

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

RESPUESTA INFLAMATORIA A ESTÍMULOS BACTERIANOS POR CÉLULAS  
MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE PACIENTES CIRRÓTICOS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:  
**VARENKA JULIETA BARBERO BECERRA**

CO-DIRECCIÓN  
**DRA. FLORENCIA VARGAS VORACKÓVA**  
**DRA. MA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ**

ASESORÍA  
**DRA. MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL**

MÉXICO D.F., JUNIO 06

---

---

**Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Depto. Gastroenterología y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI, IMSS.**

**La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACyT.**

**La Maestría en Biología Experimental fue apoyada por la beca otorgada durante el periodo 2004-2005 por parte de CONACyT con el No. de registro 185582.**

---

---

## COMITÉ TUTORIAL

Co-directora  
Dra. Florencia Vargas-Vorácková  
Departamento de Gastroenterología  
INCMNSZ

Co-directora  
Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

Asesora  
Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal  
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades  
Infecciosas y Parasitarias.  
Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI, IMSS.

---

---

## JURADO

Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal  
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades  
Infecciosas y Parasitarias.  
Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI, IMSS.

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz  
Profesor Titular  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

Dra. Mina Konigsberg Fainsten  
Profesor Titular  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

---

**Índice**

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>5</b>
1.1. Cirrosis.....	5
1.2. Bacterias Gram-negativas y Gram- positivas.....	6
1.3. Citocinas.....	6
1.4. Receptores tipo “toll” (TLRs).....	7
1.5. Activación de la cascada inflamatoria.....	8
1.6. Proteína unidora de LPS (LBP).....	9
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Justificación</b> .....	<b>13</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
4.1. General.....	14
4.2. Particulares.....	14
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>14</b>
<b>6. Métodos</b> .....	<b>15</b>
6.1. Tamaño de muestra.....	15
6.2. Pacientes.....	15
6.3. Diseño Experimental.....	16
6.4. Metodologías.....	16
6.4.1. Determinación de LPS plasmático.....	16
6.4.2. Determinación de LBP plasmática.....	17
6.4.3. Aislamiento de PBMC por gradiente de densidad.....	17
6.4.4. Estimulación de PBMC por LPS o LTA.....	18
6.4.5. Determinación de secreción de citocinas.....	18
6.4.6. Determinación de la expresión de TLRs 2 y 4 por citometría de flujo.....	19
6.5. Análisis estadístico.....	20
<b>7. Resultados</b> .....	<b>21</b>
7.1. Características de pacientes control y cirróticos.....	21
7.2. Determinaciones <i>ex-vivo</i> .....	21

---

7.2.1 LPS.....	21
7.2.2 LBP.....	22
7.2.3 Citocinas.....	22
7.2.3.1 Producción plasmática de IL-1 $\beta$ .....	22
7.2.3.2 Producción plasmática de TNF $\alpha$ .....	23
7.2.3.3 Producción plasmática de IL-6.....	23
7.2.3.4 Producción plasmática de IL-12.....	24
7.2.3.5 Producción plasmática de IL-10.....	24
7.2.4 Receptores.....	25
7.2.4.1 Expresión de CD14 en PBMC.....	25
7.2.4.2 Expresión de TLR2 en PBMC.....	26
7.2.4.3 Expresión de TLR4 en PBMC.....	27
7.3 Experimentos <i>in-vitro</i> .....	28
7.3.1 Citocinas.....	28
7.3.1.1 Producción de IL-1 $\beta$ por PBMC.....	28
7.3.1.2 Producción de TNF $\alpha$ por PBMC.....	29
7.3.1.3. Producción de IL-6 por PBMC.....	29
7.3.1.4. Producción de IL-12 por PBMC.....	30
7.3.1.5. Producción de IL-10 por PBMC.....	30
7.3.2. Receptores.....	31
7.3.2.1. Expresión de CD14 en PBMC.....	31
7.3.2.2 Expresión de TLR2 en PBMC.....	32
7.3.2.3. Expresión de TLR4 en PBMC.....	33
7.4 Correlaciones.....	34
7.4.1. <i>Ex- vivo</i> .....	34
7.4.2. <i>Ex- vivo vs In- vitro</i> .....	36
<b>8. Discusión.....</b>	<b>38</b>
8.1 LPS.....	38
8.2 LBP.....	39
8.3 Citocinas.....	42
8.4 Receptores.....	44
8.4.1 CD14.....	44

8.4.2 TLR2 y TLR4.....	45
<b>9. Conclusión.....</b>	<b>50</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>51</b>
<b>11. Anexos.....</b>	<b>58</b>

## Resumen

Concentraciones elevadas de endotoxina plasmática en pacientes cirróticos se han atribuido a una translocación bacteriana intestinal y a una disminución de la depuración hepática. En presencia de daño hepático, las endotoxinas son capaces de inducir inflamación, promoviendo la perpetuación de daño, eventualmente cirrosis. Los receptores tipo toll (TLRs) participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y en la activación subsiguiente de mediadores pro- y anti-inflamatorios. De los cuales, el TLR2 reconoce al ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias gram-positivas, y el TLR4 reconoce al lipopolisacárido (LPS) o endotoxina de bacterias gram-negativas. La activación del TLR4 por bacterias gram-negativas es capaz de disparar una respuesta inflamatoria y daño hepático. La activación solo del TLR2, parece no ser suficiente para producir inflamación. Este estudio evaluó la respuesta inflamatoria de células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes cirróticos y no-cirróticos a productos de bacterias gram-positivas y gram-negativas, mediante la secreción de citocinas ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-12}$  e  $\text{IL-10}$ ), y la expresión de TLR2 y TLR4 antes y después de la exposición a LPS o LTA. Así mismo, se determinó la correlación de estos mediadores con concentraciones plasmáticas de LPS y la proteína unidora de LPS (LBP). PBMC aisladas de seis pacientes cirróticos estadio child A-B y seis pacientes control se expusieron a LPS o LTA. La secreción de citocinas pre- y post-exposición fue determinada por ELISA, la expresión de los receptores se determinó por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales, y las concentraciones plasmáticas de LPS y LBP se determinaron utilizando el ensayo de Limulus y ELISA, respectivamente. Los datos se presentaron como medianas y se analizaron por la prueba de Wilcoxon, las correlaciones se expresaron como índices de correlación de Spearman. Las concentraciones plasmáticas de LPS y LBP fueron mayores en pacientes cirróticos, así como concentraciones de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$  e  $\text{IL-12}$ , con la excepción de  $\text{IL-10}$ , la cual fue menor en este grupo, mientras que la  $\text{IL-1}\beta$  no presentó concentraciones detectables. Las diferencias no presentaron significancia estadística. La expresión *ex-vivo* de TLR2, TLR4 y CD14 en PBMC fue



mayor en pacientes cirróticos ( $P < 0.02$ ). Ensayos *In-vitro* de PBMC expuestas a LPS disparan una secreción más vigorosa de citocinas que la exposición a LTA, en ambos grupos. Las PBMC mostraron una expresión *in-vitro* menor de TLR2 y TLR4 con la exposición a LPS en ambos grupos, mientras con el LTA, solamente se observó un aumento en la expresión de TLR2 en pacientes control. Las concentraciones plasmáticas de LPS y LBP correlacionaron significativa- e inversamente en pacientes control solamente, no así con la secreción de citocinas y expresión de los TLRs antes o después de la exposición a LPS o LTA. A manera de conclusión, la secreción de citocinas inflamatorias por las PBMC aumenta después de la exposición a LPS o LTA. Este aumento es mayor con LPS. La exposición a LPS y a LTA es seguida por una disminución en la expresión de TLR2 y TLR4. Estos resultados sugieren que productos de bacterias gram-negativas activan ambas vías de TLRs, pudiendo presentar efectos aditivos. Estudios moleculares de activación y regulación del hospedero nos guiarán a un mejor entendimiento de los procesos involucrados en la inflamación crónica hepática.

**Abstract**

Increased plasma endotoxin levels in cirrhotic patients have been attributed to intestinal bacterial translocation and decreased liver clearance. In the presence of liver injury, endotoxin is able to induce inflammation, promoting further injury, and eventually, cirrhosis. Toll-like receptors (TLRs) participate in the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), and the subsequent activation of pro- and anti-inflammatory mediators. Among them, TLR2 recognize lipoteichoic acid (LTA) of gram-positive bacteria, and TLR4 recognize lipopolysaccharide (LPS) or endotoxin of gram-negative bacteria. Activation of TLR4 by gram-negative bacteria is able to trigger inflammatory response and liver injury. The sole activation of TLR2, however, does not appear to be sufficient to produce inflammation. This study evaluates the inflammatory response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cirrhotic and non-cirrhotic patients to products of both gram-positive and negative bacteria, in terms of cytokine secretion ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and IL-10), and TLR2 and TLR4 expression before and after exposure to LPS or LTA. It also explores the correlation of these mediators with plasma LPS and LPS-binding protein (LBP). PBMC obtained from six child A-B cirrhotic patients and six non-cirrhotic controls were exposed to LPS or LTA. Pre- and post-exposure cytokine secretion was measured by means of ELISA, receptor expression was assessed by flow cytometry using monoclonal antibodies, and plasma LPS and LBP levels were determined using the Limulus assay and ELISA, respectively. Data are summarized as median values and analyzed by Wilcoxon tests, correlations are expressed as Spearman correlation indexes. Plasma LPS and LBP levels were higher in cirrhotic patients.  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and IL-12 plasma levels were higher in cirrhotic patients too, with the exception of IL-10 which was lower, whereas IL-1 $\beta$  levels were not detectable. Differences did not reach statistical significance. *Ex-vivo* expression of TLR2, TLR4 and CD14 in PBMC was higher in cirrhotic patients ( $P < 0.02$ ). *In-vitro* assays of PBMC exposure to LPS triggered a more vigorous cytokine secretion than the exposure to LTA in both groups. PBMC showed a decrease in TLR2 and TLR4 *in-vitro* expression after exposure to LPS in both groups, whereas LTA exposure was followed by an

increase in TLR2 expression in non-cirrhotic control group only. LPS and LBP levels correlated inversely and significantly in non-cirrhotic control group only. Plasma LPS and LBP levels were not correlated with PBMC cytokine secretion and TLR expression before or after exposure to LPS or LTA. In conclusion, inflammatory cytokine secretion by PBMC increases after LPS or LTA exposure. This increase is larger with LPS. LPS and LTA exposure is followed by a decrease in both TLR2 and TLR4 expression. These results suggest that products of gram-negative bacteria activate both TLRs pathways, and can have an additive effect. Molecular studies of host immune activation and regulation will lead to a better understanding of the chronic liver inflammation process.

## **1. Introducción**

### **1.1. Cirrosis**

La cirrosis hepática es la cuarta causa de muerte en nuestro país (URL:salud.gob.mx, 2003). Se define como una enfermedad crónica, difusa e irreversible, caracterizada por la existencia de fibrosis y nódulos de regeneración que conducen a una alteración de la arquitectura vascular. Aún cuando puede deberse a causas diversas, el alcoholismo y las hepatitis virales crónicas son las más frecuentes (Robbins, 1996; Yao y col, 2005).

Los pacientes con daño hepático pueden permanecer asintomáticos o presentar síntomas inespecíficos, muchas veces secundarios a la afección de otros sistemas. A medida que la lesión progresa, la insuficiencia hepática y la hipertensión portal son las responsables de la aparición de complicaciones, como hemorragias digestivas, ascitis, encefalopatía hepática y hepatocarcinoma. Estas complicaciones son más frecuentes cuanto mayor es el grado de deterioro funcional hepático, siendo la clasificación de Child-Pugh un método práctico y sensible para valorar la función hepática (Robbins, 1996).

Los pacientes hepatópatas cursan con frecuencia con endotoxemia, misma que se ha atribuido a la translocación bacteriana del lumen intestinal al sistema, y a la depuración hepática disminuida (Riordan y col, 2003; Albillos y col, 2003). Los productos bacterianos provenientes del lumen intestinal pueden inducir la elevación de citocinas pro-inflamatorias, contribuyendo a la aparición y perpetuación de inflamación hepática y, eventualmente, desarrollo de fibrosis y cirrosis (Iredale, 2003).

En condiciones normales, los productos bacterianos procedentes del intestino son eliminados por las células de Kupffer, macrófagos residentes hepáticos, durante su paso por la circulación hepática. En presencia de daño hepático, la cantidad de estos productos se incrementa en la circulación, pudiendo precipitar y promover

un daño mayor por la activación de las células de Kupffer y la liberación de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y otros mediadores pro-inflamatorios (Iredale, 2003).

### 1.2. Bacterias gram-negativas G (-) y gram-positivas G (+)

Se ha señalado que el lipopolisacárido (LPS), componente de la pared celular de bacterias G (-), cuya estructura química ha sido estudiada exhaustivamente, es capaz de activar al sistema inmune innato. El LPS es una endotoxina termoestable, que está compuesta por dos regiones, el polisacárido, que es la parte más variable (Rietschel y Brade, 1992; Chaby, 1999), y el lípido A, el cual es el responsable de la mayoría de las actividades biológicas, así como del daño causado por la endotoxina (Lazaron y Dunn, 2002). Se ha observado que el lípido A puede participar en la inflamación hepática, sobre todo en aquella secundaria al consumo excesivo de alcohol. Sin embargo, los niveles circulantes de endotoxina pueden encontrarse elevados en un número significativo de pacientes con enfermedad hepática, independientemente de su etiología (Fukui y col, 1991).

Por otro lado, la composición de la pared celular de bacterias G (+), incluye una mezcla compleja de polisacáridos fosforilados y estructuras glicolipídicas. Entre ellos predominan los peptidoglicanos, los cuales se consideran componentes estructurales importantes de la pared celular bacteriana (Salminen y col, 1998), y ácidos lipoteicoicos (LTA), que han mostrado ser inmunológicamente activos (Delcour y col, 1999; Cross y col, 2001; Miura y col, 2001). Las bacterias G (+) poseen varios componentes con capacidad inmunoestimuladora que, al igual que el LPS y el lípido A de las bacterias G (-), son liberados en cantidades elevadas a la circulación portal de pacientes con daño hepático.

### 1.3. Citocinas

Entre los mediadores inflamatorios, las citocinas poseen un papel clave en la comunicación celular durante la respuesta de fase aguda e inmune. Una de sus

funciones principales es la activación de macrófagos, facilitando el proceso de fagocitosis bacteriana, localizando la infección y protegiendo al hospedero de bacteremia y muerte (Stevens, 2002; Yao y col, 2005).

Durante la respuesta inmediata al daño, se producen citocinas de fase aguda o pro-inflamatorias, como la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) y TNF- $\alpha$ . En forma concomitante, mecanismos autorreguladores controlan la liberación de mediadores anti-inflamatorios, como la interleucina-10 (IL-10) (Knolle y col, 1995; Bienvenu y col, 1998; Bataller y Brenner, 2005).

