
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

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

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

VARENKA JULIETA BARBERO BECERRA

CO-DIRECCIÓN

DRA. FLORENCIA VARGAS VORÁCKOVA

DRA. MA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ

ASESORÍA

DRA. MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

MÉXICO D. F., 2 DICIEMBRE 2010

COMITÉ TUTORIAL

Co-directora

Dra. Florencia Vargas-Vorácková
Departamento de Gastroenterología
INCMNSZ
florvar@quetzal.innsz.mx

Co-directora

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM-Iztapalapa
mcgr@xanum.uam.mx

Asesora

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

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas
Hospital Infantil de México Federico Gómez
cmaldobe@yahoo.com

Este trabajo fue realizado en el departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría CMN, Siglo XXI, IMSS, y en el Departamento de Medicina Experimental, en el Hospital General de México.

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa está consolidado dentro del Programa Nacional de Posgrados de Calidad, Padrón PNPC 2010, CONACYT

El Doctorado en Biología Experimental fue apoyada por la beca-crédito otorgada durante el periodo 2006-2009 por parte de CONACYT con el No. de registro **185582**

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Respuesta Inflamatoria a estímulos bacterianos por células mononucleares periféricas de pacientes cirróticos, con fecha -- de ---- del 2010”.

JURADO DE EXÁMEN

Presidenta

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

Secretaria

Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal
Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Vocal

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM-Iztapalapa

Vocal

Dr. José Sotero Delgado Domínguez
Unidad de Medicina Experimental
Hospital General de México

Agradecimientos

Gracias Dios, por iluminarme para alcanzar una meta más, por ser mi luz en el horizonte cuando no podía ver más allá...

Papás (Madi y Winny), los tengo a los 2!! ¿Qué más puedo pedir? Ustedes son mi sostén, mi amor incondicional. Gracias por creer en mí hasta el final...

Hermanas (Tana y Tiger) y Hermanos (Ale y Abe), gracias por siempre estar ahí para mí, por demostrarme su cariño, por ser parte de mi vida. Sobrinos, mis adorables tormentos ¡! Ale, Pollo, Jime, Alexito y Nicolás..!!! siempre logran hacerme sonreír.

Mi comité, por permitirme aprender de ustedes día con día, gracias a ustedes comprendí mis retos y metas...

Mis amigos y tú, ustedes que han estado aquí hasta el final....

Un agradecimiento especial al Dr. José Sotero Delgado Domínguez por la ayuda brindada para la estandarización de la técnica de citometría de flujo para la determinación de la expresión extracelular e intracelular de receptores.

*“Cuando sientas que eres pleno y feliz en todos los sentidos,
que no necesitas luchar más para conseguirlo,
ya no necesitas aire para seguir...”*

Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	5
1. Introducción.....	7
1.1. Cirrosis.....	7
1.2. Bacterias Gram-negativas y Gram- positivas.....	8
1.3. Citocinas.....	8
1.4. Receptores tipo “Toll” (TLRs).....	9
1.5. Activación de la cascada inflamatoria.....	10
2. Antecedentes.....	12
3. Justificación.....	14
4. Objetivos.....	15
4.1. General.....	15
4.2. Particulares.....	15
5. Hipótesis.....	15
6. Métodos.....	16
6.1. Tamaño de muestra.....	16
6.2. Pacientes.....	16
6.3. Controles.....	16
6.4. Diseño Experimental.....	17
6.5. Metodologías.....	17
6.5.1. Aislamiento de PBMC por gradiente de densidad.....	17
6.5.2. Estimulación de PBMC por LPS o LTA.....	18
6.5.3. Determinación de secreción de citocinas.....	18
6.5.4. Determinación de la expresión extracelular e intracelular de TLRs 2 y 4 por citometría de flujo.....	19
6.5.5. Determinación de la expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α por PCR en tiempo real.....	20
6.6. Análisis estadístico.....	20
7. Resultados.....	22
7.1. Características de pacientes control y cirróticos.....	22
7.2. Determinaciones <i>ex-vivo</i>	22

7.2.1 Expresión de CD14, TLR2 y TLR4.....	22
7.2.2 Producción plasmática de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α	23
7.2.3 Expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α	23
7.3 Activación <i>in-vitro</i>	24
7.3.1 Expresión de CD14, TLR2 y TLR4.....	24
7.3.1.1 Expresión Extracelular.....	24
7.3.1.2 Expresión Intracelular.....	26
7.3.2. Secreción de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α	28
7.3.3. Expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α	31
8. Discusión.....	35
8.1 Expresión de CD14, TLR2 y TLR4.....	35
8.2 Secreción de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α	39
8.3 Expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α	41
9. Conclusión.....	44
10. Bibliografía.....	48
11. Anexos.....	55

Bacterias G (+): Bacterias gram positivas

Bacterias G (-): Bacterias gram negativas

TLRs: Receptores tipo toll

TLR2: Receptor tipo toll 2

TLR4: Receptor tipo toll 4

PBMC: Células mononucleares periféricas sanguíneas

LPS: Lipopolisacárido

LTA: Acido lipoteicoico

CD14: Cluster de diferenciación 14

CD14m: Cluster de diferenciación 14 membranal

IL-1 β : Interleucina 1 Beta

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

MAMPs: Patrones moleculares asociados a microorganismos

TIR: Toll/IL-1 receptor

MD2: co-receptor mieloide de diferenciación 2

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

p38: proteína cinasa activada por mitógenos.

IFN: Interferón

VHC: Virus de la hepatitis C

VHB: Virus de la hepatitis B

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SFB: Suero fetal bovino

NE: No estimulado

St. Faecalis: Enterococcus faecalis

E.coli: Escherichia coli

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

PE: Ficoeritrina

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

UPL: Universal Probe Library

FAM: 6-Carboxifluoresceína

HPRT: hypoxantina-fosforibosiltransferasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

MIF: Intensidad media de fluorescencia

Resumen

El papel de las bacterias gram-negativas en la patogénesis del daño hepático involucra la translocación bacteriana intestinal y la disminución de la depuración hepática, promoviendo la inflamación, daño de tejido y eventualmente, cirrosis. Un papel dañino similar se le ha adjudicado a bacterias gram-positivas. Los receptores tipo-Toll (TLRs) participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) y la activación de mediadores pro- y anti-inflamatorios. Este estudio compara, en células mononucleares periféricas (PBMC) de sujetos sanos (controles) y pacientes cirróticos, la habilidad de activar vías de reconocimiento de ligandos y respuesta inflamatoria, tanto de bacterias gram-negativas, como gram-positivas. PBMC de 12 controles y 12 pacientes externos con cirrosis se estudiaron. PBMC se aislaron y cultivaron con la exposición a LPS o LTA. Todas las determinaciones fueron realizadas antes (*ex vivo*) y después (*in vitro*) de la exposición a LPS o LTA. La expresión extracelular e intracelular de CD14, TLR2 y TLR4 *ex vivo* e *in vitro* se determinó por citometría de flujo y la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α en los sobrenadante por ELISA. Así como la expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α determinada por PCR en tiempo real. Los datos se presentan como medianas y se analizaron con la prueba de Wilcoxon. PBMC de pacientes cirróticos presentan un estado de hiperactivación traducido principalmente en concentraciones plasmáticas mayores de citocinas inflamatorias, IL-6, IL-10 e IL-12. La exposición a ligandos bacterianos, específicamente LPS, a las PBMC de pacientes cirróticos induce una disminución de la expresión intracelular de CD14 así como un aumento de la expresión intracelular del TLR2 con respecto a los NE. El TLR4 tiende a disminuir su expresión extracelular cuando se estimulan las células con LTA. El LPS es capaz de inducir una diferencia de expresión intracelular del TLR2 entre grupos. La secreción de citocinas aumentó después de la exposición por LPS o LTA, siendo más vigorosa con LPS, en ambos grupos. El LTA es capaz de inducir una producción significativa diferencial entre cirróticos y controles. La expresión del RNAm de TLR2, TNF- α , IL-12 e IL-1 β , sugiere que el transcrito de TLR2 y TNF- α son inducidos por LPS y el de IL-12 por LTA. Sin embargo, el transcrito de IL-1 β parece ser inducido por ambos estímulos. Sólo el LTA indujo una disminución significativa del transcrito de TNF- α

En conclusión, PBMC de pacientes cirróticos presentan un estado de hiperactivación. La exposición de PBMC de pacientes cirróticos a ligandos bacterianos es capaz de activar la producción de citocinas inflamatorias, así como su regulación a nivel transcripcional. El aumento del tamaño de muestra, así como otros estudios ayudarán a explicar y dilucidar los mecanismos de reconocimiento e internalización de ligandos bacterianos en PBMC de pacientes cirróticos.

Abstract

The role of gram-negative bacteria in the pathogenesis of liver injury involves intestinal bacterial translocation and decreased liver clearance, leading to inflammation, tissue injury and eventually, cirrhosis. A similar damaging role has been credited to gram-positive bacteria. Toll-like receptors (TLRs) participate in the recognition of microorganism-associated molecular patterns (MAMPs) and the activation of pro- and anti-inflammatory mediators. This study compares in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects (controls) and cirrhotic patients, the ability to activate inflammatory pathways of both gram-negative and gram-positive bacteria products. PBMC of 12 controls and 12 outpatients with cirrhosis were studied. PBMC were isolated and cultured with LPS or LTA exposure. All measurements were determined before (*ex vivo*) and after (*in vitro*) exposure to LPS or LTA. *Ex vivo* and *in vitro* CD14, TLR2 and TLR4 extracellular and intracellular expression were determined by flow cytometry and IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α secretion in supernatants by ELISA. As well as, RNAm expression from CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α were determined by real time PCR. Data are summarized as median values and analyzed by Wilcoxon tests. Cirrhotic PBMC presented a hyperactivated status primarily traduced in higher plasmatic cytokine levels, specifically IL-6, IL-10 and IL-12. Bacterial products exposure, specifically LPS, induced a decreased of CD14 intracellular expression, as well as, an increased of TLR2 intracellular expression *versus* NE. Extracellular TLR4 expression trends to decreased with LTA stimulus. LPS was capable to induce an extracellular TLR2 differential expression between groups. Cytokine secretion increased after LPS or LTA exposure, being more vigorous with LPS, in both groups. LTA was capable to induce a differential production between groups. TLR2, TNF- α , IL-12 e IL-1 β RNAm expression suggested that TLR2 and TNF- α RNAm expression were induce by LPS and IL-12 RNAm expression by LTA. However, IL-1 β RNAm expression seems to be induced by both stimuli. LTA induced a significantly decreased in TNF- α RNAm expression.

In conclusion, Cirrhotic patients PBMC present a hyperactivated status. PBMC exposure to bacterial products is capable to activate inflammatory cytokine production with transcriptional regulation. A higher size sample, as well as molecular studies, will explain recognition mechanisms and bacterial products internalization in PBMC of cirrhotic patients.

1. Introducción

1.1. Cirrosis

Dentro de las principales causas de muerte, las enfermedades del hígado ocupan la 5ta causa de muerte en el país, 3er lugar en personas entre 35-44 años y 4to lugar en personas entre 45-64 años de edad (URL:inegi.org.mx, 2007).

La cirrosis hepática 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 et al, 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 circulatorio, y a la depuración hepática disminuida (Almeida et al, 2006). 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 (Almeida et al, 2006).

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 del factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y otros mediadores pro-inflamatorios (Iredale, 2003; Almeida et al, 2006).

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 (Stewart et al, 2006). 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 (Ginsburg, 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 et al, 1991).

Por otro lado, la composición de la pared celular de bacterias G (+), incluye una mezcla compleja de polisacáridos fosforilados y estructuras glicolípídicas (Ginsburg, 2002). Entre ellos predominan los peptidoglicanos, los cuales se consideran componentes estructurales importantes de la pared celular bacteriana (Salminen et al, 1998) y ácidos lipoteicoicos (LTA), que han mostrado ser inmunológicamente activos (Ginsburg, 2002; Draing et al, 2008). 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 et al, 2005).

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

Las concentraciones de citocinas observadas en pacientes cirróticos, y descritas en la literatura no han sido consistentes. La tendencia, sin embargo, se inclina hacia una producción aumentada de citocinas pro-inflamatorias (Tilg et al, 1992; Tazi et al, 2006). In-vitro, la estimulación con LPS de células mononucleares de pacientes cirróticos produce un aumento en TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Neuman, 2001; Tazi et al, 2009). La producción de IL-10 ha presentado controversia, concentraciones significativamente detectables (Baehr et al, 2000), así como no detectables (Tazi et al, 2009) en pacientes cirróticos. El origen de estos cambios se ha atribuido tanto al agente responsable del daño hepático y a los productos bacterianos procedentes del lumen intestinal, como a los diferentes sistemas de cultivo.

1.4. Receptores tipo-Toll (TLRs)

Los TLRs (Toll-like receptors) se consideran homólogos de la proteína "Toll" de *Drosophila melanogaster*. Comprenden una familia de al menos 13 receptores, 10 expresados en humano (Li et al, 2009). Se consideran proteínas transmembranales tipo I, con dominio citoplasmático y extracelular, la porción extracelular se caracteriza por presentar repeticiones múltiples ricas en leucina; mientras que la porción citoplasmática posee gran similitud con el receptor IL-1, conocido como dominio TIR (Toll/IL-1 receptor) (Testro y Visvanathan, 2009).

Los TLRs están involucrados principalmente en la activación de la respuesta inmune innata a antígenos microbianos, así como respuesta a agentes virales y moléculas del propio hospedero (Takeda y Akira, 2005; Testro y Visvanathan, 2009). Sin embargo, también se ha descrito su papel en el control de la respuesta inmune adaptativa (Barton y Medzhitov, 2002).

Los TLRs se expresan ampliamente en varios tipos de células inmunes, incluyendo células dendríticas, células T, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, macrófagos, monocitos y células epiteliales (Liu et al, 2010).

Cada uno es responsable, más no se limita, al reconocimiento de estructuras microbianas invariantes y distintas que se han denominado patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) (Testro y Visvanathan, 2009). Dos de estos patrones se consideran el LTA de las bacterias G (+) y el LPS de las bacterias G (-), siendo reconocidos principalmente por el TLR2 y el TLR4, respectivamente (Aderem y Ulevitch, 2000; Liu et al, 2010).

