. La coexpresión de CD16 y CD206 ha sido definida para un subtipo de MOs M2 (187), y CD163 ha sido propuesto como marcador de MOs anti-inflamatorios (214). Todos estos marcadores de superficie aumentaron su expresión con el tratamiento con CECT7765 en comparación con LPS.

La estimulación con CECT7765 no indujo la producción *in vitro* por parte de los MOs de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α o IL-1, pero sí aumentó significativamente la secreción de TGF- β hasta niveles similares a los observados tras la estimulación con M-CSF y opuestos a los observados en células pre-tratadas con LPS. La secreción de citocinas pro-inflamatorias se ha asociado con la progresión de la fibrosis y el aumento de la distorsión intestinal tras el establecimiento de la hipertensión portal (70). El ambiente anti-inflamatorio inducido por CECT7765 podría reducir la permeabilidad intestinal y por lo tanto la TB en la cirrosis.

Además, CECT7765 ha mostrado ser efectivo en la inducción de una transición de fenotipo y un cambio funcional sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación y el patrón de secreción de citocinas en MOs peritoneales, incluso tras el pre-tratamiento con LPS. Esta capacidad es muy relevante en el contexto de la cirrosis, donde productos bacterianos traslocan constantemente (LPS o ADN_{bact}) en el intestino y los MOs de estos pacientes muestran claramente un fenotipo

inflamatorio M1 (106, 107, 215). Un aspecto muy importante mostrado en el estudio es el hecho de que la transición hacia un fenotipo anti-inflamatorio inducido por CECT7765 no mostró efectos negativos sobre la capacidad bactericida de MOs peritoneales y MDM de sangre periférica, incluso en cultivo con plasma de paciente cirrótico descompensado, hecho que se había asociado previamente a una reducción en la capacidad lítica de los MOs (183).

Aunque los resultados obtenidos no pueden extrapolarse a otros MOs residentes de otros tejidos, ya que se ha probado que el ambiente indirectamente modifica el fenotipo de los MOs (216), nuestros hallazgos sugieren que los pacientes con cirrosis y ascitis podrían beneficiarse de los efectos inmunomoduladores de CECT7765 sobre los MOs.



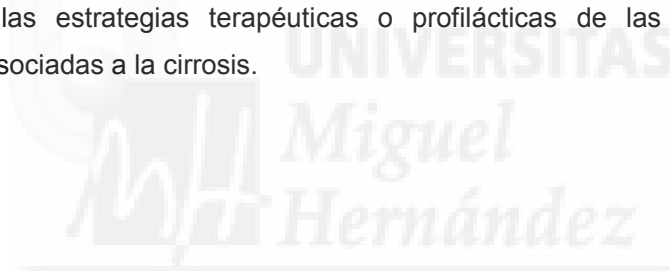


CONCLUSIONES

Conclusions



- 1-. La administración de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 disminuye la tasa de traslocación bacteriana en la cirrosis, compensando la pérdida de integridad de la barrera intestinal y reduciendo su permeabilidad.
- 2-. El uso de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 no empeora la progresión de la fibrosis ni la funcionalidad hepática y no trasloca a los ganglios linfáticos mesentéricos a nivel experimental.
- 3-. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 es capaz de modificar morfológica, fenotípica y funcionalmente la respuesta celular en la cirrosis sin reducir su capacidad bactericida.
- 4-. La administración de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 podría suplementar las estrategias terapéuticas o profilácticas de las complicaciones bacterianas asociadas a la cirrosis.



Conclusions

- 1-. The administration of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 decreases the bacterial translocation rate in cirrhosis balancing out the loss of intestinal barrier integrity and reducing its permeability.
- 2-. The use of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 does not worsen fibrosis progression or liver dysfunction and does not translocate to mesenteric lymph nodes in experimental cirrhosis.
- 3-. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 is able to modify the morphological, phenotypic and functional cellular response in cirrhosis without reducing its bactericidal capacity.
- 4-. The administration of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 may supplement therapeutic or prophylactic strategies against bacterial complications associated with cirrhosis.





