



Departament de Medicina

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

**Tesis Doctoral:**

**Modelos experimentales de peritonitis bacteriana inducida en ratas con cirrosis y nuevas estrategias terapéuticas.**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE:

**Elisabet Sánchez Ardid**

Director de Tesis:

**Dr. Carlos Guarner Aguilar**

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Sevicio de Patología Digestiva, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Centro de Investigación Biomedica en Red: Enfermedades hepáticas y digestivas (CIBERehd)

Instituto de Salud Carlos III

Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

**2015**



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

Modelos experimentales de peritonitis bacteriana inducida en ratas con cirrosis y nuevas estrategias terapéuticas.

Elisabet Sánchez Ardid

**Director de Tesis:**

Dr. Carlos Guarner Aguilar

Barcelona, julio 2015.

El Dr. Carlos Guarner Aguilar, Doctor en Medicina, director del Servicio de Patología Digestiva del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau:

Certifica que la Tesis titulada: **“Modelos experimentales de peritonitis bacteriana inducida en ratas con cirrosis y nuevas estrategias terapéuticas.”** presentada por Elisabet Sánchez Ardid se ha realizado bajo su dirección y tutela, considerando que cumple los requisitos para su lectura y defensa pública.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos firmo la siguiente certificación.

Dr. Carlos Guarner Aguilar

Barcelona, Julio 2015

*A mis padres y al tato:  
porque habéis permitido siempre  
que luchara por mis sueños.*

*A Iñaki y Martina:  
por hacerme la vida tan feliz.*

# AGRADECIMIENTOS

Quería empezar esta Tesis, recordando y agradeciendo a todas aquellas personas que han hecho posible este largo camino hasta llegar aquí:

A mi director de Tesis: Carlos Guarner Aguilar, jefe del Servicio de Digestivo del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Gracias por haberme dejado ser parte de este gran equipo médico y humano y por haber apostado por la investigación básica. Gracias por compartir tus conocimientos y enseñarme tantas cosas. Por tu sencillez, proximidad y amabilidad. Por ser no solo el jefe, sino la persona cercana que eres.

A todos los miembros del grupo: A Germán, al Dr. Monés, a Cándido, a Xavi, a Adolfo, a Maria y a todos los residentes y médicos que llegaron y todavía están en Sant Pau y también a aquellos que tomaron nuevos caminos... porque me habéis hecho sentir parte de aquello que oigo hablar allá donde vaya con gran honor, o nostalgia y también con envidia: "Porque somos de digestivo de Sant Pau" y yo, una más.

A las enfermeras, que aunque yo era la chica de las ratas, me han ayudado en todo momento. Y como no, a mis dos grandes enfermeras de investigación: Eva y Cris porque simplemente sois las mejores.

A Maite, por enseñarme cuando llegué a Sant Pau todo lo que ella sabía.

A Ana, por ayudarme y estar conmigo mientras esperaba a Martina, fue todo un placer compartir esos momentos contigo.

A todos los coautores de los artículos de esta Tesis, tanto a los compañeros de Sant Pau como los del Hospital Universitario de Alicante, porque sois unas personas simplemente geniales. A las instituciones y empresas que creyeron en nuestro proyecto y lo hicieron posible.

A los miembros del estabulario presente y pasado: no solo a Antonia, Luis y Margarita, que han sido mis compañeros del día a día, sino también a cada uno de los experimentadores y cuidadores que han ido pasando. Con todos vosotros he pasado tan buenos momentos juntos... Porque el estabulario o el S.E.A, como se llama ahora, esas cuatro paredes sin ventanas que para tantos pueden parecer claustrofóbicas, para mi han sido mi casa y me he sentido en familia. Gracias por hacerme sentir tan bien acompañada en todo momento. Y un agradecimiento especial a mis ratitas, porque ellas siempre han sabido como estaba yo en todo momento. Ellas, ahí estaban cada día: Porque sin vosotras esta Tesis no habría sido posible. Gracias de verdad.

Y no quiero olvidarme de todos aquellos trabajadores de mi hospital y del ciber que me han ayudado en el día a día: los de recerca, los de la limpieza, de los gases,

los del comedor, los de traslados, los de seguridad... porque han tenido una sonrisa y unas palabras agradables siempre para mí en todo momento.

A los miembros de micro, de bioquímica, histología que me han atendido y ayudado desinteresadamente, siempre con una sonrisa y sobretodo a los de inmuno porque me han hecho sentir como uno más de su grupo.

A todas aquellas personas que he podido conocer por mi trabajo, porque allí donde fuera he conocido a gente que trabajaba en lo mismo que nosotros y que no han dudado ni un minuto en ayudarme cuando les he necesitado: a los de Alicante, a los de Alcalá, a los de Can Ruti, a los de Madrid, a los de Oviedo, a los de Valle, a los de Pamplona, a los del Clínic... y no me gustaría olvidarme a nadie pero seguro que alguien me dejó en el tintero. Ya sabéis que en Barcelona tenéis una compañera y amiga más, para lo que necesiteis.

A Ari, a Laura y a todas aquellas compañeras de la Uni que se han convertido en mis amigas y confidentes en la actualidad porque es un placer compartir la vida con gente como vosotras. Sois las mejores.

Gracias a todos aquellos que me habéis escuchado y ayudado a montar esta Tesis: A Carlos, a Germán, a Bea, a Rita, a Juan, a Silvia, a Eva, a Isabel, a Alba, a Iñaki ... porque ha sido difícil... pero gracias a vuestra ayuda, ya está aquí.

Y ya por último dar las gracias a mi familia, que han sabido valorar siempre mi trabajo y animarme a conseguir mis metas y a continuar adelante siempre. A los que ya no están, que sé que me cuidáis desde el cielo. Sobretodo a ti papa: Que ya presento la Tesis!!!! A mis tías y tíos, a mi cuñado y cuñadas (Will, Marta y el peque Alex y a Bea) y a mis suegros (Conchi e Isaac) por que desde el primer momento me hicisteis sentir una de más de vosotros. A mi hermano, a la Brigit y a los 2 peques: Ian y Roc, por ser como sois y quererme tanto sin condiciones. Y a mi mami Esmeralda, especialmente, porque yo quiero ser como tú algún día, con esa fuerza y alegría que te caracteriza.

Y como no, a Iñaki y a la peque, Martina que han sufrido mi dedicación a la Tesis estos últimos meses. Por toda su ayuda y apoyo para conseguir que esto haya salido con cara y ojos. Y por hacer que cada día a vuestro lado sea un auténtico regalo. Gracias por los besos, las caricias y cada pequeña palabra, dibujo o gesto: Hasta el infinito y más allá!!!!!!!

En definitiva: Gracias a todos aquellos que han formado parte de mi día a día y me han hecho tan feliz.

Gracias a todos.



# INDICE

---

AGRADECIMIENTOS .....	1
INDICE .....	5
ABREVIATURAS.....	9
PREFACIO .....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
<b>1. CIRROSIS .....</b>	<b>14</b>
1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LA CIRROSIS .....	14
1.2. CURSO CLÍNICO DE LA CIRROSIS Y COMPLICACIONES DE LA CIRROSIS .....	14
1.2.1. Infecciones bacterianas .....	15
1.2.2. Tipos de infecciones bacterianas en pacientes con cirrosis .....	16
1.2.3. Traslocación bacteriana .....	16
1.2.4. Peritonitis bacteriana espontánea.....	19
<b>2. ESTADO PROINFLAMATORIO EN LA CIRROSIS.....</b>	<b>21</b>
2.1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF $\alpha$ ).....	22
2.1.1. Efectos más relevantes del TNF $\alpha$ en la cirrosis hepática.....	22
2.2. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS MODULADORAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.....	23
2.3. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS MODULADORAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA CIRROSIS.....	25
<b>3. MODELOS EXPERIMENTALES DE CIRROSIS .....</b>	<b>26</b>
3.1. MODELO DE INDUCCIÓN DE CIRROSIS POR CCL <sub>4</sub> .....	27
3.2. OTROS MODELOS DE FIBROSIS Y CIRROSIS.....	29
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	30
HIPOTESIS .....	34
▪ ESTUDIO 1.....	35
<b>DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS Y PERITONITIS BACTERIANA INDUCIDA (PBI) MEDIANTE LA INOCULACIÓN INTRAPERITONEAL DE E. COLI .....</b>	<b>35</b>
▪ ESTUDIO 2 .....	35
<b>ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO ASOCIADO O NO A UN INMUNOMODULADOR ANTI-TNF<math>\alpha</math> SOBRE LA MORTALIDAD EN RATAS CIRRÓTICAS CON PBI .....</b>	<b>35</b>
OBJETIVOS .....	36

▪ ESTUDIO 1 .....	37
<b>DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS Y PERITONITIS BACTERIANA INDUCIDA (PBI) MEDIANTE LA INOCULACIÓN INTRAPERITONEAL DE E. COLI .....</b>	<b>37</b>
▪ ESTUDIO 2 .....	37
<b>ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO ASOCIADO O NO A UN INMUNOMODULADOR ANTI-TNF<math>\alpha</math> SOBRE LA MORTALIDAD EN RATAS CIRRÓTICAS CON PBI .....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
▪ ESTUDIO 1: .....	39
<b>DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS Y PERITONITIS BACTERIANA INDUCIDA (PBI) MEDIANTE LA INOCULACIÓN INTRAPERITONEAL DE E. COLI .....</b>	<b>39</b>
▪ ESTUDIO 2: .....	47
<b>ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO ASOCIADO O NO A UN INMUNOMODULADOR ANTI-TNF<math>\alpha</math> SOBRE LA MORTALIDAD EN RATAS CIRRÓTICAS CON PBI .....</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
▪ ESTUDIO 1: .....	54
<b>DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS Y PERITONITIS BACTERIANA INDUCIDA (PBI) MEDIANTE LA INOCULACIÓN INTRAPERITONEAL DE E. COLI .....</b>	<b>54</b>
Protocolo 1: Modelo de PBI en ratas con ascitis.....	54
Protocolo 2: Modelo de PBI en ratas sin ascitis .....	55
Protocolo 3. Efecto de la administración de un tratamiento antibiótico sobre la mortalidad y la respuesta de PMN en ratas cirróticas con PBI.....	57
▪ ESTUDIO 2: .....	58
<b>ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO ASOCIADO O NO A UN INMUNOMODULADOR ANTI-TNF<math>\alpha</math> SOBRE LA MORTALIDAD EN RATAS CIRRÓTICAS CON PBI .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
▪ ESTUDIO 1: .....	62
<b>DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS Y PERITONITIS BACTERIANA INDUCIDA MEDIANTE LA INOCULACIÓN INTRAPERITONEAL DE E. COLI .....</b>	<b>62</b>
▪ ESTUDIO 2: .....	63
<b>ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO ASOCIADO O NO A UN INMUNOMODULADOR ANTI-TNF<math>\alpha</math> SOBRE LA MORTALIDAD EN RATAS CIRRÓTICAS CON PERITONITIS BACTERIANA INDUCIDA .....</b>	<b>63</b>

---

COMUNICACIONES EN CONGRESOS .....	64
▪ CONGRESOS NACIONALES: .....	65
▪ CONGRESOS INTERNACIONALES: .....	66
BIBLIOGRAFIA.....	67

# ABREVIATURAS

- CCl<sub>3</sub>: Triclorometil
- CCl<sub>4</sub>: Tetracloruro de carbono
- GLM: Ganglios linfáticos mesentéricos
- IL-10: Interleuquina 10
- IL-1β: Interleuquina 1 beta
- IL-6: Interleuquina 6
- INFγ: Interferón gamma
- LPS: Lipopolisacárido
- mAb: Anticuerpos monoclonales
- NO: Óxido nítrico
- NOx: Óxidos de nitrógeno (nitritos y nitratos)
- PBE: Peritonitis bacteriana espontánea
- PBI: Peritonitis bacteriana inducida
- PBS: Peritonitis bacteriana secundaria
- PMN: Polimorfonucleares
- SBI: Sobrecrecimiento bacteriano intestinal
- sTNF-RI: Receptores solubles del factor de necrosis tumoral I
- sTNF-RII: Receptores solubles del factor de necrosis tumoral II
- TB: Traslocación bacteriana
- TLR: Toll-like receptor
- TNF-RI: Receptor del factor de necrosis tumoral I
- TNF-RII: Receptor del factor de necrosis tumoral II
- TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa
- Ufc: Unidades formadoras de colonias

**PREFACIO**

El Servicio de Patología Digestiva del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau a parte de su labor asistencial, ha dedicado un gran esfuerzo para trabajar en el estudio de las enfermedades digestivas y hepáticas tanto en el campo de la investigación clínica como básica. Una de las áreas de investigación del Servicio se centra en el estudio de las complicaciones de la cirrosis.

En las últimas décadas varios han sido los grupos de investigación que se han interesado en este tema y, gracias al trabajo realizado, se han conseguido grandes avances en el manejo y tratamiento de las complicaciones de la cirrosis.

La presente Tesis Doctoral consta de dos estudios básicos publicados en dos revistas de prestigio internacional de la especialidad. Estos estudios se han llevado a cabo gracias a la estrecha relación del Servicio de Patología Digestiva con los Servicios de Microbiología, Inmunología y Anatomía Patológica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y con la inestimable colaboración del Grupo de Enfermedades Hepáticas del Hospital General Universitario de Alicante (CIBERehd), así como con la ayuda de las instituciones: CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III (Madrid) y de la empresa Research and Development Centocor (USA) que confió en nosotros.

Esta Tesis basa su trabajo en el desarrollo de un modelo experimental de cirrosis y peritonitis bacteriana inducida mediante la inoculación intraperitoneal de *Escherichia coli* y en estudiar el efecto de la administración de un tratamiento antibiótico asociado o no a un inmunomodulador anti-TNF $\alpha$  sobre la mortalidad en ratas cirróticas con peritonitis bacteriana inducida.

Tras una breve revisión de conceptos, expondremos el diseño y los resultados de nuestros estudios, presentaremos una discusión de los resultados y a continuación se establecerán las conclusiones finales de los estudios.



# INTRODUCCIÓN

# 1. CIRROSIS

## 1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LA CIRROSIS

La cirrosis es una enfermedad frecuente y grave, siendo una de las causas crecientes de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Las causas que originan enfermedades hepáticas son mayoritariamente prevenibles, como las hepatitis víricas, el consumo excesivo de alcohol y las relacionadas con el trastorno del metabolismo (obesidad, diabetes, hiperlipemia, etc.). Otras causas de cirrosis son aquellas desencadenadas por fármacos que pueden producir una reacción hepatotóxica y otras de origen genético (hemocromatosis, enfermedad de Wilson, etc.).

En la mayoría de países desarrollados se produce un descenso en la mortalidad por cirrosis debido al conocimiento de las consecuencias del consumo excesivo de alcohol, a la vacunación de la hepatitis B y, también, a un mejor manejo de las complicaciones de la cirrosis y a la utilización de nuevos fármacos para eliminar la infección por el virus C de la hepatitis y por un mejor control de la infección por virus B. A pesar de esta tendencia favorable, los casos de cirrosis podrían mantenerse en los próximos años debido al incremento del sobrepeso <sup>(1)</sup> y al consumo todavía elevado de alcohol <sup>(2,3)</sup>.

## 1.2. CURSO CLÍNICO DE LA CIRROSIS Y COMPLICACIONES DE LA CIRROSIS

La mayor morbilidad y mortalidad de los pacientes con enfermedades hepáticas crónicas se produce cuando desarrollan cirrosis <sup>(4)</sup>. El curso clínico de la cirrosis empieza con una fase asintomática llamada **cirrosis compensada** hasta llegar a la fase de **cirrosis descompensada** cuando aparecen determinadas complicaciones clínicas como ascitis, sepsis, disfunción renal, hemorragia gastrointestinal por hipertensión portal, encefalopatía hepática o peritonitis bacteriana espontánea (PBE) <sup>(5)</sup>.

Además, la cirrosis es el factor de riesgo más importante para la aparición de cáncer de hígado o hepatocarcinoma <sup>(6,7)</sup>.