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 CD14m, presente en la superficie del macrófago. Por carecer de un dominio citoplasmático, el CD14m es incapaz de generar una señal intracelular. Sin embargo, el CD14m 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, junto con el co-receptor mielóide de diferenciación (MD2), activan al TLR4, el cual toma el papel de un co-receptor transmembranal.

Por su parte, el LTA es reconocido por el TLR2, el cual puede heterodimerizar con el TLR6 (Mitchell et al, 2007; Draing et al, 2008). La activación del heterodímero TLR2/6 es facilitada tanto por CD36 (Triantafilou et al, 2006), como por CD14 (Nilsen et al, 2008), proponiéndose como co-receptores del TLR2 en la señalización por LTA.

Ciertas evidencias sugieren que después de la unión al CD14m, el LPS es internalizado como complejos de CD14-LPS, iniciando la señalización intracelular generando una respuesta celular (Rabehi et al, 2001) Sin embargo, se ha descrito más de una ruta para el procesamiento del LPS, siendo la internalización, el proceso que determina tanto las consecuencias, como el destino del LPS. De hecho se ha indicado que la internalización del LPS es un evento obligatorio relacionado directamente al reconocimiento y activación

celular (Hornef et al, 2002 y 2003; Dunzendorfer et al, 2004). Tal mecanismo, se ha propuesto como una barrera regulatoria adicional para prevenir estimulaciones no-controladas (Hornef et al, 2002).

A pesar de que la internalización de receptores se considera un evento relacionado al reconocimiento y activación celular (Hornef et al, 2003). Estudios han propuesto que la internalización y el tráfico intracelular son procesos independientes de la señalización (Triantafilou et al, 2006), siendo la superficie celular el sitio donde ocurre la activación celular en respuesta a productos bacterianos (Triantafilou et al, 2004). Sin embargo, cabe mencionar que estos estudios utilizan toda la bacteria y no productos bacterianos (Triantafilou et al, 2006).

Finalmente, la activación de NF- κ B, así como de protein-cinasas activadoras de mitógeno (p38), cinasas c-Jun N-terminal y la vía del interferón (IFN), resulta en la translocación de factores de transcripción, que activan genes que codifican para proteínas como mediadores inflamatorios y regulación de genes estimulados por IFN, desencadenando respuestas inflamatorias (Wong et al, 2009).

2. Antecedentes

La flora intestinal contribuye a un estado pro-inflamatorio en cirrosis, aun en la ausencia de sobre-infección, su alteración es de relevancia clínica importante para pacientes cirróticos (Almeida et al, 2006). La translocación bacteriana y el sistema inmune alterado del hospedero favorecen la predisposición a infecciones bacterianas por gram-negativos en pacientes cirróticos (Testro et al, 2010).

La importancia de considerar productos tanto de bacterias G (-) como de G (+) en modelos de inflamación hepática, radica en los hallazgos encontrados. 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- α circulante (Riordan et al, 2003). Esto sugiere que el aumento de las concentraciones circulantes de TNF- α 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 et al, 2003). Recientemente, se ha informado que pacientes con cirrosis avanzada (Child-Pugh C) presentan una baja expresión de TLR4 en monocitos, dada por la tolerancia dependiente de LPS y por el alto grado de translocación bacteriana y endotoxemia, la antibioticoterapia parece revertir este efecto (Testro et al, 2010).

El estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, mostró que la exposición a LPS o LTA induce un aumento en la expresión membranal de CD14 en pacientes cirróticos y una disminución en la expresión membranal del TLR2 y del TLR4, tanto en pacientes no-cirróticos como cirróticos. Esta disminución generalizada de expresión se acompañó de un incremento en la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10 en ambos grupos, siendo más vigorosa con exposición a LPS y relativamente mayor en cirróticos que en no-cirróticos. Estos hallazgos nos llevan a pensar que las PBMC de pacientes cirróticos presentan cierto estado de hiperactivación, capaces de responder a la exposición de ligandos bacterianos, particularmente LPS, esto sugiere que existen mecanismos de regulación inmune presentes en la enfermedad crónica hepática. Sin embargo, el nivel y la magnitud de dichos mecanismos se desconocen.

Una regulación negativa del TLR4 en cirrosis avanzada se ha asociado con tolerancia a LPS, aumentando la traslocación bacteriana y la endotoxemia (Testro et al, 2009). En este

contexto, la tolerancia a endotoxina se comprende como un mecanismo de regulación que protege a la célula de una sobre-expresión o activación sostenida. Sin embargo, la disminución de expresión del TLR4 también podría indicar la internalización de dicho receptor, lo cual se ha observado, tanto para TLR4 (Hornef et al, 2003), como para TLR2 (Triantafilou et al, 2004). Como ya se mencionó previamente, el proceso de internalización y tráfico intracelular de ligandos bacterianos es completamente independiente de la señalización intracelular, siendo consistente con la hipótesis de que la activación celular en respuesta a productos bacterianos ocurre en la superficie celular (Triantafilou et al, 2004).

Por otro lado, se ha reportado que una disminución en la expresión génica del TLR2 y del TLR4 en monocitos durante episodios sépticos, puede representar un mal pronóstico (Schaaf et al, 2009). Recientemente, se ha mostrado la correlación entre los niveles de expresión de receptores tipo-Toll (TLR2, entre otros) en PBMC y la severidad de daño en VHC (Virus de la Hepatitis C) (Li et al, 2009).

3. Justificación

La importancia del estudio de la cirrosis radica en el lugar que ocupa dentro de las principales causas de mortandad en nuestro país, la etiología diversa y falta de terapias adecuadas, ha llevado a la búsqueda del entendimiento de los procesos involucrados en esta patología; uno de ellos, se propone es la respuesta inflamatoria de pacientes cirróticos, la cual se ha atribuido al daño hepático crónico de base y a la exposición prolongada a endotoxinas.

La manipulación de la flora intestinal utilizando tanto, regímenes simbióticos gram-positivos (probióticos y fibras fermentables) o fibras fermentables solas para aumentar el contenido intestinal bacteriano tipo- ácido láctico a expensas de otras especies de la flora intestinal con más potencial patogénico, puede influenciar de manera favorable la función hepática en pacientes cirróticos (Almeida et al, 2006). Sin embargo, poco se sabe de la expresión y función de estos reguladores clave en la respuesta inmune a bacterias en cirrosis avanzada.

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 a qué nivel. 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 cirróticos, a la presencia de componentes de bacterias G (+) y G (-), en términos de expresión de receptores de membrana y regulación a nivel transcripcional, así como de secreción de citocinas y su regulación transcripcional, de forma comparativa con controles sanos.

4.2 Particulares

- Determinar la expresión extracelular e intracelular de CD14, TLR2 y TLR4 y la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α , por PBMC de controles y pacientes cirróticos, antes y después de la exposición a LPS o LTA.

- Determinar la expresión en términos de RNAm de los genes: CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α , de PBMC de controles y pacientes cirróticos, antes y después de la exposición a LPS o LTA.

5. Hipótesis

- La respuesta inflamatoria de PBMC de pacientes cirróticos, en términos de secreción de citocinas y expresión de receptores, será diferente a componentes de bacterias G (+) y G (-) con respecto a controles aparentemente sanos.

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, pero se determinó en base a una probabilidad *a priori* de 0.5 (distribución binomial). Se incluyeron 24 pacientes, 12 controles y 12 con cirrosis hepática.

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:

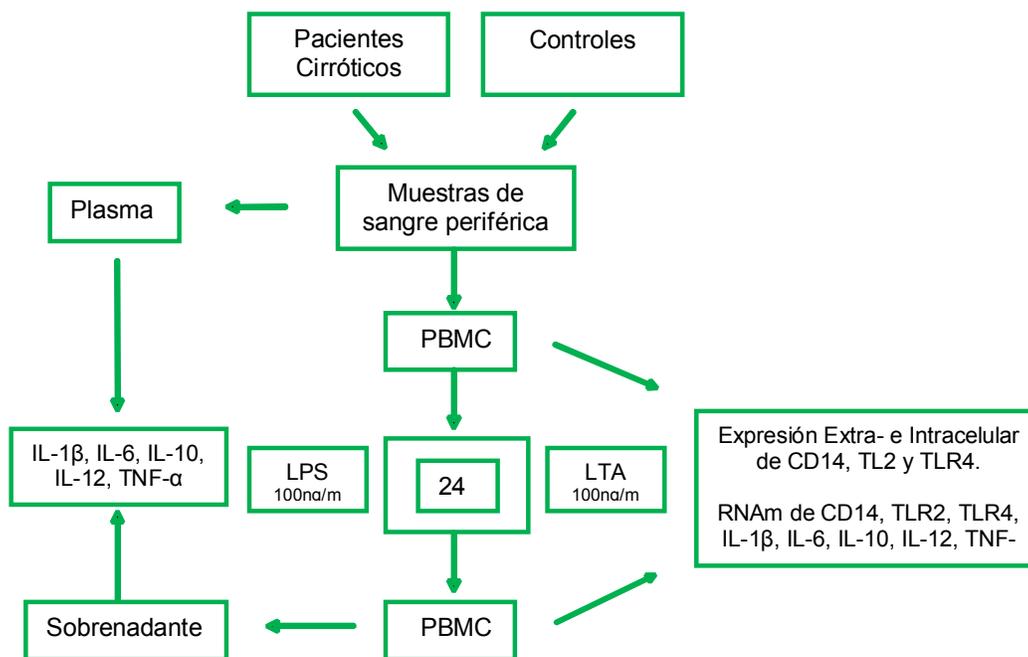
- Estadio A o B de Child-Pugh.
- Ausencia de enfermedades infecciosas, metabólicas, inmunológicas o neoplásicas concomitantes.
- Ausencia de antibioticoterapia o tratamiento inmune.
- Firma de consentimiento informado.

6.3 Controles

Se incluyeron controles que cumplieran con los criterios de inclusión siguientes:

- Ausencia de enfermedades infecciosas, metabólicas, inmunológicas o neoplásicas concomitantes.
- Ausencia de antibioticoterapia o tratamiento inmune.
- Firma de consentimiento informado.

6.4 Diseño Experimental



6.5 Metodologías

6.5.1 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 2200 rpm durante 30 min a 20°C. Se recuperó la fracción que corresponde a las PBMC (anillo blanco) y se lavó con solución salina 0.9%. Un lavado a 1500 rpm por 10 min a 20°C y dos lavados a 1000 rpm por 5 min a 4°C. Los botones de células se juntaron, y se resuspendieron con medio RPMI 1640 (Gibbco) complementado con 10% SFB (suero fetal bovino) y 1% estreptomicina-penicilina (5×10^3 U/ml – 5×10^3 µg/ml) (Gibco). Se realizó una dilución 1:100 con azul tripano para determinar el porcentaje de viabilidad celular y contar las células en una cámara de Neubauer y se ajustó a un volumen de 1×10^6 células/ml. Las células se sembraron en microplacas de 24 pozos para cultivo celular, a una densidad de 1×10^6 células / ml de medio / pozo (NUNC, AccesoLab). Bajo 3 tratamientos: NE (no estimulado), estimulación con 100ng/mL de LPS y estimulación con 100ng/mL de LTA. Se

incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad a saturación durante 18 h para estabilización.

6.5.2 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-α. La concentración de 100 ng/ml presentó un máximo en la producción de TNF-α, 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% CO₂ y 98% de humedad a saturación durante 24 h.

6.5.3 Determinación de secreción de citocinas.

La secreción de IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 y TNF-α en el sobrenadante de los cultivos y en el plasma se determinó por medio de ELISA (Biolegend). 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 TNFα e IL-6 las concentraciones obtenidas fueron muy elevadas, por lo que se diluyeron 1:2 ó 1:3. Se adicionó un segundo anticuerpo policlonal específico marcado con biotina y un agente enzimático conjugado de avidina-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 H₂SO₄ 2N. Entre cada paso se realizaron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos y 0.05% de Tween-20. Todo el proceso se realizó en condiciones de agitación constante 200 rpm (Thermomixer R, Eppendorf). Las concentraciones de cada reactivo o solución se consideraron acorde a las instrucciones del proveedor). 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.

6.5.4 Determinación de la expresión extracelular e intracelular de TLR2 y TLR4 por citometría de flujo.

Las células recién aisladas o recolectadas del cultivo se llevaron a una concentración de 1×10^6 células/tubo. Se incubó con una solución de bloqueo (anti-IgG totales, SFB 2%, EDTA 5 mM en PBS- NaN_3 0.1%) por 30 min en hielo. Se añadieron los anticuerpos (Abs) monoclonales de ratón anti-TLR2 y anti-TLR4 humanos marcados con ficoeritrina (PE) (Imgenex, SD California, USA), y anti-CD14 marcado con ficoeritrina (PE) (BD, Pharmingen, SJ California, USA), así como también los controles de isotipo, Abs de ratón anti-humano IgG_{2a,K} marcado con PE (BD, Pharmingen SJ, California, USA), incubándose 20 min en hielo. Se agregó una solución de tinción (SFB 2%, EDTA 5mM en PBS- NaN_3 0.1%). Entre cada paso, se centrifugó a 2000 rpm por 10 min a 4°C, decantando y resuspendiendo el botón con vortex. A continuación, se incubó en una solución de Fijación/Permeabilización (BD, Biosciences, SJ California, USA) por 20 min en hielo. Se realizaron 2 lavados con un regulador de permeado/lavado (BD, Biosciences, SJ California, USA) 2000 rpm por 10 min a 4°C. Se añadieron los anticuerpos (Abs) monoclonales de ratón anti-TLR2 y anti-TLR4 humanos marcados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Imgenex, SD California, USA), y anti-CD14 marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD, Pharmingen, SJ California, USA), así como también los controles de isotipo, Abs monoclonales de ratón anti-humano IgG_{2a,K} marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC), incubándose 20 min en hielo. Finalmente se realizaron 3 lavados con el regulador permeado/lavado (BD, Biosciences, SJ California, USA) 2000 rpm por 10 min a 4°C. Las células teñidas se dejaron toda la noche en una solución de paraformaldehído 4% y se adquirieron y analizaron en el citómetro de flujo (Beckman-Coulter (Dako) CyAn ADP, Denmark and California, USA). La expresión de las proteínas del CD14, TLR2 y TLR4 se cuantificaron analizando los porcentajes de fluorescencia de las células marcadas, comparando con las células NE.