Las concentraciones de citocinas observados en pacientes cirróticos e informadas en la literatura no han sido consistentes. La tendencia, sin embargo, se inclina hacia una producción aumentada de citocinas pro-inflamatorias. *In-vitro*, la estimulación con LPS de células mononucleares de pacientes cirróticos produce un aumento mayor en TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Khoruts y col, 1991; McClain y col, 1993; Le Moine y col, 1995; Rodríguez y Gonzáles, 1995; Penington y col, 1997; Song y Lin, 1999; Neuman, 2001). La producción de IL-10 puede, por otra parte, verse aumentada (Urbaschek y col, 2001) o disminuida (Taïeb y Chollet, 2001). El origen de estos cambios se ha atribuido tanto al agente responsable del daño hepático como a los productos bacterianos procedentes del lumen intestinal.

#### 1.4. Receptores tipo “toll” (TLRs)

Los TLRs se consideran homólogos de la proteína “toll” de *Drosophila melanogaster*, y comprenden una familia de al menos 11 receptores proteicos transmembranales (Mukhopadhyay y col, 2004).

Los TLRs son proteínas transmembranales con dominios extracelulares caracterizados por repeticiones múltiples ricas en leucina. Su dominio citoplasmático “TIR” (Toll/IL-1 receptor) es similar al de los receptores de la interleucina-1 (IL-1R) (Andreakos y col, 2004).

Los TLRs están involucrados en la activación de la respuesta inmune innata a antígenos microbianos. Participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Dos de estos patrones son el LPS de las bacterias G (-) y el LTA de las bacterias G (+) (Paik y col, 2003; Riordan y col, 2003). Los TLRs discriminan entre bacterias, hongos y protozoarios, por lo que son capaces de inducir una respuesta antimicrobiana específica (Aderem y Ulevitch, 2000).

Los TLRs se expresan principalmente en macrófagos y células dendríticas, controlando la activación de las células presentadoras de antígeno (APC). Juegan un papel importante en el control de la respuesta inmune adaptativa, que se inicia cuando las células T reconocen péptidos extraños unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC), expresado en las APC (Barton y Medzhitov, 2002).

Entre los once TLRs humanos identificados a la fecha, el TLR2 y TLR4, participan en la activación de la respuesta inmune innata a bacterias y micobacterias (Kaisho y Akira, 2002; Takeda y Akira, 2005). Los componentes de la pared celular de bacterias G (+), incluyendo peptidoglicanos y LTA, son reconocidos por TLR2, mientras que los componentes de bacterias G (-), como el LPS, son reconocidos por TLR4 (Aderem y Ulevitch, 2000; Miettinen y col, 2000).

La estimulación de TLR2 y TLR4 en la superficie celular ocasiona un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  (Faure y col, 2001; Iredale, 2003). Por otra parte, la expresión de TLR2 y TLR4 puede ser regulada tanto de manera directa por el LPS, o de manera indirecta por mediadores de la inflamación, como las citocinas, particularmente el TNF- $\alpha$  y el interferón gama (IFN- $\gamma$ ) (Faure y col, 2001).

### 1.5. Activación de la cascada inflamatoria

El LPS circulante promueve la síntesis hepática de la proteína unidora de LPS (LBP), la cual facilita la unión del LPS al receptor CD14 (Lazaron y Dunn, 2002). El complejo LPS-LBP es reconocido por el receptor CD14, presente en la

superficie del macrófago. Por carecer de un dominio citoplasmático, el CD14 es incapaz de generar una señal intracelular. Sin embargo, el CD14 puede unirse al TLR4, ya que ambos poseen múltiples repeticiones ricas en leucina que facilitan la interacción proteína-proteína (Lazaron y Dunn, 2002). De esta manera, el complejo LPS-LBP-CD14 activa al TLR4, que toma el papel de un co-receptor transmembranal, mismo que es capaz de transmitir la señal al núcleo celular y activar al factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). El NF- $\kappa$ B regula la transcripción de genes que codifican para proteínas como mediadores inflamatorios y citocinas, involucradas en la respuesta inflamatoria y en la respuesta de fase aguda (Aderem y Ulevitch, 2000; Miettinen y col, 2000; Faure y col, 2001; Albillos y col, 2003) Además de regular la respuesta inmune a patógenos, se activa con una gran variedad de estímulos, que incluyen productos bacterianos y citocinas, como la IL-1 $\beta$ , y el TNF- $\alpha$ , entre otros (Miettinen y col, 2000).

Al igual que el LPS de las bacterias G (-), la mayoría de los componentes de la pared celular de las bacterias G (+) utiliza al receptor CD14 para su reconocimiento por el sistema inmune. Así, se ha observado que tanto los peptidoglicanos, como el LTA, activan macrófagos por esta vía (Yoshimura y col, 1999).

#### 1.6. Proteína unidora de LPS (LBP)

El papel de la endotoxemia en el desarrollo de cirrosis aún es objeto de controversia. Esto debido a que la determinación de los niveles de endotoxinas circulantes ha sido difícil por la naturaleza episódica y transitoria de la endotoxemia, y a la vida media corta de la endotoxina (Albillos y col, 2003).

Algunos estudios informan concentraciones elevadas de endotoxinas en pacientes hepatópatas, mientras que otros informan lo contrario (Opal y col, 1999; Zweigner y col, 2001). En un estudio reciente, la mayoría de los pacientes cirróticos presentó endotoxinas circulantes dentro del intervalo de normalidad ( $0.29 \pm 0.04$  EU/mL, controles sanos) (Albillos y col, 2003). Sin embargo, la LBP mostró niveles elevados en un 60% de las muestras ( $> 9.62$   $\mu$ g/mL). La LBP



alcanza picos plasmáticos 2 a 3 días después de la bacteremia transitoria o endotoxemia, y las concentraciones permanecen elevadas hasta 72 h después. Esto sugiere que la LBP plasmática, más que el LPS, refleja la exposición prolongada a bacterias G (-) y/o a sus productos (Albillos y col, 2003; 2004).

Las concentraciones plasmáticas de LBP correlacionan significativamente con las concentraciones de CD14 soluble, por lo que se ha sugerido que podrían reflejar la magnitud de la interacción entre las endotoxinas y los monocitos (Albillos y col, 2003).

## 2. Antecedentes

La endotoxina contribuye al daño hepático por la inducción de citocinas pro-inflamatorias. La endotoxemia en la enfermedad hepática resulta de la disminución de la capacidad destoxicante de las células de Kupffer, del aumento de la permeabilidad intestinal y de la biota G (-). Se ha postulado que por la competencia con enterobacterias, los probióticos pueden disminuir la permeabilidad intestinal y la endotoxemia. Los probióticos son microorganismos no patógenos o componentes de los mismos que, cuando son ingeridos, ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Marteau, 2004). Al competir con las enterobacterias y ejercer una acción inmunomoduladora, los probióticos pueden afectar la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias en la enfermedad hepática crónica. Este efecto fue explorado en un ensayo clínico de fase I-II, donde se estudió el efecto de una bebida láctea con *Lactobacillus casei* cepa *Shirota* (LcS) sobre las concentraciones de endotoxina en plasma y de líquido de ascitis, así como sobre la secreción de citocinas por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes cirróticos. Se observó que la administración de LcS modifica las concentraciones de endotoxina y la secreción de citocinas pro- y anti-inflamatorias dependiendo de las concentraciones basales de endotoxina (Torre y col, 2002). Esto llevó a hipotetizar una respuesta inmune diferencial en el paciente cirrótico, posiblemente condicionada por estados de tolerancia y/o de activación de vías alternas de reconocimiento inmune.

Dentro del proceso de daño hepático, y de la inducción y perpetuación de la inflamación en particular, se ha enfatizado recientemente el papel de los productos bacterianos provenientes del lumen intestinal. La evidencia señala que el LPS de bacterias G (-) puede participar en la génesis de inflamación hepática, sobre todo en aquella secundaria a consumo excesivo de alcohol. Sin embargo, las concentraciones circulantes de endotoxina pueden encontrarse elevadas en un número significativo de pacientes con enfermedad hepática, independientemente de su etiología. El papel de los productos derivados de

bacterias G (+), que también se sabe son liberados en concentraciones elevadas a la circulación portal de pacientes cirróticos se desconoce.

La importancia de considerar productos tanto de bacterias G (-) como de G (+) en los modelos de inflamación hepática, radica en los hallazgos encontrados recientemente. Se ha informado que la expresión del TLR2 en PBMC, pero no del TLR4, se encuentra elevada en pacientes cirróticos, correlacionando significativamente con el TNF- $\alpha$  circulante (Riordan y col, 2003). Esto sugiere que el aumento de las concentraciones circulantes de TNF- $\alpha$  detectadas en pacientes cirróticos, pudiera deberse a estímulos de bacterias G (+) más que de G (-). El hallazgo de LTA en tejido hepático de pacientes cirróticos apoyaría esta posibilidad (Riordan y col, 2003). Sin embargo, experimentos *in-vitro* muestran que el estímulo mediado por el TLR2 no es suficiente para sensibilizar y lesionar al hígado, y que se requiere de la mediación de ambos receptores, TLR2 y TLR4, para lograr este efecto (Szabo y col, 2003). Otra explicación al incremento en el TLR2 sería un reconocimiento cruzado (Iredale, 2003). A este respecto, y pese a que estudios moleculares apoyan y muestran que el TLR4 es el receptor “predominante” del LPS, se sabe que éste no es exclusivo. Se ha observado que el TLR2 también puede funcionar como receptor del LPS cuando se sobre-expresa (Aderem y Ulevitch, 2000), y puede participar en el reconocimiento del LPS de *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Helicobacter pylori* (Takeda y Akira, 2005).

### 3. Justificación

La respuesta inflamatoria de pacientes cirróticos se ha atribuido al daño hepático crónico de base y a la exposición prolongada a endotoxinas. Estudios recientes señalan que la expresión del TLR4 en las PBMC de pacientes cirróticos no es diferente a la de controles sanos, mientras que la del TLR2 está incrementada (Riordan y col, 2003). Esto, aunado a la observación que la administración de lactobacilos se acompaña de un aumento significativo en la expresión del TLR2 (Riordan y col, 2003), ha llevado a postular que la respuesta inflamatoria pudiera deberse a bacterias G (+) más que a G (-), o que existe cierto grado de tolerancia, referido en la literatura como un estado de hiporespuesta por una exposición previa a un antígeno, así como la activación de vías alternas de reconocimiento. A este respecto, pese a que el TLR4 y TLR2 se han asociado al reconocimiento de bacterias G (-) y G (+), respectivamente, se sabe que estos receptores no son del todo específicos (Kaisho y Akira, 2002). La pregunta es si la inflamación en la hepatopatía crónica está influenciada primordialmente por la presencia de endotoxinas, o si también contribuyen a ella productos de bacterias G (+) y en qué grado. La respuesta a esta pregunta, además de tener implicaciones terapéuticas, dará un mayor entendimiento de los procesos involucrados en la inflamación crónica del hígado que activa el proceso de fibrosis y su progresión a cirrosis.

## 4. Objetivos

### 4.1 General

- Evaluar la respuesta inflamatoria de PBMC de pacientes control y cirróticos, en términos de secreción de citocinas y expresión de TLRs, ante la presencia de componentes de bacterias G (+) y G (-).

### 4.2 Particulares

- Determinar la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12, y la expresión de TLR2 y TLR4 por PBMC de pacientes control y cirróticos, antes y después de la exposición a LPS o LTA.

- Determinar los niveles plasmáticos de LPS y LBP en pacientes control y cirróticos, y correlacionarlos con la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12, y expresión de TLR2 y TLR4 por PBMC.

## 5. Hipótesis (de nulidad)

- La respuesta inflamatoria de PBMC de pacientes cirróticos, en términos de secreción de citocinas y expresión de TLRs, es similar ante la presencia de componentes de bacterias G (+) y G (-), y similar a la de pacientes control.

- La secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12, y la expresión de TLR2 y TLR4 por PBMC de pacientes cirróticos son similares después de la exposición a LPS o LTA, y son similares a las PBMC de pacientes control.

- Los niveles plasmáticos de LPS y LBP no se correlacionan con la secreción de TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12, y expresión de TLR2 y TLR4 por PBMC de pacientes control o cirróticos.

## 6. Métodos

### 6.1 Tamaño de muestra

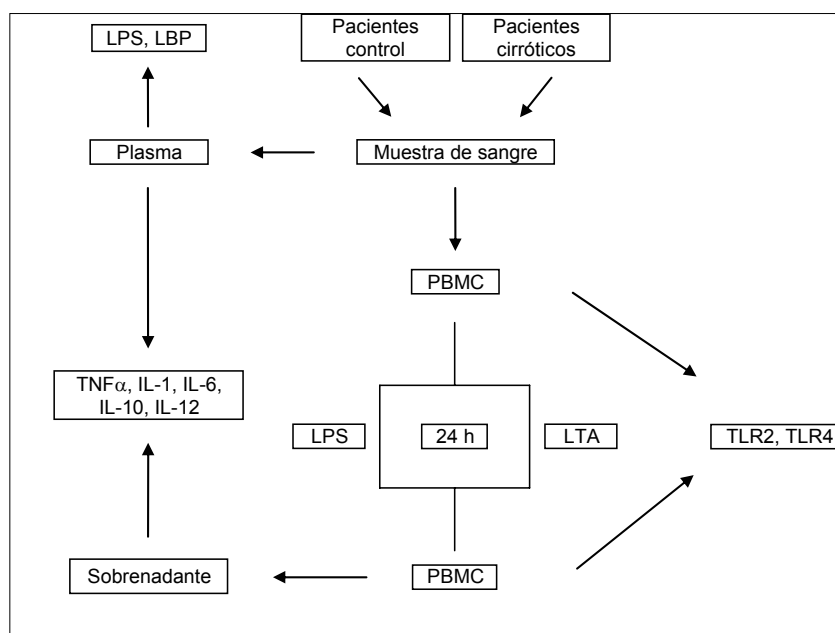
Dada la inexistencia de información precedente que sustentara el cálculo del tamaño de muestra requerido, éste no se estimó. Se incluyeron 12 pacientes, 6 control y 6 con cirrosis hepática. Un tamaño de muestra de 6 pacientes por grupo es suficiente para detectar una diferencia del "todo" vs. "nada" con base a una probabilidad *a priori* de 0.5 (distribución binomial).

### 6.2 Pacientes

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática sustentado clínica-, bioquímica- e histológicamente. Además que cumplieran con los criterios de inclusión siguientes:

- Estadio A o B de Child-Pugh.
- Ausencia de enfermedades infecciosas, metabólicas, inmunológicas o neoplásicas concomitantes.
- Ausencia de antibioticoterapia o tratamiento inmune.
- Firma de consentimiento informado.