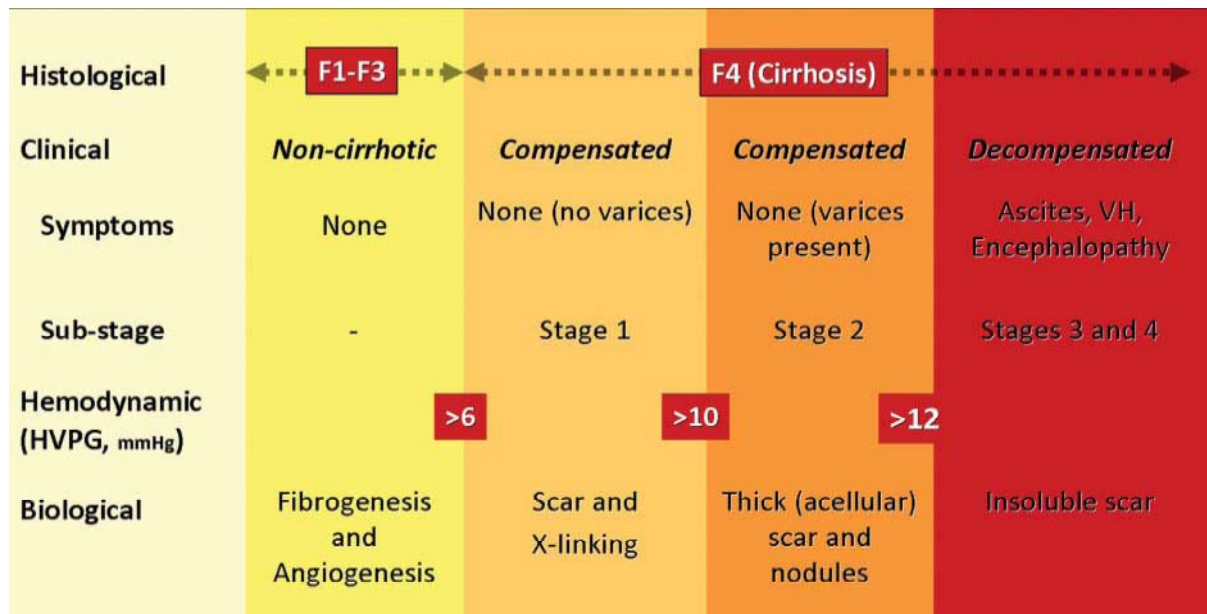


Figura 1: Evolución de la enfermedad hepática crónica. (Imagen extraída de *Garcia-Tsao et al., Hepatology, 2010*)

La cirrosis estuvo considerada, desde una perspectiva clínica, como el punto de no retorno de la enfermedad que conllevaba invariablemente a la muerte a no ser que se realizara un trasplante hepático. Últimamente esta percepción de no retorno de la cirrosis ha ido cambiando, debido en parte a una disminución de la mortalidad<sup>(8-10)</sup>.

### 1.2.1. INFECCIONES BACTERIANAS

**Las infecciones bacterianas** en los pacientes con cirrosis, son más comunes que en la población general<sup>(11)</sup>. A su vez, la incidencia es superior en aquellos con cirrosis descompensada<sup>(12, 13)</sup>. Las causas de la mayor susceptibilidad de estos pacientes a padecer infecciones bacterianas son diversas y están relacionadas con el deterioro funcional hepático, la instrumentalización de los pacientes que son ingresados por otras causas (colocación de catéteres, sondas, exploraciones agresivas, etc.), trastornos en la capacidad bactericida del líquido ascítico, alteraciones inmunológicas que se acentúan conforme evoluciona la enfermedad, así como el consumo de alcohol, la malnutrición y factores nosocomiales<sup>(14)</sup>.

La mayoría de infecciones son producidas por bacterias gramnegativas de origen intestinal, en especial enterobacterias. Las bacterias grampositivas también son frecuentes, sobre todo en los pacientes hospitalizados. Las bacterias gramnegativas más frecuentes en cultivos son: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp. y *Enterobacter* spp. y como grampositivas neumococo, enterococo y listeria. También se suelen encontrar algunas especies de *Pseudomonas*. Los cocos grampositivos han ido aumentando en los últimos años, seguramente debido a la utilización de antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de la

PBE, o a la descontaminación intestinal selectiva profiláctica<sup>(11, 15, 16)</sup>. La aparición de resistencias a los tratamientos empíricos ha resultado un problema muy importante en la práctica clínica actual<sup>(14, 17)</sup>, de ahí que sea relevante el estudio de nuevas estrategias que busquen alternativas a la utilización de antibióticos.

### 1.2.2. TIPOS DE INFECCIONES BACTERIANAS EN PACIENTES CON CIRROSIS

Los pacientes con cirrosis hepática pueden desarrollar cualquier tipo de infección. Sin embargo, las más frecuentes suelen ser urinarias (25%), bacteriemias (5%), respiratorias (15%) y las del líquido ascítico como la PBE (44%). Otras infecciones menos frecuentes son las celulitis, las endocarditis, artritis u osteomielitis.

Las bacteriemias y las infecciones del líquido ascítico pueden ser **espontáneas o primarias**, es decir, cuando se producen por bacterias procedentes habitualmente del propio intestino sin signos de infección focal, o bien **infecciones secundarias**, aquellas que se adquieren a partir de un foco infeccioso local que puede situarse en diversos territorios.

Las infecciones bacterianas también se clasifican teniendo en cuenta dónde se adquieren como **extrahospitalarias** cuando las infecciones se inician fuera del hospital, es decir, cuando el paciente no está ingresado, y las **intra-hospitalarias o nosocomiales** que se adquieren en el hospital. Actualmente, los nuevos abordajes a los que están sometidos los pacientes con enfermedades hepáticas, como son frecuentes visitas al hospital de día o a salas de urgencias, han llevado al desarrollo de nuevos tipos de infecciones donde la fuente de adquisición de las infecciones está relacionada con el momento en el cual han asistido al sistema de asistencia sanitaria, dando lugar a infecciones que presentan características diferentes y peculiares y que se encuentran entre las extrahospitalarias y las nosocomiales. De esta forma se diferencian las **infecciones nosocomiales** como aquellas adquiridas en el ámbito hospitalario y que se diagnostican en las 48 horas posthospitalización; las **adquiridas en la comunidad** cuando el paciente no ha tenido contacto con el sistema sanitario en los últimos 30 días; y las **relacionadas con el sistema de asistencia sanitaria** como aquellos casos que han tenido un contacto previo con el sistema nacional de salud, una reciente hospitalización, diálisis, o residencia en un centro sociosanitario<sup>(14, 18, 19)</sup>.

### 1.2.3. TRASLOCACIÓN BACTERIANA

La mayoría de infecciones en pacientes cirróticos son producidas por bacterias entéricas. Estas bacterias han de encontrar la manera de cruzar el epitelio intestinal. A este concepto se le conoce como **traslocación bacteriana (TB)**.

La definición de TB ha ido evolucionando en el tiempo. Inicialmente, se estableció como el paso de bacterias a través del epitelio de la mucosa del tracto gastrointestinal a la lámina propia y de allí a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y a otros órganos<sup>(20, 21)</sup>. Posteriormente, Bellot y colaboradores definieron **TB viable** al paso de bacterias viables y **TB no viable** al paso de productos bacterianos como endotoxinas, lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteicoico, ADN bacteriano, peptidoglicanos, etc.<sup>(20, 22-24)</sup>. Más recientemente se ha diferenciado **TB patológica** de **TB fisiológica**<sup>(13, 25)</sup>. TB se considera fisiológica en condiciones normales, en ausencia de una patología, y TB patológica, por ejemplo la que encontramos en la cirrosis hepática avanzada<sup>(22, 26)</sup>.

Los cambios acontecidos en la homeostasis entre la **flora bacteriana normal o microbiota**, la **permeabilidad de la barrera intestinal** y en el **sistema inmune**<sup>(27, 28)</sup>, así como la sensibilidad individual de cada paciente cirrótico, favorecen la TB<sup>(20)</sup>. Por lo tanto, cambios en la flora bacteriana intestinal, como pueden ser el **sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI)** (aumento del número de bacterias) o la **disbiosis** (alteración en la composición bacteriana) son una de las principales causas de TB y de PBE en pacientes con cirrosis<sup>(21, 28)</sup>. El SBI ocurre predominantemente en el intestino delgado<sup>(21, 29-31)</sup>. Existen varias causas que pueden explicar el SBI, como pueden ser: alteraciones en el tracto gastrointestinal, cambios en el pH gástrico, en la secreción de ácidos biliares, en la motilidad intestinal, la presencia de péptidos antimicrobianos, la hipertensión portal<sup>(21, 27, 32-37)</sup>. En ausencia de SBI también ocurre TB (0-15%), y por tanto por si solo el SBI no es suficiente para que ocurra siempre TB. Los cambios en la barrera intestinal, como las alteraciones en la adherencia bacteriana o de la permeabilidad intestinal y las alteraciones inmunológicas locales pueden también favorecer la TB<sup>(13, 25)</sup>.

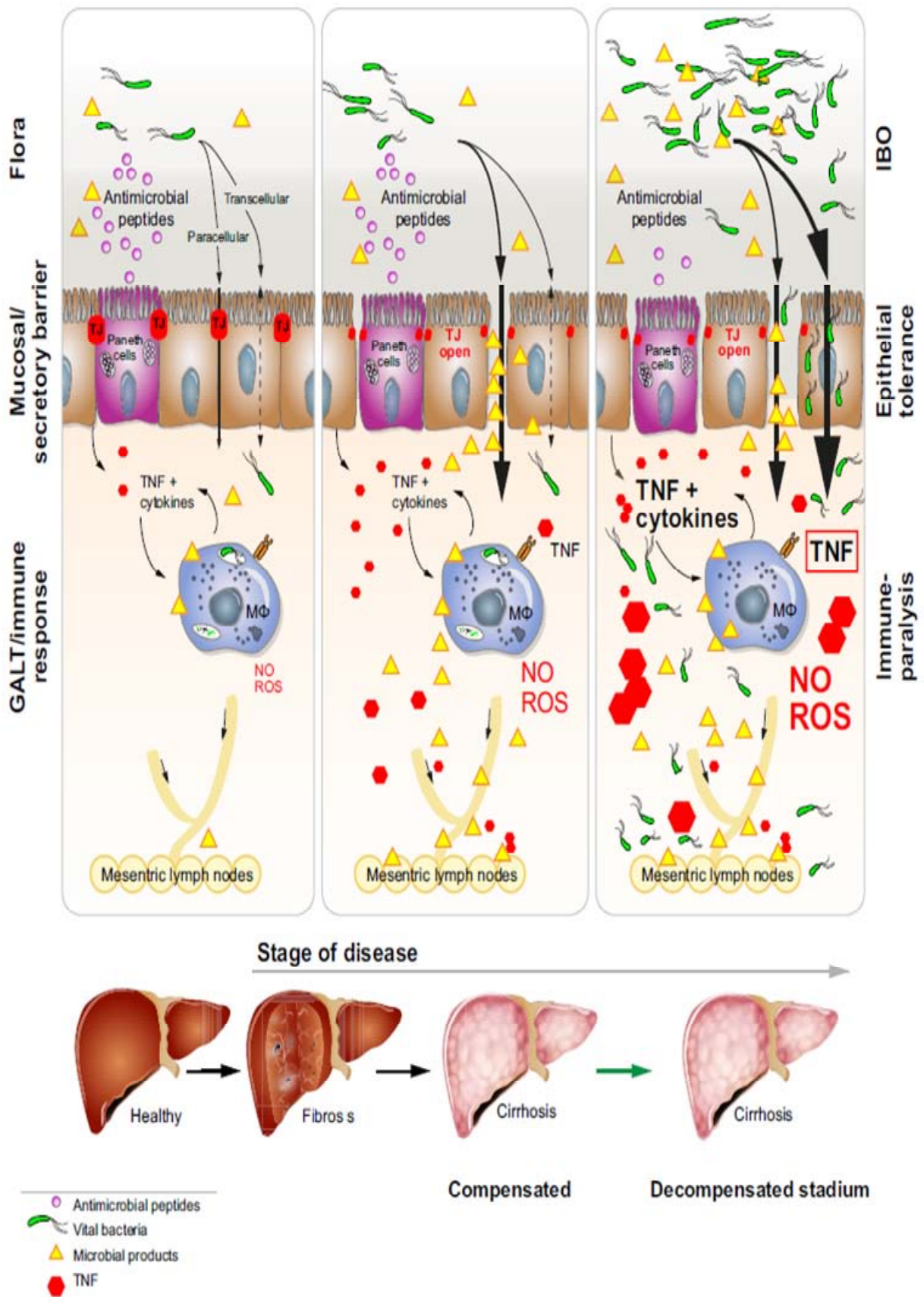


Figura 2: Evolución de la traslocación bacteriana en la evolución de la cirrosis. De TB fisiológica a TB patológica. (Imagen extraída de *Reiner Wiest et al., J hepatol, 2014*)

#### 1.2.4. PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA

La **PBE** se define como la infección del líquido ascítico, que cursa con un recuento de polimorfonucleares (PMN) en líquido ascítico mayor o igual a  $250/\text{mm}^3$  con cultivo positivo o negativo y en ausencia de causa intraabdominal aparente (perforativa o no perforativa) causante de la contaminación del líquido ascítico <sup>(38)</sup>.

La PBE es una complicación frecuente y severa en los pacientes cirróticos que han desarrollado ascitis. La mayoría de episodios de PBE son producidos por bacterias entéricas gramnegativas y normalmente son monomicrobianos <sup>(39, 40)</sup>, siendo *E. coli* la especie responsable con mayor frecuencia, seguida de *Klebsiella* spp., aunque en un 25% de los casos se detectan cocos grampositivos, especialmente *Streptococcus* spp. <sup>(39)</sup>. Las bacterias anaerobias, hongos y los cultivos polimicrobianos representan menos de un 5% del total, debiendo descartarse siempre en estos casos una peritonitis bacteriana secundaria (PBS).

En la patogénesis de la PBE juegan un papel relevante la microbiota intestinal <sup>(41)</sup>, la permeabilidad intestinal <sup>(42-47)</sup>, la TB y las alteraciones en el sistema inmune <sup>(48)</sup>. Estas alteraciones favorecen el paso de determinadas bacterias invasivas y/o endotoxinas u otros productos bacterianos a la sangre y a otros fluidos, como el líquido ascítico <sup>(49)</sup>, donde se desarrollará la infección si los mecanismos defensivos del propio líquido no son capaces de aclarar las bacterias que lo colonizan <sup>(50-53)</sup>.

En los pacientes con cirrosis hepática el riesgo de desarrollar un episodio de PBE depende de múltiples factores como la severidad de la insuficiencia hepática, la presencia de hemorragia digestiva, la concentración de proteínas en líquido ascítico, el alcoholismo, la malnutrición, la instrumentalización (sondaje vesical, catéteres endovenosos, endoscopias terapéuticas, etc.) a la que son sometidos los pacientes con cirrosis que ingresan en el hospital por causas diversas <sup>(19, 54, 55)</sup>.

Aunque los pacientes sobreviven al primer episodio de PBE, tienen una alta probabilidad de recidiva de la infección, ya que entre el 35 y 69% desarrollarán otro episodio de PBE en el plazo de un año, si no se toman medidas preventivas <sup>(56)</sup>.

En función de las características del líquido ascítico se han descrito diversas variantes de la infección del líquido ascítico:

- **PBE con cultivo positivo:** se define como la infección del líquido ascítico en la cual el recuento de PMN en líquido ascítico es  $\geq 250/\text{mm}^3$  y el cultivo es positivo.
- **PBE con cultivo negativo o ascitis neutrocítica cultivo negativo:** se considera cuando el recuento de PMN en líquido ascítico es  $\geq 250/\text{mm}^3$  pero el cultivo es negativo, en ausencia de tratamiento antibiótico previo o de otra causa que aumente los PMN en

líquido ascítico como hepatocarcinoma, carcinomatosis peritoneal, tuberculosis o pancreatitis.

- **Bacteriascitis monomicrobiana:** se define cuando hay colonización del líquido ascítico por una bacteria sin reacción inflamatoria secundaria (recuento de PMN  $<250/\text{mm}^3$ ).
- **Bacteriascitis polimicrobiana:** se produce como consecuencia de una punción inadvertida de un asa intestinal durante una paracentesis, siendo el recuento de PMN normal y el cultivo positivo para dos o más gérmenes.
- **Peritonitis bacteriana secundaria (PBS):** ocurre por el paso directo de gérmenes al líquido ascítico debido a perforación de una víscera hueca o de un absceso intraabdominal. El cultivo suele ser polimicrobiano y el recuento de PMN es  $\geq 250/\text{mm}^3$ .

En los pacientes cirróticos con alto riesgo de presentar infecciones es importante intentar prevenir las infecciones bacterianas mediante la **profilaxis**, dado el mal pronóstico de los pacientes cirróticos que desarrollan una infección bacteriana o una PBE. Medidas útiles podrían ser: la abstinencia alcohólica, reducir o evitar el ingreso hospitalario y la instrumentalización innecesaria (sondajes, etc.), mejorar el estado nutricional de los pacientes y prevenir otras complicaciones de la cirrosis. Sin embargo, la administración de antibióticos orales o intravenosos han demostrado ser la medida profiláctica más efectiva <sup>(19)</sup> como pueden ser: **la descontaminación intestinal selectiva** que se realiza mediante la administración de antibióticos orales poco absorbibles como el **norfloxacino** que actúa sobre los bacilos aerobios gramnegativos de la flora intestinal, preservando el resto de bacterias comensales y la administración de  **$\beta$ -bloqueantes** como prevención primaria o secundaria de la hipertensión portal <sup>(57, 58)</sup>. Gracias a la profilaxis de la PBE la incidencia de infecciones en pacientes con ascitis se ha conseguido reducir <sup>(59)</sup>.