6.5.5 Determinación de la expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α por PCR en tiempo real.

Se aisló el RNA total de 1.0×10^6 PBMC utilizando un kit comercial (High Pure RNA isolation kit, Roche®, Indianapolis, EU). 30 μ L (0.5-1.0 μ g) de cada RNA total fueron transcritos a cDNA utilizando un kit comercial (Transcriptor first strand cDNA síntesis kit, Roche®, Indianapolis, EU). Para realizar la PCR tiempo real, se diseñaron iniciadores específicos (Tabla 1), con la ayuda del Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche®, Indianapolis, EU) y se ocuparon además sondas Universal Probe Library (UPL®) marcadas con el fluorocromo FAM para cuantificar los niveles de expresión de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α , los cuales se normalizaron utilizando como gen endógeno HPRT. La reacción de PCR se realizó adicionando 2 μ L (3 μ g) de cDNA y mezcla de reacción comercial (Probes Master Light Cyclers 480, Roche®, Indianapolis, EU) en un volumen total de reacción de 10 μ l y se corrió a 50°C por 2 minutos y 95°C durante diez minutos seguido por 45 ciclos a 95°C 15 s, 60°C 1h en el LightCycler® 480 (Roche®, Indianapolis, Estados Unidos).

Tabla 1. Secuencias de iniciadores específicos utilizadas para amplificación en PCR tiempo real.

Mediador	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')
HPRT	tgacctgattatmttgcatacc	cgagcaagacggtcagtcct
CD14	gttcggaagactatcgacat	acaaggttctggcgtggt
TLR2	cgttctcaggtgactgctc	ccttggatcctgctgc
TLR4	ctctctcgcgtgagaccag	tccatgcattgataagtaattagga
IL-1 β	ctgtcctcgcgtgtgaaaga	ttgggtaattttgggatctaca
IL-6	gatgagtacaaaagtctgatcca	ctgcagccactggttctgt
IL-10	tgggggagaacctgaagac	acaggaagaaatcgatgaca
IL-12	cactcccaaacctgctgag	tctctcagaagtcaagggta
TNF- α	cagcctctctcctctgat	gccagagggtgattagaga

HPRT, hypoxantina-fosforibosiltransferasa.

6.6 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 controles y pacientes 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 controles y pacientes cirróticos se hizo mediante la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Características de controles y pacientes cirróticos.

Se incluyeron 24 pacientes. El grupo de controles con una n=12, presentó una relación de género masculino:femenino de 1:1, y una mediana de edad de 43.5 años (mínimo de 38 y máximo de 76 años). El grupo de pacientes cirróticos con una n=12, presentó una relación de género masculino:femenino de 1:2, y una mediana de edad de 57.5 años (mínimo de 46 y máximo de 75 años). En cuanto a la etiología, 2 presentaron cirrosis secundaria a consumo excesivo de alcohol, 1 enfermedad grasa no alcohólica, 1 cirrosis hepática alcoholo-nutricional (CHAN) y 8 cirrosis criptogénica.

7.2 Determinaciones ex-vivo

7.2.1 Expresión de CD14, TLR2 y TLR4.

La mediana de expresión de los receptores CD14, TLR2 y TLR4, tanto extracelular como intracelular, de las PBMC expresada como porcentaje de fluorescencia de células marcadas, en controles y pacientes cirróticos se muestra en la tabla 2. La diferencia de expresión intracelular de CD14 entre controles y cirróticos alcanzó significancia estadística ($p < 0.04$) (Tabla 2).

Tabla 2. Mediana de expresión extracelular e intracelular de receptores de PBMC de controles y pacientes cirróticos.

Receptor	Controles		Cirróticos		p	
	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
CD14	12.5(8.0 -19.0)	12.5(7.9 -18.5)	16.6(6.8-44.8)	17.6 (5.5-45.0)	0.17	0.04*
TLR2	5.4(0.2-16.9)	18.8(0.4 - 41.6)	5.1(0.1-45.1)	13.7 (0.1-40.2)	0.86	0.36
TLR4	6.3(0.04-23.4)	9.3(2.9-20.2)	1.2(0.1-56.4)	3.5(0.1-37.0)	0.17	0.15

Mediana (mínimo-máximo) expresada en porcentaje de fluorescencia de células marcadas. * $P < 0.05$ Significancia estadística obtenida por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

7.2.2 Producción plasmática de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α .

La mediana de la producción plasmática de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF α , expresada en pg/mL, en controles y pacientes cirróticos se muestra en la tabla 3. La diferencia de producción de IL-6, IL-10 e IL-12 entre controles y cirróticos alcanzó significancia estadística ($p < 0.002$, $p < 0.02$, $p < 0.02$) (Tabla 3).

Tabla 3. Mediana de producción plasmática de citocinas de controles y pacientes cirróticos.

Citocina	Controles	Cirróticos	p
IL-1 β	2.5 (0.0 – 11.2)	2.9 (1.3 – 32.4)	0.33
IL-6	12.4 (3.2 – 23.7)	34.6 (12.8 – 229.0)	0.002*
IL-10	4.6 (0.0 - 80.3)	9.2 (0.14 – 20.9)	0.02*
IL-12	146.1 (103.5 – 262.3)	261.0 (44.9 – 444.9)	0.02*
TNF- α	0.4 (0.0 – 5.9)	0.0 (0.0 – 24.4)	0.43

Mediana (mínimo-máximo) de producción plasmática de citocinas expresada en pg/mL. $P < 0.05$

Significancia estadística obtenida por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

7.2.3 Expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α .

La mediana de expresión de los receptores CD14, TLR2 y TLR4, y de las citocinas, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α , por las PBMC expresada en unidades relativas de expresión, en controles y pacientes cirróticos se muestra en la Tabla 4. No se encontró ninguna diferencia significativa entre la expresión de RNAm de los genes de receptores y citocinas, entre el grupo de controles y cirróticos (Tabla 4).

Tabla 4. Mediana de expresión RNAm de receptores y citocinas por PBMC de controles y pacientes cirróticos.

Gen	Controles	Cirróticos	p
CD14	NA	NA	NA
TLR2	18.6 (14.0 – 20.2)	18.7 (14.9 – 21.9)	0.5
TLR4	NA	NA	NA
IL-1 β	14.3 (10.2 – 16.1)	15.4 (13.0 – 20.0)	0.1
IL-6	20.9 (18.2 – 22.0)	21.1 (15.0 – 22.9)	0.9
IL-10	NA	NA	NA

IL-12	27.4 (26.0 – 29.0)	27.2 (26.1 – 34.4)	0.5
TNF- α	22.3 (19.7 – 26.3)	23.3 (21.0 – 32.7)	0.2

NA=No Amplificó. Mediana (mínimo-máximo) expresada en unidades relativas de expresión. Valores de P obtenidos por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

7.3 Activación *in-vitro*

7.3.1 Expresión de CD14, TLR2 y TLR4.

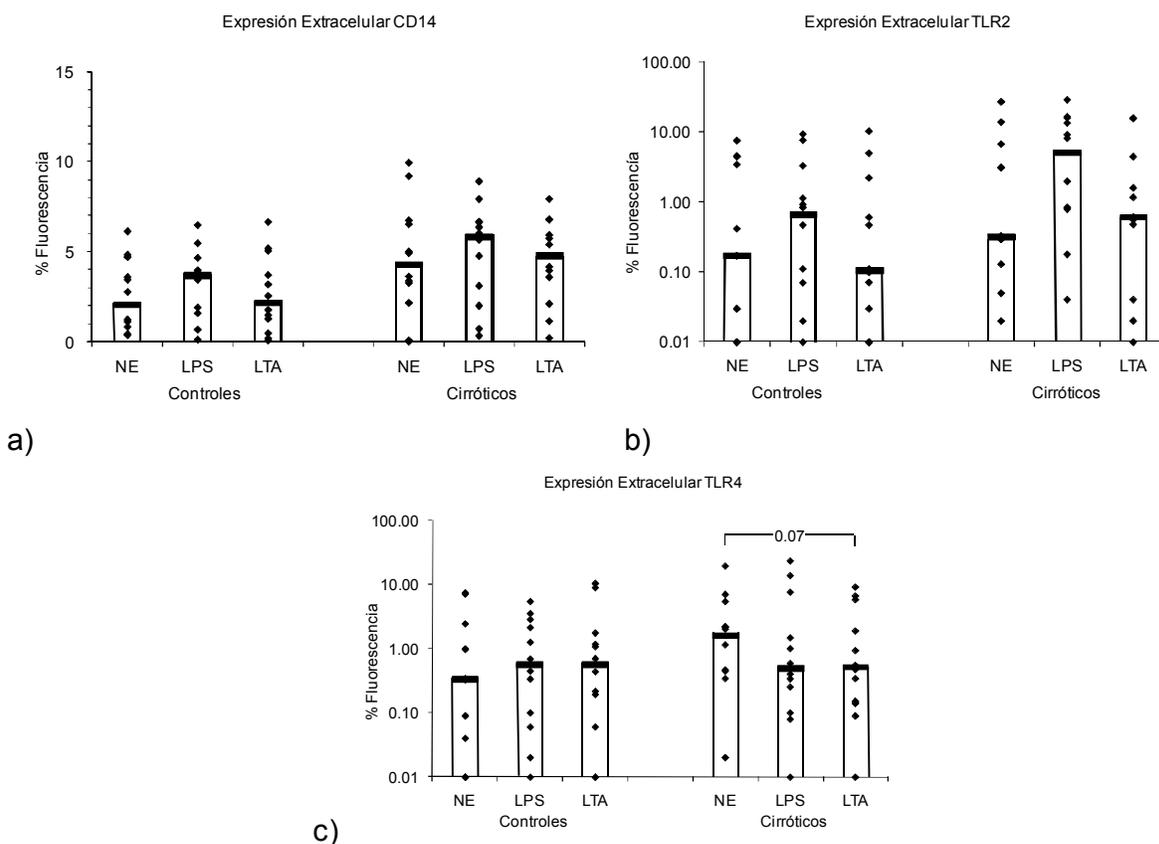
7.3.1.1 Expresión Extracelular.

La expresión extracelular de CD14, TLR2 y TLR4 por PBMC no estimuladas (NE) fue mayor en pacientes cirróticos que en controles. La mediana de expresión extracelular de CD14 fue de 4.3% (0.0-9.9) vs. 2.0 % (0.3–6.1) ($P<0.12$), la mediana de expresión extracelular del TLR2 fue de 0.3% (0.0–26.8) vs. 0.2% (0.0–7.5) ($P<0.45$), y la mediana de expresión extracelular de TLR4 fue de 1.6% (0.0–19.5) vs. 0.3% (0.0-7.6) ($P<0.19$), respectivamente (Gráficas 1a, b, c).

Después de la exposición a LPS, la expresión extracelular de CD14, TLR2 y TLR4 por PBMC de controles fue mayor que el valor NE correspondiente, [3.7% (0.1–6.5) vs. 2.0% (0.3–6.1), $P<0.14$], [0.6% (0.0–9.3) vs. 0.2% (0.0-7.5), $P<0.45$], [0.6% (0.0–5.5) vs. 0.3% (0.0-7.6), $P<0.42$], respectivamente. PBMC de pacientes cirróticos mostraron, después de la misma exposición, un incremento de la expresión extracelular del CD14 [5.8% (0.3-8.9) vs. 4.3% (0.0-9.9), $P<0.48$] y del TLR2 [5.1% (0.0-28.9) vs. 0.3% (0.0-26.8), $P<0.14$]. Y una disminución de la expresión extracelular de TLR4 [0.5% (0.0-23.3) vs. 1.6% (0.0-19.5), $P<0.94$]. Sin embargo, ninguna diferencia fue estadísticamente significativa (Gráficas 1a, b, c).

La exposición a LTA, no afectó la expresión extracelular de CD14 en controles [2.1% (0.1 – 6.6)] al compararla con las condiciones NE [2.0% (0.3–6.1), $P<0.58$]. Tampoco afectó la expresión extracelular de TLR2 [0.1% (0.0–10.2) vs. 0.2% (0.0-7.5), $P<0.77$]. La expresión extracelular de TLR4 mostró un ligero aumento [0.6% (0.0–10.6) vs. 0.3% (0.0-7.6), $P<0.48$]. Las PBMC de pacientes cirróticos mostraron, después de la misma exposición, un incremento de la expresión extracelular del CD14 [4.8% (0.2-7.9) vs. 4.3% (0.0-9.9),

$P < 0.58$] y del TLR2 [0.6% (0.0-15.8) vs. 0.3% (0.0-26.8), $P < 0.69$]. Y una disminución de la expresión extracelular de TLR4 [0.5% (0.0-9.1) vs. 1.6% (0.0-19.5), $P < 0.071$], la cual mostró tendencia a la significancia. Los cambios restantes no mostraron diferencia significativa (Gráficas 1a, b, c).



Gráfica 1. Expresión extracelular de receptores por PBMC de controles y pacientes cirróticos bajo condiciones de no-exposición (NE), LPS o LTA. a) CD14, b) TLR2, c) TLR4. Valor expresado en porcentaje de fluorescencia de células marcadas. La barra representa los valores de Mediana. $P < 0.10$ Tendencia a la significancia obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon.

Tomando la condición NE como una referencia del 100%, la mediana de diferencia relativa en la expresión extracelular de CD14, TLR2 y TLR4 tiende a ser positiva, se observó un aumento en ambos grupos después de la exposición con LPS, a excepción de la expresión extracelular de TLR4 en el grupo de cirróticos. Sin embargo la diferencia no fue significativa ($P < 0.95$, $P < 0.45$, $P < 0.12$), respectivamente. De acuerdo a LTA, el grupo de pacientes cirróticos presenta una similitud con lo observado con el LPS, no así en el grupo de controles, a excepción del TLR4 ($P < 0.17$, $P < 0.95$, $P < 0.20$) (Tabla 5).

Tabla 5. Diferencias* relativas de mediana en la expresión extracelular de receptores por PBMC de controles y pacientes cirróticos después de la exposición a LPS o LTA.