### 6.3 Diseño Experimental



### 6.4 Metodologías

#### 6.4.1 Determinación de LPS plasmático

La muestra de sangre venosa con anticoagulante se centrifugó a 250 g por 10 min a 20°C (Hettich Zentrifugen Rotina 35R V2.13). Del plasma obtenido se obtuvo una alícuota y se almacenó a -70°C para su posterior determinación.

La endotoxina plasmática se determinó utilizando el ensayo cromogénico cuantitativo del lisado de amebocitos del limulus (LAL, QCL-1000, Biowhitakker), acorde a las instrucciones del proveedor. Brevemente, los inhibidores de la reacción se eliminaron diluyendo el plasma 1:200 con agua libre de pirógenos, y calentando las muestras a 70°C durante 5 min. Se ajustó el pH de las muestras a un rango de 7-8, por medio del uso de soluciones de hidróxido de sodio 0.1 N y ácido clorhídrico 0.1 N. En una microplaca estéril (NUNC, AccesoLab), se colocaron los estándares (4 estándares a diferentes concentraciones, preparados de una solución stock de endotoxina de *E. coli* proporcionada por Biowhitakker), el blanco y las muestras por duplicado. Se adicionó el LAL y se incubó la placa en

un termoagitador (Thermomixer R, Eppendorf) por 10 min. Se adicionó el sustrato cromogénico (precalentado a  $37\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ) y se incubó la placa en un termoagitador (Thermomixer R, Eppendorf) por 6 min. Finalmente, se adicionó ácido acético glacial al 25% para detener la reacción. La reacción se llevó a cabo a  $37\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ . Se leyó la densidad óptica en un lector de microplaca (Multiskan Ascent, Labsystems) a una longitud de onda de 405-410 nm.

#### 6.4.2 Determinación de LBP plasmática

El LBP plasmático se determinó por medio del método de ELISA, utilizando un anticuerpo específico para LBP humana (Hbt human LBP ELISA test kit, HyCult biotechnology). La microplaca de poliestireno sensibilizada previamente con anticuerpo anti-LBP humana se lavó 3 veces con solución amortiguadora de lavado/dilución (solución salina de fosfatos con Tween 20 y  $\text{MgCl}_2$ ). Se adicionaron los estándares (LBP humana) y las muestras de plasma (dilución 1:1000 para controles y 1:2000 para pacientes). Se incubó por 1 h ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ). Se realizaron 3 lavados con la solución amortiguadora. Se adicionó un segundo anticuerpo anti-LBP humana biotilado. Se incubó por 1 h ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) y se realizaron 3 lavados con la solución amortiguadora. Se adicionó el conjugado de estreptavidina-peroxidasa e incubó por 1 h ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ). Se realizaron 3 lavados con la solución amortiguadora y se agregó tetrametilbencidina e incubó por 30 min ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ). La reacción se detuvo con una solución de paro de ácido cítrico 2M. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placa (Multiskan Ascent, Labsystems). Las concentraciones de LBP (ng/ml) se obtuvieron interpolando los valores de las muestras en la curva estándar.

#### 6.4.3 Aislamiento de PBMC por gradiente de densidad.

La muestra de sangre venosa con anticoagulante se diluyó 1:2 con solución salina 0.9%. Se distribuyó en tubos cónicos de 15 ml previamente adicionados con Lymphoprep (Axis Shield) en una relación 1:3. Se centrifugó a 540 g durante 30 min a  $20^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó la fracción que corresponde a las PBMC (anillo blanco)



y se lavó con solución salina 0.9%. Un lavado a 250 g por 10 min a 20°C y dos lavados a 110 g por 5 min a 4°C. Los botones de células se juntaron, y se resuspendieron con medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con 10% SFB (suero fetal bovino) y 1% estreptomicina-penicilina ( $5 \times 10^3$  U/ml –  $5 \times 10^3$  µg/ml) (Gibco). Se realizó una dilución 1:100 con azul tripano para determinar porcentaje de viabilidad celular y contar las células en una cámara de Neubauer y se ajustó a un volumen de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se sembraron en microplacas de 6 pozos para cultivo celular, a una densidad de  $3 \times 10^6$  células / 2ml de medio / pozo (NUNC, AccesoLab) por duplicado para 3 tratamientos: sin tratamiento (control), estimulación con LPS y estimulación con LTA. Se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad a saturación durante 18 h para estabilización.

#### 6.4.4 Estimulación de PBMC por LPS o LTA

Las concentraciones para la estimulación de PBMC con LPS y LTA se determinaron de acuerdo a una cinética de concentración: 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml, determinando la activación como producción de TNF $\alpha$ . La concentración de 100 ng/ml presentó un máximo en la producción de TNF $\alpha$ , considerándose la concentración óptima de activación.

Las PBMC estabilizadas se estimularon con endotoxina (LPS; *E. coli*, Sigma Chemical Co) a una concentración final de 100 ng/ml o con ácido lipoteicoico (LTA; *St. faecalis*, Sigma Chemical Co.) en una concentración final de 100 ng/ml, incubándose posteriormente a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad a saturación durante 24 h.

#### 6.4.5 Determinación de secreción de citocinas

La secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1, 6, 10, y 12 en el sobrenadante de los cultivos y en plasma se determinó por medio de ELISA (OptiEIA, Pharmingen). Las microplacas de poliestireno (NUNC, AccesoLab) se sensibilizaron con un anticuerpo monoclonal específico contra cada una de estas citocinas. Se agregó el sobrenadante o plasma, o bien las diluciones del estándar de la citocina

correspondiente y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente, en el caso de IL-6 las concentraciones obtenidas fueron muy elevadas, por lo que se diluyeron 1:2. Se adicionó un segundo anticuerpo policlonal específico marcado con biotina y un agente enzimático conjugado de avidin-peroxidasa para llevar a cabo la reacción enzimática. Se agregó una solución sustrato formada por tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno produciendo un compuesto colorido. La reacción se detuvo por una solución de paro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Entre cada paso se realizaron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos y 0.05% de Tween-20. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placa (Multiskan Ascent, Labsystems) y las concentraciones de citocinas (pg/ml) se obtuvieron en base a la curva estándar.

6.4.6 Determinación de la expresión de TLRs 2 y 4 por citometría de flujo.

En una microplaca de 96 pozos (NUNC, AccesoLab) se colocó una suspensión celular de  $5 \times 10^5$  células/pozo. Se incubó con una solución de bloqueo (suero de conejo 2%, SFB 2%, EDTA 5 mM en PBS-NaN<sub>3</sub> 0.1%) por 1 h en hielo. Se añadieron los anticuerpos (Abs) monoclonales de ratón anti-TLR2 y anti-TLR4 humanos marcados con ficoeritrina (PE) (Sta. Cruz), y anti-CD14 marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sta. Cruz), así como también los controles de isotipo, Abs de cabra anti-ratón IgG<sub>2a</sub> marcado con FITC y Abs de cabra anti-ratón IgG<sub>2a</sub> marcado con PE (Sta. Cruz), incubándose 30 min en hielo. Se agregó una solución de tinción (SFB 2%, EDTA 5mM en PBS-NaN<sub>3</sub> 0.1%). Entre cada paso, se centrifugó a 690 g por 3 min a 4°C, decantando y resuspendiendo el botón con vortex. Se pasó el contenido de cada pozo a tubos para FACS con regulador de tinción. Se adquirió en FACS. Las células se analizaron en el citómetro EPICS-ALTRA (Bekman-Coulter). La expresión de proteína de los TLRs 2 y 4 se cuantificó analizando los porcentajes de fluorescencia de las células marcadas, comparando con las células sin tratar.

## 6.5 Análisis estadístico

Los resultados se dividieron en aquellos obtenidos directamente del plasma y PBMC y se denominaron *ex-vivo*, y aquellos obtenidos después de la activación de las PBMC con LPS o LTA denominados *in-vitro*.

Los resultados *ex-vivo*, se resumieron en términos de mediana, y valores mínimo y máximo. Las comparaciones entre pacientes control y cirróticos se hicieron mediante la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon (o U de Mann-Whitney). Para los cambios inducidos por LPS y LTA *in-vitro*, se calcularon las diferencias entre las células cultivadas sin exposición y aquellas expuestas a LPS o LTA. Estas diferencias se resumieron en términos de medianas, y valores mínimo y máximo. El análisis se realizó con la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. La comparación de las diferencias entre pacientes control y cirróticos se hizo mediante la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon.

La correlación entre LPS y LBP, y de éstos con las citocinas y TLRs se ponderó mediante el índice de correlación de Spearman ( $r_s$ ).

Se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados

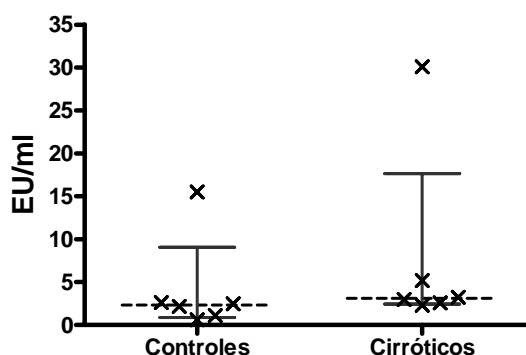
### 7.1 Características de pacientes control y cirróticos.

Se incluyeron 12 pacientes. El grupo de pacientes control con una n=6, presentó una relación de género masculino:femenino de 1:5, y una mediana de edad de 52 años (mínimo de 41 y máximo de 75 años). El grupo de pacientes cirróticos con una n=6, presentó una relación de género masculino:femenino de 2:4, y una mediana de edad de 56.5 años (mínimo de 41 y máximo de 69 años). En cuanto a la etiología, 2 presentaron cirrosis secundaria a consumo excesivo de alcohol y 4 cirrosis criptogénica.

### 7.2 Determinaciones *ex-vivo*

#### 7.2.1 LPS

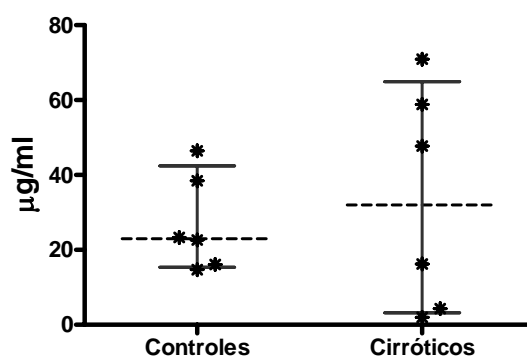
La mediana de concentración plasmática de LPS, expresada en unidades de endotoxina por mL (EU/mL), fue de 2.32 (0.61 a 15.51) en pacientes control y de 3.10 (2.28 a 30.09) en pacientes cirróticos. Aún cuando la mediana fue mayor en pacientes cirróticos, la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a los pacientes control ( $p < 0.11$ ) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Concentraciones plasmáticas de LPS de pacientes control y pacientes cirróticos.

### 7.2.2 LBP

La mediana de concentración plasmática de LBP, expresada en  $\mu\text{g/ml}$ , fue de 22.96 (14.67 a 46.40) en pacientes control y de 31.95 (1.98 a 70.89) en pacientes cirróticos. Aún cuando la mediana fue mayor en pacientes cirróticos la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a los pacientes control ( $p < 0.75$ ) (Gráfica 2).

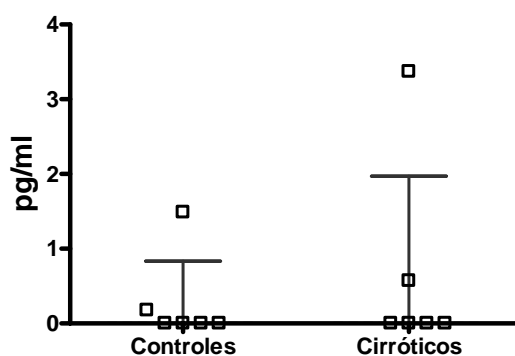


Gráfica 2. Concentraciones plasmáticas de LBP de pacientes control y pacientes cirróticos.

### 7.2.3 Citocinas

#### 7.2.3.1 Producción plasmática de IL-1 $\beta$

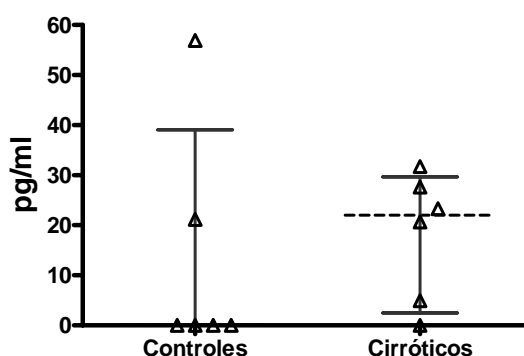
La mediana de producción de IL-1 $\beta$  en plasma, expresada en  $\text{pg/ml}$ , fue de 0.0 (0.0 a 1.49) en pacientes control y de 0.0 (0.0 a 3.37) en pacientes cirróticos. Se observan concentraciones menores al límite de detección en ambos grupos ( $p < 0.85$ ) (Gráfica 3). (Nivel de detección  $\geq 4 \text{ pg/mL}$ )



Gráfica 3. Producción plasmática de IL-1 $\beta$  de pacientes control y pacientes cirróticos.

### 7.2.3.2 Producción plasmática de TNF $\alpha$

La mediana de producción de TNF $\alpha$  en plasma, expresada en pg/ml, fue de 0.0 (0.0 a 56.95) en pacientes control y de 22.01 (0.0 a 31.74) en pacientes cirróticos. Esta producción diferencial no alcanzó significancia estadística ( $p < 0.24$ ) (Gráfica 4). (Nivel de detección  $\geq 4$  pg/mL)

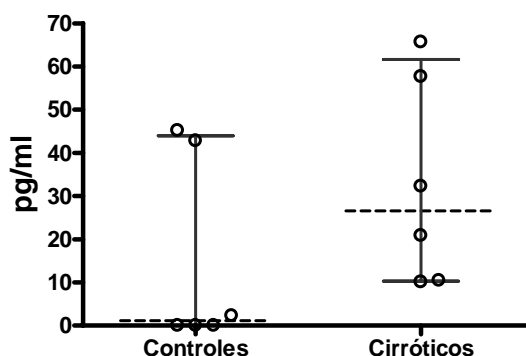


Gráfica 4. Producción plasmática de TNF $\alpha$  de pacientes control y pacientes cirróticos.

### 7.2.3.3 Producción plasmática de IL-6

La mediana de producción de IL-6 en plasma, expresada en pg/ml, fue de 1.15 (0.0 a 45.16) en pacientes control y de 26.58 (10.13 a 65.62) en pacientes

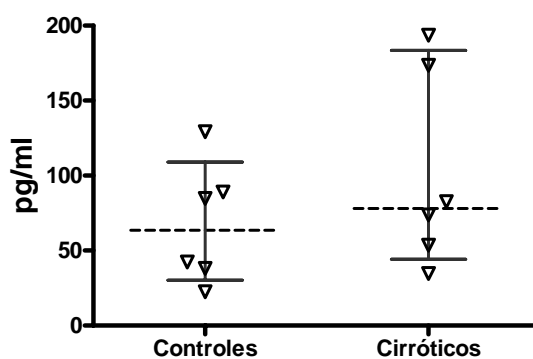
cirróticos. Esta producción diferencial no alcanzó significancia estadística ( $p < 0.11$ ) (Gráfica 5). (Nivel de detección  $\geq 4$  pg/mL)



Gráfica 5. Producción plasmática de IL-6 de pacientes control y pacientes cirróticos.