El **tratamiento de la PBE**, en la actualidad, es un tratamiento hospitalario <sup>(60)</sup>. Inmediatamente después del diagnóstico de la PBE, se realiza tratamiento antibiótico empírico temprano, debiéndose mantener hasta 24-48 horas después de confirmar la resolución de la infección mediante paracentesis y normalización del recuento de PMN ( $<250/\text{mm}^3$ ). Actualmente las **cefalosporinas de 3ª generación** están consideradas como el tratamiento de elección ya que ofrecen una mayor tasa de resolución de la infección, menores complicaciones (nefrotoxicidad de los aminoglicósidos) y mayor supervivencia que el tratamiento clásico con **ampicilina asociada a un aminoglicósidos** <sup>(61)</sup>. Los tratamientos más recomendados son **cefotaxima** o **ceftriaxona** intravenosos. Otras cefalosporinas (**cefonicid, ceftazidima, ceftizoxima**) tienen eficacia similar pero no son tan utilizados en la práctica clínica habitual. La resolución de PBE con estos antibióticos es cercana al 90% de los casos. También la utilización de **quinolonas** puede ser útil para el tratamiento la PBE, cuando la situación clínica del paciente lo permite, es decir, cuando el



paciente no presente signos de shock, íleo paralítico, encefalopatía hepática, hemorragia digestiva o insuficiencia renal <sup>(62)</sup>.

En los últimos años se están detectando un aumento de infecciones causadas por bacterias resistentes a cefalosporinas de 3ª generación <sup>(19)</sup> como consecuencia de su amplio uso en estos pacientes, tanto como tratamiento de las infecciones, como profilaxis de la infección. Este fenómeno se produce especialmente en las infecciones nosocomiales y en las infecciones en pacientes que han tenido contacto reciente con el hospital, por lo que en los pacientes en los que se sospecha una infección por estas bacterias o bien en los que no responden adecuadamente al tratamiento convencional en las primeras 24 horas, es preferible administrar **carbapenems**.

**La expansión de volumen plasmático con albúmina humana** endovenosa se ha visto que es útil asociado al antibiótico, consiguiendo reducir la incidencia de la insuficiencia renal y mejorando la supervivencia en pacientes con PBE <sup>(63, 64)</sup>.

Con todas estas estrategias en la profilaxis y tratamiento, el pronóstico a corto plazo de los pacientes con PBE ha mejorado extraordinariamente en las últimas décadas, pasando de una mortalidad inicial de casi el 100% <sup>(65)</sup>, hasta conseguir en la actualidad reducirla aproximadamente a un 20-30% <sup>(66, 67)</sup>. El uso de antibióticos, por tanto, es eficaz en pacientes con PBE, pero su uso excesivo da lugar a la aparición de multiresistencias bacterianas, donde la utilización de terapias antibióticas convencionales no son útiles, aumentando por tanto la mortalidad. A su vez, el pronóstico de los pacientes que sobreviven a un episodio de PBE sigue siendo malo a largo plazo (la supervivencia es de un 30% al año y del 20% a los dos años de seguimiento) y entre un 40%-70% de los pacientes que sobreviven a un episodio de PBE presentarán una nueva infección en el periodo de un año, si no se toman medidas preventivas <sup>(56)</sup>.

De ahí la necesidad de buscar nuevas estrategias tanto para prevenir como para tratar infecciones en pacientes cirróticos que lleven a mejorar la supervivencia. Las evidencias publicadas hasta ahora son bastante limitadas: se postula por la utilización de probióticos, betabloqueantes no selectivos o soluciones de ácidos biliares <sup>(33, 58, 68-70)</sup>. Estas estrategias aunque parecen prevenir la TB y la PBE en modelos experimentales, ninguna de ellas es tan efectiva como la utilización de antibióticos.

## **2. ESTADO PROINFLAMATORIO EN LA CIRROSIS**

Los pacientes con cirrosis hepática presentan un marcado **estado proinflamatorio sistémico**, caracterizado por un aumento de los niveles circulantes de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios <sup>(41, 53, 71-76)</sup>. Este aumento de citoquinas es dependiente del estadio de la enfermedad <sup>(53, 71, 77-79)</sup>. En las fases descompensadas se producen cambios a nivel sérico

de diferentes mediadores proinflamatorios como un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) <sup>(80)</sup> así como de niveles de citoquinas proinflamatorias como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleuquina 6 (IL-6) <sup>(53, 71, 79)</sup> y también de mediadores antiinflamatorios como la interleuquina 10 (IL-10) y receptores solubles de IL-1 $\beta$  y de TNF $\alpha$  <sup>(78, 81)</sup>.

## 2.1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF $\alpha$ )

El TNF $\alpha$  es considerado el mediador principal de la respuesta inmune innata frente a las bacterias gramnegativas. El aumento desproporcionado de TNF $\alpha$  en pacientes cirróticos con ascitis e infecciones bacterianas se cree que está relacionado directamente con las causas de muerte.

El TNF $\alpha$  es una potente citoquina proinflamatoria que ejerce diferentes efectos estimulando a numerosos tipos celulares diferentes. Es una proteína soluble de 17 kd compuesta por 3 subunidades idénticas. Una vez sintetizado el TNF $\alpha$ , puede encontrarse insertado en la membrana celular o bien de forma soluble en el plasma <sup>(82)</sup>.

La respuesta del TNF $\alpha$  depende directamente de su unión a su receptor. Existen 2 tipos diferentes de receptores <sup>(83, 84)</sup>:

- Receptor del factor de necrosis tumoral I: (TNF-RI) de 55 kd codificado en el gen *p55*
- Receptor del factor de necrosis tumoral II: (TNF-RII) de 75 Kd codificado en el gen *p75*

El dominio transmembrana de los receptores de TNF $\alpha$  es susceptible a la lisis por proteasas, liberando la forma soluble del receptor:

- Receptor soluble del factor de necrosis tumoral I (sTNF-RI)
- Receptor soluble del factor de necrosis tumoral II (sTNF-RII)

La afinidad del TNF $\alpha$  por el receptor es inusualmente baja para una citoquina. Sin embargo, el TNF $\alpha$  se sintetiza en cantidades elevadas y puede saturar fácilmente al receptor. Los dos tipos de receptores están presentes en los fluidos corporales, pudiendo actuar como inhibidores competitivos del receptor de superficie celular <sup>(85, 86)</sup>. Las dos formas, la soluble y la de membrana, son activas, aunque la soluble se considera biológicamente más activa.

### 2.1.1. EFECTOS MÁS RELEVANTES DEL TNF $\alpha$ EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

Son muchos los efectos que produce el TNF $\alpha$  en la cirrosis hepática, donde podemos destacar:

- **En el hígado** produce daño estructural favoreciendo la progresión de la fibrosis y la apoptosis <sup>(87)</sup>. También produce activación de macrófagos y células estrelladas hepáticas, aumentando la resistencia vascular intrahepática <sup>(83, 84, 88, 89)</sup>. Además, las células hepáticas

no inmunes como: las células endoteliales, las células epiteliales biliares y las células estrelladas hepáticas, son capaces de producir TNF $\alpha$  ante una respuesta a productos bacterianos a través de los toll-like receptor (TLR) <sup>(44, 90)</sup>.

- **En la mucosa intestinal** favorece la progresión de la inflamación. Produce daño en la barrera intestinal, altera la estructura y la función de membrana y aumenta la permeabilidad intestinal favoreciendo cambios en la organización de las uniones intercelulares tipo tight-junction favoreciendo la TB <sup>(91, 92)</sup>.
- **A nivel circulatorio** favorece alteraciones vasculares. Los productos bacterianos inducen la síntesis de TNF $\alpha$ , entre otros mediadores proinflamatorios como el NO <sup>(47)</sup>. El TNF $\alpha$  y los productos de óxido nítrico: nitritos y nitratos (NOx) producen vasodilatación arterial esplácnica, una de las principales causas del síndrome circulatorio hiperdinámico. Estas alteraciones hemodinámicas favorecen el deterioro de la función hepática y el síndrome hepatorenal.
- **A nivel renal**, niveles elevados de TNF $\alpha$ , IL-6 y NOx inducen el desarrollo de la insuficiencia renal en pacientes cirróticos que tienen PBE <sup>(40, 93)</sup>.

## 2.2. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS MODULADORAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Para el tratamiento de enfermedades inflamatorias se están estudiando varias estrategias basadas en la modulación de citoquinas como **la neutralización de citoquinas, los receptores de bloqueo y la activación de vías antiinflamatorias** <sup>(94)</sup>.

Dentro de los tratamientos con **neutralización de citoquinas** podemos encontrar **los receptores solubles** o **los anticuerpos monoclonales** cuyas funciones son evitar que la citoquina se una a la superficie celular mediante la unión a un receptor soluble, a un antagonista natural o bien a un anticuerpo monoclonal. Los tratamientos con neutralización de citoquinas con **inhibidores del TNF $\alpha$**  como **los anti-TNF $\alpha$**  pueden ayudar a suprimir la inflamación <sup>(95)</sup>. La terapia biológica utilizando anti-TNF $\alpha$  para inhibir el TNF $\alpha$ , ha ido evolucionando desde los 70 hasta nuestros días y se ha convertido en un tratamiento ampliamente utilizada, seguro y eficaz para los pacientes con diversas enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, la psoriasis y, en el campo de la patología digestiva, la enfermedad inflamatoria intestinal <sup>(96-102)</sup>. Los anti-TNF $\alpha$  más utilizados actualmente son anticuerpos monoclonales o bien proteínas de fusión obtenida mediante la fusión de una porción del receptor soluble del TNF $\alpha$  con un fragmento de inmunoglobulina G humana <sup>(103, 104)</sup>.

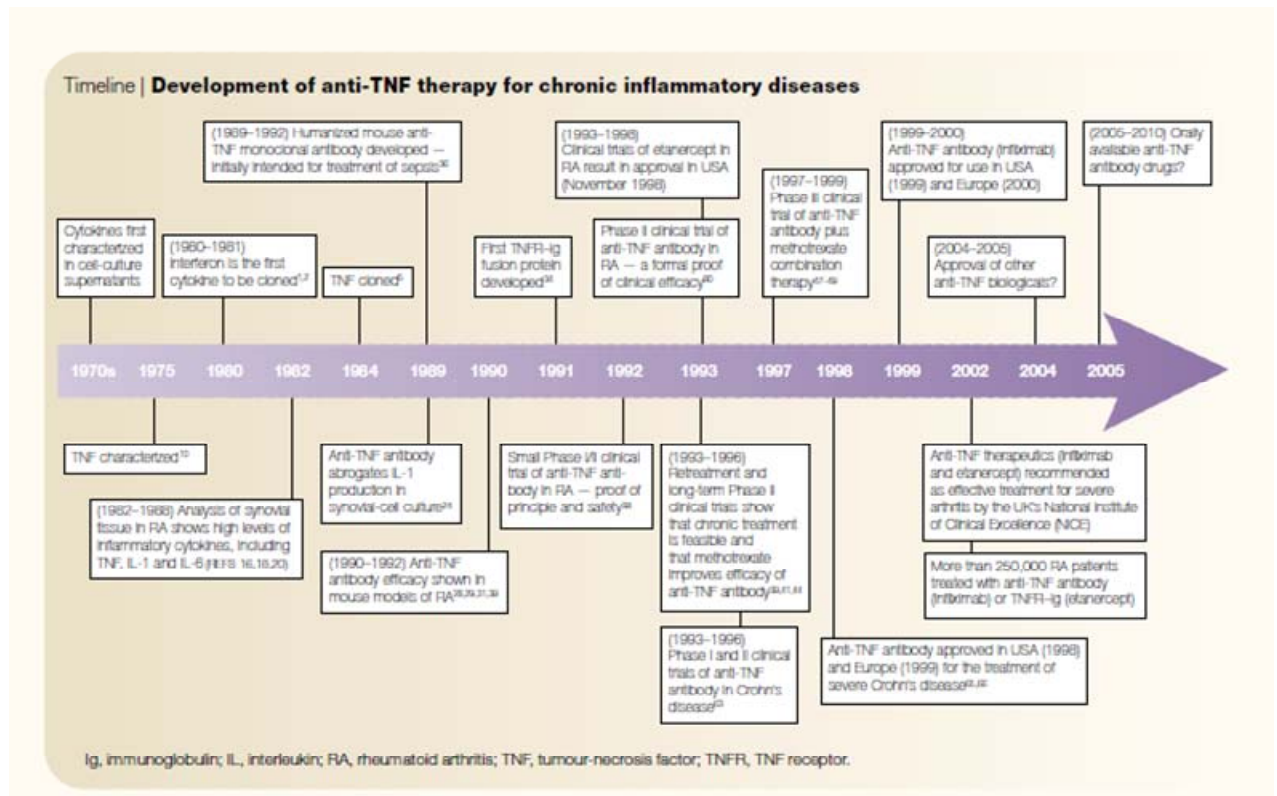


Figura 3: Evolución de la terapia anti-TNF $\alpha$  en las enfermedades inflamatorias. (Imagen extraída de Marc Feldmann et al., *Nature*, 2002)

El bloqueo de la capacidad de un receptor para unirse a su citoquina es otra de las estrategias para interrumpir la transducción de señales. Esto se puede lograr ya sea con **antagonistas naturales de los receptores**, o con **anticuerpos contra receptores de citoquinas**. La cantidad de antagonista debe ser lo suficientemente importante como para bloquear a la mayoría de los receptores durante largos períodos.

Ciertas **citoquinas inmunorreguladoras** tales como la IL-10 y la IL-4 podrían ser útiles para disminuir la inflamación<sup>(105-107)</sup>. Sin embargo, sus efectos son pleiotrópicos. Son citoquinas proteicas de bajo peso molecular o glicoproteínas con una vida media corta, y mantener concentraciones séricas terapéuticas de citoquinas antiinflamatorias es difícil y costoso. Una solución potencial sería el uso de la **terapia génica** que induciría la continua síntesis de citoquinas antiinflamatorias terapéuticas.

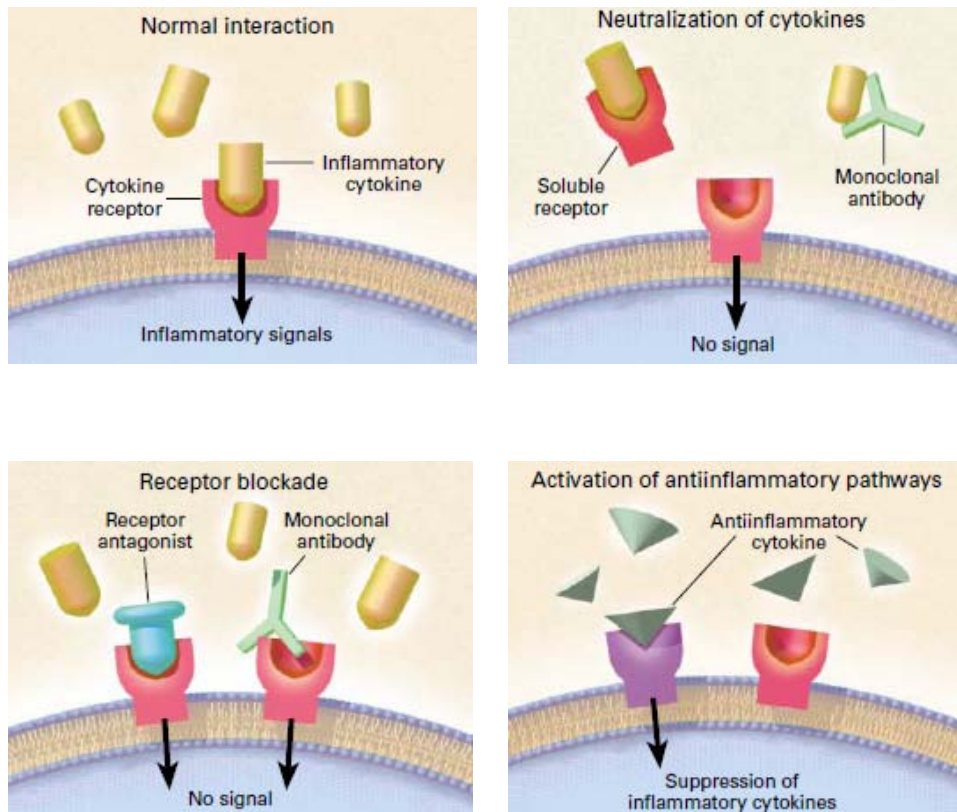


Figura 4: Formas de bloqueo de citoquinas proinflamatorias. (Imagen modificada extraída de Ernest HS Choy et al., *N Engl J Med*, 2001)

### 2.3. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS MODULADORAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA CIRROSIS

Debido al efecto potencialmente patológico de la inflamación y el daño que produce en el hígado, entre otros órganos se ha postulado como una buena diana terapéutica la modulación de la respuesta inflamatoria en el campo de la cirrosis<sup>(53, 71, 75)</sup>.

Se han llevado a cabo diversos trabajos con este fin entre los que se incluyen:

- La **descontaminación bacteriana intestinal**, que reduce el paso de productos bacterianos, tales como LPS a la circulación sistémica, disminuyendo la producción de TNF $\alpha$  por células del sistema inmune activado y atenuando la vasodilatación periférica<sup>(53, 75, 87, 108)</sup>.
- **Inhibiendo la síntesis del TNF $\alpha$**  en modelos experimentales de cirrosis e hipertensión portal. Ejemplos de este tipo de terapia son por un lado estudios en el que se utilizó el bloqueo de la señal producida por la inducción de la producción de TNF $\alpha$  y NO utilizando **Tyrphostin**, un inhibidor específico de la protein tyrosine kinase, consiguiendo mejorar el estado hiperdinámico. La utilización de **Talidomida**, un derivado del ácido glutámico, que inhibe selectivamente la producción de TNF $\alpha$  mediante la degradación del RNA

mensajero, también se ha utilizado para reducir la síntesis de TNF $\alpha$  y descender los niveles de NO en un modelo de hipertensión portal prehepático <sup>(61, 100)</sup>.