Receptor	Localización	Tratamiento	Controles	Cirróticos	Valor P
CD14	Extracelular	LPS	+ 19.4%	+ 20.9%	<0.95
		LTA	- 23.5%	+ 11.5%	<0.17
TLR2	Extracelular	LPS	+ 11.9%	+ 159.1%	<0.45
		LTA	0%	+ 21.9%	<0.95
TLR4	Extracelular	LPS	+ 37.1%	- 26.6%	<0.12
		LTA	+ 36.5%	- 52.9%	<0.20

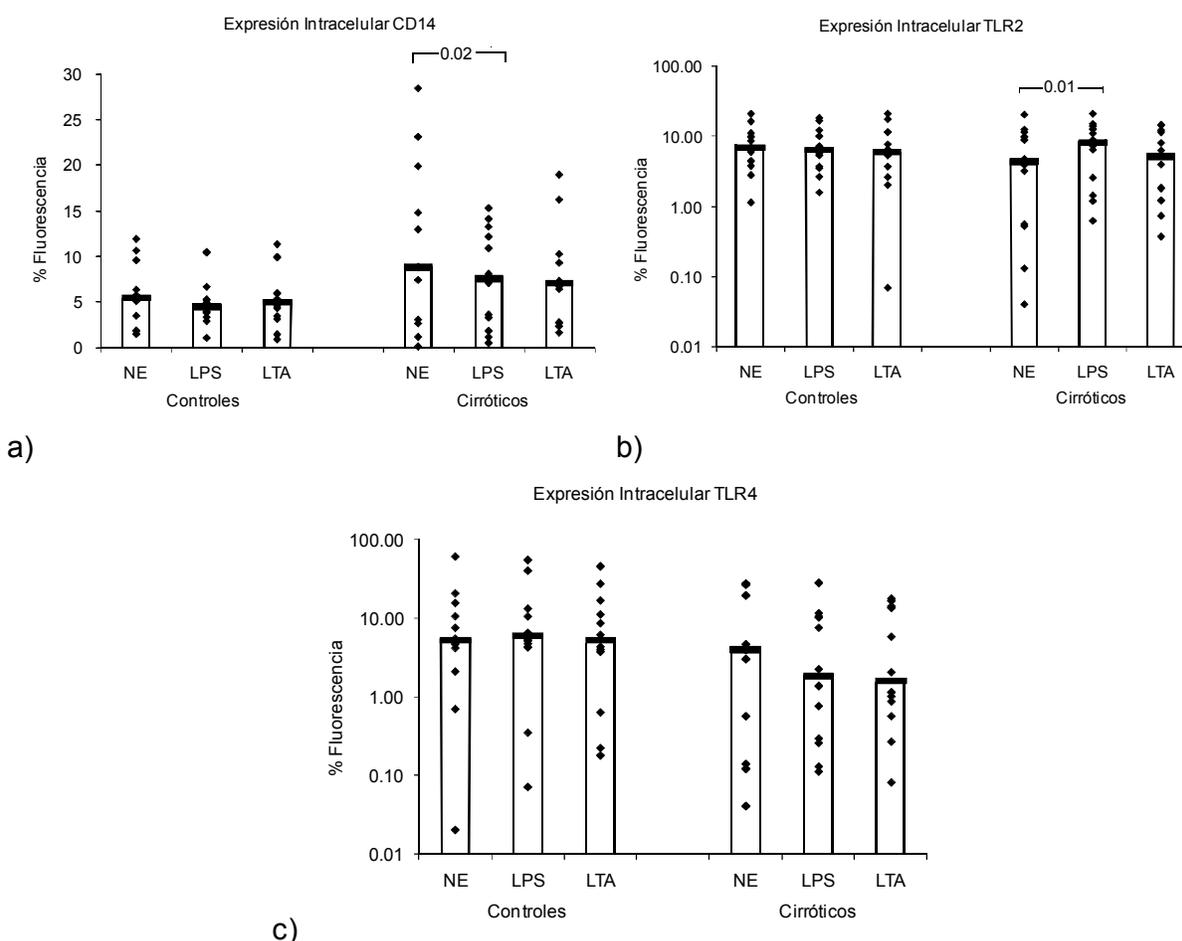
* Diferencia con el valor de no-exposición (NE) (considerado como una referencia del 100%). Un valor negativo refleja disminución, un valor positivo refleja aumento. Valores de P obtenidos por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

7.3.1.2 Expresión Intracelular

La expresión intracelular de CD14 por PBMC NE fue mayor en pacientes cirróticos que en controles. La mediana de expresión intracelular de CD14 fue de 8.8% (0.1-28.4) vs. 5.4 % (1.5-12.0) (P<0.22). Por el contrario, la mediana de expresión intracelular del TLR2 y de TLR4 fue menor en pacientes cirróticos que en controles [4.4% (0.0-20.5) vs. 6.8% (1.1-21.2), P<0.39], [4.0% (0.0-27.5) vs. 5.2% (0.0-61.0) (P<0.27), respectivamente (Gráficas 2a, b, c).

Después de la exposición con LPS, la expresión intracelular de CD14 y TLR2 por PBMC de controles fue menor que el valor NE correspondiente, [4.5% (1.1 – 10.6) vs. 5.4% (1.5-12.0), P<0.39], [6.5% (1.6-18.4) vs. 6.8% (1.1-21.2), P<0.94]. Por el contrario, la expresión intracelular de TLR4 fue mayor que el valor de NE correspondiente [6.0% (0.1-54.7) vs. 5.2% (0.0-61.0), P<0.64], PBMC de pacientes cirróticos mostraron, después de la misma exposición, una disminución de la expresión intracelular del CD14 [7.6% (0.5 – 15.3) vs. 8.8% (0.1-28.4), P<0.02] y del TLR4 [1.8% (0.1-28.0) vs. 4.0% (0.0-27.5), P<0.48]. Y un aumento de la expresión intracelular de TLR2 [8.1% (0.6-21.1) vs. 4.4% (0.0-20.5), P<0.01]. La disminución de la expresión intracelular del CD14 y el aumento observado de TLR2 presentaron diferencia significativa (Gráficas 2a, b, c).

La exposición a LTA, disminuyó la expresión intracelular de CD14 y TLR2 en controles, al compararse con las condiciones NE [5.0% (0.9–11.4) vs. 5.4% (1.50–12.0), $P < 0.43$] y [6.0% (0.1–21.2) vs. 6.8% (1.1-21.2), $P < 0.53$]. La expresión intracelular de TLR4 no mostró cambio [5.2% (0.2–45.4) vs. 5.2% (0.0-61.0), $P < 0.75$]. PBMC de pacientes cirróticos mostraron, después de la misma exposición, una disminución de la expresión intracelular del CD14 [7.0% (1.7 - 56.6) vs. 8.8% (0.1-28.4), $P < 0.35$] y del TLR4 [1.6% (0.1-17.7) vs. 4.0% (0.0-27.5), $P < 0.29$]. Y un ligero aumento de la expresión intracelular de TLR2 [5.1% (0.4-14.7) vs. 4.4% (0.0-20.5), $P < 0.43$]. Los cambios observados no mostraron diferencia significativa (Gráficas 1a, b, c).



Gráfica 2. Expresión intracelular de receptores de PBMC de controles y pacientes cirróticos bajo condiciones de no-exposición (NE), LPS o LTA. a) CD14, b) TLR2, c) TLR4. Valor expresado en porcentaje de fluorescencia de células marcadas. La barra representa los valores de Mediana. $P < 0.05$ Significancia estadística, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon.

Tomando la condición NE como una referencia del 100%, la mediana de diferencia relativa en la expresión intracelular de CD14 tiende a ser negativa, una disminución, en el grupo de controles y cirróticos, después de la exposición con LPS ($P<0.52$) y LTA ($P<0.73$). Por el contrario, la expresión intracelular del TLR2 tiende a ser positiva, un aumento, en ambos grupos, después de la exposición con LPS ($P<0.05$) y LTA ($P<0.15$). Finalmente, de acuerdo a la expresión intracelular del TLR4, tiende a ser negativa, una disminución, después de la exposición con LPS ($P<0.30$) y LTA ($P<0.95$). A excepción del grupo de controles con LPS (Tabla 5).

Tabla 6. Diferencia* relativas de mediana de la expresión intracelular de receptores de PBMC de controles y pacientes cirróticos después de la exposición a LPS o LTA.

Receptor	Localización	Tratamiento	Controles	Cirróticos	Valor P
CD14	Intracelular	LPS	- 4.6%	- 14.1%	<0.52
		LTA	- 6.8%	- 12.6%	<0.73
TLR2	Intracelular	LPS	+ 16.3%	+ 66.1%	<0.05*
		LTA	+ 3.7%	+ 28.2 %	<0.15
TLR4	Intracelular	LPS	+ 21.9%	- 23.8%	<0.30
		LTA	- 5.6%	- 7.0%	<0.95

*Diferencia con el valor de no-exposición (NE) (considerado como una referencia o del 100%). Un valor negativo refleja una disminución, un valor positivo refleja un aumento. * $P<0.05$ Significancia estadística obtenida por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

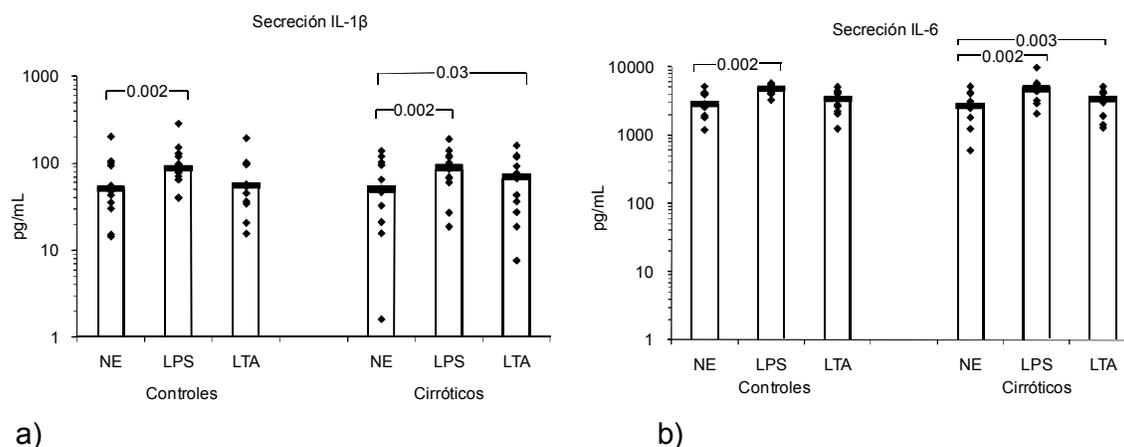
7.3.2 Secreción IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α .

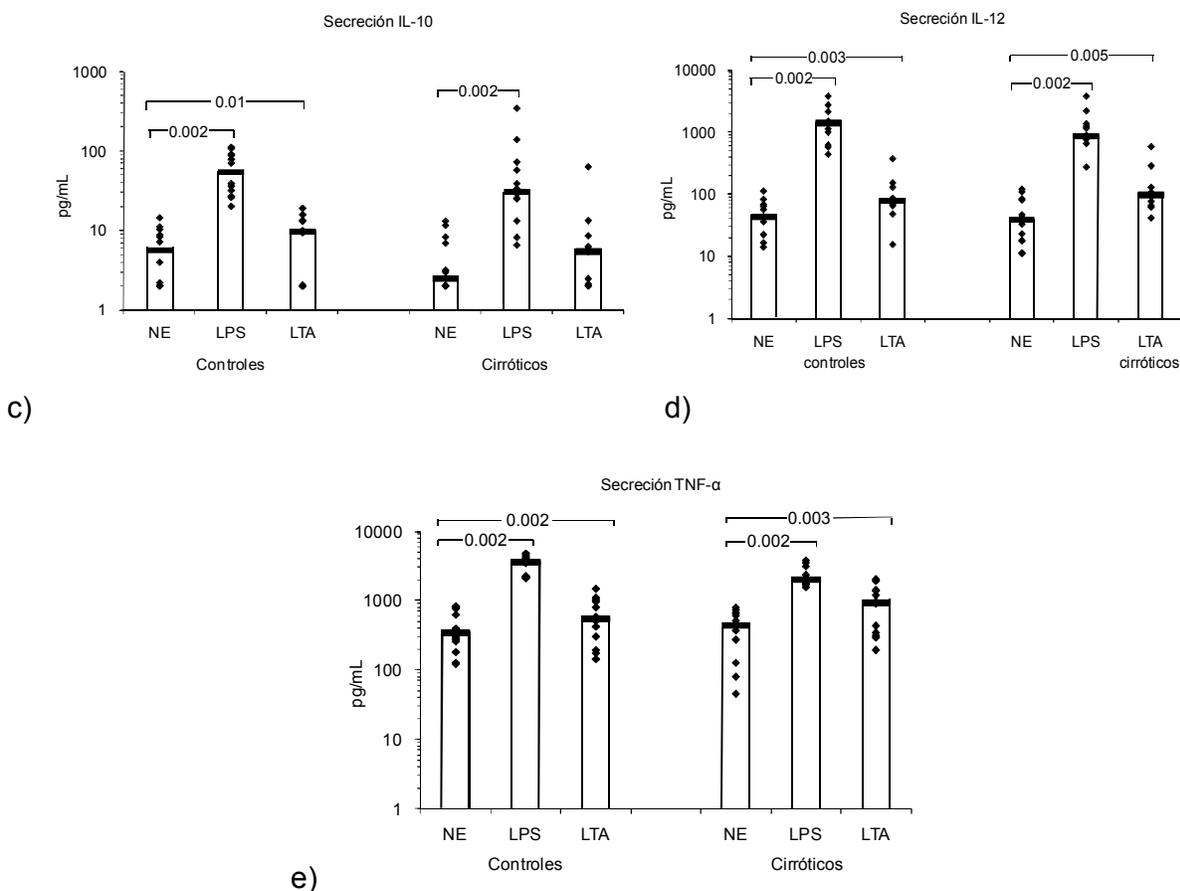
La secreción de citocinas por PBMC NE de controles y cirróticos fue similar, IL-1 β [51.0 (14.4-202.5) vs. 50.2 (1.6-138.6), $P<0.95$], IL-6 [2,836.3 (1,201.5-5,217.8) vs. 2,698.6 (589.6-5,083.7), $P<0.60$], IL-10 [5.6 (2.0-14.4) vs. 2.2 (2.0-12.9), $P<0.31$], IL-12 [43.1 (14.1-113.5) vs. 38.2 (11.3-121.0), $P<0.75$], TNF- α [345.9 (124.0-826.3) vs. 442.6 (45.8-796.9), $P<0.69$] (Gráfica 3).