#### 7.2.3.4 Producción plasmática de IL-12

La mediana de producción de IL-12 en plasma, expresada en pg/ml, fue de 63.61 (22.56 a 129.22) en pacientes control y de 78.11 (34.78 a 193.56) en pacientes cirróticos. Esta producción diferencial no alcanzó significancia estadística ( $p < 0.52$ ) (Gráfica 6). (Nivel de detección  $\geq 15$  pg/mL).

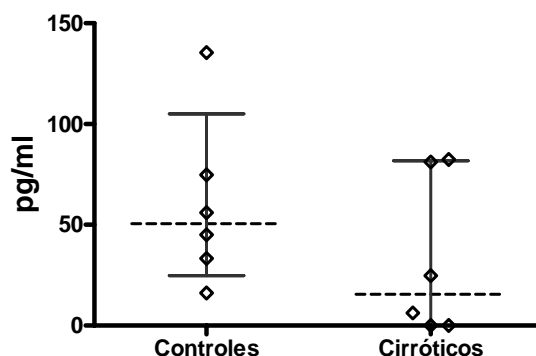


Gráfica 6. Producción plasmática de IL-12 de pacientes control y pacientes cirróticos.

#### 7.2.3.5 Producción plasmática de IL-10

La mediana de producción de IL-10 en plasma, expresada en concentración (pg/ml), fue de 50.54 (16.19 a 135.46) en pacientes control y de 15.57 (0.0 a

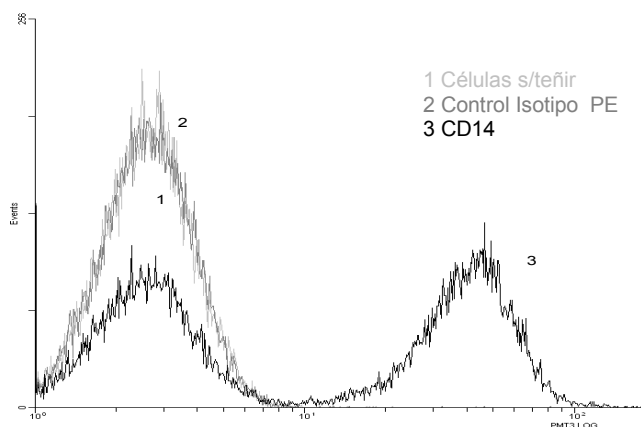
82.38) en pacientes cirróticos. Esta producción diferencial no alcanzó significancia estadística ( $p < 0.26$ ) (Gráfica 7). (Nivel de detección  $\geq 4$  pg/mL)



Gráfica 7. Producción plasmática de IL-10 de pacientes control y pacientes cirróticos.

## 7.2.4 Receptores

### 7.2.4.1 Expresión de CD14 en PBMC

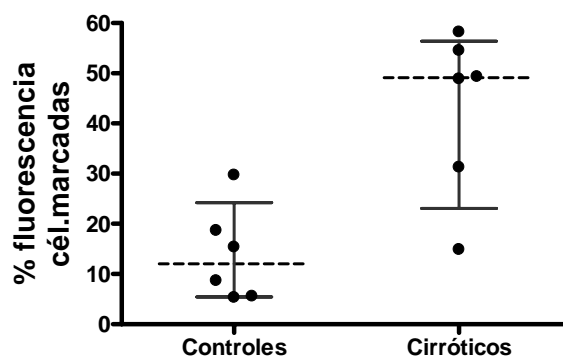


Histograma 1. Expresión ex-vivo de CD14 en PBMC humanas por citometría de flujo

En el histograma 1 se ilustra un análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos anti-CD14 marcado con fluorocromo (PE). El eje "x" indica la intensidad de fluorescencia emitida, mientras que el eje "y" indica el número de eventos, o número de células. Los números 1 y 2 indican los controles negativos, 1 para las células sin teñir y 2 para el control de isotipo ( $IgG_{2a}$ ). El desplazamiento a la derecha indica una expresión positiva, lo cual se observa para CD14.

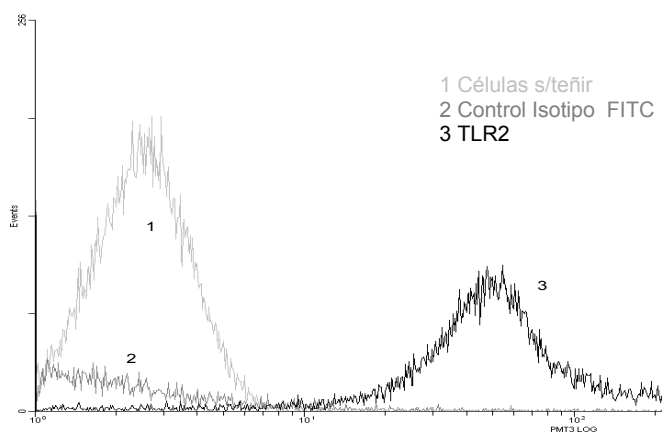


La mediana de expresión del receptor CD14 por las PBMC expresada como porcentaje de fluorescencia de células marcadas, fue de 12.03 (5.31 a 29.72) en pacientes control y de 49.11 (14.85 a 58.21) en pacientes cirróticos. Esta expresión diferencial alcanzó significancia estadística ( $p < 0.02$ ) (Gráfica 8).



Gráfica 8. Expresión de CD14 por PBMC humanas de pacientes control y pacientes cirróticos.

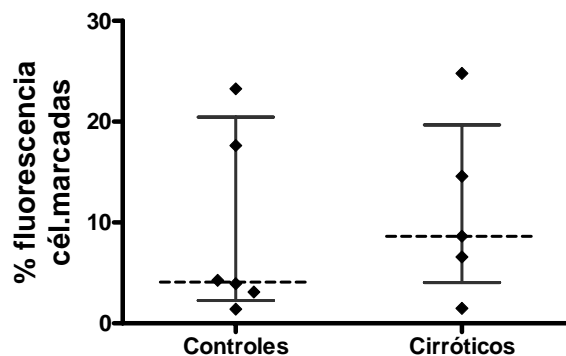
#### 7.2.4.2 Expresión de TLR2 en PBMC



Histograma 2. Expresión ex-vivo de TLR2 en PBMC humanas por citometría de flujo

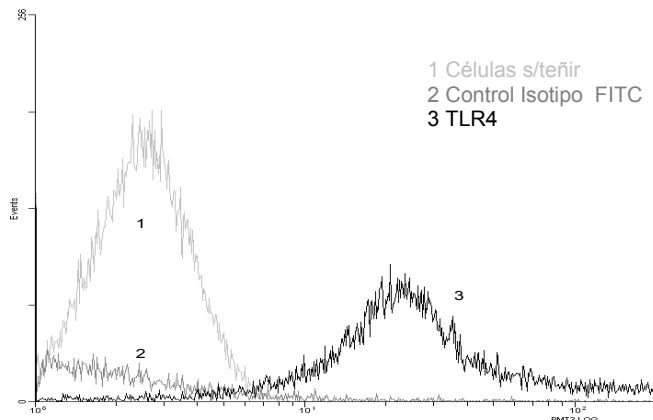
En el histograma 2 se ilustra un análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos anti-TLR2 marcado con fluorocromo (FITC). Los números 1 y 2 indican los controles negativos, 1 para las células sin teñir y 2 para el control de isotipo ( $IgG_{2a}$ ). Un desplazamiento hacia la derecha indica una expresión positiva, lo cual se observa para TLR2.

La mediana de expresión del receptor TLR2 por las PBMC, expresada como porcentaje de fluorescencia de células marcadas, fue de 4.09 (1.41 a 23.26) en pacientes control y de 8.63 (1.48 a 24.78) en pacientes cirróticos. Esta expresión diferencial no alcanzó significancia estadística ( $p < 0.46$ ) (Gráfica 9).



Gráfica 9. Expresión de TLR2 por PBMC humanas de pacientes control y pacientes cirróticos (n = 5 por exclusión de valor extremo).

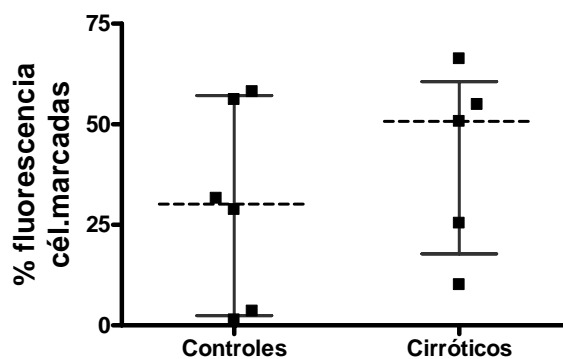
#### 7.2.4.3 Expresión de TLR4 en PBMC



Histograma 3. Expresión ex-vivo de TLR4 en PBMC humanas por citometría de flujo

En el histograma 3 se ilustra un análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos anti-TLR4 marcado con fluorocromo (FITC). Los números 1 y 2 indican los controles negativos, 1 para las células sin teñir y 2 para el control de isotipo ( $IgG_{2a}$ ). Un desplazamiento hacia la derecha indica una expresión positiva, lo cual se observa para TLR4.

La mediana de expresión del receptor TLR4 por las PBMC, expresada como porcentaje de fluorescencia de células marcadas, fue de 30.18 (1.33 a 58.10) en pacientes control y de 50.71 (10.07 a 66.29) en pacientes cirróticos. Esta expresión diferencial no alcanzó significancia estadística ( $p < 0.58$ ) (Gráfica 10).



Gráfica 10. Expresión de TLR4 por PBMC humanas de pacientes control y pacientes cirróticos (n = 5 por exclusión de valor extremo).

### 7.3 Experimentos *in-vitro*

#### 7.3.1 Citocinas

##### 7.3.1.1 Producción de IL-1 $\beta$ por PBMC

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	$\uparrow 25.05$ ( $\downarrow 31.79$ a $\uparrow 61.47$ )	$p < 0.17$	$\downarrow 11.67$ ( $\downarrow 26.43$ a $\uparrow 9.07$ )	$p < 0.17$
Cirróticos	6	$\uparrow 86.19$ ( $\uparrow 6.55$ a $\uparrow 284.40$ )	$p < 0.03$	$\uparrow 6.55$ ( $\uparrow 2.40$ a $\uparrow 11.31$ )	$p < 0.03$
		$p < 0.11$		$p < 0.04$	

Cuadro 1. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la producción *in-vitro* de IL-1 $\beta$  por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA.

Los valores de las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA, produjeron una mediana de cambio diferencial en la producción de IL-1 $\beta$ , un aumento con LPS y una disminución con LTA, esta producción diferencial no alcanzó significancia estadística (Cuadro 1, Anexo 1a). Las PBMC de pacientes cirróticos, post-exposición a LPS y LTA, aumentaron su producción de IL-1 $\beta$ , siendo está estadísticamente significativa (Cuadro 1, Anexo 1b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios inducidos por LPS

no fueron significativamente diferentes, por el contrario, los cambios inducidos por LTA si presentaron diferencia significativa, debido al incremento en la producción de IL-1 $\beta$  que mostraron las PBMC de pacientes cirróticos.

### 7.3.1.2. Producción de TNF- $\alpha$ por PBMC

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	↑ 292.64 (↑ 51.86 a ↑ 658.44)	p < 0.03	↑ 8.53 (↓ 35.00 a ↑ 124.67)	p < 0.22
Cirróticos	6	↑ 71.17 (↑ 10.10 a ↑ 713.37)	p < 0.03	↑ 11.79 (↓ 18.66 a ↑ 160.08)	p < 0.25
		p < 0.52		p < 0.87	

Cuadro 2. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la producción *in-vitro* de TNF- $\alpha$  por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA.

Los valores de las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA produjeron una mediana de cambio en la producción de TNF $\alpha$ , presentando un aumento con ambos estímulos, siendo significativo solo con LPS (Cuadro 2, Anexo 2a). De la misma manera, en las PBMC de pacientes cirróticos, la post-exposición a LPS y LTA produjo un cambio en la mediana de producción a la alta en ambos estímulos, presentando significancia estadística solo con LPS (Cuadro 2, Anexo 2b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios inducidos tanto por LPS, como por LTA, no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos.

### 7.3.1.3. Producción de IL-6 por PBMC

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	↑ 285.26 (↓ 116.01 a ↑ 1320.00)	p < 0.12	↑ 236.26 (↓ 253.33 a ↑ 1682.56)	p < 0.17
Cirróticos	6	↑ 579.78 (↑ 328.46 a ↑ 680.14)	p < 0.03	↑ 331.81 (↑ 34.10 a ↑ 621.88)	p < 0.03
		p < 0.34		p < 0.52	

Cuadro 3. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la producción *in-vitro* de IL-6 por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA.

Las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA, aumentaron su producción de IL-6, sin alcanzar ésta significancia estadística (Cuadro 3, Anexo

3a). En las PBMC de pacientes cirróticos, la exposición a LPS y LTA produjo un cambio en la mediana de producción a la alta con ambos estímulos, presentando significancia estadística (Cuadro 3, Anexo 3b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios inducidos por LPS y LTA no fueron significativamente diferentes.

#### 7.3.1.4. Producción de IL-12 por PBMC

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	↑ 633.89 (↓ 22.56 a ↑ 1411.11)	p < 0.05	↑ 132.78 (↑ 17.78 a ↑ 317.78)	p < 0.03
Cirróticos	6	↑ 1195.28 (↑ 316.90 a ↑ 6396.90)	p < 0.03	↑ 144.17 (↓ 26.67 a ↑ 2336.67)	p < 0.05
		p < 0.20		p < 0.63	

Cuadro 4. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la producción *in-vitro* de IL-12 por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA.

Los valores de las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA, produjeron una mediana de cambio en la producción de IL-12, presentando un aumento con ambos estímulos, siendo estadísticamente significativos (Cuadro 4, Anexo 4a). En las PBMC de pacientes cirróticos, la post-exposición a LPS y LTA produjo un cambio similar en la mediana de producción a la alta con ambos estímulos, de igual manera, presentando significancia estadística (Cuadro 4, Anexo 4b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios inducidos tanto por LPS, como por LTA, no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos.