- **Bloqueo del TNF $\alpha$**  utilizando **anticuerpos monoclonales anti-TNF $\alpha$**  consiguiendo atenuar la necrosis hepática y la inflamación en un modelo crónico en ratas bajo exposición a etanol. En otro estudio en ratas con estenosis de la vena porta se inhibió el TNF $\alpha$  circulante mediante la utilización de anticuerpo policlonal anti-TNF $\alpha$  permitiendo conseguir una acción compensatoria inmunitaria <sup>(73, 109)</sup>.
- **Tratamientos con inmunomoduladores biológicos que inhiben específicamente el TNF $\alpha$**  producido por los monocitos activados por LPS, como el **AM3** cuyos componentes activos son glicoconjugados compuestos de un polisacárido de  $\alpha$ -glucomanan de *Candida utilis* y las proteínas de empaquetamiento Ricc3 de *Ricinus communis* <sup>(110, 111)</sup>. Posee efectos reguladores sobre la inmunidad innata y adaptativa en modelos experimentales y clínicos de inflamación <sup>(112-115)</sup>. En un modelo de ratas con cirrosis descompensada se ha observado que normaliza la producción de TNF $\alpha$  no solo atenuando el estado proinflamatorio sistémico y hepático, sino que disminuye la fibrosis hepática y revierte parcialmente el estado circulatorio hiperdinámico sin aumentar la susceptibilidad a infecciones bacterianas <sup>(116-119)</sup>.

### 3. MODELOS EXPERIMENTALES DE CIRROSIS

La investigación en medicina se basa principalmente en tres fuentes de conocimiento: el paciente, las necropsias y el animal de experimentación. Los modelos experimentales se definen como cualquier sistema, lógico, físico o biológico capaz de simular total o parcialmente el proceso que pretendemos estudiar. Los modelos animales son los modelos más complejos y cercanos posibles a las condiciones reales. Se considera que un modelo experimental es un buen modelo si cumple una serie de requisitos, como que sea robusto, reproducible y que sea lo más semejante posible a la enfermedad que causa en humanos. Han de ser capaces de producir cambios patológicos discretos y graduales y conseguir una alta reproducibilidad y baja mortalidad.

Los modelos experimentales en cirrosis ya se abordaron desde 1936 por Cameron y colaboradores <sup>(120)</sup> y, posteriormente, Korpassy Kovacs describió un modelo de cirrosis inducida por la administración crónica de ácido tánico en rata <sup>(121)</sup>. También se desarrollaron otros modelos en animales de mayor tamaño, como perros <sup>(122, 123)</sup>. Sin embargo, la necesidad de utilizar grandes cantidades de animales, los gastos y las instalaciones de estabulación impulsaron a los investigadores a desarrollar modelos de cirrosis en ratas a través de la administración de toxinas o mediante la ligadura del conducto biliar <sup>(124-127)</sup>.

Los modelos animales en el estudio de la fibrosis y cirrosis se utilizan para mejorar la comprensión de la patogénesis, en el diagnóstico, en el pronóstico, y para encontrar mejores herramientas terapéuticas. Sin embargo, hasta la fecha, no existe un modelo que reproduzca todas las características de las enfermedades hepáticas en el humano y en muchos casos no hay modelos disponibles para todas las enfermedades.

La investigación experimental de la fibrosis se ha realizado básicamente en roedores: rata y ratón <sup>(128, 129)</sup>. Los modelos de fibrosis se desarrollaron primero en rata y posteriormente se adaptaron a ratón debido a las ventajas genéticas que pueden ofrecer estos animales.

La utilización de **agentes hepatotóxicos** administrados de forma repetida es la manera clásica para inducir fibrosis hepática, siendo capaz de producir inflamación hepática y fibrogenesis. **La tioacetamida, la dimetilnitrosamida, la dietilnitrosamida y el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>)** son los más comúnmente utilizados. A continuación nos centraremos en el modelo del CCl<sub>4</sub>, que es el modelo a partir del cual desarrollamos nuestros modelos en esta Tesis.

### 3.1. MODELO DE INDUCCIÓN DE CIRROSIS POR CCL<sub>4</sub>

El modelo de inducción de cirrosis por CCl<sub>4</sub> es el modelo que mejor reproduce algunas de las características más relevantes de la cirrosis humana como la hipertensión portal, la inflamación hepática y sistémica, la formación de fibrosis, el síndrome de circulación hiperdinámica, la formación de ascitis, la TB a los GLM, las infecciones bacterianas y la regresión potencial de la fibrosis, entre otros <sup>(124, 130-138)</sup>. Es una gran herramienta para determinar tanto los mecanismos patogénicos de la cirrosis como para la caracterización de sus alteraciones inmunológicas <sup>(75)</sup>, debido a su gran paralelismo con el estado proinflamatorio sistémico descrito en pacientes <sup>(79)</sup>.

El CCl<sub>4</sub> es una sustancia de elevada hepatotoxicidad. El CCl<sub>4</sub> no es tóxico *per se*, sino que sus efectos tóxicos son atribuibles a la generación del radical reactivo triclorometil (**CCl<sub>3</sub>·**) tras ser metabolizado por el citocromo **p450 por el enzima CYP1** expresado en los hepatocitos perivenulares del hígado <sup>(139)</sup>, con mínima expresión extrahepática y, por tanto, no ocasiona daño en otros órganos. El CCl<sub>3</sub>· produce efecto citotóxico y peroxidación lipídica y daño hepático celular <sup>(140-143)</sup>.

Desde su primera utilización en perros para inducir cirrosis, se ha utilizado principalmente en roedores: primero en ratas y posteriormente se adaptó a ratones, cerdos, conejos y primates <sup>(124, 144-146)</sup>.

El CCl<sub>4</sub> se administra conjuntamente con **fenobarbital**, añadido al agua de bebida. El fenobarbital produce un aumento en la actividad del citocromo p450 en el retículo endoplasmático liso, y acelera el desarrollo de la fibrosis haciendo que la acción del CCl<sub>4</sub> sea más efectiva <sup>(147, 148)</sup>.

Se han descrito diferentes métodos de administración: subcutánea, intramuscular, intraperitoneal<sup>(149)</sup>, orogástrica<sup>(150, 151)</sup> o por inhalación<sup>(152, 153)</sup>. La administración orogástrica de CCl<sub>4</sub> es posiblemente el método más utilizado sobretodo en el estudio de la fibrosis y de las infecciones bacterianas. Proctor desarrolló un modelo de fibrosis mediante la administración por sondaje gástrico de CCl<sub>4</sub> en ratas Wistar<sup>(150)</sup>. Runyon, posteriormente, optimizó la dosis en función de la variación de peso de la rata tras la administración orogástrica de CCl<sub>4</sub>, permitiendo así conseguir una elevada incidencia de ascitis y describiendo por primera vez la PBE en un modelo animal de cirrosis hepática. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de un peso entre 100-120 g con fenobarbital en el agua de bebida de forma *ad libitum* a una dosis de 1,5 nmol/l. Cuando los animales llegan a los 200 g, inician la inducción de cirrosis con 20 µl. La dosificación irá aumentando en función de la variación de peso entre el día de la inducción y a las 48 horas después de tomar el tóxico. Una vez aparece ascitis la dosis de mantenimiento es de 40 µl. Con esta individualización de la dosis se consigue una elevada incidencia de cirrosis y de desarrollo de ascitis entre la semana 7 y la 22. Este modelo tiene una elevada mortalidad (50-55%), y suele ocurrir alrededor de las primeras semanas debido a la toxicidad aguda del CCl<sub>4</sub><sup>(136)</sup>. Es sin duda el modelo más utilizado para estudios de la cirrosis hepática, la PBE y las bacteriemias<sup>(27, 28, 136-138, 154-159)</sup>. Se considera un buen modelo debido a que la mayoría de animales que superan la fase aguda de hepatotoxicidad por CCl<sub>4</sub> desarrollan cirrosis micronodular, a diferencia de otros modelos en donde no aparece o es inconstante. También se caracteriza por desarrollar ascitis entre la semana 7-22 en la mayoría de animales, a diferencia de otros modelos en los que se presenta esporádicamente. También desarrollan de forma espontánea PBE así como TB<sup>(28, 136-138, 154-158)</sup>, obteniendo evidencias de la identidad entre las bacterias de la luz intestinal y las traslocadas<sup>(28, 157)</sup>. No se observa lesión intestinal secundaria al tóxico<sup>(136, 160)</sup>.

Pese a una gran aceptación del modelo presenta una serie de limitaciones entre las que destacan la gran variabilidad en la respuesta de los animales al tóxico, la elevada mortalidad, la administración del tóxico es variable para obtener cirrosis y/o ascitis y la ascitis infectada presenta diferencias con la que presentan los humanos. En la rata la mayoría de los episodios de PBE son polimicrobianos (en un 66-75%), a diferencia de los pacientes donde casi siempre son infecciones monomicrobianas. Se obtienen con frecuencia cultivos positivos de *Enterococcus faecalis* y *Proteus* spp., y en humanos representan solo un 5% de las PBE. El diagnóstico de la PBE en la rata teniendo en cuenta un nivel de PMN en líquido ascítico de 250/mm<sup>3</sup> es controvertida, a diferencia de lo que ocurre en humanos. Se ha observado en ratas con y sin PBE diferencias significativas en el porcentaje de PMN y en las proteínas del líquido ascítico, debido seguramente a la linfomonocitosis periférica que presentan estos animales, mientras que en los humanos predominan los neutrófilos.



### 3.2. OTROS MODELOS DE FIBROSIS Y CIRROSIS

Existen otros modelos menos utilizados de fibrosis como aquellos **por interferencia en la dieta** <sup>(161)</sup>, por ejemplo la **dieta MCD**, la **dieta con etionina** o la **dieta CDA** <sup>(162)</sup>. Suelen ser buenos modelos para estudiar el estrés oxidativo, la inflamación y los elementos fibróticos del hígado graso no alcohólico, aunque son incapaces de reproducir los mecanismos patogénicos y el contexto metabólico de la enfermedad humana.

Otros modelos se desarrollan por **interferencias inmunológicas**, produciéndose determinadas acciones sobre el sistema inmunitario que pueden provocar fibrosis y otras alteraciones de la estructura hepática aunque no consiguen los típicos cambios histológicos que definen a la cirrosis hepática. Son modelos en los que se utiliza **concanavalina A** para estudios de hepatitis fulminante producida por virus o hepatotoxicidad <sup>(163)</sup>, o bien **modelos con suero heterólogo** en los que existen componentes inmunológicos relacionados con la fibrogénesis hepática. Entre las sustancias antigénicas más utilizadas se podría destacar el suero de cerdo y de caballo, la seroalbúmina de huevo y de cerdo, la gamma-globulina humana y la globulina sérica porcina. Suelen ser modelos que producen fibrosis hepática, pero no cirrosis <sup>(164, 165)</sup>.

Otros modelos utilizan productos procedentes de la **pared celular bacteriana** <sup>(166)</sup> o bien la utilización de **endotoxinas** <sup>(167)</sup>.

Los **modelos genéticos** son modelos experimentales que han adquirido un gran auge en los últimos años. Se han desarrollado en ratones, para el estudio de enfermedades crónicas colestásicas, autoinmunes o esteatohepatitis, ya que esta especie permite más fácilmente la manipulación del genoma <sup>(168-171)</sup>.

Por último, también existen modelos en los que se produce **daño hepático por colestasis**, una de las causas más frecuentes de fibrosis hepática y cirrosis en pacientes con enfermedades hepáticas agudas o crónicas. Estos modelos son capaces de imitar estos procesos fisiopatológicos que conducen a la colestasis y a la lesión hepática, como la **obstrucción de las vías biliares**, **modelos autoinmunes** o **de lesión tóxica directa**.

# JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Los pacientes cirróticos tienen una elevada sensibilidad a las infecciones <sup>(11-13)</sup>, siendo la PBE especialmente grave. Pese a que el tratamiento antibiótico es eficaz, la mortalidad de la PBE todavía está alrededor del 20-40%.

Los modelos experimentales descritos hasta el momento son modelos de cirrosis que pueden llegar a desarrollar ascitis y PBE, aunque con dificultades metodológicas. El modelo más utilizado actualmente es el modelo de cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> descrito por Runyon y colaboradores <sup>(159)</sup>. Este modelo de cirrosis se ha utilizado para el estudio de la patogenia de la ascitis, de la disfunción renal, el estudio de la TB <sup>(28, 124, 136, 137, 172)</sup> y para evaluar los efectos de tratamientos que modifiquen la presión portal y la excreción renal de sodio y agua <sup>(173-175)</sup>, entre otros. Presenta, pero, una serie de inconvenientes para el estudio de la PBE <sup>(176)</sup>, como pueden ser:

- La selección de la especie y de la cepa de estudio es muchas veces compleja. En la literatura se suele utilizar para el estudio de infecciones bacterianas y de la PBE ratas de las cepas Wistar y Sprague-Dawley. Éstas, muchas veces, no se comportan de igual manera, influyendo la casa comercial, la procedencia, la estacionalidad, etc. Esta variabilidad se manifiesta en diferencias importantes en el desarrollo de la cirrosis, ascitis y PBE, por lo que es complejo conseguir grupos homogéneos en los estudios.
- Existe una elevada mortalidad previa al desarrollo de ascitis (30-35%) <sup>(159)</sup>.
- La probabilidad de desarrollar ascitis y PBE es muy variable en los diferentes estudios, desde un 11% <sup>(137)</sup>, 48% <sup>(136, 138)</sup>, 70% <sup>(155)</sup> e inclusive en ratas cirróticas desnutridas de hasta un 80% <sup>(138)</sup>.
- No permiten determinar con exactitud el momento en el que desarrollan ascitis y peritonitis. La detección de la PBE exige practicar paracentesis sucesivas desde el momento en el que la rata desarrolla ascitis.
- Una vez las ratas tienen ascitis existe una elevada mortalidad antes de que desarrollen PBE, como consecuencia de las complicaciones relacionadas con el deterioro hepático.
- Cuando se desarrolla PBE es difícil trabajar durante períodos suficientemente prolongados para poder evaluar nuevas estrategias terapéuticas por la elevada mortalidad.
- Existen diferencias en el líquido ascítico entre ratas con cirrosis y el paciente con cirrosis <sup>(176)</sup> cuando se desarrolla PBE. Hasta ahora se cree que en el líquido ascítico de las ratas predomina, mediante cultivo convencional, la presencia simultánea de diversos microorganismos, a diferencia del paciente donde el cultivo suele ser monomicrobiano y predominan las bacterias gramnegativas <sup>(136, 154-157, 159)</sup>. Asimismo, el cultivo de GLM en ratas con cirrosis experimental y TB es polimicrobiano en un 40% de los casos <sup>(136, 154-157)</sup>. Pese a que la ratio bacilo gramnegativo/coco grampositivo es similar entre pacientes y

modelos experimentales, las especies de *Proteus* spp. y *Enterococcus* spp. son mucho más prevalentes en el modelo experimental. Otra diferencia en el líquido ascítico de los animales de experimentación es que los neutrófilos en el líquido ascítico infectado constituye solo un porcentaje minoritario, entre un 30-35% del recuento celular, seguramente por el predominio de linfocitos en la sangre periférica de las ratas.

Para validar nuevos tratamientos es imprescindible disponer de un modelo experimental que se asemeje al máximo a la patología humana a estudiar. Por esta razón una gran parte de nuestro estudio en esta Tesis se centra en proponer nuevos modelos experimentales de peritonitis bacteriana inducida (PBI) en ratas cirróticas con y sin ascitis mediante la inoculación intraperitoneal de la cepa de *E. coli* ATCC25922.

Una vez desarrollado un nuevo modelo de peritonitis bacteriana inducida nos centramos en la búsqueda de un posible tratamiento que pudiera ser efectivo y disminuir la mortalidad actual. Los pacientes con cirrosis y ascitis presentan una activación de la respuesta proinflamatoria durante los episodios de PBE<sup>(93)</sup>. Además, a pesar de la administración de cefalosporinas de tercera generación, los pacientes con PBE presentan continuos episodios de TB que acentúan la marcada respuesta inflamatoria<sup>(177)</sup>. En pacientes con PBE se encuentran niveles elevados de metabolitos del NO, especialmente en los que desarrollan disfunción renal<sup>(178)</sup> y una marcada activación de citoquinas, principalmente TNF $\alpha$  e IL-6, frente a la infección<sup>(93, 179)</sup>. Se recomienda, por todo ello, realizar estudios para desarrollar nuevas estrategias contra las infecciones bacterianas en pacientes cirróticos<sup>(13)</sup>, como pueden ser:

- Desarrollo de nuevos modelos experimentales para comprender mejor la fisiopatología de las infecciones.
- Búsqueda de posibles biomarcadores para identificar a los pacientes de alto riesgo que pueden ser detectados de forma temprana y podrían ser indicativos de una reducción en la morbilidad y la mortalidad.
- Estrategias preventivas para reducir la sensibilidad de los órganos diana mientras se mantiene la competencia inmunológica.
- Herramientas para detectar el tipo de infección que limitará el uso de antibióticos de amplio espectro y posiblemente reducir la incidencia de infecciones bacterianas multirresistentes.
- Mejor selección de pacientes para la profilaxis.
- Desarrollo de terapias profilácticas no basadas en la utilización de antibióticos.
- Mejor gestión del episodio agudo de la infección utilizando el uso de nuevas estrategias asociado a la terapia antibiótica.
- Abordar ensayos para tratar otras infecciones típicas del paciente cirrótico.