BIBLIOGRAFÍA

References



1. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35:140-148.
2. Goulis J, Armonis A, Patch D, Sabin C, Greenslade L, Burroughs AK. Bacterial infection is independently associated with failure to control bleeding in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1998;27:1207-1212.
3. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18:353-358.
4. Yoshida H, Hamada T, Inuzuka S, Ueno T, Sata M, Tanikawa K. Bacterial infection in cirrhosis, with and without hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1993;88:2067-2071.
5. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998;27:669-674; quiz 675-666.
6. Deschenes M, Villeneuve JP. Risk factors for the development of bacterial infections in hospitalized patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2193-2197.
7. Wyke RJ. Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 1987;28:623-641.
8. Greig PD, Langer B, Blendis LM, Taylor BR, Glynn MF. Complications after peritoneovenous shunting for ascites. *Am J Surg* 1980;139:125-131.
9. Shrake PD, Troiano F, Rex DK. Peritonitis following colonoscopy in a cirrhotic with ascites. *Am J Gastroenterol* 1989;84:453-454.
10. Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1988;8:632-635.
11. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988;6:80-84.
12. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984;4:53-58.
13. Soriano G, Guarner C, Tomas A, Villanueva C, Torras X, Gonzalez D, Sainz S, et al. Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1992;103:1267-1272.
14. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986;91:1343-1346.
15. Guarner C, Soriano G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Seminars in liver disease* 1997;17:203-217.
16. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. Major problems in clinical surgery 1964;1:1-85.
17. Van Thiel DH, Hassanein T, Gurakar A, Wright HI, Caraceni P, De Maria N, Nadir A. Liver transplantation after an acute episode of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatogastroenterology* 1996;43:1584-1588.
18. Follo A, Llovet JM, Navasa M, Planas R, Forn X, Francitorra A, Rimola A, et al. Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 1994;20:1495-1501.
19. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Rodes J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988;8:27-31.
20. Altman C, Grange JD, Amiot X, Pelletier G, Lacaine F, Bodin F, Etienne JP. Survival after a first episode of spontaneous bacterial peritonitis. Prognosis of

potential candidates for orthotopic liver transplantation. *Journal of gastroenterology and hepatology* 1995;10:47-50.

21. Silvain C, Besson I, Ingrand P, Mannant PR, Fort E, Beauchant M. Prognosis and long-term recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Journal of hepatology* 1993;19:188-189.

22. Guarner C, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Gastroenterologist* 1995;3:311-328.

23. Gines P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forne M, et al. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1990;12:716-724.

24. Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: an explosion of information. *Hepatology* 1988;8:171-175.

25. Garcia-Tsao G. Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis? *J Hepatol* 2001;34:150-155.

26. Casafont Morencos F, de las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1996;41:552-556.

27. Rimola A, Bory F, Teres J, Perez-Ayuso RM, Arroyo V, Rodes J. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1985;5:463-467.

28. Barnes PF, Arevalo C, Chan LS, Wong SF, Reynolds TB. A prospective evaluation of bacteremic patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1988;8:1099-1103.

29. Conn HO, Fessel JM. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme. *Medicine* 1971;50:161-197.

30. Gomez F, Ruiz P, Schreiber AD. Impaired function of macrophage Fc gamma receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N Engl J Med* 1994;331:1122-1128.

31. Hassner A, Kletter Y, Shlag D, Yedvab M, Aronson M, Shibolet S. Impaired monocyte function in liver cirrhosis. *British medical journal* 1981;282:1262-1263.

32. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infection and immunity* 1979;23:403-411.

33. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433.

34. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of hepatology* 2014;60:197-209.

35. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J.Hepatol.* 2001;34:32-37.

36. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841.

37. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Journal of medicine* 1992;23:217-244.