#### 7.3.1.5. Producción de IL-10 por PBMC

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	↑ 269.52 (↑ 105.00 a ↑ 780.95)	p < 0.03	↑ 92.98 (↑ 2.38 a ↑ 142.31)	p < 0.03
Cirróticos	6	↑ 448.57 (↑ 146.19 a ↑ 662.62)	p < 0.03	↑ 28.57 (↓ 24.76 a ↑ 63.33)	p < 0.14
		p < 0.75		p < 0.08	

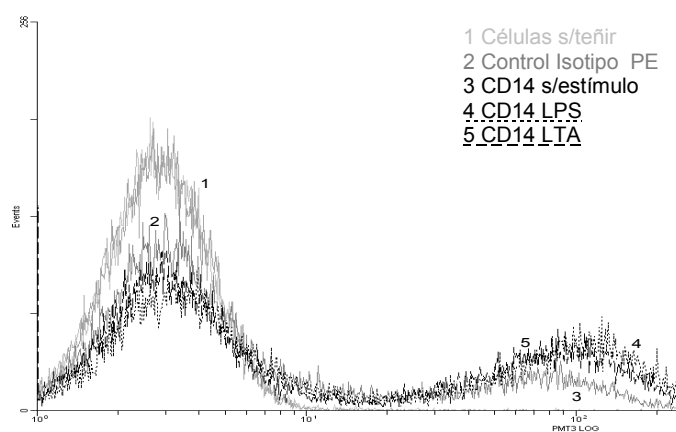
Cuadro 5. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la producción *in-vitro* de IL-10 por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA.

Los valores de las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA produjeron una mediana cambio en la de producción de IL-10, presentando un aumento con ambos estímulos, siendo estadísticamente significativos (Cuadro 5, Anexo 5a). En las PBMC de pacientes cirróticos, la post-exposición a LPS y LTA

produjo un cambio en la mediana de producción a la alta con ambos estímulos, presentando significancia estadística solo con LPS (Cuadro 5, Anexo 5b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios inducidos tanto por LPS, como por LTA, no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos, sin embargo con LTA se observa cierta tendencia a la significancia.

### 7.3.2 Receptores

#### 7.3.2.1 Expresión de CD14 en PBMC



Histograma 4. Expresión *in-vitro* de CD14 en PBMC humanas después del estímulo con LPS o LTA por citometría de flujo.

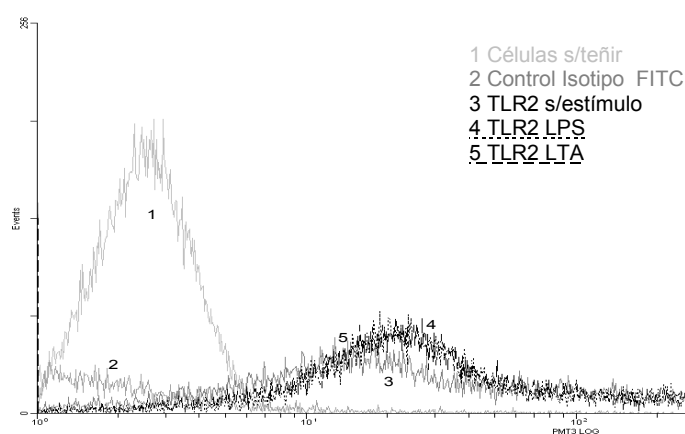
En el histograma 4 se ilustra un análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos anti-CD14 marcado con fluorocromo (PE). Los números 1 y 2 indican los controles negativos, 1 para las células sin teñir y 2 para el control de isotipo (IgG<sub>2a</sub>). Un desplazamiento hacia la derecha indica una expresión positiva, lo cual se observa tanto para las células sin tratamiento, como para las células estimuladas con LPS o LTA.

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	↓ 0.99 (↓ 7.15 a ↑ 0.66)	p < 0.12	↓ 0.82 (↓ 1.87 a ↑ 0.17)	p < 0.05
Cirróticos	6	↓ 0.59 (↓ 5.70 a ↑ 22.16)	p < 0.75	↑ 12.24 (↓ 4.45 a ↑ 21.80)	p < 0.07
		p < 0.52		p < 0.05	

Cuadro 6. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la expresión *in-vitro* de CD14 por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA.

Los valores de las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA produjeron una mediana de cambio en la expresión de CD14, mostrando una disminución con ambos estímulos, presentando significancia estadística solo con LTA (Cuadro 6, Anexo 6a). En las PBMC de pacientes cirróticos, la post-exposición a LPS y LTA produjo un cambio diferencial en la mediana de expresión, una disminución con LPS y un aumento con LTA, ambos estímulos no fueron estadísticamente significativos, sin embargo, LTA tendió a la significancia (Cuadro 6, Anexo 6b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios producidos por LPS no fueron estadísticamente diferentes, sin embargo, los cambios producidos por LTA si lo fueron debido al incremento en la expresión de CD14 que mostraron las PBMC de pacientes cirróticos.

### 7.3.2.2. Expresión de TLR2 en PBMC



Histograma 5. Expresión *in-vitro* de TLR2 en PBMC humanas después del estímulo con LPS o LTA por citometría de flujo.

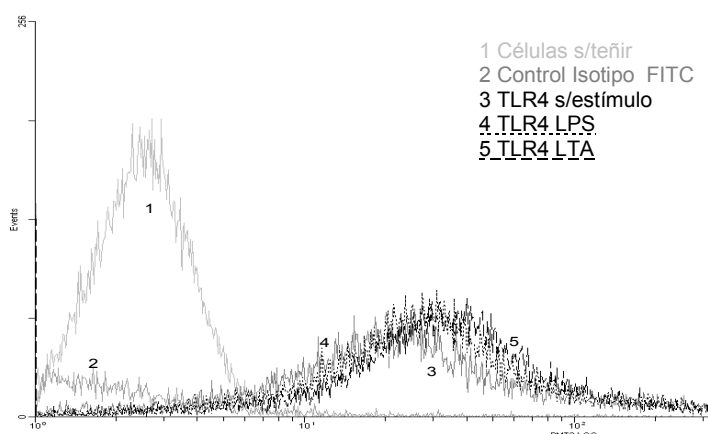
En el histograma 5 se ilustra un análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos anti-TLR2 marcado con fluorocromo (FITC). Los números 1 y 2 indican los controles negativos, 1 para las células sin teñir y 2 para el control de isotipo (IgG<sub>2a</sub>). Un desplazamiento hacia la derecha indica una expresión positiva, lo cual se observa tanto para las células sin tratamiento, como para las células estimuladas con LPS o LTA.

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	↓ 0.18 (↓ 0.33 a ↑ 0.40)	p < 0.60	↑ 0.40 (↓ 0.20 a ↑ 1.35)	p < 0.12
Cirróticos	5	↓ 4.12 (↓ 2.76 a ↓ 11.67)	p < 0.04	↓ 2.65 (↓ 0.55 a ↓ 6.93)	p < 0.04
		p < 0.01		p < 0.01	

Cuadro 7. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la expresión *in-vitro* de TLR2 por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA. n = 5 por exclusión de valor extremo.

Los valores de las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA produjeron una mediana de cambio diferencial en la expresión de TLR2, mostrando una disminución con LPS y un aumento con LTA, sin embargo, no se alcanza significancia estadística en ambos (Cuadro 7, Anexo 7a). En las PBMC de pacientes cirróticos, la post-exposición a LPS y LTA produjo un cambio en la mediana de expresión, observándose una disminución con ambos estímulos, presentando ambos significancia estadística (Cuadro 7, Anexo 7b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios inducidos tanto por LPS, como por LTA, fueron significativamente diferentes, debido a la disminución en la expresión de TLR2 que mostraron las PBMC de pacientes cirróticos.

### 7.3.2.3. Expresión de TLR4 en PBMC



Histograma 6. Expresión *in-vitro* de TLR4 en PBMC humanas después del estímulo con LPS o LTA por citometría de flujo.



En el histograma 6 se ilustra un análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos anti-TLR4 marcado con fluorocromo (FITC). Los números 1 y 2 indican los controles negativos, 1 para las células sin teñir y 2 para el control de isotipo (IgG<sub>2a</sub>). Un desplazamiento hacia la derecha indica una expresión positiva, lo cual se observa tanto para las células sin tratamiento, como para las células estimuladas con LPS o LTA.

Grupo	n	Cambio post-exposición			
		LPS		LTA	
Control	6	↓ 0.48 (↓ 3.97 a ↑ 0.89)	p < 0.34	↓ 0.68 (↓ 1.92 a ↑ 0.05)	p < 0.12
Cirróticos	5	↓ 9.34 (↓ 4.43 a ↓ 16.89)	p < 0.04	↓ 2.02 (↓ 9.16 a ↑ 2.47)	p < 0.34
		p < 0.01		p < 0.58	

Cuadro 8. Cambio (mediana, mínimo y máximo) en la expresión *in-vitro* de TLR4 por PBMC humanas de pacientes control y cirróticos después del tratamiento con LPS y LTA. n = 5 por exclusión de valor extremo.

Los valores de las PBMC de pacientes control, post-exposición a LPS y LTA produjeron una mediana de cambio en la expresión de TLR4, mostrando una disminución con ambos estímulos, sin embargo, no alcanzan significancia estadística (Cuadro 8, Anexo 8a). En las PBMC de pacientes cirróticos, la post-exposición a LPS y LTA produjo un cambio en la mediana de expresión, mostrando una disminución con ambos estímulos, presentando significancia estadística solo con LPS (Cuadro 8, Anexo 8b). Comparando estos cambios entre pacientes control y cirróticos, los cambios inducidos por LPS fueron significativamente diferentes, debido a la disminución en la expresión de TLR4 que mostraron las PBMC de pacientes cirróticos. Por el contrario, los cambios inducidos por LTA, no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos.

## 7.4 Correlaciones

### 7.4.1. *Ex- vivo*

Las correlaciones entre concentraciones plasmáticas de LPS, LBP y Albúmina de pacientes control y pacientes cirróticos, se ponderaron mediante el índice de correlación de Spearman (r) (Cuadro 9).

Mediador	LPS		LBP	
	Control	Paciente	Control	Paciente
LBP	-0.83**	0.08	-	-
Albúmina	0.80	-0.60	-0.40	-0.03

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones plasmáticas de LPS, LBP y Albúmina de pacientes control y pacientes cirróticos. Nivel de Significancia \* $p < 0.10$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

La correlación entre las concentraciones plasmáticas de LBP y LPS de pacientes control, presentó una correlación indirecta significativa ( $p < 0.04$ ) (Cuadro 9).

Las correlaciones entre concentraciones plasmáticas de LPS, LBP y citocinas, y expresión de receptores *ex-vivo* en PBMC de pacientes control y pacientes cirróticos, se ponderaron mediante el índice de correlación de Spearman (Cuadro 10).

Mediador	LPS		LBP	
	Control	Paciente	Control	Paciente
CD14	-0.66	0.48	0.66	-0.08
TLR2	-0.14	-0.70	0.31	-0.50
TLR4	-0.26	-0.70	0.26	-0.54
IL-1 $\beta$	-0.37	-0.68	-0.03	0.07
TNF $\alpha$	0.51	-0.31	-0.68	0.14
IL-6	-0.21	-0.2	0.58	0.71
IL-12	0.43	-0.77*	-0.26	0.03
IL-10	0.14	-0.46	-0.14	0.20

Tabla 10. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones plasmáticas de LPS, LBP y citocinas, y expresión de receptores *ex - vivo*, en PBMC de pacientes control y pacientes cirróticos. Nivel de Significancia \* $p < 0.10$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$ .

La correlación entre concentraciones plasmáticas de IL-12 y LPS en pacientes cirróticos, presentó una correlación indirecta con tendencia a la significancia ( $p < 0.07$ ) (Cuadro 10).

7.4.2. *Ex- vivo vs In- vitro*

Las correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de LPS y LBP, y las concentraciones de citocinas y expresión de receptores *in-vitro*, en PBMC estimuladas con LPS o LTA de pacientes control y pacientes cirróticos, se ponderaron mediante el índice de correlación de Spearman (Cuadro 11).

Mediador	LPS				LBP			
	Control		Paciente		Control		Paciente	
	LPS	LTA	LPS	LTA	LPS	LTA	LPS	LTA
CD14	0.14	0.26	0.26	-0.09	-0.49	-0.37	-0.14	-0.03
TLR2	0.66	0.49	0.30	0.20	-0.2	-0.66	0.80*	0.70
TLR4	-0.66	-0.03	0.70	0.50	0.14	-0.49	0.50	0.60
IL-1 $\beta$	-0.20	0.14	-0.14	0.94***	-0.14	-0.09	0.43	-0.03
TNF $\alpha$	-0.83**	-0.60	0.26	-0.03	0.77*	0.89**	0.49	0.43
IL-6	-0.66	-0.20	-0.60	-0.20	0.71	0.37	0.31	0.26
IL-12	-0.26	-0.54	0.09	0.03	0.14	0.14	0.89**	0.60
IL-10	-0.66	-0.60	0.20	0.20	0.66	0.71	-0.37	-0.37

Tabla 11. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones plasmáticas de LPS y LBP, y las concentraciones de citocinas y expresión de receptores *in-vitro*, en PBMC estimuladas con LPS o LTA de pacientes control y pacientes cirróticos. Niveles de Significancia \*p<0.10, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01.

La correlación entre concentraciones plasmáticas de LPS y concentraciones de IL-1 $\beta$  *in-vitro*, secretadas por PBMC por exposición a LTA en pacientes cirróticos presentó una correlación directa significativa (p<0.005), mientras que en la correlación de concentraciones plasmáticas de LPS y concentraciones de TNF $\alpha$  *in-vitro*, secretadas por PBMC por exposición a LPS en pacientes control, presentó una correlación indirecta significativa (p<0.04) (Cuadro 11).

La correlación entre concentraciones plasmáticas de LBP y expresión de TLR2 *in-vitro*, en PBMC por exposición a LPS en pacientes cirróticos, presentó una correlación directa con tendencia a la significancia (p<0.10) (Cuadro 11).

La correlación de concentraciones plasmáticas de LBP y concentraciones de TNF $\alpha$  *in-vitro*, secretadas por PBMC por exposición a LPS y a LTA en pacientes control, presentó una correlación directa, con tendencia a la significancia (p<0.07)

y significativa ( $p < 0.02$ ), respectivamente. La correlación entre concentraciones plasmáticas de LBP y concentraciones de IL-12 *in-vitro*, secretadas por PBMC por exposición a LPS en pacientes cirróticos, presentó una correlación directa significativa ( $p < 0.02$ ) (Cuadro 11).

## 8. Discusión

### 8.1 LPS

La endotoxemia del paciente cirrótico se ha correlacionado de manera importante con la gravedad del daño hepático (García-Tsao y Wiest, 2004), lo que ha llevado a investigar el valor clínico de esta determinación en pacientes con daño hepático agudo. Los resultados a este respecto han sido controversiales debido a la variación considerable de las concentraciones de endotoxina durante el proceso agudo (Opal y col, 1999), y al intervalo amplio de detección de endotoxina que puede variar de 0 a 93% (Albillos y col, 2003).