En nuestro estudio, decidimos asociar a la administración de antibióticos un agente que bloquea el TNF $\alpha$ . Por lo tanto, la segunda parte de nuestra Tesis, utiliza el modelo previamente desarrollado para valorar el efecto de una nueva estrategia terapéutica en el modelo de cirrosis y PBI, que en el caso de ser efectiva, pudiera ser evaluada en pacientes con cirrosis y PBE. Concretamente, se comparó la administración de ceftriaxona sola o en combinación con un inmunomodulador: anti-TNF $\alpha$ .

**HIPOTESIS**

Las hipótesis de trabajo de los proyectos para la realización de la Tesis Doctoral son:

- **ESTUDIO 1**

***Desarrollo de un nuevo modelo experimental de cirrosis y peritonitis bacteriana inducida (PBI) mediante la inoculación intraperitoneal de E. coli***

- **Hipótesis de trabajo:**

Desarrollar un modelo experimental de PBI en ratas con cirrosis que permita evaluar nuevas estrategias terapéuticas, seleccionando la concentración de *E. coli* que proporcione una mortalidad elevada a las 48 horas, similar a los pacientes con cirrosis y PBE no tratados con antibióticos.

- **ESTUDIO 2**

***Estudio del efecto de la administración de un tratamiento antibiótico asociado o no a un inmunomodulador anti-TNF $\alpha$  sobre la mortalidad en ratas cirróticas con PBI***

- **Hipótesis de trabajo:**

Evaluar si la administración del antibiótico y/o anti-TNF $\alpha$  consigue disminuir la mortalidad y las alteraciones inmunológicas que se producen en el modelo de PBI.

# OBJETIVOS



Se han llevado a cabo los siguientes proyectos para la realización de la Tesis Doctoral con los siguientes objetivos

- **ESTUDIO 1**

***Desarrollo de un nuevo modelo experimental de cirrosis y peritonitis bacteriana inducida (PBI) mediante la inoculación intraperitoneal de *E. coli****

- Desarrollar un nuevo modelo experimental de ratas cirróticas con ascitis y PBI mediante la inoculación intraperitoneal de *E. coli*.
- Desarrollar un nuevo modelo experimental de ratas cirróticas sin ascitis y PBI mediante la inoculación intraperitoneal de *E. coli*.
- Estudio de la mortalidad después de la inoculación intraperitoneal de *E. coli* en el modelo de ratas cirróticas con y sin ascitis.
- Estudio de la respuesta de los leucocitos peritoneales a la infección.
- Estudio de la concentración óptima de *E. coli* para la realización de estudios terapéuticos.

- **ESTUDIO 2**

***Estudio del efecto de la administración de un tratamiento antibiótico asociado o no a un inmunomodulador anti-TNF $\alpha$  sobre la mortalidad en ratas cirróticas con PBI***

- Evaluar el efecto de la terapia antibiótica y de la administración de anti-TNF $\alpha$  sobre la mortalidad en ratas cirróticas sin ascitis a las que se le induce PBI.
- Evaluar el efecto de los tratamientos realizados en el modelo experimental sobre la TB.
- Estudiar el efecto del tratamiento con anti-TNF $\alpha$  con o sin ceftriaxona sobre la función renal, hepática y sobre la respuesta inflamatoria, valorada mediante la determinación de los niveles de TNF $\alpha$  y de NOx en muestras de sangre obtenidas durante la laparotomía.

# MATERIAL Y MÉTODOS

- **ESTUDIO 1:**

***Desarrollo de un nuevo modelo experimental de cirrosis y peritonitis bacteriana inducida (PBI) mediante la inoculación intraperitoneal de E. coli***

Sanchez E, Such J, Chiva MT, Soriano G, Llovet T, Merce J, Sancho F, *et al.* Development of an experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhotic rats with or without ascites. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1230-1236 <sup>(180)</sup>.

### **MATERIAL Y METODOS**

Ratas macho Sprague-Dawley con cirrosis inducida mediante la administración orogástrica de CCl<sub>4</sub> con (n= 22) o sin (n= 101) ascitis fueron aleatorizadas para recibir una inyección intraperitoneal de 1 ml de agua estéril con diferentes concentraciones de *E. coli*. Posteriormente se les inyectó en la cavidad abdominal diferentes volúmenes de agua estéril. Un subgrupo de animales sin ascitis recibió ceftriaxona 4 horas después de la inoculación de *E. coli*. La mortalidad de las ratas se evaluó 48 horas después de la inoculación bacteriana.

### **RESULTADOS**

No hubo mortalidad en los grupos que recibieron solo agua estéril intraperitoneal ni en aquellos que fueron infectados con una dosis de 10<sup>7</sup> ufc de *E. coli*. Las ratas con ascitis mostraron una menor mortalidad que las ratas sin ascitis a las que se les inyectó 10<sup>8</sup> o 10<sup>9</sup> ufc de *E. coli* (p<0.05). La mortalidad fue mayor con 10<sup>9</sup> ufc respecto a 10<sup>8</sup> ufc de *E. coli* tanto en ratas con ascitis (pNS) como en las ratas sin ascitis (p<0.01). Se observó una tendencia a una menor mortalidad en las ratas inoculadas con 10<sup>8</sup> ufc de *E. coli* y mayor volumen de líquido inoculado (Tablas 1 y 2).

Se observó una marcada respuesta de las células polimorfonucleares peritoneales 4 horas después de la inyección de *E. coli* tanto en ratas con o sin ascitis (Figuras 1 y 2). La terapia con antibióticos redujo significativamente la mortalidad en las ratas infectadas con 10<sup>8</sup> ufc de *E. coli* (p<0.01).

# Development of an Experimental Model of Induced Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Rats With or Without Ascites

Elisabet Sánchez,<sup>1,7</sup> José Such, M.D.,<sup>2,7</sup> Maite Teresa Chiva,<sup>1</sup> Germán Soriano, M.D.,<sup>1,7</sup> Teresa Llovet,<sup>3</sup> Javier Mercè, M.D.,<sup>4</sup> Francisco Sancho, M.D.,<sup>5</sup> Carlos Muñoz, M.D.,<sup>2,7</sup> Xiao-yu Song,<sup>6</sup> Miguel Pérez-Mateo, M.D.,<sup>2,7</sup> Joaquín Balanzó, M.D.,<sup>1,7</sup> and Carlos Guarner, M.D.<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>Liver Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Autonomous University, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Liver Unit, Hospital General Universitario, Alicante, Spain; <sup>3</sup>Departments of <sup>3</sup>Microbiology, <sup>4</sup>Biochemistry, and <sup>5</sup>Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Autonomous University, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Research and Development Centocor, Malvern, Pennsylvania; and <sup>7</sup>CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

- BACKGROUND:** Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is a severe complication of cirrhotic patients associated with a high mortality.
- AIM:** To develop an available experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhosis.
- MATERIAL AND METHODS:** Sprague-Dawley rats with carbon-tetrachloride-induced cirrhosis with (N = 22) or without (N = 101) ascites were randomized to receive an intraperitoneal administration of different concentrations of *Escherichia coli* (*E. coli*) diluted in 1 mL of sterile water in ascitic rats and in different volumes in nonascitic rats. A subgroup of nonascitic animals received ceftriaxone 4 h after *E. coli* inoculation. Mortality of rats was evaluated 24 h after bacterial inoculation.
- RESULTS:** None of the rats receiving sterile water alone and only one infected with 10<sup>7</sup> cfu of *E. coli* died. Ascitic rats showed a lower mortality rate than nonascitic rats infected with 10<sup>8</sup> or 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli* ( $P < 0.05$ ). Mortality was higher with 10<sup>9</sup> cfu than with 10<sup>8</sup> cfu of *E. coli* in ascitic ( $P$  NS) and nonascitic ( $P < 0.01$ ) rats. A trend was noted to ward higher mortality in nonascitic rats inoculated with 10<sup>8</sup> cfu with increasing water volumes. A marked peritoneal polymorphonuclear cell response was observed 4 h after *E. coli* injection in both ascitic and nonascitic rats. Antibiotic therapy significantly reduced the mortality rate of rats infected with 10<sup>8</sup> cfu ( $P < 0.01$ ).
- CONCLUSIONS:** This experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhosis with or without ascites may represent a useful tool for the study of pathogenic events postinfection and for the design of new therapeutic strategies to treat patients with SBP.

(Am J Gastroenterol 2007;102:1230–1236)

## INTRODUCTION

Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is a characteristic and severe infection in patients with cirrhosis. Short-term prognosis of SBP has improved during the last decades due to several factors (1, 2), such as prompt diagnosis of this complication with the routine practice of diagnostic paracentesis (2, 3), standardization of diagnostic criteria of ascitic fluid infection (4, 5), and worldwide use of nonnephrotoxic, third generation cephalosporins (6). However, a significant number of patients with SBP develop infection-associated complications, such as systemic hemodynamic dysfunction and progressive renal failure, leading in some cases to death (1, 2). In fact, half of the patients with SBP and renal failure die during hospitalization compared with 6% of patients without renal failure (7, 8).

In rats, carbon tetrachloride induces cirrhosis, ascites, and in some cases SBP. This model of cirrhosis has been extensively used to study the pathogenesis of ascites, renal dysfunction, and bacterial translocation (9–13), and to evaluate the effect of several drugs to modify portal pressure and renal excretion of sodium and water (14–16). However, this experimental model has not been used to evaluate therapy of SBP because either the rats die before the development of SBP or are so sick at the time of diagnosis that the study cannot be continued due to the extremely high mortality of animals. Further, infection in rats is polymicrobial in one-third of the cases (17).

To our knowledge, a useful experimental model of bacterial peritonitis in cirrhotic rats has not been established to allow the evaluation of new therapies for SBP and related complications, such as renal failure, before its clinical application.

An experimental model of induced bacterial peritonitis was described in normal rats (18). In this model, short-term mortality was directly related to the concentration of the bacteria and the volume injected in the peritoneal cavity.

The aim of the present study has been to develop a model of cirrhosis and induced bacterial peritonitis in rats with ascites and to evaluate the effect of peritoneal fluid volume on mortality in infected nonascitic cirrhotic rats. This model may become a useful tool to study commonly associated complications to SBP, such as renal insufficiency or encephalopathy, and to evaluate the efficacy of therapeutic interventions to improve short-term prognosis in patients with SBP.

## MATERIAL AND METHODS

### **PROTOCOL 1: Induced Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Rats With Ascites**

Male Sprague-Dawley rats were included in this study. Rats were individually caged at a constant room temperature of 21°C and exposed to a 12:12 light/dark cycle. A control group of healthy rats was previously used to evaluate the virulence of the selected strain of *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC25922).

Cirrhosis was induced as previously described by Runyon *et al.* (19). Rats weighing 100–120 g were fed standard rodent chow (B/K) and were treated with 1.5 mmol/L phenobarbital in tap water. When rats reached a weight of >200 g, weekly doses of CCl<sub>4</sub> (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, NJ) were given intragastrically using a sterile pyrogen-free syringe (Artsana p.p.a., Greenclate) with an attached stainless steel animal feeding tube (Popper and Sons, New Hyde Park, NY) without anesthesia. The first dose of CCl<sub>4</sub> was 20 µL and subsequent doses were adjusted based on changes in weight 48 h after the last dose, as previously reported (20). After a minimum of 12 wk of induction of cirrhosis, and ascites had developed as shown by paracentesis, an intraperitoneal (i.p.) injection of 10<sup>8</sup> or 10<sup>9</sup> cfu of viable *E. coli* diluted in 1 mL of sterile water was administered under air anesthesia with fluorane. Twenty-four hours later, the mortality rate was evaluated. Early after the death or 48 h after the experimental inoculation, a laparotomy was performed to obtain a sample of the liver for histological evaluation.

In six rats with ascites, a diagnostic paracentesis was performed at the time of infection with *E. coli* and 4, 6, 24, and 48 h after the induction of infection, if the rat was alive, to quantify polymorphonuclear cell infiltration in the ascitic fluid, as an index of peritoneal leukocyte response to infection. Cell counting was done on an Olympus BH-2 microscope (20×10) and using a Neubauer chamber. For the differential cell count, a Cytospin cell preparation system (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA) was used. After ultracentrifugation of ascitic fluid, samples were dyed by the method of May-Grünwald Giemsa to identify polymorphonuclear cells.

### **PROTOCOL 2: Induced Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Rats Without Ascites**

Cirrhosis was induced in Sprague-Dawley rats following the same methodological approach as in protocol 1. After 16 wk of administration of CCl<sub>4</sub>, a paracentesis was performed to rule out the presence of ascites under air anesthesia with fluorane. Immediately postparacentesis, an intraperitoneal injection of 0, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, or 10<sup>9</sup> cfu of viable *E. coli* diluted in different volumes of sterile water (1, 10, 20, and 30 mL) was administered. Twenty-four-hour mortality incidence was evaluated. After the death or 48 h after the inoculation, a laparotomy was performed to obtain a sample of the liver for histological evaluation. As in protocol 1, a diagnostic paracentesis was performed at the time of infection with *E. coli* and 4, 6, 24, and 48 h after the induced infection in 20 rats without ascites, if the rat was alive, to evaluate the peritoneal leukocyte response to infection.

### **PROTOCOL 3: Effect of Antibiotic Therapy on Mortality in Cirrhotic Rats With Induced Bacterial Peritonitis**

Cirrhotic rats without ascites were included in this protocol. Eight rats were inoculated with 10<sup>8</sup> and 15 rats with 10<sup>9</sup> cfu of viable *E. coli* diluted in 20 mL of sterile water. Four hours after inoculation, rats were treated with ceftriaxone 100 mg/kg subcutaneously, that was administered daily for 7 days. The mortality rate of this group of animals was evaluated 1 wk after the infection and compared with that from rats included in protocol 2. After the death or 7 days after the inoculation, a laparotomy was performed to obtain a sample of the liver for histological evaluation. In surviving rats, samples of mesenteric lymph nodes and ascitic and pleural fluid, if present, were also obtained for microbiological culture.

This study was approved by the Animal Research Committee of the Institut de Recerca de Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) and by the Departament de Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (DARP). Animals received care according to the criteria outlined in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

### **Statistical Analysis**

Fisher's exact test was used to compare mortality between groups. The Wilcoxon nonparametric test was used to compare variations of polymorphonuclear count in ascitic or peritoneal fluid after inoculation with *E. coli*. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

A control group of 24 healthy rats was previously used to evaluate the virulence of the selected strain of *E. coli*. An i.p. injection of 10<sup>8</sup> or 10<sup>9</sup> cfu of viable *E. coli* diluted in 20 mL of sterile water was administered. Table 1 shows the mortality of healthy control rats and cirrhotic rats infected with *E. coli* according to the dose of *E. coli* and the weight of the rat. Marked differences in mortality rate were observed

**Table 1.** Short-Term Mortality in Healthy Control Rats and Cirrhotic Rats With Ascites and Induced Bacterial Peritonitis According to the Weight and Size of the Bacterial Inoculum

Weight (g)	Healthy Control Rats						Cirrhotic Rats With Ascites		
	180–230			450–500			450–500		
<i>E. coli</i> concentration (cfu)	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	Total	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	Total	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	Total
Mortality (%)	7/9 (78%)	6/6 (100)	13/15 (87%)	0/6 (0%)	0/3 (0%)	0/9* (0%)	3/10 (30%)	7/12 (58%)	10/22† (45%)

\* $P < 0.05$  with respect to total group of control rats weighing 180–230 g.

† $P < 0.05$  with respect to total group of control rats weighing 450–500 g.

according to the weight of control rats. Short-term mortality in low-weight rats (180–230 g) receiving 10<sup>8</sup> or 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli* was 77.8% and 100%, respectively, while the mortality of heavier animals (450–500 g) was significantly lower (0%) for inoculation of both 10<sup>8</sup> and 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli* ( $P < 0.05$ ).

#### PROTOCOL 1: Induced Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Rats With Ascites

Twenty-two cirrhotic rats with ascites were included in protocol 1. Ten rats received an i.p. injection of 10<sup>8</sup> cfu of *E. coli* in 1 mL of sterile water and 12 rats received 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli* in 1 mL of sterile water. Three of the 10 rats (30%) in the 10<sup>8</sup> group and 7 of 12 (58%) in the 10<sup>9</sup> group died during the first 24 h postinfection (NS) (Table 1). Short-term mortality was significantly higher in cirrhotic rats with ascites and induced peritonitis than in infected control rats with similar weight (45% vs 0%, respectively,  $P < 0.05$ ) (Table 1). Histological evaluation showed severe fibrosis or cirrhosis in all rats.