38. Garcia-Tsao G. Bacterial translocation: cause or consequence of decompensation in cirrhosis? *Journal of hepatology* 2001;34:150-155.

39. Teltschik Z, Wiest R, Beisner J, Nuding S, Hofmann C, Schoelmerich J, Bevins CL, et al. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to

- compromised Paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology* 2012;55:1154-1163.
40. Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-217.
41. Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002;36:135-141.
42. Zapater P, Frances R, Gonzalez-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008;48:1924-1931.
43. Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2004;18:353-372.
44. Husebye E. Gastrointestinal motility disorders and bacterial overgrowth. *Journal of internal medicine* 1995;237:419-427.
45. Saltzman JR, Kowdley KV, Pedrosa MC, Sepe T, Golner B, Perrone G, Russell RM. Bacterial overgrowth without clinical malabsorption in elderly hypochlorhydric subjects. *Gastroenterology* 1994;106:615-623.
46. Sarker SA, Gyr K. Non-immunological defence mechanisms of the gut. *Gut* 1992;33:987-993.
47. Schuffler MD, Rohrmann CA, Chaffee RG, Brand DL, Delaney JH, Young JH. Chronic intestinal pseudo-obstruction. A report of 27 cases and review of the literature. *Medicine* 1981;60:173-196.
48. Corazza GR, Menozzi MG, Strocchi A, Rasciti L, Vaira D, Lecchini R, Avanzini P, et al. The diagnosis of small bowel bacterial overgrowth. Reliability of jejunal culture and inadequacy of breath hydrogen testing. *Gastroenterology* 1990;98:302-309.
49. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000;31:43-48.
50. Novella M, Sola R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, Coll S, et al. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997;25:532-536.
51. Casafont Morencos F, de las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Digestive diseases and sciences* 1996;41:552-556.
52. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998;28:1187-1190.
53. Campillo B, Pernet P, Bories PN, Richardet JP, Devanlay M, Aussel C. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *European journal of gastroenterology & hepatology* 1999;11:755-759.
54. Llovet JM, Bartoli R, Planas R. [Intestinal bacterial translocation]. *Gastroenterol Hepatol* 1996;19:374-382.
55. Astaldi G, Strosselli E. Peroral biopsy of the intestinal mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J Dig Dis* 1960;5:603-612.

56. Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Sola-Vera J, et al. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2002;14:371-376.
57. Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, Girona E, et al. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 2003;50:1482-1486.
58. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwarth ME. Allopurinol reduces bacterial translocation, intestinal mucosal lipid peroxidation, and neutrophil-derived myeloperoxidase activity in chronic portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats. *Pediatric research* 1996;40:422-428.
59. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwarth ME. The effect of vitamin C and vitamin E supplementation on bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common-bile-duct-ligated rats. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 1997;29:187-194.
60. Frances R, Chiva M, Sanchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, et al. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J.Hepatol.* 2007;46:797-803.
61. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993;18:1139-1143.
62. Deitch EA, Berg R. Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection. *J Burn Care Rehabil* 1987;8:475-482.
63. van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Schellekens PT, van den Bergh RL, Waaijer JL, Oudeman-Gruber NJ, et al. Relationship between patterns of engraftment in peripheral blood and immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation for (severe) combined immunodeficiency. *Blood* 1994;84:3936-3947.
64. McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992;10:75-88.
65. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-341.
66. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996;14:275-300.
67. Bodey GP. Antibiotic prophylaxis in cancer patients: regimens of oral, nonabsorbable antibiotics for prevention of infection during induction of remission. *Rev Infect Dis* 1981;3 suppl:S259-268.
68. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980;68:332-343.
69. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am J Med* 1980;68:344-355.
70. Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385-1396.