Sin embargo, después de la exposición con LPS, la secreción de citocinas fue significativamente mayor en comparación al valor NE correspondiente, tanto para el grupo de controles, IL-1 β [87.4 (39.6-286.2) vs. 51.0 (14.4-202.5), $P<0.002$], IL-6 [4,820.4

(3,276.3-5,798.2) vs. (2,836.3 (1,201.5-5,217.8), $P<0.002$], IL-10 [54.4 (20.0-111.7) vs. 5.6 (2.0-14.4), $P<0.002$], IL-12 [1,390.9 (438.4-3,861.3) vs. 43.1(14.1-113.5), $P<0.002$], TNF- α [3,576.9 (2,078.3-4,839.6) vs. 345.9 (124.0-826.3), $P<0.002$], como para el grupo de pacientes cirróticos, IL-1 β [88.9 (18.8-189.7) vs. 50.2 (1.6-138.6), $P<0.002$], IL-6 [4,738.9 (2,065.2-9,774.2) vs. 2,698.6 (589.6-5,083.7), $P<0.002$], IL-10 [31.0 (6.5-345.5) vs. 2.2 (2.0-12.9), $P<0.002$], IL-12 [859.0 (275.4-3,837.0) vs. 38.2 (11.3-121.0), $P<0.002$], TNF- α [2,017.5 (1,553.8-3,823.8) vs. 442.6 (45.8-796.9), $P<0.002$] (Gráfica 3).

De igual manera, después de la exposición con LTA, la secreción de citocinas fue significativamente mayor en comparación al valor NE correspondiente, para el grupo de controles, IL-1 β [55.3 (15.4-195.1) vs. 51.0 (14.4-202.5), $P<0.53$], IL-6 [3,413.3 (1,247.4-5,131.1) vs. (2,836.3 (1,201.5-5,217.8), $P<0.14$], IL-10 [9.6 (0.7-18.9) vs. 5.6 (2.0-14.4), $P<0.01$], IL-12 [78.7 (15.4-373.4) vs. 43.1 (14.1-113.5), $P<0.003$], TNF- α [546.8 (141.7-1,476.0) vs. 345.9 (124.0-826.3), $P<0.002$], como para el grupo de pacientes cirróticos, IL-1 β [69.4 (7.6-159.5) vs. 50.2 (1.6-138.6), $P<0.03$], IL-6 [3,354.2 (1,274.8-5,054.1) vs. 2,698.6 (589.6-5,083.7), $P<0.003$], IL-10 [5.4 (2.0-63.0) vs. 2.2 (2.0-12.9), $P<0.11$], IL-12 [97.0 (41.4-582.0) vs. 38.2 (11.3-121.0), $P<0.005$], TNF- α [935.1 (192.7-2,019.0) vs. 442.6 (45.8-796.9), $P<0.003$] (Gráfica 3).





Gráfica 3. Secreción de Citocinas de PBMC de controles y pacientes cirróticos bajo condiciones de no-exposición (NE), LPS o LTA. a) IL-1 β , b) IL-6, c) IL-10, d) IL-12, e) TNF- α . Valor expresado en unidades de concentración pg/mL. La barra representa los valores de Mediana. P<0.05 Significancia estadística, P<0.10 Tendencia a la significancia, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon.

Tomando los valores de NE como referencia, la mediana de la diferencia relativa en la secreción de citocinas entre la exposición a LPS o LTA y NE, tendió a ser positiva, un aumento. Observándose generalmente mayor en pacientes cirróticos que en controles, alcanzando significancia estadística en IL-1 β , IL-6 y TNF- α , bajo la exposición a LTA, P<0.07, P<0.05, P<0.04, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Diferencia* relativas de mediana de la producción de citocinas de PBMC de controles y pacientes cirróticos después de la exposición de LPS o LTA.

Citocina	Tratamiento	Controles	Cirróticos	Valor P
IL-1 β	LPS	+ 71.5%	+ 42.1%	<0.30
	LTA	+ 2.9%	+ 19.6%	<0.07**
IL-6	LPS	+ 51.4%	+ 63.9%	<0.64
	LTA	+ 3.2%	+ 15.4%	<0.05*
IL-10	LPS	+ 1,106.5%	+ 1,451.6%	<0.90
	LTA	+ 19.4%	+ 170.0%	<0.77
IL-12	LPS	+ 1,894.6%	+ 2,064.0%	<0.60
	LTA	+ 22.7%	+ 117.0%	<0.22
TNF- α	LPS	+ 771.1%	+ 474.1%	<0.69
	LTA	+ 36.1%	+ 83.3%	<0.04*

*Diferencia con el valor de no-exposición (NE) (considerado como una referencia o del 100%). Un valor negativo refleja una disminución, un valor positivo refleja un aumento. *P<0.05 Significancia estadística, **P<0.10 Tendencia a la significancia, obtenida por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

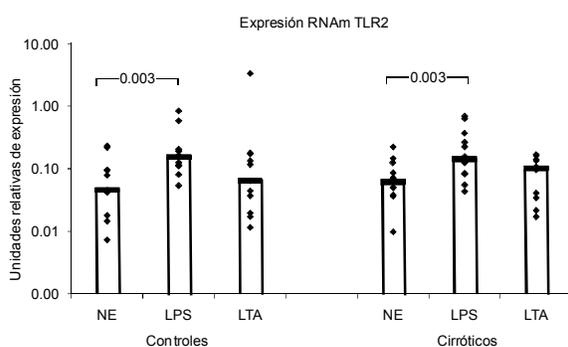
7.3.3 Expresión RNAm CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α .

La expresión de genes de PBMC NE de controles vs. cirróticos fue similar, TLR2 [0.05 (0.01-0.23) vs. 0.06 (0.01-0.23), P<0.71], IL-1 β [7.88 (1.91-33.91) vs. 6.85 (1.43-21.36), P<0.76], IL-12 [0.04 (0.01-0.09) vs. 0.05 (0.02-0.19), P<0.10], TNF- α [5.37 (1.94-23.53) vs. 7.79 (2.84-21.33), P<0.31]. Los genes de CD14, TLR4, IL-6 e IL-10 no mostraron amplificación (Gráfica 4).

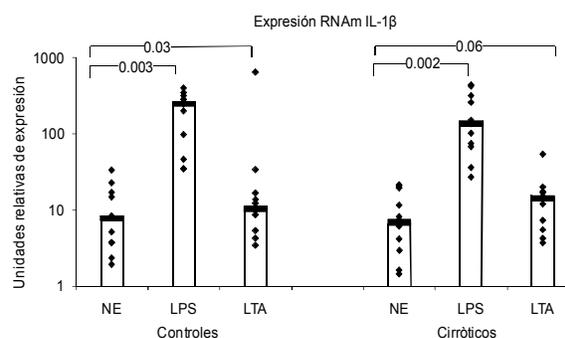
Después de la exposición a LPS, la expresión de genes fue significativamente mayor en comparación al valor NE correspondiente, tanto para el grupo de controles, TLR2 [0.16 (0.05-0.85) vs. 0.05 (0.01-0.23), P<0.003], IL-1 β [243.10 (34.43-402.0) vs. (7.88 (1.91-33.91), P<0.003], TNF- α [21.64 (10.33-37.08) vs. 5.37 (1.94-23.53), P<0.003], como para el grupo de cirróticos, TLR2 [0.14 (0.04-0.70) vs. 0.06 (0.01-0.23), P<0.003], IL-1 β [136.80

(26.91-439.60) vs. 6.85 (1.43-21.36), $P<0.002$], TNF- α [16.20 (6.48-32.88) vs. 7.79 (2.84-21.33), $P<0.01$]. En el grupo de controles, IL-12 solo presentó tendencia, en comparación al valor NE correspondiente [0.05 (0.01-0.22) vs. 0.04 (0.01-0.09), $P<0.09$], el grupo de pacientes cirróticos no presentó cambio importante, [0.04 (0.02-0.18) vs. 0.05 (0.02-0.19), $P<0.67$] (Gráfica 4).

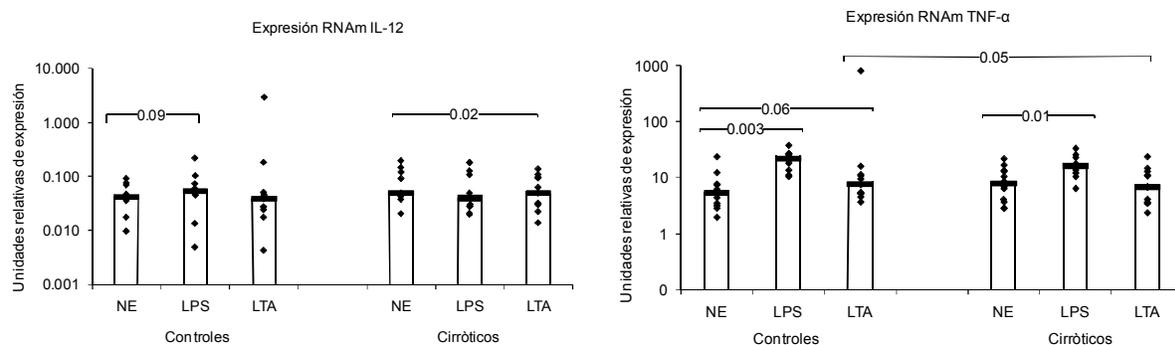
De acuerdo a la exposición con LTA, la expresión de genes fue significativamente mayor en comparación al valor NE correspondiente, para el grupo de controles de acuerdo a IL-1 β [10.22 (3.42-655.6) vs. (7.88 (1.91-33.91), $P<0.03$], observándose una tendencia para TNF- α [7.50 (3.64-804.70) vs. 5.37 (1.94-23.53), $P<0.06$]. TLR2 [0.06 (0.01-3.39) vs. 0.05 (0.01-0.23), $P<0.72$] e IL-12 [0.04 (0.004-2.95) vs. 0.04 (0.01-0.09), $P<0.48$], no presentaron cambios importante. Para el grupo de cirróticos, la expresión de genes fue significativamente mayor en comparación al valor NE correspondiente, de acuerdo a IL-12 [0.05 (0.01-0.14) vs. 0.05 (0.02-0.19), $P<0.02$], observándose tendencia con IL-1 β [14.09 (3.65-54.23) vs. 6.85 (1.43-21.36), $P<0.06$], no se observó diferencia significativa en TLR2 [0.10 (0.02-0.17) vs. 0.06 (0.01-0.23), $P<0.27$], ni en TNF- α [6.79 (2.39-23.56) vs. 7.79 (2.84-21.33), $P<0.64$] (Gráfica 4).



a)



b)



c)

d)

Gráfica 4. Expresión de RNAm de PBMC de controles y pacientes cirróticos bajo condiciones de no-exposición (NE), LPS o LTA. a) TLR2, b) IL-1 β , c) IL-12, d) TNF- α . Valor expresado en unidades de expresión relativa. La barra representa los valores de Mediana. P<0.05 Significancia estadística, P<0.10 Tendencia a la significancia, obtenidas por la prueba de rangos señalados de Wilcoxon (NE vs. LPS y/o LTA) y la prueba de U de Mann-Whitney (Controles vs. Cirróticos).

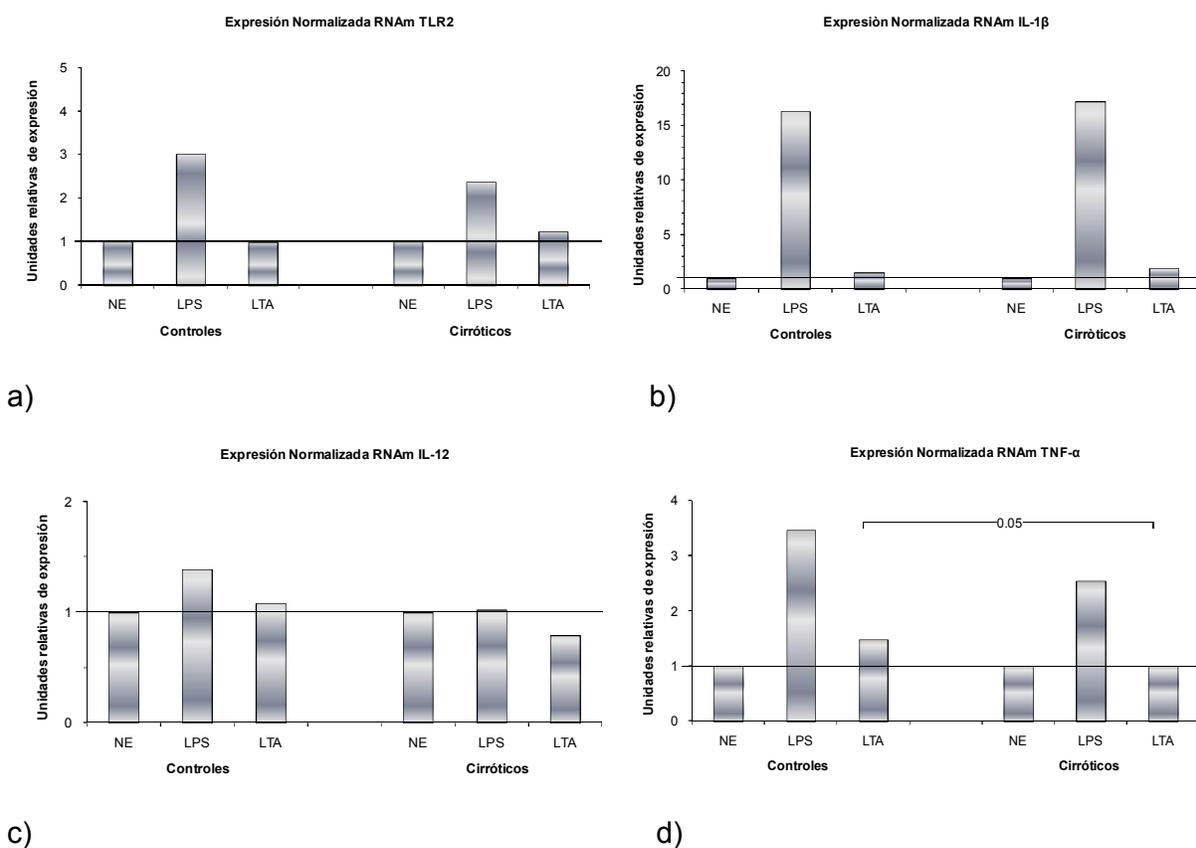
Tomando los valores de NE como referencia, la mediana de diferencia relativa en la expresión de genes entre la exposición a LPS o LTA y NE, tendió a ser positiva, un aumento. Alcanzando solo significancia estadística en TNF- α bajo la exposición con LTA (P<0.05) (Tabla 8).