#### PROTOCOL 2: Induced Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Rats Without Ascites

One hundred one rats with cirrhosis without ascites were included in this protocol. Rats were randomized to receive an i.p. injection of 0, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, or 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli* in 1, 10,

20, or 30 mL of sterile water. Table 2 shows the mortality of cirrhotic rats infected with *E. coli* according to the concentration of *E. coli* and the volume of sterile water injected. None of the rats receiving sterile water without *E. coli* and only one rat infected with 10<sup>7</sup> cfu of *E. coli* died (7.7%). Mortality rates of rats inoculated with 10<sup>8</sup> cfu of *E. coli* showed a trend to increase according to the volume of sterile water administered (43, 50, 70, and 80% in 1, 10, 20, and 30 mL of sterile water, respectively), although values did not reach significance. In contrast, the mortality rate of rats infected with 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli* was almost completely independent of the injected volume of sterile water. A concentration of 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli* caused a significantly higher mortality in cirrhotic rats without ascites than a concentration of 10<sup>8</sup> ( $P < 0.01$ ). This difference did not achieve statistical significance in cirrhotic rats with ascites ( $P$  NS), probably due to the reduced number of rats with ascites included in protocol 1. All rats showed severe fibrosis or cirrhosis at laparotomy.

#### Polymorphonuclear Cell Response to Infection

Figure 1 shows peritoneal leukocyte count in a group of cirrhotic rats with (N = 6) or without (N = 20) ascites at the

**Table 2.** Short-Term Mortality in Cirrhotic Rats Without Ascites and Induced Bacterial Peritonitis According to the Volume of Sterile Water Injected and Concentration of the Bacterial Inoculum

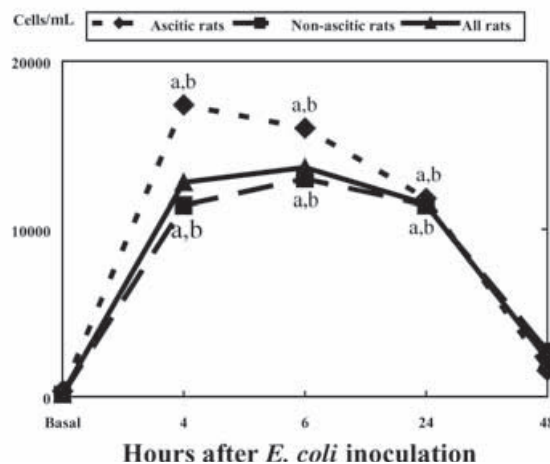
<i>E. coli</i> concentration (cfu)	Sterile Water Volume (mL) Injected in Cirrhotic Rats Without Ascites				
	1	10	20	30	Total
0	0/3 0%	0/4 0%	0/4 0%	0/3 0%	0/14* 0%
10 <sup>7</sup>	0/3 0%	0/3 0%	1/4 25%	0/3 0%	1/13* 7.7%
10 <sup>8</sup>	3/7 43%	5/10 50%	7/10 70%	8/10 80%	23/37† 62.2%
10 <sup>9</sup>	5/5 100%	9/10 90%	12/12 100%	9/10 90%	35/37 94.6%

\* $P < 0.001$  with respect to groups receiving 10<sup>8</sup> or 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli*.

† $P < 0.01$  with respect to group receiving 10<sup>9</sup> cfu of *E. coli*.

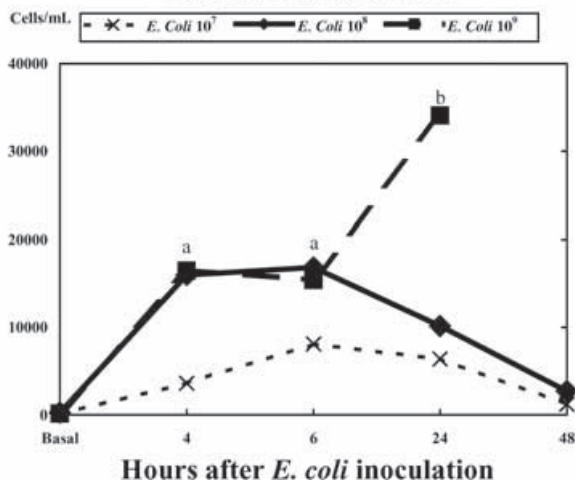
The first number of the fractions detailed represents the number of dead animals in a given group, and the second the total animals tested.

POLYMPHONUCLEAR COUNT IN ASCITIC OR PERITONEAL FLUIDS IN CIRRHOTIC RATS



**Figure 1.** Variations of polymorphonuclear count in ascitic or peritoneal fluids in cirrhotic rats after *E. coli* inoculation according to the presence or absence of ascites at the time of *E. coli* injection. a:  $P < 0.001$  with respect to basal data including ascitic and nonascitic rats. b:  $P$  NS between ascitic and nonascitic rats.

## POLYMPHONUCLEAR COUNT IN ASCITIC OR PERITONEAL FLUIDS IN CIRRHOTIC RATS



**Figure 2.** Variations of polymorphonuclear count in ascitic or peritoneal fluids in cirrhotic rats after *E. coli* inoculation according to the injected dose of *E. coli*. a:  $P < 0.05$  with respect to basal value. b:  $P < 0.05$  with respect to rats injected with  $10^7$  or  $10^8$ .

time of *E. coli* inoculation and 4, 6, 24, and 48 h postinfection, if animals survived and still had peritoneal fluid. A marked and significant peritoneal polymorphonuclear cell response was detected in cirrhotic rats at 4, 6, and 24 h postinfection. No significant differences in peritoneal leukocyte response between ascitic and nonascitic rats were observed.

Figure 2 shows peritoneal polymorphonuclear response in cirrhotic rats according to the injected dose of *E. coli*. The peritoneal cell response was independent of the concentration of *E. coli* injected 4 and 6 h postinfection, but increased significantly in rats infected with  $10^9$  with respect to  $10^7$  or  $10^8$  cfu of *E. coli* 24 h postinfection ( $P < 0.05$ ).

### PROTOCOL 3: Effect of Antibiotic Therapy on Mortality in Cirrhotic Rats With Induced Bacterial Peritonitis

Twenty-three cirrhotic rats without ascites were inoculated with  $10^8$  cfu ( $N = 8$ ) or  $10^9$  cfu ( $N = 15$ ) of viable *E. coli* diluted in 20 mL of sterile water. Four hours after inoculation, rats were treated daily with ceftriaxone 100 mg/kg subcutaneously for 7 days. No deaths were observed in rats infected with  $10^8$  cfu of *E. coli*, while 11 of 15 rats inoculated with  $10^9$  cfu died ( $P < 0.01$ ). Mortality was significantly lower in cirrhotic rats inoculated with  $10^8$  cfu and treated with ceftriaxone than in those nontreated from protocol 2 (0/8 vs 7/10,  $P < 0.01$ ), but not in those rats infected with  $10^9$  cfu (11/15 vs 12/12,  $P$  NS). In one rat inoculated with  $10^9$  cfu, *E. coli* was detected in pleural fluid at laparotomy. All rats showed also severe fibrosis or cirrhosis at laparotomy.

## DISCUSSION

SBP is a severe bacterial infection in cirrhosis with an improved short-term prognosis during the last two decades

(3, 21). Although most of the rapidly diagnosed and treated SBP episodes are satisfactorily resolved, a significant number of patients may still develop infection-associated complications, such as hepatic encephalopathy, septic shock, or progressive renal failure, leading in some cases to an irreversible hepatorenal syndrome and death (3, 7, 21). A recent clinical study has demonstrated a better short-term prognosis in SBP cirrhotic patients treated with cefotaxime and systemic volume expansion with albumin (8). However, no experimental models of SBP are available to evaluate new therapeutic strategies that may be then transferred to clinical trials.

The first protocol was aimed to induce bacterial peritonitis in cirrhotic rats with ascites by the intraperitoneal administration of *E. coli*. This microorganism was selected because it is the most common organism causing SBP in patients with cirrhosis (3, 21). Virulence of the *E. coli* strain was previously evaluated by its administration to normal rats. Short-term mortality in infected control rats was similarly high with a dose of  $10^8$  or  $10^9$  cfu of *E. coli* administered intraperitoneally in 20 mL of sterile water (Table 1), which is in agreement with previous publications (18).

Short-term mortality was higher in rats with cirrhosis and ascites receiving  $10^9$  than  $10^8$  cfu of *E. coli*, although values did not reach statistical significance (58.3% vs 30%,  $P$  NS), and these figures were significantly higher than those observed in control animals with similar weight (Table 1). This likely supports the existence of a marked impairment of defensive mechanisms in cirrhotic animals, similar to what has been described in patients with advanced cirrhosis (3, 21).

Notably, mortality of normal rats with induced bacterial peritonitis is directly related to the volume of fluid injected in the peritoneal cavity (18), which suggests that mortality of cirrhotic rats with induced bacterial peritonitis might depend on the volume of ascitic fluid. The second protocol was performed to evaluate the mortality observed in an experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhotic rats without ascites infected with different concentrations of bacterial inoculum and volumes. In animals with cirrhosis without ascites, short-term mortality was directly related to the size of the inoculum. While only one rat inoculated with  $10^7$  died (7.7%),  $10^8$  cfu of *E. coli* was the lowest concentration of bacterial inoculum that caused relevant mortality (Table 2). However, mortality was significantly lower in rats receiving  $10^8$  cfu of *E. coli* than in those receiving  $10^9$  cfu ( $P < 0.01$ ). In contrast to previous studies in noncirrhotic rats (17), mortality was not affected by the volume of sterile water inoculated in nonascitic rats, probably because mortality was observed in almost all rats receiving an intraperitoneal dose of  $10^9$  cfu of *E. coli*. However, cirrhotic rats inoculated with  $10^8$  cfu of *E. coli* showed a trend to a higher mortality when the inoculum was diluted in larger volumes of sterile water (Table 2). It is likely that increasing the number of animals tested with this experimental approach, this trend would achieve statistical significance.

When comparing both protocols, short-term mortality was significantly higher in cirrhotic animals without ascites than in animals that had already developed ascites, independent of the inoculum of *E. coli*. Three mechanisms may explain, at least in part, these findings. First, ascitic fluid has an intrinsic bactericidal capacity (22) and the likelihood of developing an SBP episode is directly related to the ascitic fluid antimicrobial activity (23–25). Patients with low ascitic fluid opsonic activity (23) or low ascitic fluid total protein show a higher incidence of SBP during follow-up (24, 25). Cirrhotic rats without ascites inoculated with *E. coli* diluted in water would lack this antimicrobial mechanism in ascitic fluid. Second, both during the induction of cirrhosis and when ascites is already evident, animals show the presence of fragments of bacterial genome in blood and ascitic fluid (26). This has been observed to induce a marked peritoneal inflammatory response in patients with cirrhosis (27), which may in turn increase the peritoneal cellular bactericidal activity (28). This would lead to lower mortality in animals that had already developed ascites at inoculation. However, in the present study, we did not evaluate the antimicrobial activity of ascitic and peritoneal fluids of cirrhotic rats to confirm these hypotheses. Third, the large water overload injected in the peritoneal cavity could also contribute to the higher mortality in nonascitic cirrhotic rats compared with ascitic rats. In fact, a trend was noted to higher mortality in nonascitic rats inoculated with  $10^8$  cfu with increasing water volumes. However, this effect was not observed in noninfected cirrhotic rats or rats infected with  $10^8$  or  $10^9$  cfu. Similar volumes of water administered by gavage have been used to evaluate the capacity to excrete free water in cirrhotic rats with ascites without describing a higher mortality (29). We cannot exclude, however, that the higher mortality observed in nonascitic than in ascitic rats may be related to the older age and/or to the higher dose of  $\text{CCl}_4$  received by the former group of animals. It is likely that cirrhotic rats that did not develop ascites may show a longer survival than nonascitic cirrhotic rats, probably indicating a better liver function.

A marked peritoneal leukocyte response occurred rapidly after *E. coli* injection in animals, independent of the presence or not of ascites (Fig. 1), and this is similar to what has been reported in control rats (18, 30). Presence of ascites did not affect peritoneal leukocyte response, which was more marked than that usually observed in cirrhotic patients with SBP (1, 2). In contrast, the peritoneal polymorphonuclear response was initially similar irrespective of the size of the inoculum during the first hours postinfection, but increased significantly in rats inoculated with the higher dose of *E. coli* with respect to the lower doses (Fig. 2), in which there was a progressive decrease in ascitic polymorphonuclear count. These data demonstrate the capacity of cirrhotic rats to control the infection, if they are infected with a low inoculum.

Noteworthy, all cirrhotic rats infected with  $10^8$  cfu of *E. coli* and treated with ceftriaxone survived the infection, while only 27% of rats infected with  $10^9$  cfu did. These data demon-

strate that antibiotic treatment is effective in this model of induced bacterial peritonitis as in patients with SBP (3, 6), but rats infected with a high inoculum probably require additional maneuvers to survive to the infection. Therefore, this model of induced bacterial peritonitis might represent a useful tool to evaluate new therapeutic approaches to improve short-term survival in cirrhotic patients with previous SBP clinical investigation.

In conclusion, we have developed an experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhotic rats with or without ascites. The characteristics of this model regarding short-term mortality and graded response to the size of the bacterial inoculum may make it useful to study the local, systemic, and renal derangements that usually take place following peritoneal infection in patients with cirrhosis and ascites, together with the evaluation of new therapeutic approaches to reduce short-term mortality for potential clinical application in the future.

## STUDY HIGHLIGHTS

### What Is Current Knowledge

- An experimental model of carbon-tetrachloride-induced cirrhosis and ascites in rats is well established.
- This model is useful to study the pathogenesis of ascites, renal dysfunction, and bacterial translocation and to evaluate the effect of several drugs to modify portal pressure and renal excretion of sodium and water.
- A useful experimental model of bacterial peritonitis in cirrhotic rats to allow the evaluation of new therapies for spontaneous bacterial peritonitis (SBP) and related complications is lacking: this is relevant, because therapies for SBP cannot not be tested in animal models, because when this complication is detected in animals, they are so sick that they usually die at in the short term.

### What Is New Here

- An experimental model of bacterial peritonitis in cirrhotic rats with or without ascites that is easily reproducible, caused by *E. coli*, the most common organism in patients with SBP.
- The differences required in the inoculum in control rats and cirrhotic rats with or without ascites inducing variations of mortality and the effect of peritoneal fluid volume on mortality in infected nonascitic cirrhotic rats.
- This model may become a useful tool to study commonly associated complications to SBP, such as renal insufficiency or encephalopathy, and to evaluate the efficacy of therapeutic interventions to improve short-term prognosis in patients with SBP.



**Reprint requests and correspondence:** Carlos Guarner, M.D., Liver Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Autonomous University of Barcelona, Mas Casanovas 90, 08041 Barcelona, Spain.  
Received September 13, 2006; accepted January 8, 2007.

## REFERENCES

- Llovet JM, Planas R, Morillas R, et al. Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: Multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993;88:388–92.
- Toledo C, Salmeron JM, Rimola A, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: Predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 1993;17:251–7.
- Guarner C, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Gastroenterologist* 1995;3:311–28.
- Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, et al. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: A consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000;32:142–53.
- Navasa M, Casafont F, Clemente G, et al. Consensus on spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis: Diagnosis, treatment, and prophylaxis. *Gastroenterol Hepatol* 2001;24:37–46.
- Felisart J, Rimola A, Arroyo V, et al. Cefotaxime is more effective than is ampicillin–tobramycin in cirrhotics with severe infections. *Hepatology* 1985;5:457–62.
- Follo A, Llovet JM, Navasa M, et al. Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: Incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 1994;20:1495–501.
- Sort P, Navasa M, Arroyo V, et al. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 1999;341:403–9.
- López-Novoa JM, Rengel M, Hernando L. Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 1980;238:F353–7.
- Jiménez W, Clària J, Arroyo V, et al. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: A useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7:90–7.
- Llovet JM, Bartoli R, Planas R, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994;35:1648–52.
- Garcia-Tsao G, Lee F-Y, Barden GE, et al. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835–41.
- Guarner C, Runyon BA, Young S, et al. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in an experimental model of cirrhosis in rats. *J Hepatol* 1997;26:1372–8.
- Bosch-Marcé M, Jiménez W, Angeli P, et al. Aquaretic effect of the k-opioid agonist RU 51599 in cirrhotic rats with ascites and water retention. *Gastroenterology* 1995;109:217–23.
- Castro A, Jiménez W, Clarià J, et al. Impaired responsiveness to angiotensin in experimental cirrhosis: Role of nitric oxide. *Hepatology* 1993;18:367–72.
- Bosch J. Effect of pharmacological agents on portal hypertension: A haemodynamic appraisal. *Clin Gastroenterol* 1985;14:169–84.
- Llovet JM, Bartoli R, Planas R. Bacterial infection of the ascitic fluid in rats with carbon-tetrachloride-induced cirrhosis. In: Arroyo V, Ginés P, Rodés J, et al., eds. Ascites and renal dysfunction in liver disease. Pathogenesis, diagnosis and treatment. Malden, MA: Blackwell Science, 1999:397–408.
- Dunn DL, Barke RA, Ahrenholz DH, et al. The adjuvant effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis. *Ann Surg* 1984;199:37–43.
- Runyon BA, Sugano S, Kanel G, et al. A rodent model of cirrhosis, ascites and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:489–93.
- Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792–6.
- Guarner C, Soriano G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Semin Liver Dis* 1997;17:203–17.
- Fromkes JJ, Thomas FB, Mekhjian HS, et al. Antimicrobial activity of human ascitic fluid. *Gastroenterology* 1977;73:668–72.
- Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1988;8:632–5.
- Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986;91:1343–6.
- Such J, Guarner C, Enríquez J, et al. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988;6:80–4.
- Such J, Guarner C, Chiva MT, et al. A polymerase chain reaction-based method detects a high incidence of bacterial translocation in cirrhotic rats with negative conventional cultures. *Hepatology* 2002;36:524A.
- Francés R, Munoz C, Zapater P, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004;53:860–4.
- Utasincharoen P, Kespichayawattana W, Anuntagool N, et al. CpG ODN enhances uptake of bacteria by mouse macrophages. *Clin Exp Immunol* 2003;132:70–5.
- Claria J, Jimenez W, Arroyo V, et al. Blockade of the hydrosmotic effect of vasopressin normalizes water excretion in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1989;97:1294–9.
- Dunn DL, Barke RA, Knight NB, et al. Role of resident macrophages, peritoneal neutrophils, and translymphatic absorption in bacterial clearance from the peritoneal cavity. *Infect Immun* 1985;49:257–64.