71. Debure A, Colombel JF, Cywiner Golenzer C, Rouchette J, Hoang C, Dellagi K, Galian A, et al. [Role of the digestive tract immune system in the control of bacterial translocation in gnotoxenic mice]. *Gastroenterologie clinique et biologique* 1986;10:712-717.
72. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis* 1988;157:1032-1038.
73. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986;6:252-262.
74. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. *Archives of surgery* 1987;122:48-53.
75. Spitz J, Hecht G, Taveras M, Aoys E, Alverdy J. The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence. *Gastroenterology* 1994;106:35-41.
76. Ding JW, Andersson R, Soltesz VL, Parsson H, Johansson K, Wang W, Bengmark S. Inhibition of bacterial translocation in obstructive jaundice by muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in the rat. *Journal of hepatology* 1994;20:720-728.
77. Yousif-Kadaru AG, Rajkovic IA, Wyke RJ, Williams R. Defects in serum attractant activity in different types of chronic liver disease. *Gut* 1984;25:79-84.
78. Naveau S, Poynard T, Abella A, Pignon JP, Poitrine A, Agostini H, Zourabichvili O, et al. Prognostic value of serum fibronectin concentration in alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1985;5:819-823.
79. Rogers DE. Host mechanisms which act to remove bacteria from the blood stream. *Bacteriological reviews* 1960;24:50-66.
80. Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, Angeli P, Sacerdoti D, Amodio P, Gatta A. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994;19:628-634.
81. Mal F, Huu TP, Bendahou M, Trinchet JC, Garnier M, Hakim J, Beaugrand M. Chemoattractant and opsonic activity in ascitic fluid. A study in 47 patients with cirrhosis or malignant peritonitis. *Journal of hepatology* 1991;12:45-49.
82. Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients. *The Journal of infectious diseases* 1983;147:1011-1017.
83. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology* 1993;18:353-358.
84. Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1984;4:1209-1211.
85. Grange JD, Roulot D, Pelletier G, Pariente EA, Denis J, Ink O, Blanc P, et al. Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial. *Journal of hepatology* 1998;29:430-436.
86. Soriano G, Guarner C, Teixido M, Such J, Barrios J, Enriquez J, Vilardell F. Selective intestinal decontamination prevents spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:477-481.
87. Rolachon A, Cordier L, Bacq Y, Nousbaum JB, Franza A, Paris JC, Fratte S, et al. Ciprofloxacin and long-term prevention of spontaneous bacterial peritonitis: results of a prospective controlled trial. *Hepatology* 1995;22:1171-1174.

88. Singh N, Gayowski T, Yu VL, Wagener MM. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 1995;122:595-598.
89. Llovet JM, Rodriguez-Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa M, Menacho M, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *Journal of hepatology* 1997;26:88-95.
90. Grange JD, Amiot X, Grange V, Gutmann L, Biour M, Bodin F, Poupon R. Amoxicillin-clavulanic acid therapy of spontaneous bacterial peritonitis: a prospective study of twenty-seven cases in cirrhotic patients. *Hepatology* 1990;11:360-364.
91. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Vinado B, Perez J, Cabre E, Arnal J, et al. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996;23:781-787.
92. Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:1719-1724.
93. Fernandez J, Navasa M, Planas R, Montoliu S, Monfort D, Soriano G, Vila C, et al. Primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis delays hepatorenal syndrome and improves survival in cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:818-824.
94. Navasa M, Casafont F, Clemente G, Guarner C, de la Mata M, Planas R, Sola R, et al. [Consensus on spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis: diagnosis, treatment, and prophylaxis]. *Gastroenterologia y hepatologia* 2001;24:37-46.
95. Alarcon T, Pita J, Lopez-Brea M, Piddock LJ. High-level quinolone resistance amongst clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1993;32:605-609.
96. Terg R, Llano K, Cobas SM, Brotto C, Barrios A, Levi D, Wasen W, et al. Effects of oral ciprofloxacin on aerobic gram-negative fecal flora in patients with cirrhosis: results of short- and long-term administration, with daily and weekly dosages. *Journal of hepatology* 1998;29:437-442.
97. Fernandez J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, de Lope CR, Roca D, Pavesi M, et al. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 2012;55:1551-1561.
98. Dupeyron C, Mangeney N, Sedrati L, Campillo B, Fouet P, Leluan G. Rapid emergence of quinolone resistance in cirrhotic patients treated with norfloxacin to prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1994;38:340-344.
99. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1991;35:1647-1650.
100. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 1996;178:5853-5859.
101. Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 1989;2:378-424.
102. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in cell & developmental biology* 2001;12:215-223.
103. Campillo B, Dupeyron C, Richardet JP, Mangeney N, Leluan G. Epidemiology of severe hospital-acquired infections in patients with liver cirrhosis:

- effect of long-term administration of norfloxacin. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 1998;26:1066-1070.
104. Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Frances R, Shah N, Mookerjee RP, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:574-581.
105. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:433-439.
106. Albillos A, Hera Ad Ade L, Reyes E, Monserrat J, Munoz L, Nieto M, Prieto A, et al. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-631.
107. Munoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledo L, Monserrat J, Sanz E, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:411-419.
108. Munoz L, Jose Borrero M, Ubeda M, Lario M, Diaz D, Frances R, Monserrat J, et al. Interaction between intestinal dendritic cells and bacteria translocated from the gut in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2012;56:1861-1869.
109. Ubeda M, Munoz L, Borrero MJ, Diaz D, Frances R, Monserrat J, Lario M, et al. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis. *Hepatology* 2010;52:2086-2095.
110. Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Marechal R, Degre D, Demetter P, de Nadai P, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646-657.
111. Giron JA, Alvarez-Mon M, Menendez-Caro JL, Abreu L, Albillos A, Manzano L, Durantez A. Increased spontaneous and lymphokine-conditioned IgA and IgG synthesis by B cells from alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1992;16:664-670.
112. Deviere J, Content J, Denys C, Vandebussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 1990;11:628-634.
113. Lopez-Talavera JC, Levitzki A, Martinez M, Gazit A, Esteban R, Guardia J. Tyrosine kinase inhibition ameliorates the hyperdynamic state and decreases nitric oxide production in cirrhotic rats with portal hypertension and ascites. *J Clin Invest* 1997;100:664-670.
114. Zhang W, Yue B, Wang GQ, Lu SL. Serum and ascites levels of macrophage migration inhibitory factor, TNF-alpha and IL-6 in patients with chronic virus hepatitis B and hepatitis cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:577-580.
115. Giron-Gonzalez JA, Martinez-Sierra C, Rodriguez-Ramos C, Macias MA, Rendon P, Diaz F, Fernandez-Gutierrez C, et al. Implication of inflammation-related cytokines in the natural history of liver cirrhosis. *Liver Int* 2004;24:437-445.
116. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999;104:1223-1233.
117. Ludwiczek O, Vannier E, Moschen A, Salazar-Montes A, Borggraefe I, Gabay C, Enrich B, et al. Impaired counter-regulation of interleukin-1 by the soluble IL-1 receptor type II in patients with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1360-1365.