Tabla 8. Diferencia* relativas de mediana de la expresión de RNAm de PBMC de controles y pacientes cirróticos después de la exposición de LPS o LTA.

Gen	Tratamiento	Controles	Cirróticos	Valor P
TLR2	LPS	+ 3.0%	+ 2.4%	<0.20
	LTA	+ 1.0%	+ 1.2%	<1.00
IL-1 β	LPS	+ 16.3%	+ 17.3%	<0.90
	LTA	+ 1.5%	+ 1.9%	<0.76
IL-12	LPS	+ 1.4%	+ 1.0%	<0.11
	LTA	+ 1.3%	+ 0.7%	<0.25
TNF- α	LPS	+ 3.4%	+ 2.5%	<0.12
	LTA	+ 1.5%	+ 1.0%	<0.05*

*Diferencia con el valor de no-exposición (NE) (considerado como una referencia o del 100%). Un valor negativo refleja una disminución, un valor positivo refleja un aumento. *P<0.05 Significancia estadística, obtenida por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

La expresión relativa/normalizada de genes por PBMC NE de controles vs. cirróticos fue similar. Con la exposición a LPS se observó un aumento de la expresión con TLR2, IL-1 β , y TNF- α en ambos grupos, IL-12 solo presentó aumento en el grupo de controles. En relación a la exposición de LTA, se observó un aumento de TLR2 solo en el grupo de pacientes cirróticos y en ambos grupos de IL-1 β , siendo mayor en el grupo de pacientes cirróticos. IL-12 y TNF- α , presentaron un aumento en el grupo de controles, siendo significativo solamente en TNF- α ($P < 0.05$) (Gráfica 5).



Gráfica 5. Expresión Normalizada de RNAm de PBMC de controles y pacientes cirróticos bajo condiciones de no-exposición (NE), LPS o LTA. a) TLR2, b) IL-1 β , c) IL-12, d) TNF- α . Valor en unidades de expresión relativa. La barra representa los valores de Mediana. $P < 0.05$ Significancia estadística, obtenida por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

8. Discusión

8.1 Expresión de CD14, TLR2 y TLR4

La importancia de conocer los procesos que involucra la fisiopatología hepática radica en que hoy en día, la cirrosis hepática ocupa el 5to lugar dentro de las primeras causas de mortandad en México. Los pacientes cirróticos cursan episodios de endotoxemia, misma que se ha atribuido a la translocación bacteriana y a la depuración hepática disminuida. El papel tanto de las bacterias gram (-) como gram (+) y la respuesta inmune en este tipo de pacientes, es de relevancia para el entendimiento de los procesos celulares hepáticos, así como las implicaciones terapéuticas que ayuden a desarrollar terapias coadyuvantes en el tratamiento de la cirrosis.

Las células mononucleares de los pacientes cirróticos presentaron mayor expresión intracelular de CD14 que los controles ($P \leq 0.04$), lo cual sugiere que en estos pacientes existe un reservorio intracelular de CD14. Los episodios de endotoxemia, así como de propensión a infecciones conllevan a una mayor capacidad o sensibilidad de los pacientes cirróticos para reconocer ligandos bacterianos, lo cual puede ser a través de los TLRs. Se observó que la expresión de los TLRs 2 y 4 fue mayor a nivel intracelular que extracelular en ambos grupos, esto soporta la idea de un recambio constante de receptores, dado por una reorganización de la membrana plasmática y una internalización de receptores para ser reciclados a la superficie (Triantafilou et al, 2004), así como la existencia de reservorios en compartimentos intracelulares (Hornef et al, 2002). La presencia constitutiva del CD14 localizada en balsas lipídicas sustenta la diferencia de distribución de CD14 con respecto a los TLRs, que comúnmente son reclutados después de la estimulación o activación (Triantafilou et al, 2006).

De acuerdo a resultados previos, se demostró que la expresión membranal de CD14 en PBMC de pacientes cirróticos se incrementó en presencia de LPS o LTA, a diferencia de la expresión membranal de TLR2 y 4, la cual disminuyó. Esta

observación sugiere que el TLR2 y el TLR4 al reconocer ligandos bacterianos se internalizan, lo que fue determinado por la expresión extra- e intracelular de TLRs 2 y 4 en PBMC de pacientes cirróticos sometidos a un estímulo con LPS o LTA.

En relación a la expresión de CD14, los resultados de este estudio fueron similares a los obtenidos en el estudio previo, en el cual la exposición a LPS o LTA incrementaron la expresión extracelular de CD14 tanto en pacientes cirróticos como en controles. Por el contrario, en este estudio, la expresión intracelular del CD14 disminuyó en pacientes cirróticos ($P \leq 0.02$). Esta diferencia en el sentido de la respuesta, nos sugiere la presencia de un sistema de regulación activado por el estímulo con ligandos bacterianos.

El proceso de internalización de receptores no se observó, sin embargo estudios como la microscopía confocal y un número mayor de pacientes, podrían confirmar esta hipótesis.

Cabe señalar que en términos de magnitud, la expresión membranal tanto extra- como intracelular de CD14 en PBMC en respuesta a ligandos bacterianos de pacientes cirróticos es mayor en comparación al grupo control, esto es debido probablemente a la presencia de un estado de hiperactivación condicionado por la exposición crónica a microorganismos y sus productos, por lo que estudios de cinética de exposición a ligandos bacterianos esclarecerían esta hipótesis.

En cuanto al TLR2 los resultados de este estudio fueron diferentes a los obtenidos en un estudio previo, dado que no se observó el mismo patrón de respuesta; la expresión extra- e intracelular aumento, principalmente con LPS en el grupo de cirróticos, siendo significativo solo en la expresión intracelular vs. NE ($P \leq 0.015$) y vs. controles ($P \leq 0.015$). Se sabe que el LPS es capaz de inducir la producción de mediadores inflamatorios como IL-1, TNF- α e IL-6 de forma sistémicas, los cuales han demostrado tener un efecto modulador directamente proporcional sobre TLR2 en sepsis a estímulos bacterianos (Bornstein et al, 2004), lo cual sugiere que el aumento observado en la expresión extra e intracelular de TLR2 por el LPS en PBMC de pacientes cirróticos fue regulado por las concentraciones plasmáticas

elevadas de los mediadores inflamatorios en los pacientes cirróticos, principalmente la IL-6 ($P \leq 0.002$).

Es importante señalar, que el LTA, ligando aparentemente específico del TLR2, no indujo ese cambio. La presencia del polimorfismo Arg753Gln en el gen de TLR2, se ha asociado a una reducción de respuesta a infecciones por Gram (+), especialmente en choque séptico por staphylococcus (Cook et al, 2004). El estudio de la presencia de este polimorfismo es en pacientes con cirrosis criptogénica o alcohólica, etiologías que predominan en nuestra estudio, nos ayudaría a entender estos resultados.

Por otro lado, la expresión de TLR4 extra- e intracelular disminuyó con ambos estímulos en PBMC de pacientes cirróticos, solo la expresión extracelular con LTA presentó tendencia a la significancia ($P \leq 0.07$). Esta disminución se explica como consecuencia a una exposición crónica al LPS, lo cual induce una regulación negativa del TLR4, generando una sensibilidad disminuida a este ligando (Hornef y col, 2002). La inhibición de la presencia del TLR4 en la superficie celular de la membrana se ha postulado como mecanismo de tolerancia al LPS (Nomura et al, 2000; Testro y Visvanathan, 2009). De acuerdo a un estudio realizado por Hornef et al, 2002, la determinación de altas concentraciones de TLR4 en compartimentos citoplasmáticos, como el aparato de Golgi, confirmarían esta hipótesis. Así como estudios específicos de tolerancia en PBMC de pacientes cirróticos.

Se sabe que el CD14 y el TLR4 actúan de manera conjunta en el reconocimiento del LPS, sin embargo el incremento de CD14 y disminución de TLR4 indican que otros componentes pueden influenciar de manera importante la expresión del CD14. Por ejemplo, se sabe que la lipoproteína de alta densidad (HDL) es capaz de regular negativamente la expresión del CD14 en monocitos (Galbois et al, 2009). Bajas concentraciones de HDL explicarían el incremento de la expresión de CD14 observada en PBMC de pacientes cirróticos. Es probable que la

determinación y correlación de esta molécula en pacientes cirróticos confirmen esta observación.

Riordan et al, 2003 determinaron que en pacientes cirróticos, estadio Child-pugh C, la expresión de TLR4 en monocitos es regulada negativamente, mientras que la expresión de TLR2 es equivalente a la de controles. En este estudio el grupo de pacientes cirróticos presentó en su mayoría estadio child-pugh B, observándose un decremento en la expresión extra- e intracelular de TLR4. El estadio de daño en los pacientes cirróticos determina la dirección de la respuesta, así como la presencia de una regulación hacia una inflamación crónica (Testro et al, 2010).

La respuesta aparentemente opuesta del TLR2 vs TLR4 se explica por medio de la existencia de vías de señalización individuales para cada TLR que conllevan a las diferentes respuestas biológicas obtenidas por diferentes ligandos (Triantafyllou et al, 2004). Una deficiencia de TLR2/4 superficiales puede ser compensada por señalización a través de TLRs intracelulares, logrando cierta complementariedad y sinergismo entre receptores de superficie y TLRs endosomales (Rad et al, 2009). Se ha indicado que aunque ciertos TLRs presentan mecanismos independientes y distintos de expresión, siguen vías de activación intracelulares similares (Khan et al, 2007).

Cabe señalar que la expresión de receptores en PBMC en este estudio se representó en términos de porcentaje de fluorescencia (% de fluorescencia o de células marcadas), otros estudios han representado este valor en términos de intensidad media de fluorescencia (MIF) (Gratama et al, 1998; Mao et al, 2005; Schaaf et al, 2009). De acuerdo al análisis en términos de MIF, nuestro estudio arrojó los siguientes hallazgos: disminución significativa de expresión extracelular de CD14 por LTA en el grupo de cirróticos, así como diferencia significativa de los no expuestos (NE) a la expresión intracelular de TLR2 entre grupos (Anexo). Sin embargo, la tendencia a la disminución de expresión extracelular de TLR4 en pacientes cirróticos, en respuesta al LTA, se mantuvo ($P < 0.09$) (Anexo).

Las diferencias de interpretación en la expresión de receptores radican en que en un caso se refiere al número de células que expresan el receptor (% Fluorescencia), y en el otro, a la cantidad de receptores expresados por célula (MIF), ambos parámetros reflejan el estado de maduración o de funcionalidad, siendo complementaria la información que revelan. El % de Fluorescencia, es un parámetro útil e informativo, siempre y cuando se cuente con una población homogénea, con una distribución de fluorescencia capaz de discriminar entre poblaciones positivas y negativas. Por otro lado, la MIF dada por el número de receptores en la célula, se determina en función de la densidad del receptor y depende del conjugado fluorocromo-anticuerpo (Borowitz et al, 1997).

8.2 Secreción IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α .

La concentración plasmática elevada de citocinas inflamatorias como IL-6, IL-12 e IL-10 en los pacientes cirróticos refleja una hiperactivación de estos pacientes. Pese a que otras citocinas como IL-1 β no se encontraron incrementadas o como el TNF- α que presentó concentraciones por debajo del mínimo de detección. Lo cual pudo deberse a que el TNF- α posee una vida media corta (Márquez et al, 2009) y es secretado principalmente durante picos repetitivos de endotoxemia, seguidos de periodos de degradación por proteasas plasmáticas, como la elastasa de neutrófilos, la cual se ha encontrado elevada en cirrosis (Baehr et al, 2000).

Se ha reportado que el perfil y concentraciones circulantes de citocinas puede variar de acuerdo a la etiología, Khoruts et al, 1991 reportaron concentraciones plasmáticas elevadas de TNF- α , IL-1 α e IL-6 en un 50% de pacientes con cirrosis alcohólica estable y no detectando IL-1 β . Mientras que Tilg et al, 1992 observaron concentraciones séricas elevadas de IL-1 β y TNF- α en infección por VHB (Virus de la Hepatitis B) y VHC crónica. En nuestro estudio, la etiología predominante fue la cirrosis criptogénica, la cual se considera una cirrosis de origen no definido. La esteatohepatitis no alcohólica (NASH), se considera la enfermedad subyacente en el 30-70% de pacientes con este tipo de cirrosis, así como la obesidad o

diabetes, excluyendo virus, alcohol y alteraciones autoinmunes (Parra et al, 2005). La IL-6 y el TNF- α , principalmente, se consideran citocinas involucradas en respuesta de fase aguda, así como también en metabolismo de lípidos, por lo que se consideran citocinas importantes en el desarrollo de esteatosis (Parra et al, 2005). Esto justificaría el aumento significativo de estas citocinas en pacientes con cirrosis criptogénica.

El estímulo de PBMC de pacientes cirróticos con LPS o LTA indujo un aumento significativo en la producción de IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α . Lo cual se ha observado en trabajos previos (Tazi et al, 2009; Testro et al, 2009). Sin embargo, la IL-10 sólo incrementó significativamente con LPS, se considera al LPS un ligando con mayor potencia que el LTA para inducir la activación celular, traducida en incremento en la producción de citocinas inflamatorias. El hecho de que el LPS, y no el LTA, indujeran un aumento importante de la IL-10 por PBMC de pacientes cirróticos, confirma que los pacientes cirróticos presentan una respuesta anti-inflamatoria fuerte, y requieren de un estímulo “mayor” para inducir citocinas pro-inflamatorias.