## CONFLICT OF INTEREST

**Guarantor of the paper:** Dr. Carlos Guarner is the guarantor of the paper. In this study, there are no competing interests.

**Author contributions:** Carlos Guarner and Jose Such contributed equally to the design and development of this investigation and with Xiao-yu Song designed the study and wrote the manuscript.

Elisabet Sánchez and M. Teresa Chiva developed the experimental model following the above authors' guidelines.

Teresa Llovet performed the microbiologic studies.

Javier Merce performed the cell count of all ascitic fluids and revised the accuracy of lab procedures.

Francisco Sancho performed the pathologic studies of the livers.

German Soriano and Carlos Muñoz contributed to the design of the study, analyzed the results, and reviewed the manuscript.

Miguel Perez-Mateo and Joaquim Balanzó are the Chiefs of the Departments of Gastroenterology and Hepatology of the hospitals of Alicante and Barcelona, respectively, and reviewed the manuscript and suggested some modifications.

**Study Support:** This study was partially funded by unrestricted grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI05/1574 and PI02/0398) (Madrid, Spain), AGAUR (2005SGR01085) of Generalitat de Catalunya, and Centocor (Malvern, PA).

---

**ESTUDIO 2:*****Estudio del efecto de la administración de un tratamiento antibiótico asociado o no a un inmunomodulador anti-TNF $\alpha$  sobre la mortalidad en ratas cirróticas con PBI***

Sanchez E, Frances R, Soriano G, Mirelis B, Sancho FJ, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, *et al.* Modulation of inflammatory response in a cirrhotic rat model with induced bacterial peritonitis. PLoS One 2013; 8 e59692 <sup>(181)</sup>.

**MATERIAL Y METODOS**

Ratas macho Sprague-Dawley con cirrosis inducida mediante la administración de CCl<sub>4</sub> por sondaje gástrico y sin ascitis, se les indujo PBI mediante una inyección intraperitoneal de 1 ml de agua estéril con una concentración de 10<sup>9</sup> ufc de *E. coli* y se inyectó en la cavidad peritoneal 20 ml de agua estéril. Fueron aleatorizadas a recibir por vía subcutánea: placebo, ceftriaxona, anti-TNF $\alpha$  y ceftriaxona, o anti-TNF $\alpha$  solo.

**RESULTADOS**

No se observaron diferencias entre los grupos al inicio del estudio con respecto a la función renal, pruebas hepáticas, niveles séricos de nitritos/nitratos y TNF $\alpha$  (Tabla 1).

El tratamiento con ceftriaxona redujo la mortalidad (73,3%), pero las diferencias no alcanzaron significación estadística en comparación con el placebo.

La mortalidad en las ratas tratadas con ceftriaxona y anti-TNF $\alpha$  fue significativamente menor que en los animales que recibieron placebo (53% vs 100%,  $p < 0.01$ ) (Figura 1).

Los niveles de TNF $\alpha$  en suero se redujeron significativamente en las ratas que sobrevivieron tratadas con ceftriaxona y anti-TNF $\alpha$  pero no en aquellas tratadas con antibiótico solo (Tabla 1).

# Modulation of Inflammatory Response in a Cirrhotic Rat Model with Induced Bacterial Peritonitis

Elisabet Sánchez<sup>1,2,3,4</sup>, Rubén Francés<sup>2,7</sup>, Germán Soriano<sup>1,2,3,4</sup>, Beatriz Mirelis<sup>4,5</sup>, Francesc J. Sancho<sup>6</sup>, José Manuel González-Navajas<sup>2,7</sup>, Carlos Muñoz<sup>8</sup>, Xiao-yu Song<sup>9</sup>, Miguel Pérez-Mateo<sup>6†</sup>, José Such<sup>2,7\*</sup>, Carlos Guarner<sup>1,2,3,4,\*</sup>

**1** Liver Section, Department of Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **3** Institut d'Investigacions Biomèdiques de Sant Pau (IIB), Barcelona, Spain, **4** Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain, **5** Department of Microbiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, **6** Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, **7** Unidad Hepática, Hospital General Universitario, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain, **8** Department of Microbiology, Hospital General Universitario, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain, **9** Research and Development Centocor, Malvern, Pennsylvania, United States of America

## Abstract

Bacterial peritonitis is a severe complication in patients with cirrhosis and ascites and despite antibiotic treatment, the inflammatory response to infection may induce renal dysfunction leading to death. This investigation evaluated the effect of TNF- $\alpha$  blockade on the inflammatory response and mortality in cirrhotic rats with induced bacterial peritonitis treated or not with antibiotics. Sprague-Dawley rats with carbon-tetrachloride-induced cirrhosis were treated with an intraperitoneal injection of  $10^9$  CFU of *Escherichia coli* diluted in 20 mL of sterile water to induce bacterial peritonitis and randomized to receive subcutaneously-administered placebo, ceftriaxone, anti-TNF- $\alpha$  mAb and ceftriaxone, or anti-TNF- $\alpha$  mAb alone. No differences were observed between groups at baseline in respect to renal function, liver hepatic tests, serum levels of nitrite/nitrate and TNF- $\alpha$ . Treatment with ceftriaxone reduced mortality (73.3%) but differences did not reach statistical significance as compared to placebo. Mortality in rats treated with ceftriaxone and anti-TNF- $\alpha$  mAb was significantly lower than in animals receiving placebo (53% vs. 100%,  $p < 0.01$ ). Serum TNF- $\alpha$  decreased significantly in surviving rats treated with ceftriaxone plus anti-TNF- $\alpha$  mAb but not in treated with antibiotics alone. Additional studies including more animals are required to assess if the association of antibiotic therapy and TNF- $\alpha$  blockade might be a possible approach to reduce mortality in cirrhotic patients with bacterial peritonitis.

**Citation:** Sánchez E, Francés R, Soriano G, Mirelis B, Sancho FJ, et al. (2013) Modulation of Inflammatory Response in a Cirrhotic Rat Model with Induced Bacterial Peritonitis. PLoS ONE 8(3): e59692. doi:10.1371/journal.pone.0059692

**Editor:** Srinivas Kaveri, Cordelier Research Center, INSERMU872-Team16, France

**Received:** September 14, 2012; **Accepted:** February 17, 2013; **Published:** March 20, 2013

**Copyright:** © 2013 Sánchez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was partially funded by unrestricted grants from the Generalitat de Catalunya (AGAUR) (2005SGR01085), Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) P108-0262 and from the Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Alicante. Centocor (Malvern, PA, USA) also provided funding to conduct this investigation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Centocor (Malvern, PA, USA) provided funding to conduct this investigation, and is the employer of XYS. The anti-TNF mAb used in this study is a product of Centocor. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

\* E-mail: cguarner@santpau.cat

✉ These authors contributed equally to this work.

† Deceased

## Introduction

Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is a common and severe infection in patients with cirrhosis. Short-term prognosis has improved in recent decades due to prompt diagnosis during routine paracentesis [1], standardization of diagnostic criteria based on ascitic fluid analyses [2], [3], and use of non-nephrotoxic third generation cephalosporins [4]. However, a significant number of patients with SBP still develop complications such as infections, systemic hemodynamic dysfunction and progressive renal failure, that lead to death [1], [2]. Fifty percent of SBP patients who develop renal failure die during hospitalisation compared to only 6% of patients without this complication [5]. The administration of albumin to these patients has demonstrated a reduction in the incidence of renal dysfunction and improvement in short-term survival [5], [6].

Episodes of SBP are associated with a marked release of proinflammatory cytokines such as tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and effector molecules like nitric oxide metabolites (NO $_x$ ) that keep a close relationship with SBP-induced morbidity and mortality [7], [8]. Patients with SBP show a long-lasting marked increase in serum NO $_x$  that may contribute to maintaining splanchnic vasodilatation and thus worsen the hemodynamic hyperkinetic state [9], [10]. Besides, nitrite and nitrate levels in serum and ascitic fluid at diagnosis of infection are significantly higher in SBP patients who develop renal impairment as a consequence of the ascitic fluid infection than in patients who maintain a stable renal function [11].

Our group has recently reported that patients with SBP present recurrent episodes of bacterial translocation (BT) and maintain a marked inflammatory reaction [12] despite the administration of

third generation cephalosporins. In rats, a new therapy with the blockade of TNF- $\alpha$  has two direct consequences: it blunts the development of the hyperdynamic circulation and reduces portal pressure in a model of portal hypertension [13], and reduces the frequency of BT episodes in model of cirrhosis [14]. Accordingly, the association of the usual third-generation cephalosporin with TNF- $\alpha$  blockade during a peritonitis episode may not only slow down the ongoing infection, but also improve survival. However, since TNF- $\alpha$  is part of the normal immune response, it is necessary to assess whether TNF- $\alpha$  blockade would increase the risk of developing superinfections.

We previously developed an experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhotic rats with or without ascites [15] that mimics SBP in patients, and considered it might be useful to evaluate the efficacy of new therapeutic interventions on short-term prognosis of patients with SBP. The present study aimed, therefore, to evaluate the effect of TNF- $\alpha$  blockade on the inflammatory response and mortality in cirrhotic rats with induced bacterial peritonitis treated or not with antibiotics.

## Materials and Methods

### Animals

Male Sprague-Dawley were purchase from Harlan Laboratories. Rats were individually caged at a constant room temperature of 21°C, exposed to a 12:12 light/dark cycle and allowed free access to water and rat chow.

The study was approved by the Animal Research Committee at the Institut de Recerca de Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) and by the Department of Agriculture, Livestock and Fisheries of the Generalitat de Catalunya (DARP). Animals received care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### Induction of Cirrhosis

Cirrhosis was induced as previously described by Runyon et al [16]. Rats weighing 100-120 g were fed standard rodent chow (B/K) and were treated with 1.5 mM/L phenobarbital in tap water. When rats reached a weight of 200 g weekly doses of carbon-tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, NJ) were given intragastrically using a sterile pyrogen-free syringe (Artisana p.p.a., Greenclate) with an attached stainless steel animal feeding tube (Popper and Sons, New Hyde Park, NY) without anaesthesia. The first dose of CCl<sub>4</sub> was 20  $\mu$ L and subsequent doses were adjusted based on changes in weight 48 hours after the last dose, as previously reported [17].

### Experimental Design

CCl<sub>4</sub> was administered over 16 weeks, the required period for cirrhosis development [16]. To rule out the presence of ascites a paracentesis was performed under air anaesthesia with isoflurane (Forane, Abbott ind.). Sixty rats were then immediately injected intraperitoneally (i.p.) with a dose of 10<sup>9</sup> colony-forming unit (CFU) of *Escherichia coli* (*E. coli*) diluted in 20 mL of sterile water to induce bacterial peritonitis as previously reported [15]. Four hours later, a blood sample was taken from the saphena vein, centrifuged and stored at -80°C for subsequent analysis.

Animals were then randomly allocated into four groups to receive: serum subcutaneously (s.c.) (Group I, n = 15), ceftriaxone 100 mg/kg s.c. daily for 7 days beginning 4 hours after *E. coli* injection (Group II, n = 15), anti-TNF- $\alpha$  mAb 15 mg/kg i.p. in a single dose (Centacor R&D, Inc, Malvern, PA, USA) and ceftriaxone 100 mg/kg s.c. daily for 7 days (Group III, n = 15) and monoclonal Antibody Anti-Tumour Necrosis Factor Alfa

(anti-TNF- $\alpha$  mAb) 15 mg/kg i.p. in a single dose (Group IV, n = 15). Survival was monitored daily for 7 days.

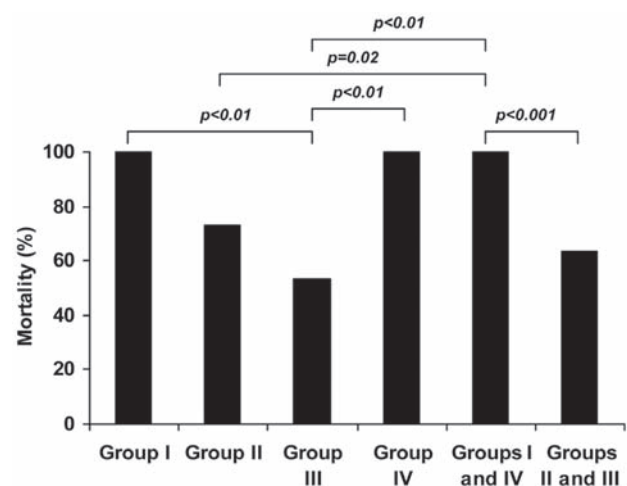
### Laparotomy

Laparotomy was performed under anaesthesia with 10 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer) and 50 mg/kg ketamine (ketolar, Parke-Dawis) in strictly sterile conditions in surviving rats 7 days after induction of peritonitis. In brief, abdominal fur was removed with a depilatory and the skin was sterilised with iodine. A short incision in the abdominal wall (3–4 cm.) was performed and a sample of intraperitoneal fluid was obtained for bacterial culture. The abdomen was then opened via a 3 cm median incision and the remaining fluid was evacuated. If no free fluid was present, sterile swabs were passed over the parietal peritoneal surface and then plated. Samples of pleural fluid were also collected for microbiological study. The mesenteric lymph nodes from the ileo-cecal area were aseptically dissected, removed, weighed, and liquefied in sterile saline for bacterial culture. Blood was collected from the cava vein in a non-additive sterile interior vacutainer (Becton Dickinson Vacutainer Systems Eur., Meylan Cedex, France), centrifuged and stored to determine liver and renal function parameters and TNF- $\alpha$  and NOx levels. A sample of the liver was also obtained for histological evaluation. All samples were stored at -80°C. Rats were then euthanized with intravenous sodium thiopentate (Pentotal, Abbott Laboratories).

### Biochemical Analysis

Immunoassays for quantitative measurement of rat TNF- $\alpha$  in blood samples were performed using TNF- $\alpha$  Quantikine rat Immunoassays (R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. All samples were tested in duplicate and read at 450 nm and 490 nm in a ThermoMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA).

The sum of the NOx: nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) is widely used as an index of NO generation and expressed as NOx levels [18]. NOx levels were calculated by measuring conversion of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> to NO<sub>2</sub><sup>-</sup> by the enzyme nitrate reductase using an ELISA assay (R&D Systems, Minneapolis, MN) based on the Griess



**Figure 1. Mortality observed in rats with cirrhosis and induced bacterial peritonitis during one week after *E. coli* inoculation.** Group I: placebo (serum s.c.); Group II: ceftriaxone s.c.; Group III: anti-TNF- $\alpha$  mAb i.p.+ceftriaxone s.c.; Group IV: anti-TNF- $\alpha$  mAb i.p.; Groups I and IV (non-antibiotic treated rats) and Groups II and III (antibiotic treated rats).

doi:10.1371/journal.pone.0059692.g001

reaction that absorbs visible light at 540 nm, and expressed as  $\mu\text{mol/L}$ . All samples were tested in duplicate, and values were corrected by running samples with culture media to assess background NOx levels.

### Statistical Analysis of Experimental Data

Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (SPSS Inc. version 17.0, Chicago, Illinois, USA). All biochemical parameters are reported as mean  $\pm$  SD. Differences between groups were analysed using the non-parametric Mann-Whitney U-test. Fisher's exact test was used to compare mortality between groups. The Wilcoxon non-parametric test was used to compare variations of serum analytical parameters after inoculation with *E. coli*. A two-tailed  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### Results

Sixty rats with cirrhosis and without ascites, as demonstrated by a negative diagnostic paracentesis, were included and randomised. Forty-nine rats (81.7%) died during the study, mainly during the first 24 hours after *E. coli* injection. No rats died in the first 4 hours after intraperitoneal *E. coli* inoculation. Figure 1 shows mortality during the week of the study. As detailed, all rats in groups I (placebo) and IV (treated with anti-TNF- $\alpha$  mAb alone) died during the study period. A significant reduction in mortality was observed in the overall group of cirrhotic rats treated with antibiotic with or without anti-TNF- $\alpha$  mAb (63.3%, groups II and III) as compared with animals not receiving antibiotics (100%, groups I and IV,  $p < 0.001$ ). Mortality in the group of animals treated with ceftriaxone alone (73.3%, group II) was lower than the corresponding value in groups I or IV, although differences did not reach statistical significance, probably due to the low number of animals tested. In contrast, infected cirrhotic rats treated with the combination of ceftriaxone plus anti-TNF- $\alpha$  mAb (group III) showed a significant reduction in mortality (53.3%) when compared to non-treated rats (group I,  $p < 0.01$ ) or to rats treated with anti-TNF- $\alpha$  mAb alone (group IV,  $p < 0.01$ ).