118. Buck M, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Stalling C, Grace ND, Burroughs AK, Patch D, et al. Novel inflammatory biomarkers of portal pressure in compensated cirrhosis patients. *Hepatology* 2014;59:1052-1059.
119. Kaser A, Ludwiczek O, Waldenberger P, Jaschke W, Vogel W, Tilg H. Endotoxin and its binding proteins in chronic liver disease: the effect of transjugular intrahepatic portosystemic shunting. *Liver* 2002;22:380-387.
120. Giron-Gonzalez JA, Martinez-Sierra C, Rodriguez-Ramos C, Rendon P, Macias MA, Fernandez-Gutierrez C, Diaz F, et al. Adhesion molecules as a prognostic marker of liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:217-224.
121. Trebicka J, Krag A, Gansweid S, Schiedermaier P, Strunk HM, Fimmers R, Strassburg CP, et al. Soluble TNF-alpha-receptors I are prognostic markers in TIPS-treated patients with cirrhosis and portal hypertension. *PLoS One* 2013;8:e83341.
122. Grunhage F, Rezori B, Neef M, Lammert F, Sauerbruch T, Spengler U, Reichel C. Elevated soluble tumor necrosis factor receptor 75 concentrations identify patients with liver cirrhosis at risk of death. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1255-1262.
123. Eriksson AS, Gretzer C, Wallerstedt S. Elevation of cytokines in peritoneal fluid and blood in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2004;51:505-509.
124. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43:S121-131.
125. Bellot P, Garcia-Pagan JC, Frances R, Abralde JG, Navasa M, Perez-Mateo M, Such J, et al. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2010;52:2044-2052.
126. Rasaratnam B, Kaye D, Jennings G, Dudley F, Chin-Dusting J. The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2003;139:186-193.
127. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, Suarez I, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:1257-1266.
128. Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, Mani AR, et al. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2007;45:1517-1526.
129. Kerfoot SM, D'Mello C, Nguyen H, Ajuebor MN, Kubes P, Le T, Swain MG. TNF-alpha-secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice. *Hepatology* 2006;43:154-162.
130. Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, Dunn KW, El-Achkar TM, Plotkin Z, Sandoval RM, et al. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1505-1516.
131. Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, Yende S, Kong L, Carter M, Angus DC, et al. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int* 2010;77:527-535.
132. Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum JA. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock* 2014;41:3-11.

133. Gonzalez-Navajas JM, Bellot P, Frances R, Zapater P, Munoz C, Garcia-Pagan JC, Pascual S, et al. Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin. *J Hepatol* 2008;48:61-67.
134. Lin RS, Lee FY, Lee SD, Tsai YT, Lin HC, Lu RH, Hsu WC, et al. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1995;22:165-172.
135. Riordan SM, Skinner N, Nagree A, McCallum H, McIver CJ, Kurtovic J, Hamilton JA, et al. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:1154-1164.
136. Manigold T, Bocker U, Hanck C, Gundt J, Traber P, Antoni C, Rossol S. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:275-282.
137. Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang KM, Vonderheide RH, Kaplan DE. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology* 2012;55:709-719.
138. Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* 2012;143:1158-1172.
139. Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 1980;303:622-626.
140. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 2008;20:52-60.
141. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004;76:509-513.
142. Akagawa KS. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int J Hematol* 2002;76:27-34.
143. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-964.
144. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 2004;28:509-554.
145. Hanamura T, Motoyoshi K, Yoshida K, Saito M, Miura Y, Kawashima T, Nishida M, et al. Quantitation and identification of human monocytic colony-stimulating factor in human serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988;72:886-892.
146. Conti L, Gessani S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology* 2008;213:859-870.
147. Caracciolo D, Shirsat N, Wong GG, Lange B, Clark S, Rovera G. Recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) requires subliminal concentrations of granulocyte/macrophage (GM)-CSF for optimal stimulation of human macrophage colony formation in vitro. *J Exp Med* 1987;166:1851-1860.
148. Walker F, Nicola NA, Metcalf D, Burgess AW. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell* 1985;43:269-276.
149. Metcalf D, Nicola NA. The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: enhancement and suppression by colony-stimulating factor combinations. *Blood* 1992;79:2861-2866.

150. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4560-4565.
151. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 2006;79:285-293.
152. Li G, Kim YJ, Broxmeyer HE. Macrophage colony-stimulating factor drives cord blood monocyte differentiation into IL-10(high)IL-12absent dendritic cells with tolerogenic potential. *J Immunol* 2005;174:4706-4717.
153. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L, Patarroyo JC, et al. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med* 2007;13:935-943.
154. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787-795.
155. Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 2014;59:2034-2042.
156. Kirpich IA, McClain CJ. Probiotics in the treatment of the liver diseases. *J Am Coll Nutr* 2012;31:14-23.
157. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, Xiao Y, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999;117:577-583.
158. Ruseler-van Embden JG, van Lieshout LM, Gosselink MJ, Marteau P. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:675-680.
159. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995;78:491-497.
160. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994;35:483-489.
161. Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2008;48:945-951.
162. Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004;39:1441-1449.
163. Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, Bazhukova TA, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008;42:675-682.
164. Pereg D, Kotliroff A, Gadoth N, Hadary R, Lishner M, Kitay-Cohen Y. Probiotics for patients with compensated liver cirrhosis: a double-blind placebo-controlled study. *Nutrition* 2011;27:177-181.
165. Pande C, Kumar A, Sarin SK. Addition of probiotics to norfloxacin does not improve efficacy in the prevention of spontaneous bacterial peritonitis: a double-blind placebo-controlled randomized-controlled trial. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2012;24:831-839.

166. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* 2009;49:989-997.
167. Chen L, Pan DD, Zhou J, Jiang YZ. Protective effect of selenium-enriched *Lactobacillus* on CCl₄-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J Gastroenterol* 2005;11:5795-5800.
168. Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM. *Lactobacillus* feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;205:243-247.
169. Chiva M, Soriano G, Rochat I, Peralta C, Rochat F, Llovet T, Mirelis B, et al. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol*. 2002;37:456-462.
170. Soriano G, Sanchez E, Guarner C, Schiffrin EJ. *Lactobacillus johnsonii* La1 without antioxidants does not decrease bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Journal of hepatology* 2012;57:1395-1396.
171. Bauer TM, Fernandez J, Navasa M, Vila J, Rodes J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J Hepatol*. 2002;36:501-506.
172. Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:2310-2321.
173. Moya-Perez A, Romo-Vaquero M, Tomas-Barberan F, Sanz Y, Garcia-Conesa MT. Hepatic molecular responses to *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 in a mouse model of diet-induced obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24:57-64.
174. Moya-Perez A, Neef A, Sanz Y. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS One* 2015;10:e0126976.
175. Zapater P, Cano R, Llanos L, Ruiz-Alcaraz AJ, Pascual S, Barquero C, Moreu R, et al. Norfloxacin modulates the inflammatory response and directly affects neutrophils in patients with decompensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:1669-1679.
176. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995;273:117-123.
177. Runyon BA. Paracentesis of ascitic fluid. A safe procedure. *Arch Intern Med* 1986;146:2259-2261.
178. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:489-493.
179. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology* 1995;22:696-699.
180. Duran EM, Shapshak P, Worley J, Minagar A, Ziegler F, Haliko S, Moleon-Borodowsky I, et al. Presenilin-1 detection in brain neurons and FOXP3 in peripheral blood mononuclear cells: normalizer gene selection for real time reverse transcriptase pcr using the deltadeltaCt method. *Front Biosci* 2005;10:2955-2965.