Por otro lado, solo el TNF- α y la IL-12 presentaron diferencias significativa tanto con LPS, como con LTA en ambos grupos, lo cual confirma la capacidad de la célula para responder a infecciones bacterianas producidas por bacterias Gram (-) y Gram (+).

Cabe señalar, que el estímulo de LTA fue capaz de incrementar la producción de citocinas inflamatorias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) en PBMC de pacientes cirróticos, lo cual indica que estímulos de bacterias gram (+) son capaces de estimular la producción de citocinas en células de estos pacientes de manera importante, alentando la idea de que terapias y/o co-tratamientos con probióticos, bacterias gram (+), en cirrosis podrían inmunomodular la respuesta, lo cual podría beneficiar a los pacientes. Sin embargo, se requieren de más estudios para sustentarlo.

8.3 Expresión de RNAm de CD14, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α .

Para conocer las diferencias de expresión de citocinas y receptores a nivel transcripcional se llevó a cabo el análisis de los RNAm. En la expresión ex vivo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para los transcritos de TLR2, IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α . La expresión de los RNAm de los genes de CD14, TLR4 e IL-10 fue prácticamente nula, detectándose solo en un rango de 1-5 pacientes (datos no mostrados). Esto nos indica que la producción basal incrementada de citocinas inflamatorias por PBMC de pacientes cirróticos en comparación al grupo control no está regulada a nivel transcripcional. Se sugiere que la regulación podría ser post-traducciona, induciéndose este aumento de citocinas inflamatorias en PBMC de pacientes cirróticos.

El estímulo con LPS induce un aumento en el RNAm de TLR2 en PBMC de cirróticos y controles con respecto a los no tratados, estos resultados son apoyados por un estudio donde se observó que el estímulo de monocitos/macrófagos humanos con LPS aumentó significativamente la expresión de TLR2 (O'Mahony et al, 2008), este efecto también se ha observado en modelos murinos (Maris et al, 2006; Sweet et al, 2001). Estos resultados indican una regulación a nivel transcripcional, lo cual indica que en la cirrosis esta regulación aún permanece. Por otro lado, la expresión de los transcritos de CD14 y TLR4 fue prácticamente nula, observándose sólo en dos pacientes.

El hecho de que no se haya detectado expresión de transcrito de TLR4 en la mayoría de los pacientes incluidos puede deberse a las diferentes condiciones de estimulación, como a las cinéticas de expresión que pudiese presentar el transcrito de TLR4 (Medvedev et al, 2000; Nomura et al, 2000). En modelos murinos, se ha especulado una cierta "cooperación" entre TLR2 y TLR4, siendo esencial para el primer contacto con la bacteria gram-negativa. Se sabe que el TLR2 se induce después, por señalización del TLR4, siendo el segundo receptor del LPS que

ayuda a la respuesta inmune contra bacterias (Matsuguchi et al, 2000; Spiller et al, 2008).

De acuerdo a la expresión transcripcional de las citocinas, el estímulo con LPS y LTA aumenta la expresión de IL-1 β en pacientes cirróticos, siendo este aumento significativo, lo cual concuerda con la producción de proteína de IL-1 β . La IL-12 incrementó significativamente en PBMC de cirróticos con LTA, lo cual confirma la regulación de IL-12 en infecciones bacterianas por bacterias gram (+) a nivel de transcrito y proteína. Finalmente, el TNF- α es regulado positivamente por el LPS en PBMC de pacientes cirróticos, tanto a nivel transcripcional, como a nivel de proteína, no así con el LTA.

En cuanto a la regulación de TNF- α por LTA se observó una menor expresión en pacientes cirróticos a nivel transcripcional y una mayor producción en pacientes cirróticos, pero a nivel de producción de proteína. Esto sustenta el papel de bacterias gram(+) como co-tratamiento en cirrosis, ya que se muestra que pueden modular a nivel de RNAm la respuesta inflamatoria de cirrosis. Se ha descrito que el RNAm de TNF- α es substancialmente sobrerregulado en células nativas tratadas con ligandos de TLR2 y LPS (Long et al, 2009), y a su vez es capaz de sobrerregular la expresión génica del TLR2 (Matsuguchi et al, 2000). Cabe mencionar que las citocinas pro-inflamatorias son capaces de controlar la expresión proteica de los TLRs en la superficie celular e intracelular, a través de regulación de vías inhibitorias de RNAm, traducción y procesos post-traduccionales (O'Mahony et al, 2008). La expresión del RNAm de la IL-6 solo se detectó con el estímulo de LPS

De acuerdo a Well et al, 2005, se ha descrito que el RNAm que codifica para citocinas y algunos factores de transcripción de respuesta temprana se inducen transitoriamente, seguidos de una rápida declinación. La producción de IL-10 se considera una citocina de respuesta tardía, lo cual explica su ausencia en la detección a nivel de RNAm. Una cinética de expresión de RNAm de los genes no detectados ayudaría a comprender y a explicar este fenómeno.

Con respecto a la expresión de TLRs y el grado de daño en los pacientes cirróticos, se ha mostrado su importancia en relación a la respuesta (Riordan et al, 2003; Galbois et al, 2009) así como la relación entre el grado de daño y expresión de TLR4 (Bosisio et al, 2002). Sin embargo, la relación con la etiología no está sustentada, sugiriendo que factores diferentes de las causas de cirrosis son responsables de la regulación diferencial de TLR2 y TLR4 en PBMC de pacientes con cirrosis hepática (Bosisio et al, 2002). En este estudio no se detectó una relación entre grado de daño y/o la etiología, por lo que un aumento de número de pacientes podría confirmar la presencia o no de esta relación.

Una regulación positiva en la expresión del transcrito puede representar un mecanismo compensatorio en la interacción parcial del ligando (Bosisio et al, 2002). Así como eventos de “splicing alternativo” pueden regular la producción de formas solubles de proteínas unidas a la membrana y a receptores, controlando la capacidad de un microambiente celular para responder a un ligando en particular (Wells et al, 2005).

No se debe excluir el papel de otras moléculas en el proceso de reconocimiento del LPS (Hornef et al, 2003), como por ejemplo la proteína de choque térmico Gp96, la cual de manera extracelular ha demostrado que ejerce una alta actividad inmuno-estimuladora e induce la secreción de las citocinas y la regulación positiva de moléculas estimuladoras, como CD40, CD80, CD86 y CD91. Hornef et al, 2003 ha descrito la relación del proceso de ensamble del LPS y el TLR4 y MD2. Así también, se debe considerar el estudio de mecanismos moleculares de traducción de señales involucrados en el fenómeno de tolerancia, como por ejemplo, la alteración de componentes de señalización que llevan a la translocación de NF- κ B y moléculas, tales como IRAK-1, I κ B α , I κ B β y MD2, en macrófagos tolerantes al LPS (Dobrovolskaia y col, 2003, Nomura y col, 2000), lo cual podría permitir un mejor entendimiento de la respuesta del hospedero y su regulación (Zweigner y col, 2001).

9. Conclusión

9.1 Conclusiones Parciales

PBMC de pacientes cirróticos presentan un estado de hiperactivación (Figura 1) traducido principalmente en concentraciones plasmáticas mayores de citocinas inflamatorias, IL-6, IL-10 e IL-12.

La exposición a ligandos bacterianos, específicamente LPS, de las PBMC de pacientes cirróticos induce una disminución de la expresión intracelular de CD14, así como un aumento de la expresión intracelular del TLR2 con respecto a los no estimulados. El TLR4 tiende a disminuir su expresión extracelular cuando se estimulan las células con LTA. El LPS es capaz de inducir una diferencia de expresión intracelular del TLR2 (Figura 2). Estas diferencias de respuesta deberán confirmarse con un número mayor de pacientes, así como estudios más precisos que ayuden a explicar y dilucidar el mecanismo de reconocimiento e internalización de ligandos bacterianos en PBMC de pacientes cirróticos.

La secreción de citocinas inflamatorias, IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α , por PBMC de pacientes cirróticos aumentó significativamente después de la exposición a LPS o LTA. La IL-10 solo presentó diferencia significativa con LPS. La magnitud de respuesta es mayor con LPS, sin embargo, la respuesta entre pacientes cirróticos y controles indica que sólo el LTA fue capaz de inducir una producción significativa diferencial para IL-6, TNF- α y tendencia para IL-1 β (Figura 2). El LPS se considera un potente activador celular, sin embargo, ligandos de bacterias gram (+) son capaces de inducir una activación de respuesta diferencial en pacientes cirróticos, el uso de probióticos como terapia inmunomoduladora en cirrosis es alentador y requiere de estudios más detallados para confirmarlo.

La expresión del RNAm de TLR2, TNF- α , IL-12 e IL-1 β , sugiere que el transcrito de TLR2 y TNF- α son inducidos por LPS y el de IL-12 por LTA. Sin embargo, el transcrito de IL-1 β parece ser inducido por ambos estímulos. Sólo el LTA indujo

una disminución significativa del transcrito de TNF- α (Figura 2). Se sugiere que la producción de citocinas por PBMC de pacientes cirróticos está regulada a nivel transcripcional inducida por ligandos bacterianos. La disminución de la expresión transcripcional de TNF- α por efecto del LTA en PBMC de pacientes cirróticos apoya la existencia de mecanismos de regulación y homeostasis presentes en enfermedades crónicas hepáticas.

El estudio de la cirrosis en relación a activación con ligandos bacterianos, en términos de receptores y citocinas a diferentes niveles, membranal, intracelular, transcripcional y de proteína no se había estudiado en conjunto y a profundidad. La sugerencia de la existencia de mecanismos de regulación en cirrosis, alienta al estudio y desarrollo de terapias y co-tratamientos contra enfermedades crónicas hepáticas.

9.2 Conclusión final

PBMC de pacientes cirróticos presentan un estado de hiperactivación. La exposición de PBMC de pacientes cirróticos a ligandos bacterianos es capaz de activar la producción de citocinas inflamatorias, así como su regulación a nivel transcripcional. El aumento del tamaño de muestra, así como otros estudios ayudarán a explicar y dilucidar los mecanismos de reconocimiento e internalización de ligandos bacterianos en PBMC de pacientes cirróticos.

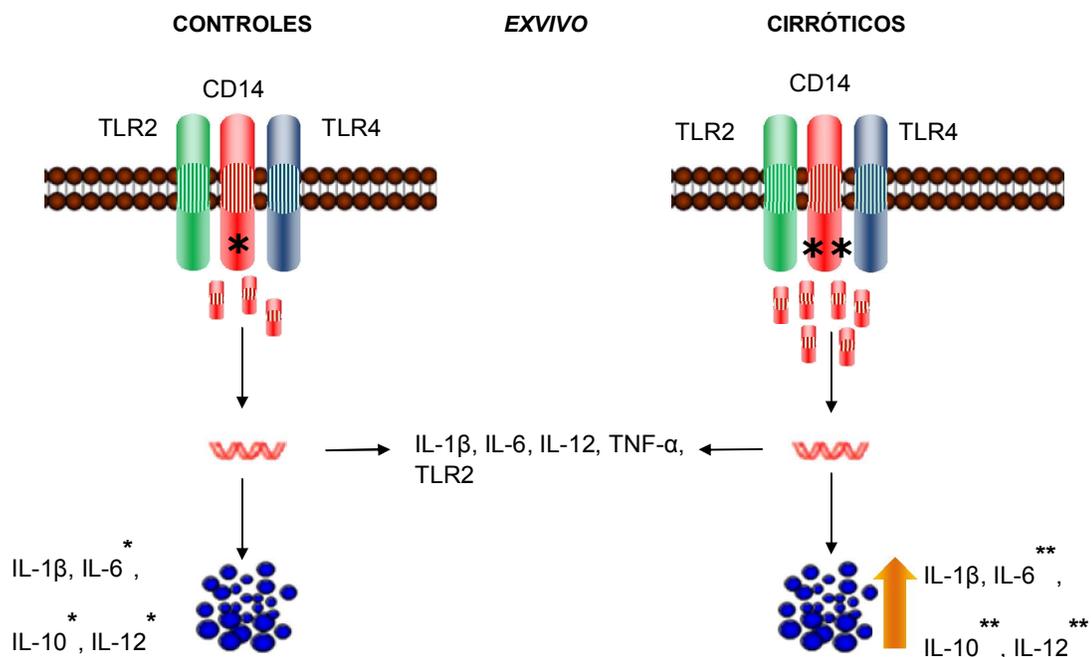


Figura 1. Expresión *ex vivo* de receptores y mediadores por PBMC de pacientes cirróticos vs controles. La expresión intracelular del CD14 en cirróticos es mayor significativamente que en controles. La expresión a nivel transcripcional no es diferente entre cirróticos y controles. La producción de citocinas inflamatorias es mayor en cirróticos que en controles. */** diferencia significativa entre grupos, controles vs. cirróticos