En las determinaciones *ex-vivo* de este estudio, los pacientes cirróticos presentaron una mediana de concentración de endotoxina mayor a la de los pacientes control, misma que no alcanzó significancia estadística debido probablemente al tamaño pequeño de muestra (Gráfica 1). Este hallazgo concuerda con lo informado por otros investigadores, quienes encontraron concentraciones de endotoxina plasmática más altas en pacientes cirróticos a comparación de controles sanos (Han, 2002; Paik y col, 2003; Riordan y col, 2003), siendo éstas significativamente mayores en aquellos con daño secundario al consumo excesivo de alcohol (Fukui y col, 1991).

Se ha especulado que las concentraciones circulantes elevadas de endotoxina en pacientes cirróticos pudieran ser insuficientes para estimular los mecanismos específicos de señalización involucrados en la respuesta inflamatoria (Riordan y col, 2003). Esto se ha atribuido a la falta de internalización y co-localización del LPS (Nishiya y DeFranco, 2004). Se ha observado que el LPS alcanza compartimentos intracelulares, internalizándose y co-localizándose con TLR4 en el aparato de Golgi (Bosisio y col, 2002; Hornef y col, 2002; Nishiya y DeFranco, 2004). Este parece ser un evento necesario relacionado directamente con el reconocimiento y activación de varios tipos celulares (Hornef y col, 2002). Sin embargo, el reconocimiento de LPS a través del TLR4 localizado en la superficie

celular de los macrófagos parece no requerir internalización (Hornef y col, 2003). Esto ha llevado a postular que en estados tempranos de infección, el reconocimiento ocurre a nivel de superficie celular, y en estados crónicos o tardíos, el reconocimiento es a nivel intra-celular (Nishiya y DeFranco, 2004). Sin embargo, la controversia persiste, ya que algunos estudios apoyan la estimulación celular mediada por el LPS independiente de su internalización (Hornef y col, 2003).

## 8.2 LBP

El LPS promueve la síntesis de la LBP, ésta se sintetiza constitutivamente en los hepatocitos. Se ha descrito que células epiteliales intestinales y de pulmón pueden representar fuentes adicionales de LBP (Zweigner y col, 2001; Albillos y col, 2004). La LBP inicia el reconocimiento del LPS, formando complejos (agregados) que se unen al receptor CD14 vía dependiente-lípido A, siendo transferido al complejo TLR4-MD2 (Triantafilou y Triantafilou, 2002).

En las determinaciones *ex-vivo* de este estudio, los pacientes cirróticos presentaron una mediana de concentración mayor que los pacientes control, misma que no alcanzó significancia estadística (Gráfica 2). La literatura indica que las concentraciones normales de LBP en humano oscilan entre 5-15µg/mL, elevándose substancialmente durante la respuesta de fase aguda, pudiendo llegar a concentraciones por arriba de los 200µg/mL. Estas concentraciones pueden, sin embargo, variar considerablemente durante el curso del proceso séptico (Hamman y col, 2005). En pacientes con sepsis severa, hasta un 97% puede cursar con concentraciones elevadas de LBP (Opal y col, 1999). En pacientes cirróticos se han observado concentraciones elevadas de LBP plasmática (Albillos y col, 2003). Sin embargo, la concentración plasmática de LBP puede estar disminuida en pacientes con sepsis bacteriana por G (-) (Lazaron y Dunn, 2002).

La LBP reconoce al LPS, acarreándolo para su reconocimiento por CD14 y formando el complejo LBP-LPS-CD14 (Zweigner y col, 2001). A concentraciones

bajas, la LBP activa y amplifica la respuesta inflamatoria del hospedero al LPS. Su participación es crítica en la iniciación de la respuesta inmune (Zweigner y col, 2001). En la fase aguda, su concentración plasmática se incrementa de 5 a 20 veces (Lazaron y Dunn, 2002), promoviendo su capacidad de protección e inhibición de actividad celular inflamatoria secundaria a la exposición al LPS, por la supresión de la formación del complejo LPS-CD14 e inhibición de la translocación nuclear del NFκB, favoreciendo el aclaramiento del LPS vía sistémica y celular, en monocitos humanos (Zweigner y col, 2001; Albillos y col, 2004; Hamman y col, 2005). Al existir una elevación en la concentración de la LBP, su interacción con el LPS aumenta, incrementándose la densidad de opsonización que limita el reconocimiento del LPS por CD14 (Hamman y col, 2005). Cabe aclarar, que la composición plasmática de fase aguda es compleja, y no se pueden excluir factores que pudiesen ser responsables de efectos moduladores del LPS (Zweigner y col, 2001).

En cuanto a la relación entre concentraciones plasmáticas de la LBP y el LPS, cuando ambas están elevadas, puede haber una relación directa (Albillos y col, 2003). Este hallazgo, sin embargo, no ha sido consistente, ya que concentraciones plasmáticas de LBP elevadas pueden no coincidir con una elevación plasmática del LPS (Albillos y col, 2004), y viceversa (Lazaron y Dunn, 2002). Más aún, las concentraciones de ambas pueden no correlacionar en absoluto (Opal y col, 1999). Los resultados aquí obtenidos muestran una correlación inversa significativa entre el LPS y la LBP, pero sólo en el grupo de pacientes control ( $r = -0.83$ ,  $p < 0.04$ ) (Cuadro 9, Gráfica 11).

Se ha postulado que pacientes con progreso rápido al choque séptico no sintetizan adecuadamente LBP y no son capaces de tener una respuesta de fase aguda adecuada (secundaria a disfunción hepática pre-existente), por lo que presentan infecciones sistémicas exacerbadas (Opal y col, 1999). Se ha observado una regulación positiva de la LBP en sepsis severa de bacterias G (+) y G (-) (Zweigner y col, 2001), por lo que se ha propuesto una relación directa, del pronóstico de daño, con concentraciones plasmáticas elevadas de LBP (Opal y

col, 1999). De aquí que las concentraciones altas de la LBP, pudieran ser un marcador para el diagnóstico de sepsis, sea ésta causada por bacterias G (+), G (-), u hongos (Opal y col, 1999). Sin embargo, otros estudios indican que la LBP no es un buen indicador pronóstico para la mortalidad secundaria a sepsis severa (Zweigner y col, 2001). Los resultados aquí obtenidos muestran concentraciones mayores de LBP en pacientes cirróticos en comparación a pacientes control, un tamaño de muestra mayor podría dilucidar y apoyar el papel de esta proteína como marcador diagnóstico.

La función de la LBP no se restringe al reconocimiento de, e interacción con otras estructuras, como lipoproteínas, lipopéptidos o LTA. La LBP es capaz de unirse a ligandos bacterianos y transferirlos del receptor celular a otros compartimentos del hospedero, fungiendo como mecanismo de detoxificación (Schröder y col, 2004). De hecho, se ha propuesto un papel sinérgico de la LBP y otras lipoproteínas para inhibir la actividad del LPS (Zweigner y col, 2001), neutralizándolo y eliminándolo de vías sistémicas, mostrando un efecto protector durante el proceso de sepsis (Zweigner y col, 2001; Hamman y col, 2005).

Se ha observado que la LBP puede modular la secreción monocítica de citocinas pro-inflamatorias (Zweigner y col, 2001). Estudios recientes indican que la LBP puede mediar la inducción de citocinas producida por componentes de bacterias G (+), tales como, LTA y peptidoglicanos (Schröder y col, 2004). Incluso, se ha sugerido la formación de un complejo estable LBP-LTA (Schröder y col, 2003). Así, además de presentar concentraciones plasmáticas elevadas, la LBP correlaciona con el  $TNF\alpha$  y la IL-6 en pacientes cirróticos con ascitis (Albillos y col, 2003). Con base a lo anterior se ha sugerido que concentraciones plasmáticas elevadas de la LBP pueden proteger al hospedero de complicaciones sistémicas inducidas por bacterias G(-) y G(+) mediadas por citocinas durante sepsis (Schröder y col, 2003).

La respuesta del hospedero a endotoxina es dependiente de características fisicoquímicas de la molécula de endotoxina, de concentraciones relativas de LBP



y del nivel de respuesta celular a endotoxina (Opal y col, 1999). Esta respuesta a LPS es diferencial entre individuos y parece contribuir a la susceptibilidad individual de enfermedad (Miller y col, 2005).

Recientemente se ha demostrado una relación importante entre LPS y albúmina. La albúmina se considera un co-factor importante en la formación y liberación de complejos bioactivos de endotoxina (LPS-LBP) de células respondedoras a LPS (Gioannini y col, 2002). Por medio de la estabilización de intermediarios lábiles formados, la albúmina permite una transferencia de monómeros de endotoxina a blancos específicos del hospedero (Gioannini y col, 2002). En ausencia de albúmina, tal complejo sería inestable y de vida corta (Gioannini y col, 2002; Weiss, 2003). Se ha publicado, que pacientes cirróticos pueden presentar concentraciones séricas elevadas de albúmina (Albillos y col, 2003). Por otra parte, concentraciones séricas bajas de albúmina son consideradas un predictor independiente del desarrollo de infecciones bacterianas en cirrosis (García-Tsao y Wiest, 2004). En los resultados obtenidos en este estudio, no se encontró correlación entre concentraciones plasmáticas de albúmina y valores LPS y LBP (Cuadro 9).

### 8.3 Citocinas

En las determinaciones *ex-vivo*, las concentraciones plasmáticas de citocinas pro-inflamatorias en pacientes cirróticos, presentó un aumento. Así, el  $TNF\alpha$ , la IL-6 e IL-12 (Gráfica 4 a 6) aumentaron, mientras que la IL-10 disminuyó. Las concentraciones de IL-1 $\beta$  fueron menores al nivel de detección aceptable en ambos grupos de estudio (Gráfica 3). Estas respuestas diferenciales no alcanzaron significancia estadística, pero son consistentes con las informadas por otros investigadores (Riordan y col, 2003).

En los experimentos *in-vitro*, se observó un aumento tanto en el grupo de pacientes control, como en cirróticos, con ambos estímulos. De manera global, la exposición de PBMC al LPS disparó una producción de citocinas más “vigorosa”,

que la exposición a LTA (Cuadros 1 a 5, Anexos 1 a 5). Este patrón se observó en ambos grupos y es consistente con los resultados de otro estudio, donde esta respuesta diferencial se atribuyó a un estímulo celular independiente de CD14. (Schröder y col, 2003).

En estudios previos, PBMC pre-sensibilizadas por exposición a un antígeno como endotoxina, pueden exhibir una disminución marcada en la capacidad *in-vitro* para la producción de mediadores de inflamación, cuando subsecuentemente se estimulan con el mismo antígeno, fenómeno referido como tolerancia (Riordan y col, 2003). La tolerancia se ha caracterizado en ciertos estudios por la supresión de producción de ciertos mediadores de inflamación, y no inhibición de expresión de otros mediadores (Medvedev y col, 2000).

La inducción de tolerancia a endotoxina no es específica por un reconocimiento inicial del LPS por el TLR4, ya que el reconocimiento de esta molécula por miembros de la familia de TLR/IL-1R diferentes a TLR4, han mostrado un desarrollo de tolerancia a retos subsecuentes con endotoxina. La capacidad de un estímulo, de no compartir homología estructural con una molécula, induce una respuesta referida como, “tolerancia cruzada” (Dobrovolskaia y col, 2003). Por otro lado, se ha reportado que el pre-tratamiento de macrófagos peritoneales murinos con IL-1 $\beta$  resulta en la inhibición de transactivación de NF $\kappa$ B y AP-1 en respuesta al LPS (Medvedev y col, 2000), así como la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  inducida por LPS en macrófagos pre-tratados con LTA (Lehner y col, 2001).

El LPS posee la capacidad de inducir la producción de mediadores de inflamación por ciertos tipos celulares. Se ha informado que PBMC de pacientes cirróticos, pre-sensibilizadas por exposición a antígenos de bacterias G (+), aumentan la producción de TNF $\alpha$ . (Riordan y col, 2003). El LTA en particular, induce en los macrófagos humanos una liberación marcada de citocinas pro-inflamatorias, como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, y otros mediadores celulares (Schwandner y col, 1999; Schröder y col, 2003). Tanto el LPS, como el LTA, pueden inducir la producción de IL-12

por macrófagos y otras células del sistema inmune (Mukhopadhyay y col, 2004). Esta producción aumentada de citocinas inflamatorias no se ha observado, sin embargo, en macrófagos peritoneales de ratón, se ha mostrado una producción disminuida de IL-6 e IL-12 posterior a la exposición a LPS (Nomura y col, 2000).

En cuanto a la IL-1 $\beta$ , sólo ésta presentó una respuesta diferencial *in-vitro* entre grupos con el estímulo de LTA. Pacientes control disminuyeron su producción, mientras que pacientes cirróticos la aumentaron ( $p < 0.037$ ). El LPS e IL-1 $\beta$  son capaces de inducir *in-vitro* un estado de tolerancia cruzada en macrófagos, indicando que la tolerancia a endotoxina involucra la vía de señalización de IL-1 (Medvedev y col, 2000). Se sugiere a IL-1 como mediador de tolerancia *in-vivo*, así como inductor de tolerancia cruzada *in-vitro*. En el estudio presente, el papel dual de la IL-1 podría explicar la respuesta diferencial *in-vitro* bajo el estímulo de LTA entre grupos.

En cuadros de sepsis severa, la IL-10 posee un efecto anti-inflamatorio en células mononucleares (Zweigner y col, 2001). Se ha postulado que citocinas anti-inflamatorias, producidas por macrófagos tolerantes a endotoxina, contribuyen indirectamente al estado de tolerancia (Medvedev y col, 2000). Esto podría explicar la producción disminuida de IL-10 observada *ex-vivo* en los pacientes cirróticos de este estudio.

## 8.4 Receptores

### 8.4.1 CD14

El CD14 es un receptor de reconocimiento patrón. Reconoce una variedad amplia de ligandos bacterianos (Schröder y col, 2004). Componentes de bacterias G (+), como los peptidoglicanos y el LTA, emplean este receptor para la activación de macrófagos (Yoshimura y col, 1999). Su identificación ha contribuido en forma importante al entendimiento de las vías de señalización, particularmente la que involucra al LPS (Lazaron y Dunn, 2002). En este estudio, se observó una

expresión *ex-vivo* mayor de CD14 en pacientes cirróticos ( $p < 0.02$ ) (gráfica 8), misma que podría explicarse por la exposición crónica a microorganismos intestinales y sus productos. Se sabe que el daño hepático crónico se acompaña, con frecuencia, de sobre-crecimiento bacteriano intestinal, permeabilidad intestinal alterada y translocación bacteriana que contribuyen a la presencia de endotoxemia crónica la cual, a su vez, afecta la expresión de CD14 en PBMC (Albillos y col, 2003). Durante este tipo de situaciones clínicas severas, se ha sugerido que concentraciones circulantes de CD14 pueden reflejar la cantidad de endotoxina y su activación celular (Albillos y col, 2003), así como una relación entre concentraciones elevadas de CD14 y alteraciones de la vía de reconocimiento por TLRs, en pacientes con daño hepático, (Dolganiuc y col, 2006).