181. Tarnowski BI, Spinale FG, Nicholson JH. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 1991;66:297-302.
182. Xu W, Zhao X, Daha MR, van Kooten C. Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol* 2013;53:179-186.
183. O'Brien AJ, Fullerton JN, Massey KA, Auld G, Sewell G, James S, Newson J, et al. Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. *Nat Med* 2014;20:518-523.
184. Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Moya A, Peiro G, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, et al. Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2014;34:850-858.
185. Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Moya-Perez A, Zapater P, Peiro G, Gonzalez-Navajas JM, Gomez Del Pulgar EM, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis. *Eur J Nutr* 2015;doi: 10.1007/s00394-015-0837-x.
186. Drevets DA, Canono BP, Campbell PA. Measurement of bacterial ingestion and killing by macrophages. *Curr Protoc Immunol* 2015;109;doi: 10.1002/0471142735.im0471141406s0471142109.
187. Labonte AC, Tosello-Tramont AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells* 2014;37:275-285.
188. Liaskou E, Zimmermann HW, Li KK, Oo YH, Suresh S, Stamataki Z, Qureshi O, et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* 2013;57:385-398.
189. Gomez-Hurtado I, Zapater P, Bellot P, Pascual S, Perez-Mateo M, Such J, Frances R. Interleukin-10-mediated heme oxygenase 1-induced underlying mechanism in inflammatory down-regulation by norfloxacin in cirrhosis. *Hepatology* 2011;53:935-944.
190. Young SL, Simon MA, Baird MA, Tannock GW, Bibiloni R, Spencely K, Lane JM, et al. *Bifidobacterial* species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:686-690.
191. Segain JP, Raingeard de la BD, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;47:397-403.
192. Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Inhibition of interferon gamma signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Molecular cancer research : MCR* 2003;1:855-862.
193. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 2011;3:118-134.
194. Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Peiro G, Zapater P, Gutierrez A, Perez-Mateo M, Sanz Y, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl4-induced fibrosis. *PLoS one* 2011;6:e23037.
195. Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, Svensson M, Marsal J, Mack M, Picarella D, et al. Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* 2006;107:3447-3454.

196. Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Usui S, Saeki K, Matsumoto A, Mikami Y, et al. C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2013;58:337-350.
197. Hammerich L, Bangen JM, Govaere O, Zimmermann HW, Gassler N, Huss S, Liedtke C, et al. Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of gammadelta T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis. *Hepatology* 2014;59:630-642.
198. Helwig U, Lammers KM, Rizzello F, Brigidi P, Rohleder V, Caramelli E, Gionchetti P, et al. Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* 2006;12:5978-5986.
199. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of Bifidobacterium logum strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 2007;150:531-538.
200. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, Pulendran B. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-4989.
201. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4733-4743.
202. Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004;172:2739-2743.
203. Plantinga TS, van Maren WW, van Bergenhenegouwen J, Hameetman M, Nierkens S, Jacobs C, de Jong DJ, et al. Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by Bifidobacterium breve and Lactobacillus strains of probiotics. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:621-628.
204. Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, Brenner DA, Schnabl B. Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012;143:1330-1340.
205. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3029-3034.
206. Lee SM, Joo YD, Seo SK. Expression and Function of TLR2 on CD4 Versus CD8 T Cells. *Immune Netw* 2009;9:127-132.
207. Moorthy G, Murali MR, Devaraj SN. Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during Shigella dysenteriae 1 infection in rats. *Nutrition* 2009;25:350-358.
208. Khailova L, Dvorak K, Arganbright KM, Halpern MD, Kinouchi T, Yajima M, Dvorak B. Bifidobacterium bifidum improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G940-949.
209. Zhou YK, Qin HL, Zhang M, Shen TY, Chen HQ, Ma YL, Chu ZX, et al. Effects of Lactobacillus plantarum on gut barrier function in experimental obstructive jaundice. *World J Gastroenterol* 2012;18:3977-3991.

210. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 2012;7:e42656.
211. Edin S, Wikberg ML, Rutegard J, Oldenborg PA, Palmqvist R. Phenotypic skewing of macrophages in vitro by secreted factors from colorectal cancer cells. *PLoS One* 2013;8:e74982.
212. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17253-17258.
213. Isidro RA, Bonilla FJ, Pagan H, Cruz ML, Lopez P, Godoy L, Hernandez S, et al. The Probiotic Mixture VSL#3 Alters the Morphology and Secretion Profile of Both Polarized and Unpolarized Human Macrophages in a Polarization-Dependent Manner. *J Clin Cell Immunol* 2014;5:1000227.
214. Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 2010;47:1650-1660.
215. Frances R, Munoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, Pascual S, Perez-Mateo M, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004;53:860-864.
216. Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 2014;159:1327-1340.