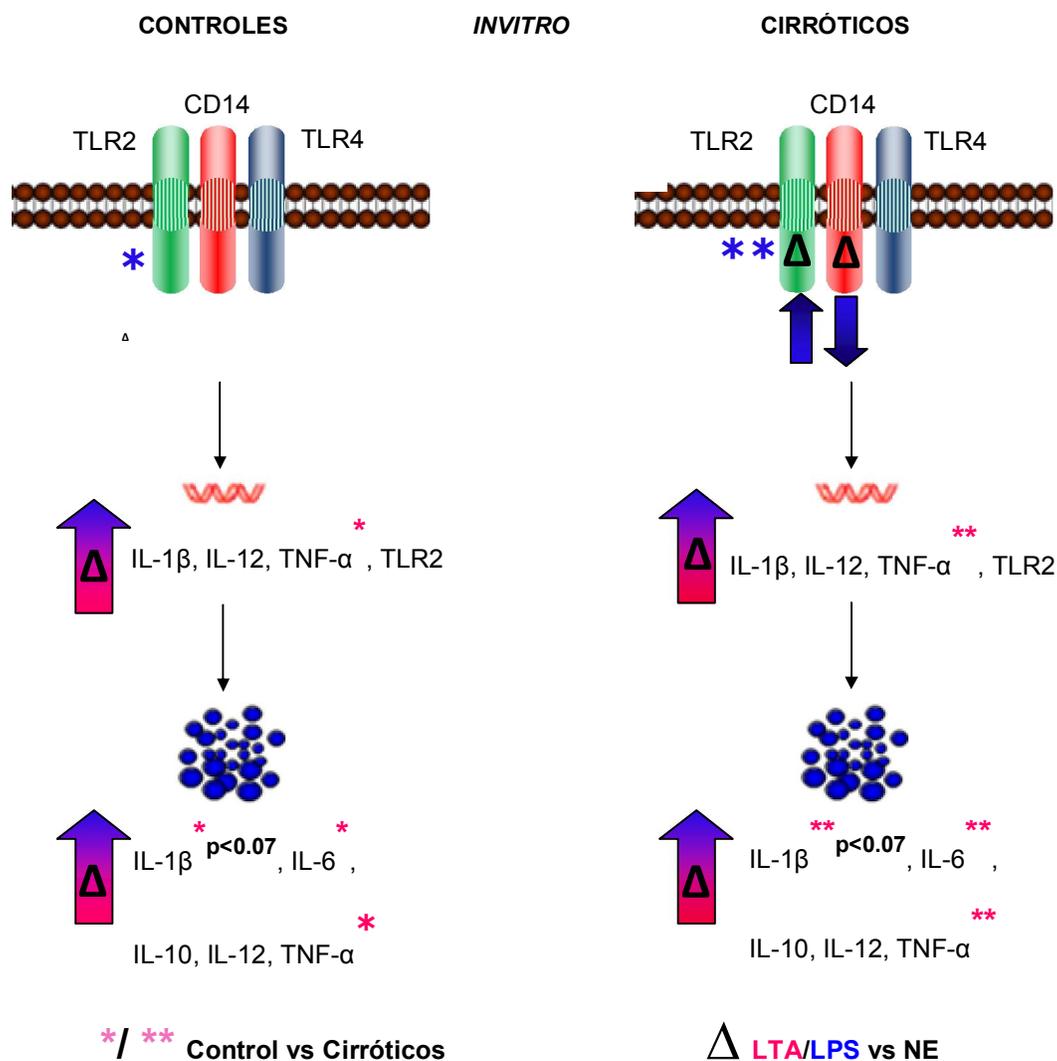


Figura 2. Expresión *in vitro* de receptores y mediadores por PBMC de pacientes cirróticos vs controles. Con la exposición a LPS, la expresión intracelular del CD14 disminuye, mientras que la de TLR2 aumenta vs. NE (no estímulo) en PBMC de pacientes cirróticos. A su vez, la expresión intracelular de TLR2 es mayor en cirróticos. La expresión a nivel transcripcional tiende a aumentar con el estímulo de LPS o LTA en ambos grupos, siendo significativo vs NE. TNF-α fue significativamente mayor en cirróticos vs. controles. La producción de citocinas aumenta significativamente con LPS o LTA en ambos grupos vs NE, la producción de IL-1β, IL-6 y TNF-α es mayor significativamente en cirróticos. */** diferencia significativa entre grupos, controles vs. cirróticos. Δ LTA/LPS vs NE diferencia significativa entre estímulo, LPS o LTA y no estimulado, NE.

10. Bibliografía

- Almeida J, Galhenage S, Yu J, Kurtovic J, Riordan SM. Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12(10):1493-1502
- Baehr Vv, Döcke WD, Plauth M, Liebenthal C, Küpferling S, Lochs H, Baumgarten R, Volk HD. Mechanisms of endotoxin tolerance in patients with alcoholic liver cirrhosis: role of interleukin 10, interleukin 1 receptor antagonist, and soluble tumour necrosis factor receptors as well as effector cell desensitization. *Gut* 2000; 47:281-287.
- 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.
- Bornstein SR, Zacharowski P, Schumann RR et al. Impaired adrenal stress response in Toll-like receptor 2-deficient mice. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 16695–700.
- Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, Melnick S, Parker JW, Picker L, Stetler-Stevenson M. U.S-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic Neoplasia by flow cytometry: data analysis and interpretation. *Cytometry* 1997; 30:236-244.
- 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- γ : 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.
- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 975–9.
- Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TM, Frøkiaer H. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a

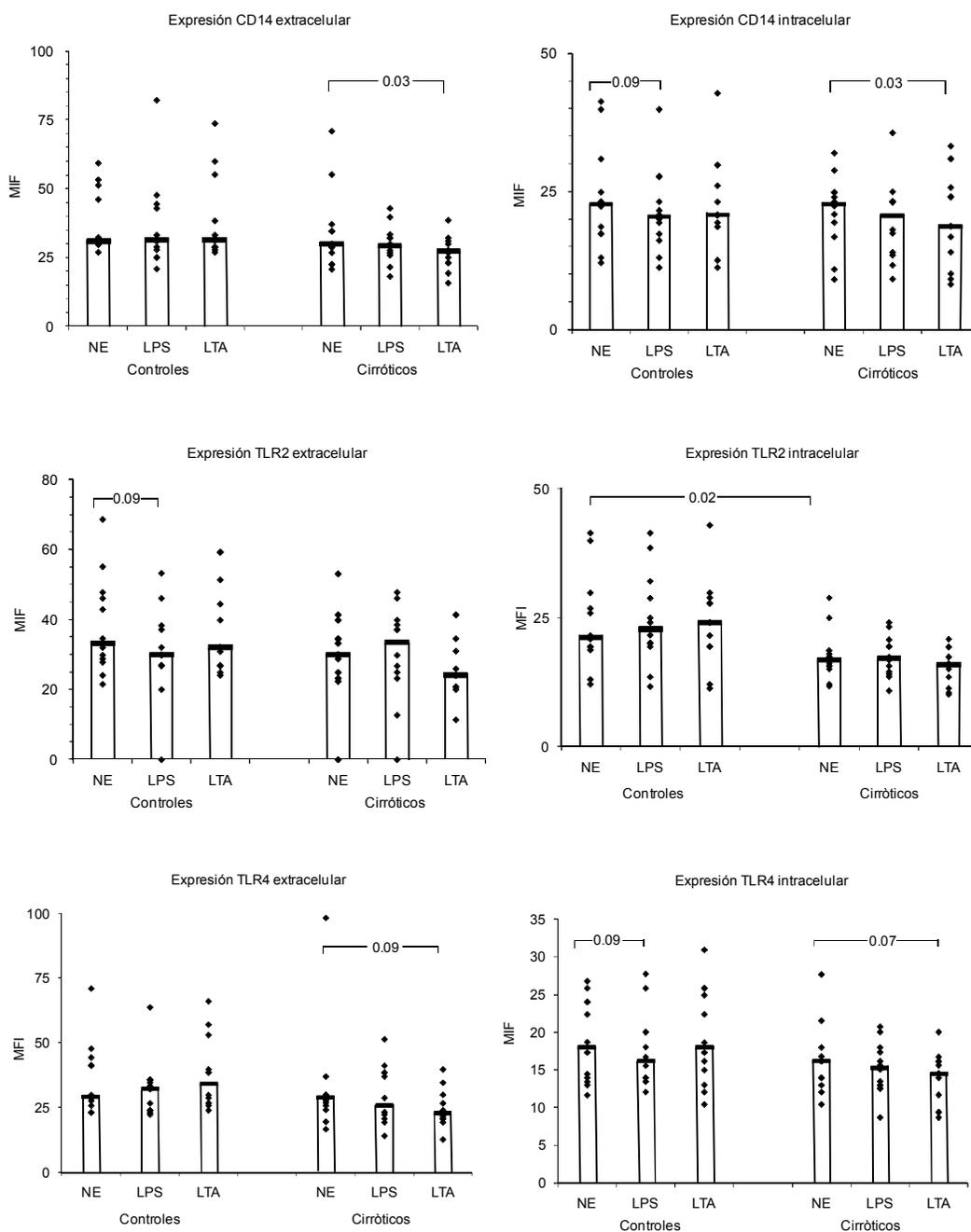
- comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *J Immunol Methods*. 2009; 340(2):95-101.
- Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN. Induction of in vitro reprogramming by toll-like receptor TLR2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF- κ B signaling pathway components. *J Immunol* 2003; 170:508-519.
 - Draing C, Sigel S, Deininger S, Traub S, Munke R, Mayer C, Hareng L, Hartung T, Aulock Sv, Hermann C. Cytokine induction by gram-positive bacteria. *Immunobiology* 2008; 213:285-296.
 - Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: role of LBP and sCD14 in mediating LPS-responses. *FASEB J* 2004; 18(10):1117-1119.
 - 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.
 - Galbois A, Thabut D, Tazi KA, et al. Ex Vivo effects of high density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology* 2009; 49:175-84.
 - Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infectious Diseases* 2002;2:171-179.
 - Gratama JW, D’hautcourt JL, Mandy F, et al. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. *Cytometry* 1998; 33: 166-178.
 - 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.
 - Iredale JP. Regulating hepatic inflammation: pathogen-associated molecular patterns take their toll. *Hepatology* 2003; 37:979-982.

- Khan S, Bijker MS, Weterings JJ, Tanke HJ, Adema GJ, Hall Tv, Drijfhout JW, et al. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *J Biol Chem* 2007;282(29):21145-21159
- 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.
- Li M, Zhou Y, Feng G, Su SB. The Critical role of toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune disease. *Curr Mol Med* 2009; 9:365-374
- Liu G, Zhang L, Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of toll-like receptors to T cells. *Clin Exp Immunol* 2010;160:168-175.
- Long EM, Millen B, Kubes P, Robbins SM. Lipoteichoic acid induces unique inflammatory responses when compared to other toll-like receptor 2 ligands. *PLoS ONE* 2009; 4(5): 1-10.
- Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, Coppel RL, Shimoda S, Ishibachi H, Gershwin ME. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 802-808.
- Maris NA, Dessing MC, de Vos AF, Bresser P, Van der Zee JS, Jansen HM, Spek CA, Van der Poll T. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *Eur Respir J* 2006; 28:622-626.
- Matsuguchi T, Musikachoen 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.
- 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.
- Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol* 2007;193:323-330.
 - Neuman MG. Mechanisms of alcoholic liver disease: cytokines. *Clin Biochem* 2001; 34:163-166.
 - Nilsen NJ, Deininger S, Nonstad U, Skjeldal F, Husebye H, Rodionov D, Aulock Sv, Hartung T, Lien E, Bakke O, Espevik T. Cellular trafficking of lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J Leukocyte Biology* 2008; 84:1-12.
 - 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.
 - O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* 2008; 5:1-8
 - Parra RI, Martínez LE, Ruíz MB, Panduro CA. Susceptibilidad genética a la cirrosis. *Investigación en salud* 2005; 7:48-54.
 - Rabehi L, Irinopoulou T, Cholley B, Haeffner-Cavaillon N, Carreno MP. Gram-positive and gram-negative bacteria do not trigger monocytic cytokine production through similar intracellular pathways. *Infect Immune* 2001; 69(7):4590-4599.
 - Rad R, Ballhorn W, Volland P, Eisenâcher K, Mages J, Rad L, et al. Extra- and Intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2009; 136(7):2247-57
 - 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.

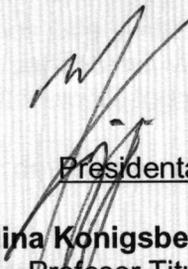
- Robbins. Patología Estructural y Funcional. Edit. Interamericana McGraw-Hill, 5ª edición. Madrid, 1996. pp. 431-432.
- Salminen S, Wright A, Morelli L. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int J Food Microbiol* 1998; 44:93-106.
- Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T, Bremen Tv, Sayk F, Dodt C, Dalhoff K, Droemann D. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagnostic Pathology* 2009, 4:12.
- Spiller S, Elson G, Ferstl R, Dreher S, Mueller T, Freudenberg M, Daubeuf B, Wagner H, Kirschning CJ. TLR4-induced IFN- γ production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *J Exp Med* 2008, 205(8); 1747-1754.
- 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.
- Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health- a review. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 2006, 5:7.
- Sweet MJ, Leung BP, Kang D, Sogaard M, Schulz K, Trajkovic V, Campbell CC, Xu D, Liew FY. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2001; 166: 6633-6639.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14.
- Tazi KA, Quioc JJ, Saada V, Bezeaud A, Lebrec D, Moreau R. Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: posible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol* 2006; 45(2):280-9.
- Tazi KA, Quioc JJ, Razek WA, Tellier Z, Guichard C, Denis EO, Lebrec D, Moreau R. Protein array technology to investigate cytokine production by monocytes from patients with advanced alcoholic cirrhosis: an ex vivo pilot study. *Hepatology Research* 2009; 39:706-715.
- Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:943-954.

- Testro AG, Gow PJ, Angus PW, Wongseelashote S, Skinner N, Markovska V, Visvanathan K. Effects of antibiotics on expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 on mononuclear cells in patients with advanced cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 52:199-205.
- Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992; 103:264-274.
- Triantafilou M, Manukyan M, Mackie A, Morath S, Hartung T, Heine H, Triantafilou K. Lipoteichoic Acid and Toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *J Biol Chem* 2004; 279(39):40882-89.
- Triantafilou M, Gamper FGJ, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafilou K. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 2006; 281(41):31002-11.
- URL:<http://www.inegi.org.mx>. INEGI/Secretaría de Salud. Principales causas de mortalidad nacional, 2007.
- Wells CA, Ravasi T, Hume DA. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *J Leukoc Biol* 2005; 78:9-13.
- Wong CK, Wong PTY, Tam LS, Li EK, Chen DP, Lam CWK. Activation profile of toll-like receptors of peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2009, 159:11-22.
- Yao XX, Jiang SL, Yao DM. Current research of hepatic cirrhosis in China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 617-622.
- 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.



“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Respuesta Inflamatoria a estímulos bacterianos por células mononucleares periféricas de pacientes cirróticos, con fecha -- de ---- del 2010”.

JURADO DE EXÁMEN



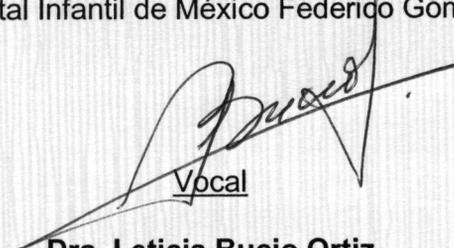
Presidenta

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



Secretaria

Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal
Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Vocal

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM-Iztapalapa



Vocal

Dr. José Sotero Delgado Domínguez
Unidad de Medicina Experimental
Hospital General de México