En los experimentos *in-vitro*, la exposición de las PBMC de pacientes control al LPS y LTA induce una expresión disminuida de CD14, misma que alcanza significancia estadística con LTA ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 6, Anexo 6a). En pacientes cirróticos, por el contrario, el cambio de expresión fue diferencial, disminución con LPS y aumento con LTA, sin alcanzar significancia estadística (Cuadro 6, Anexo 6b). Se ha observado que macrófagos peritoneales de ratón expuestos a LPS muestran expresión disminuida de CD14 (Nomura y col, 2000), por otro lado, promonocitos expuestos a LTA se activan vía CD14-dependiente (Cleveland y col, 1996). A esto, algunos componentes de bacterias G (+) que son reconocidos por TLR2 también son ligandos de CD14 (Yoshimura y col, 1999).

#### 8.4.2 TLR2 y TLR4

La activación de TLR3 en el sistema portal y parénquima hepático apoya la participación de estos receptores en la patofisiología de la enfermedad hepática crónica (Takii y col, 2005). Esta participación parece ser, sin embargo, selectiva, ya que la expresión de TLR4 en PBMC de pacientes cirróticos no se ha visto sea diferente a la de controles (Riordan y col, 2003). En el estudio presente se

observó expresión mayor *ex-vivo*, aunque no estadísticamente significativa, de TLR2 y TLR4 en pacientes cirróticos (Gráficas 9 y 10).

Estudios en macrófagos de ratón señalan al TLR4 como receptor dominante y esencial en la respuesta inmune innata inducida por un primer contacto con bacterias G (-), y al TLR2 como receptor auxiliar e indispensable en la respuesta inmune contra bacterias, no solo durante el contacto inicial, sino también en contactos subsecuentes (Matsuguchi y col, 2000).

El reconocimiento del LPS es altamente dependiente de la especie de microorganismo del que se deriva. De aquí que el LPS de ciertas especies puede activar TLRs diferentes al TLR4 (Jefferies y O'Neill, 2002). Así, se ha descrito el reconocimiento de ciertos tipos de LPS por el TLR2 mas no por el TLR4 (Matsuguchi y col, 2000; Medvedev y col, 2000).

El TLR2 posee la capacidad de reconocer un repertorio amplio de moléculas (Takeda y Akira, 2005; Dolganiuc y col, 2006). La literatura indica que éstas son, principalmente, productos de bacterias G (+), como LTA (Schröder y col, 2003). Respecto a este último, se ha informado que también puede ser reconocido por el TLR4 (Jefferies y O'Neill, 2002). Esto ha llevado a proponer que ambos TLR2 y TLR4 son requeridos para reconocer al LTA (Dobrovolskaia y col, 2003).

La capacidad del TLR2 de formar dímeros puede contribuir a una diversidad de respuestas del sistema inmune innato (Yoshimura y col, 1999; Kaisho y Akira, 2002), así como una respuesta "cooperadora" debida a la asociación de homo- y heterodímeros de TLRs (Matsuguchi y col, 2000). Esto, aunado a los factores endógenos, proteínas de choque térmico y matriz extracelular involucrados en la respuesta mediada por TLR4 (Wang y col, 2005), podría llevar a la activación de vías diferentes de señalización, permitiendo ampliar o diversificar la respuesta a patógenos (Ozinsky y col, 2000).

En los experimentos *in-vitro* de este estudio, la exposición a LPS de PBMC de pacientes control derivó en una expresión disminuida tanto del TLR2 como del

TLR4. La exposición a LTA de estas mismas células ocasionó disminución en la expresión de TLR4 únicamente. Ninguno de estos cambios alcanzó significancia estadística (Cuadro 7 y 8, Anexo 7a y 8a). En PBMC de pacientes cirróticos, se observó un cambio significativo a la baja en la expresión del TLR2 y TLR4 después de la exposición a ambos estímulos, LPS y LTA. El único cambio que no alcanzó significancia estadística fue el del TLR4 posterior a la exposición a LTA (Cuadro 7 y 8, Anexo 7b y 8b). Estos hallazgos sugieren que el LPS, al ser reconocido por ambos TLR2 y TLR4, pudiendo derivar en una “activación aditiva” de las cascadas inflamatorias subsecuentes. *In-vivo*, se ha observado que la exposición de pacientes cirróticos a antígenos de bacterias G (+) incrementa en forma significativa la expresión de TLR2 por PBMC (Riordan y col, 2003), sin embargo, una exposición de estas células a antígenos de bacterias G (+) *in-vitro*, disminuye en forma significativa la expresión del TLR2 (Riordan y col, 2003). El incremento *In-vivo*, que contrasta con el descenso observado en el estudio presente, pudiera deberse a una respuesta inmune diferente en nuestros pacientes determinada, en parte, por la etiología de la cirrosis y los niveles de endotoxemia. A este respecto, en el estudio de Riordan, 47% de los pacientes tenía hepatitis viral, mientras que en nuestro estudio ninguno la tenía. Se ha observado que los monocitos de pacientes con hepatitis por virus C presentan una expresión mayor de TLR2, mientras que el TLR4 no muestra cambios (Dolganiuc y col, 2006). La exposición a LPS puede también disminuir la expresión de TLR4 por monocitos/macrófagos humanos (Nomura y col, 2000). En lo que concierne a los niveles de endotoxina, los pacientes de Riordan mostraron niveles de endotoxina significativamente más altos que los controles. Los niveles de endotoxina de los pacientes cirróticos evaluados en este estudio, si bien fueron más altos que los controles, no fueron significativamente diferentes. Niveles mayores de endotoxinas circulantes parecen asociarse a una expresión mayor de TLR2 y a una expresión sin cambios o menor de TLR4 (Riordan y col, 2003; Manigold y col, 2003).

La regulación a la baja de TLR4 se ha atribuido a una sensibilidad disminuida al LPS, resultante de una exposición crónica a este compuesto (Hornef y col, 2002).

Se ha postulado también que esto es debido a un estado de “saturación” por la presencia de concentraciones crónicamente elevadas de endotoxina en pacientes cirróticos (Riordan y col, 2003).

En monocitos cultivados, la expresión de TLR2 y 4 disminuye a las 2 horas de cultivo, aumentando significativamente a las 8 horas después de la estimulación con LPS, y regresando a los valores basales a las 24 horas (Marsik y col, 2003), interpretándose como un mecanismo de tolerancia a LPS, dado por una disminución en la expresión del TLR4 superficial de monocitos/macrófagos expuestos a LPS (Wang y col, 2005). Esta tolerancia puede también ser cruzada, ya que células que expresan ambos TLR2 y TLR4, reconocen inicialmente al LPS vía TLR4, y reducen este reconocimiento en estímulos subsecuentes vía TLR2 y viceversa (Iredale, 2003).

La tolerancia al LPS no se atribuye únicamente a una supresión en la expresión del TLR4 superficial (Hornef y col, 2002). *In-vitro*, la exposición de macrófagos a LPS puede inducir patrones diferentes de respuesta celular, mediados por agonistas del TLR2 y 4 (Jones y col, 2001). De aquí que la tolerancia a endotoxina puede acompañarse de un incremento en la expresión de CD14 (Medvedev y col, 2000).

La sobre-producción de citocinas inflamatorias indica que la tolerancia a LPS es inducida por mecanismos alternos, tales como el transporte intracelular modificado en macrófagos colerizados a LPS (Nomura y col, 2000), modulación selectiva o represión de componentes de la cascada de señalización, y desensibilización-cruzada de respuestas a productos bacterianos diferentes (Hume y col, 2001) Estos mecanismos indican que el fenómeno de tolerancia no inhibe totalmente las funciones celulares, sino que representa una “reprogramación celular” o adaptación a la presencia de bacterias (Medvedev y col, 2000). Se ha sugerido, asimismo, un estado de activación continua y sostenida, en la cual, otros agonistas puedan amplificar la respuesta. En este estado, se genera una transición que impide cualquier reactivación previa al decaimiento total. Bajo estas circunstancias, la respuesta al estímulo bacteriano

posee una vida media intrínseca o requeriría de una estimulación continua (Hume y col, 2001).

La información referida hasta el momento se orienta hacia estudios realizados a nivel circulatorio, sangre periférica, sin embargo se ha relacionado la participación de los TLRs y la tolerancia como procesos de protección y regulación a nivel epitelial contra alteraciones en la microflora intestinal (Hornef y col, 2003; Rakoff y col, 2004). A nivel hepático, una disfunción de barrera de mucosa severa (García-Tsao y Wiest, 2004) considera la participación de los TLRs en la progresión de enfermedad crónica hepática (Takii y col, 2005).

Los resultados obtenidos en este estudio no muestran un patrón de correlación consistente entre las concentraciones del LPS y/o la LBP con respecto a concentraciones de citocinas y expresión de receptores *in-vitro*. Estudios previos no muestran una correlación significativa entre endotoxina circulante y concentraciones de citocinas, por lo que se ha sugerido la posibilidad de otro tipo de estímulos (Riordan y col, 2003), sin embargo, otros estudios si han demostrado una correlación significativa entre la expresión del TLR2 y concentraciones de LPS y CD14s, no así con TLR4 (Manigold y col, 2003).

Se requieren estudios orientados que diluciden la dinámica de las síntesis de la LBP y otros componentes de la respuesta de fase aguda de proteínas hepáticas a sepsis (Opal y col, 1999). El estudio experimental de mecanismos moleculares involucrados en el fenómeno de tolerancia como, por ejemplo, la alteración de componentes de señalización que llevan a la translocación de NF $\kappa$ B y moléculas adaptadoras (IRAK-1, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , MD2) en macrófagos tolerantes a LPS (Dobrovolskaia y col, 2003, Nomura y col, 2000), permitirá un entendimiento mejor de la respuesta del hospedero, así como de su regulación (Zweigner y col, 2001).



## 9. Conclusión

La secreción de citocinas inflamatorias por las PBMC de pacientes cirróticos y control aumenta después de la exposición a LPS o LTA, siendo este aumento mayor con LPS. La exposición con LPS disminuye la expresión de TLR2 y TLR4 en ambos grupos, mientras que la exposición a LTA aumenta solo la expresión de TLR2 en pacientes control. Las concentraciones plasmáticas del LPS y la LBP tienden a ser mayores en pacientes cirróticos, correlacionando significativa- e inversamente en pacientes control solamente.

La activación de más de una vía de señalización de los TLRs, podría explicar el gran aumento de la secreción de citocinas inducido por LPS. Los cambios observados podrían traducirse como una posible presencia del fenómeno de tolerancia. El impacto de estos hallazgos en la glándula hepática dará un entendimiento mejor de la participación de bacterias y sus productos en el daño hepático. Es necesario incrementar el tamaño de muestra para validar algunas de las tendencias observadas que no alcanzaron significancia estadística.

## 10. Bibliografía

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-787.
- Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003; 37:208-217.
- Albillos A, de la Hera A, Alvarez M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004; 363:1608-1610.
- Andreakos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol Rev* 2004; 202:250-265.
- Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptative immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:380-383.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:209-218.
- Bienvenu JAD, Monneret G, Gutowski MCI, Fabien N. Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology* 1998; 129:55-61.
- Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- $\gamma$ : a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 2002; 99:3427-3431.
- Chaby R. Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. *Drug Discov Today* 1999; 4:209-221.
- Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic Acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun* 1996; 64:1906-1912.
- Cross ML, Stevenson LM, Gill HS. Anti-allergy properties of fermented food: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol* 2001; 1:891-901.
- Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999; 76:159-184.

- Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN. Induction of in vitro reprogramming by toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF- $\kappa$ B signaling pathway components. *J Immunol* 2003; 170:508-519.
- Dolganiuc A, Garcia C, Kodys K, Szabo G. Distinct toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1198-1204.
- Faure E, Thomas L, Xu H. Bacterial lipopolysaccharide and IFN $\gamma$  induce toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol* 2001; 166:2018-2024.
- Fukui H, Brauner B, Bode JC, Bode C. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol* 1991; 12:162-169.
- García-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18:353-372.
- Gioannini TL, Zhang D, Teghanemt A, Weiss JP. An essential role for albumin in the interaction of endotoxin with lipopolysaccharide-binding protein and sCD14 and resultant cell activation. *J Biol Chem* 2002; 277:47818-47825.
- Hamman L, Alexander C, Stamme C, Zähringer U, Schumann RR. Acute-phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes via different mechanisms. *Infect Immun* 2005; 73:193-200.
- Han De-Wu. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8:961-965.
- Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2002; 195:559-570.
- Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2003; 198:1225-1235.

- Hume DA, Undehill DM, Sweet MJ, Ozinsky AO, Liew FY, Aderem A. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol* 2001; 2:11.
- Iredale JP. Regulating hepatic inflammation: pathogen-associated molecular patterns take their toll. *Hepatology* 2003; 37:979-982.
- Jefferies C, O'Neill LAJ. Signal transduction pathway activated by toll-like receptors. *Mod Asp Immunobiol* 2002; 2:169-175.
- Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:iii6-iii12.
- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1589:1-13.
- Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991; 13:267-276.
- Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995; 22:226-229.
- Lazon V, Dunn DL. Molecular Biology of Endotoxin Antagonism. *World J Surg* 2002; 26:790-798.
- Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001; 166:5161-5167.
- Le Moine O, Marchant A, De Groote D, Azar C, Goldman M, Deviere J. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22:1436-1439.
- Manigold T, Boecker U, Hanck Ch, Gundt J, Traber P, Antoni Ch, Rossol S. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:275-282.

- Marsik C, Mayr F, Cardona F, Derhaschnig U, Wagner OF, Jilma B. Endotoxaemia modulates toll-like on leucocytes in humans. *B J Haematol* 2003; 121:653-656.
- Marteau P, Seksik P. Tolerance of probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38:S67-S69.
- Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, Yoshikai Y. Gene expressions of toll-like receptor 2, but not toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 2000; 165:5767-5772.
- McClain C, Hill D, Schmidt J, Diehl AM. Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993; 13:170-182.
- Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000; 164:5564-5574.
- Miettinen M, Lehtonen A, Julkunen I. Lactobacilli and streptococci activate NF- $\kappa$ B and STAT signaling pathways in human macrophages. *J Immunol* 2000; 164:3733-3740.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:36-46.
- Miura K, Fukumoto S, Dirgahayu P, Hirai K. Excretory/secretory products from plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei* suppress gene expressions and production of tumor necrosis factor-alpha in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or lipoteicoic acid. *Int J Parasitol* 2001; 31:39-47.
- Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. The potential for toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* 2004; 112:521-530.
- Neuman MG. Mechanisms of alcoholic liver disease: cytokines. *Clin Biochem* 2001; 34:163-166.
- Nishiya T, DeFranco AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the toll-like receptors. *J Biol Chem* 2004; 279:19008-19017.

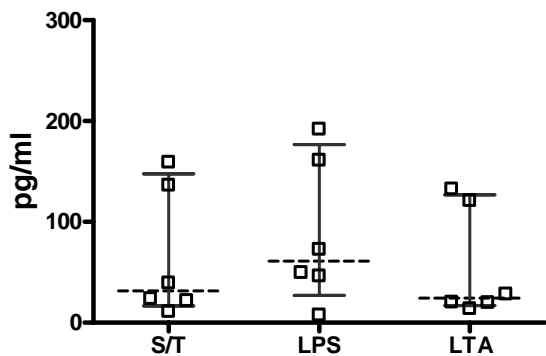
- Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164:3476-3479.
- Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180:1584-1589.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:13766-13771.
- Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cell. *Hepatology* 2003; 37:1043-1055.
- Pennington HL, Hall PM, Wilce PA, Woraall S. Ethanol feeding enhances inflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-induced hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 305-313.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118:229-241.
- Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992; 267:54-61.
- Riordan SM, Skinner N, Nagree A, McCallum H, McIver CJ, Kurtovic J, Hamilton JA, Bengmark S, Williams R, Visvanathan K. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37:1154-1164.
- Robbins. Patología Estructural y Funcional. Edit. Interamericana McGraw-Hill, 5ª edición. Madrid, 1996. pp. 431-432.
- Rodriguez-Rodriguez E, González-Reimers E. Cytokine levels in acute alcoholic hepatitis: a sequential study. *Drug Alcohol Depend* 1995; 39:23-27.
- Salminen S, Wright A, Morelli L. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int J Food Microbiol* 1998; 44:93-106.

- Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; 278:15587-15594.
- Schröder NWJ, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, Hamann L, Göbel UB, Schumann RR. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol* 2004; 173:2683-2691.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274:17406-17409.
- Song C, Lin A. Cytokines in detoxified patients with chronic alcoholism without liver disease: increased monocytic cytokine production. *Soc Biol Psychiatry* 1999; 45:1212-1216.
- Stevens DL. Toll receptors, CD14, MD-2 and NOD2: their role in health and acute and chronic infections diseases. *Curr Infect Dis* 2002; 15:219-220.
- Szabo G, Romics L, Kodys K. Distinct roles for toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in liver sensitization and injury. *Hepatology* 2003; 38:250A.
- Taïeb J, Chollet-Martin S. The role of interleukin-10 in severe acute alcoholic hepatitis. *Clin Biochem* 2001; 34:237-238.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14.
- Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Shimizu-Yoshida Y, Nakao R, Kusumoto K, Nagaoka S, Yano K, Abiru S, Ueki T, Matsumoto T, Daikoku M, Taniguchi K, Fujioka H, Migita K, Yatsunami H, Nakashima M, Harada M, Ishibashi H. Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 2005; 85:908-920.
- Torre A, Vargas F, Barbero V, Milke P, Rosas R, Tuz F, Muñoz R, Gutiérrez G, López N. Decrease in systemic cytokine secretion after *Lactobacillus casei* administration to cirrhotic patients. *Gastroenterology* 2002; 123: T829.

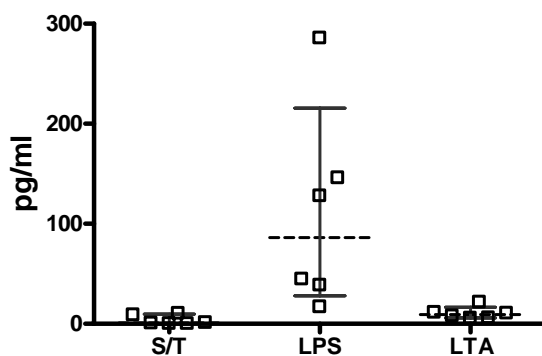
- Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002; 23:301-304.
- Urbaschek R, McCuskey RS, Rudi V, Becker KP. Endotoxin, endotoxin-neutralizing-capacity, sCD14, sICAM-1, and cytokines in patients with various degrees of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:261-268.
- [URL:http://www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx). INEGI/Secretaría de Salud. Principales causas de mortalidad nacional, 2003.
- Wang AP, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Yatsunami H, Ishibashi H. Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2005; 25:85-91.
- Weiss J. Bactericidal / permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:785-790.
- Yao XX, Jiang SL, Yao DM. Current research of hepatic cirrhosis in China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 617-622.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of gram positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; 163:1-5.
- Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* 2001; 98:3800-3808.



Anexos 1a-1b

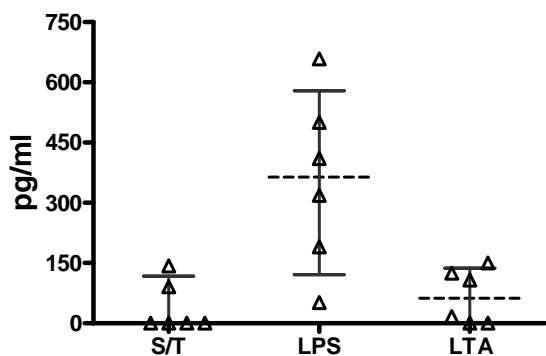


Producción *in-vitro* de IL-1 $\beta$  por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

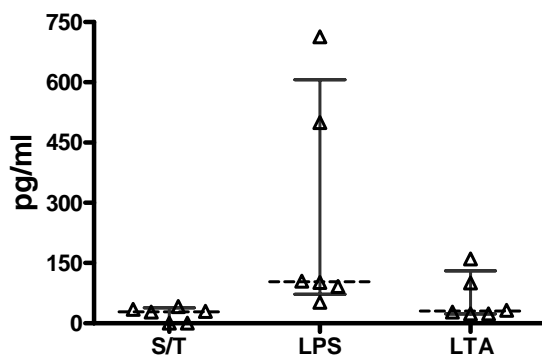


Producción *in-vitro* de IL-1 $\beta$  por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

Anexos 2a-2b

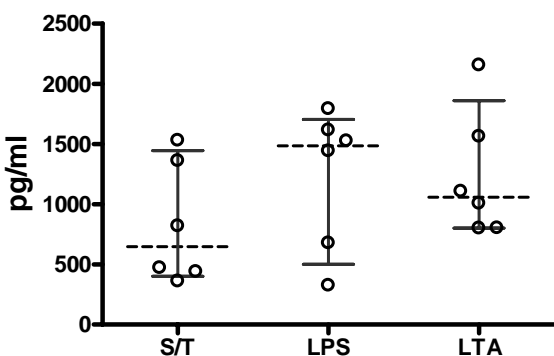


Producción *in-vitro* de TNF $\alpha$  por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, tratamiento).

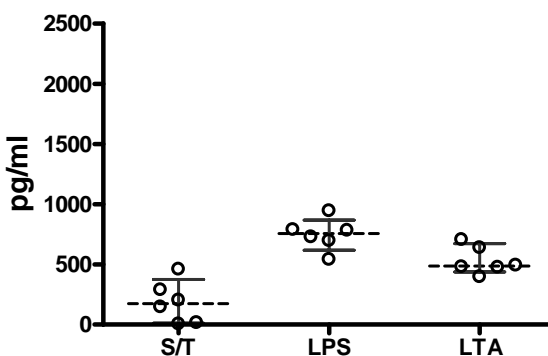


Producción *in-vitro* de TNF $\alpha$  por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

Anexos 3a y 3b

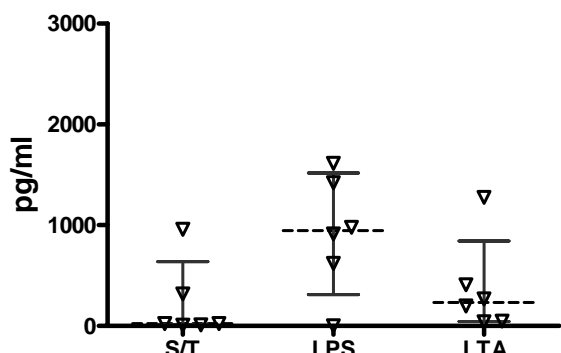


Producción *in-vitro* de IL-6 por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

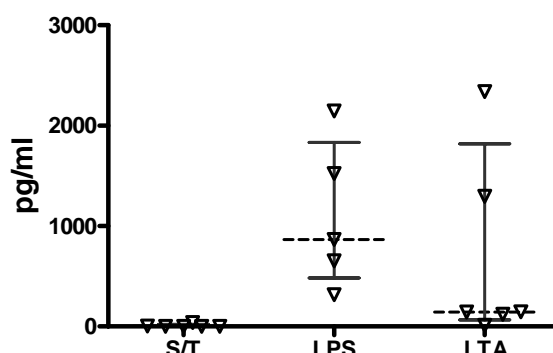


Producción *in-vitro* de IL-6 por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

Anexos 4a y 4b

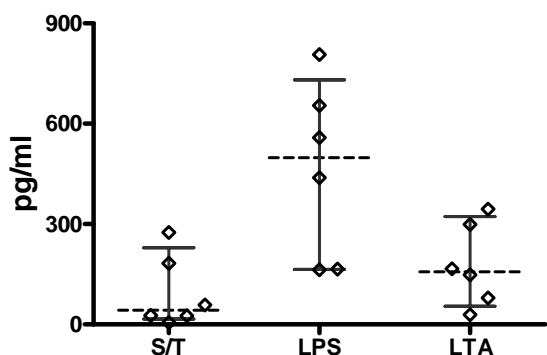


Producción *in-vitro* de IL-12 por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

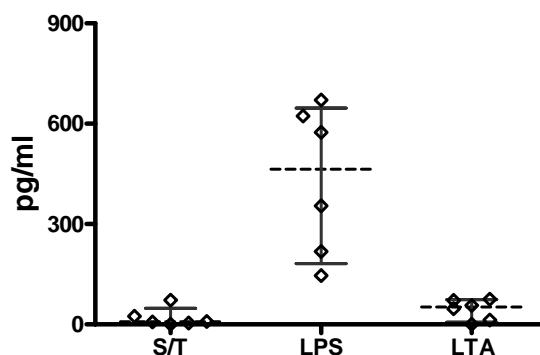


Producción *in-vitro* de IL-12 por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

Anexos 5a y 5b

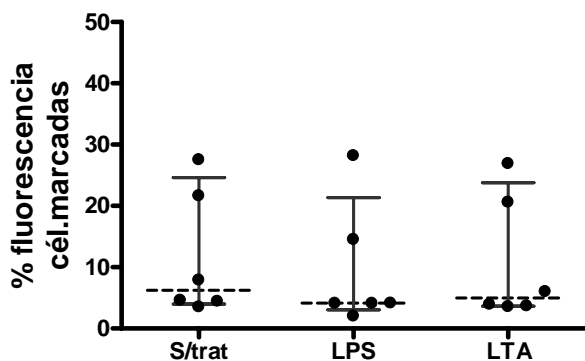


Producción *in-vitro* de IL-10 por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

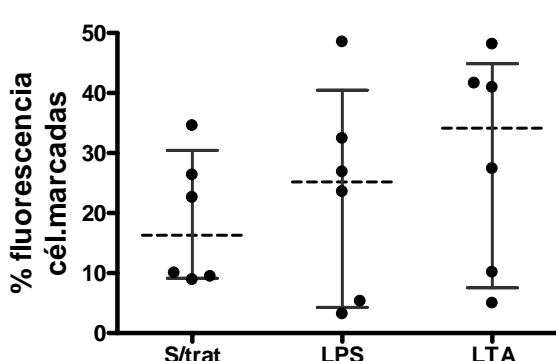


Producción *in-vitro* de IL-12 por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

Anexos 6a y 6b

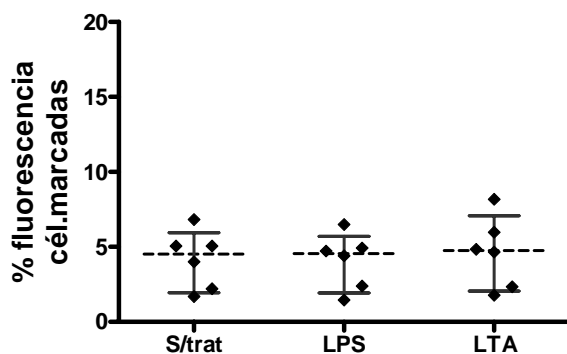


Expresión *in-vitro* de CD14 por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

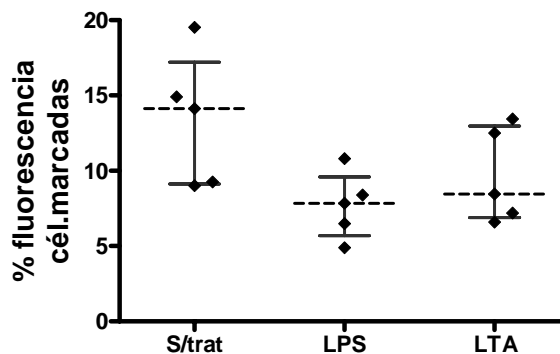


Expresión *in-vitro* de CD14 por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

## Anexos 7a y 7b

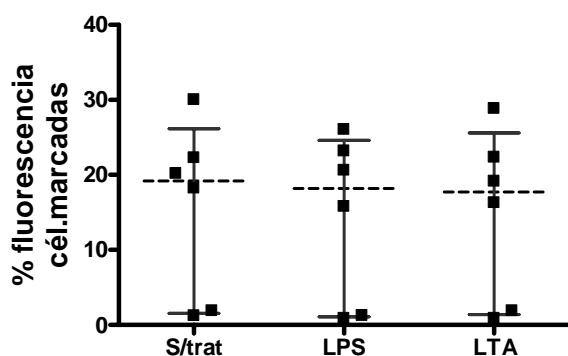


Expresión *in-vitro* de TLR2 por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).

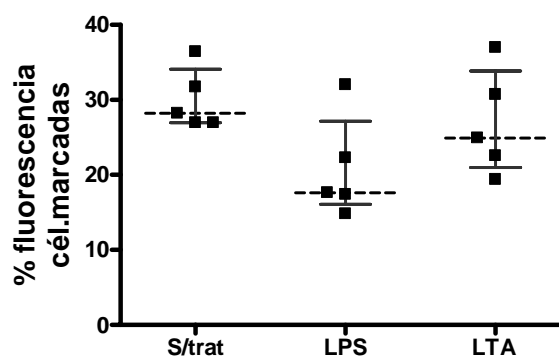


Expresión *in-vitro* de TLR2 por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento) (n = 5, por exclusión de valor extremo).

## Anexos 8a y 8b



Expresión *in-vitro* de TLR4 por PBMC humanas de pacientes control después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento).



Expresión *in-vitro* de TLR4 por PBMC humanas de pacientes cirróticos después del tratamiento con LPS o LTA (S/T, sin tratamiento) (n = 5, por exclusión de valor extremo).