Table 1 shows basal analytical parameters, including renal and liver function tests and serum TNF- $\alpha$  and NOx levels, obtained four hours after *E. coli* injection. All parameters were similar in all four groups of cirrhotic rats included in the study. When comparisons were established between non-surviving versus surviving animals, basal serum NOx was the only analytical parameter showing a significant increase in non-surviving rats ( $p < 0.05$ ).

Variations in renal and liver function tests and serum TNF- $\alpha$  and NOx levels were studied in surviving rats in samples obtained 4 hours after bacterial inoculation and at laparotomy. As detailed in Table 2, a significant reduction in TNF- $\alpha$  serum levels was observed in these rats (groups II+III,  $p < 0.05$ ). This variation was even more remarkable in rats treated with ceftriaxone plus anti-TNF- $\alpha$  mAb ( $p < 0.05$ ). The decrease of serum TNF- $\alpha$  levels in rats treated with antibiotic alone, however, did not reach statistical significance. NOx levels showed a tendency to increase at laparotomy in comparison with baseline values in all surviving animals but this was only statistically significant in Groups II+III ( $p < 0.05$ ). Liver parameters also decreased significantly in these rats ( $p < 0.01$ ) and no variations in renal function were observed.

Laparotomy was performed on all surviving rats 7 days after intraperitoneal bacterial inoculation, and samples were cultured as described above. *E. coli* was isolated in pleural fluid in 1 animal from Group II, and when considering animals included in Group III, 1 animal showed an *E. coli* in peritoneal fluid, 1 rat presented *E. coli* and *Enterococcus* in mesenteric lymph nodes and a third animal had *E. coli* in the liver. The number of surviving rats with positive culture was higher in group II (3/4) than in group III (1/7), although values did not reach statistical significance ( $p = 0.08$ ).

Histological study of the liver was performed in all surviving rats and showed severe fibrosis in all cases.

### Discussion

To our knowledge, this is the first study to date to assess new therapeutic approaches to reduce mortality during episodes of bacterial peritonitis in cirrhotic rats. These rats develop SBP in the last phases of induction of cirrhosis, but animals are so sick at that time that they usually die during or immediately after the diagnostic paracentesis, becoming an inadequate model for the study of new therapeutic approaches. We developed a new model of induced bacterial peritonitis in rats with cirrhosis, with or without ascitic fluid, and reported mortality rates similar to those found in a clinical setting [15]. This study represents the first application of this animal model to assess new therapeutic options to reduce mortality during episodes of induced bacterial peritonitis.

Our study investigated the effect of TNF- $\alpha$  blockade and/or antibiotics on the inflammatory response and mortality in a cirrhotic rat model with induced bacterial peritonitis. We here report evidences that modulation of inflammatory response, as represented by TNF- $\alpha$  blockade together with the usual third-generation cephalosporin-based therapy in animals with induced

**Table 1.** Basal analytical parameters of the groups of cirrhotic rats with induced bacterial peritonitis.

GROUPS	I (n = 15)	II (n = 15)	III (n = 15)	IV (n = 15)	Non-surviving rats (n = 49)	Surviving rats (n = 11)
Urea (mM)	6,6 $\pm$ 1,2	7,0 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 0,9	6,6 $\pm$ 1,9	6,6 $\pm$ 1,7	6,4 $\pm$ 1,0
Creatinine ( $\mu\text{M}$ )	57,8 $\pm$ 6,6	56,3 $\pm$ 9,5	52,5 $\pm$ 9,2	57,6 $\pm$ 8,9	55,6 $\pm$ 8,9	54,3 $\pm$ 7,5
Bilirubine ( $\mu\text{M}$ )	11,9 $\pm$ 9,5	12,5 $\pm$ 7,2	17,1 $\pm$ 10,1	13,6 $\pm$ 10,2	15,1 $\pm$ 9,6	12,9 $\pm$ 7,7
AST (u/L)	1140 $\pm$ 363	1020 $\pm$ 585	1091 $\pm$ 387	1014 $\pm$ 616	1089 $\pm$ 547	929 $\pm$ 420
ALT (u/L)	622 $\pm$ 316	693 $\pm$ 482	608 $\pm$ 263	640 $\pm$ 509	650 $\pm$ 438	640 $\pm$ 349
GGT (u/L)	10,9 $\pm$ 6,2	10,8 $\pm$ 5,2	12,7 $\pm$ 7,4	13,7 $\pm$ 6,2	12,6 $\pm$ 5,9	11,1 $\pm$ 7,2
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	176 $\pm$ 100	163 $\pm$ 96	204 $\pm$ 118	207 $\pm$ 137	198,6 $\pm$ 117,7	167,6 $\pm$ 101,4
NOx (nmol/mL)	107 $\pm$ 30	98 $\pm$ 39	121 $\pm$ 46	129 $\pm$ 89	125,4 $\pm$ 62,0*	84,9 $\pm$ 26,9

Samples of blood were obtained 4 hours after intraperitoneally administration of *E. coli*.

\* $p < 0.05$  respect to surviving rats.

doi:10.1371/journal.pone.0059692.t001

**Table 2.** Variations in renal and liver function tests and serum TNF- $\alpha$  and NOx levels in surviving cirrhotic rats between the infection of *E.coli* and the laparotomy.

GROUPS	II (n = 4 )	III (n = 7 )	II+III (n = 11 )
Urea (mM)	6.7 $\pm$ 1.0 $\rightarrow$ 6.3 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 1.0 $\rightarrow$ 6.1 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 1.0 $\rightarrow$ 6.1 $\pm$ 0.6
Creatinine ( $\mu$ M)	51.5 $\pm$ 4.1 $\rightarrow$ 51.3 $\pm$ 3.9	56.0 $\pm$ 8.8 $\rightarrow$ 56.3 $\pm$ 7.6	54.3 $\pm$ 7.5 $\rightarrow$ 54.5 $\pm$ 6.8
Bilirubine ( $\mu$ M)	9.2 $\pm$ 4.3 $\rightarrow$ 1.5 $\pm$ 0.6*	15.0 $\pm$ 8.7 $\rightarrow$ 1.5 $\pm$ 0.8*	12.9 $\pm$ 7.7 $\rightarrow$ 1.5 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>
AST (u/L)	919 $\pm$ 519 $\rightarrow$ 174 $\pm$ 116	936 $\pm$ 401 $\rightarrow$ 160 $\pm$ 80*	929 $\pm$ 420 $\rightarrow$ 165 $\pm$ 89 <sup>†</sup>
ALT (u/L)	558 $\pm$ 336 $\rightarrow$ 43 $\pm$ 16	687 $\pm$ 375 $\rightarrow$ 46 $\pm$ 30*	640 $\pm$ 349 $\rightarrow$ 45 $\pm$ 25 <sup>†</sup>
GGT (u/L)	12.5 $\pm$ 9.1 $\rightarrow$ 3.6 $\pm$ 4.7	10.3 $\pm$ 6.6 $\rightarrow$ 0.9 $\pm$ 1.7*	11.1 $\pm$ 7.2 $\rightarrow$ 1.7 $\pm$ 2.9 <sup>†</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	132 $\pm$ 96 $\rightarrow$ 98.4 $\pm$ 60.4	189 $\pm$ 118 $\rightarrow$ 48.5 $\pm$ 41.8*	168.5 $\pm$ 107 $\rightarrow$ 66.6 $\pm$ 52.7*
NOx (nmol/mL)	74 $\pm$ 39 $\rightarrow$ 127.9 $\pm$ 82.4	91 $\pm$ 46 $\rightarrow$ 139.6 $\pm$ 68.5	85.5 $\pm$ 42.5 $\rightarrow$ 135.3 $\pm$ 69.9*

\*p&lt;0.05 respect to basal serum levels,

<sup>†</sup>p<0.01 respect to basal serum levels.

doi:10.1371/journal.pone.0059692.t002

bacterial peritonitis, may represent a useful tool to increase survival compared to non-treated rats or treated only with TNF- $\alpha$  blockade. However, this benefit was not statistically significant compared to rats treated only with third-generation cephalosporin. In addition, despite a higher number of positive culture at laparotomy in surviving rats from group II (3/4) than in group III (1/7) (p = 0.08), with the current data we can not speculate about a protective effect of TNF- $\alpha$  blockade with the combined treatment. Probably, additional studies including more animals are required to assess if the association of antibiotic therapy and TNF- $\alpha$  blockade might be a possible approach to reduce mortality in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis.

As pointed out above, higher levels of NO and TNF- $\alpha$  at diagnosis of SBP and during SBP episodes predict complications such as renal insufficiency and survival [7], [11], [19]. Recent findings from our group may offer a clue to explain the maintained inflammatory reaction in SBP. When studying sequential samples of blood from SBP patients under antibiotic therapy, we observed the maintenance of molecular evidence of BT as demonstrated by the presence of bacterial genomic fragments (bacterial DNA) in blood and found that levels kept a direct and significant relation with proinflammatory cytokines and NO [12]. However, in rats, TNF- $\alpha$  blockade appears to blunt hemodynamic disturbances in a model of portal hypertension [13], and reduce episodes of BT in a model of cirrhosis [14]. These data suggest that modulation of the inflammatory response might improve survival, supporting our hypothesis that the use of a selective mAb against TNF- $\alpha$  together with ceftriaxone would decrease mortality in an intraperitoneal infection episode. Since TNF- $\alpha$  is part of the normal immune response against bacterial infections, it is necessary to investigate whether the administration of anti-TNF- $\alpha$  mAb might result in an increased risk of bacterial superinfections. However, in the present study we did not observe superinfections in surviving rats treated with antibiotics and anti-TNF- $\alpha$  mAb.

There were two main analytical findings when comparing samples obtained immediately after i.p. administration of *E. coli* and at laparotomy in surviving rats: first, baseline NOx was the only parameter to show statistically significant differences between surviving and dying rats (Table 1). This information is similar to that reported in patients with SBP [11], and may be related to repeated episodes of BT and stimulation of the immune response prior to i.p. injection with *E. coli*. Indeed, bacteria components such as lipopolysaccharide or DNA stimulate the immune response through joining toll-like receptors 4 and 9, respectively [20], [21],

and it is likely that higher NOx levels will correlate with more severe haemodynamic disturbances in this model.

Second, TNF- $\alpha$  levels decreased significantly in surviving animals when receiving ceftriaxone alone or in combination with mAb, although values only reached significance in the combination therapy arm. This seems logical when considering the specificity of anti-TNF- $\alpha$  mAb used in this investigation. No differences in the rate of BT were observed when comparing animals included in Groups II or III. These results are similar to others previously reported by our group [14] that showed that anti-TNF- $\alpha$  mAb in non-infected rats with cirrhosis does not increase the likelihood of developing infections. In this investigation, however, rats were infected, and the trend towards an increased persistence of bacteria in mesenteric lymph nodes in animals receiving the combination therapy may point to a decreased ability to fight against infection once it is established. Caution should therefore be recommended when considering the immune modulation with administration of anti-TNF- $\alpha$  mAb in an active infection setting.

TNF- $\alpha$  blockade may be also achieved by several non-monoclonal related molecules. Xanthine derivatives such as pentoxifylline [22] or serotonin 5-hydroxytryptamine (2A) receptor agonists such as 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine [23] are potent TNF- $\alpha$  inhibitors that might be use to confirm presented data. In addition, the use of these molecules would avoid the formation of anti-drug antibodies.

In conclusion, the administration of ceftriaxone and anti-TNF- $\alpha$  mAb decreases serum TNF- $\alpha$  levels. However, in the present study we did not observe significant differences on survival in cirrhotic rats with induced bacterial peritonitis treated with antibiotics with or without anti-TNF- $\alpha$  mAb. Additional studies including more animals are required to assess if the association of antibiotic therapy and TNF- $\alpha$  blockade might be a possible approach to reduce mortality in cirrhotic patients with bacterial peritonitis, before this therapeutic combination can be recommended. This animal model may represent a useful tool to assess the efficacy of new therapies in these patients.

## Acknowledgments

CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, CIBERehd (Madrid, Spain). We thank Carolyn Newey for English language revision.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CG JS. Performed the experiments: ES RF FJS. Analyzed the data: ES RF GS BM FJS JS CG.

Contributed reagents/materials/analysis tools: ES RF GS BM FJS JMG CM XYS MPM JS CG. Wrote the paper: ES CG JS RF.

## References

- Guarner C, Runyon BA (1995) Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Gastroenterologist* 3: 311–328.
- Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock IJ, Planas R, et al. (2000) Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 32: 142–153.
- Runyon BA (2004) Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *Hepatology* 39: 841–856.
- Felisart J, Rimola A, Arroyo V, Perez Ayuso RM, Quintero E, et al. (1985) Cefotaxime is more effective than is ampicillin-tobramycin in cirrhotics with severe infections. *Hepatology* 5: 457–462.
- Follo A, Llovet JM, Navasa M, Planas R, Forns X, et al. (1994) Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 20: 1495–1501.
- Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, et al. (1999) Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 341: 403–409.
- Navasa M, Follo A, Filella X, Jimenez W, Francitorra A, et al. (1998) Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 27: 1227–1232.
- Garcia-Tsao G, Angulo P, Garcia JC, Groszmann RJ, Cadelina GW (1998) The diagnostic and predictive value of ascites nitric oxide levels in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 28: 17–21.
- Bories PN, Campillo B, Azaou L, Scherman E (1997) Long-lasting NO overproduction in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 25: 1328–1333.
- Genesca J, Gonzalez A, Segura R, Catalan R, Marti R, et al. (1999) Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 94: 169–177.
- Such J, Hillebrand DJ, Guarner C, Berk L, Zapater P, et al. (2004) Nitric oxide in ascitic fluid is an independent predictor of the development of renal impairment in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 571–577.
- Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, Cano R, et al. (2008) Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 47: 978–985.
- Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ (1995) Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 108: 761–767.
- Frances R, Chiva M, Sanchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, et al. (2007) Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 46: 797–803.
- Sanchez E, Such J, Chiva MT, Soriano G, Llovet T, et al. (2007) Development of an experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhotic rats with or without ascites. *Am J Gastroenterol* 102: 1230–1236.
- Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA (1991) A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 100: 489–493.
- Runyon BA, Squier S, Borzio M (1994) Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 21: 792–796.
- Tsikas D (2005) Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 39: 797–815.
- Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J (1993) Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 104: 1492–1497.
- Beutler B (2000) Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 12: 20–26.
- Frances R, Munoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, et al. (2004) Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 53: 860–864.
- Marques LJ, Zheng L, Poulakis N, Guzman J, Costabel U (1999) Pentoxifylline inhibits TNF- $\alpha$  production from human alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*. 159(2): 508–511.
- Yu B, Becnel J, Zerfaoui M, Rohatgi R, Boulares AH, et al. (2008) Serotonin 5-hydroxytryptamine (2A) receptor activation suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammation with extraordinary potency. *J Pharmacol Exp Ther*. 327(2): 316–323.



# DISCUSIÓN

En la presente Tesis se propone desarrollar un modelo experimental de PBI en ratas cirróticas con y sin ascitis y valorar el efecto de un nuevo tratamiento inmunomodulador asociado o no a un antibiótico.

A continuación discutiremos los resultados más relevantes obtenidos en los 2 estudios:

#### ▪ ESTUDIO 1:

##### ***Desarrollo de un nuevo modelo experimental de cirrosis y peritonitis bacteriana inducida (PBI) mediante la inoculación intraperitoneal de E. coli***

Es este estudio desarrollamos los siguientes protocolos:

- Protocolo 1: Modelo de PBI en ratas con ascitis.
- Protocolo 2: Modelo de PBI en ratas sin ascitis.
- Protocolo 3: Efecto de un tratamiento antibiótico sobre la mortalidad en ratas cirróticas sin ascitis con PBI.

#### **Protocolo 1: Modelo de PBI en ratas con ascitis**

El primer protocolo tenía por objetivo inducir PBI en ratas cirróticas con ascitis mediante la administración intraperitoneal de *E. coli*. Para inducir PBI se seleccionó *E. coli*, debido a que es el microorganismo más común que causa la PBE en pacientes con cirrosis <sup>(28, 182)</sup> y el microorganismo utilizado en modelos de sepsis en ratas sanas <sup>(183)</sup>. Se seleccionó la cepa de *E. coli* ATCC25922.

Se realizó un estudio previo en el que se evaluó la virulencia de la cepa de *E. coli* administrándola intraperitonealmente en ratas sanas, sin cirrosis. En ratas sanas de peso entre 180-230 g la mortalidad, a corto plazo (dentro de las primeras 48 horas), fue elevada tanto si se administraba en 20 ml de agua estéril 1 ml a la concentración de  $10^8$  ufc/ml como si se administraba 1ml a la concentración de  $10^9$  ufc/ml de *E. coli* (78% y 100% respectivamente), lo cual está de acuerdo con publicaciones anteriores <sup>(183)</sup>. Cabe destacar, pero, que en ratas con un peso entre 180-230 g (ratas jóvenes, equivalentes al peso en el que se inicia la inducción de cirrosis) presentan una mortalidad significativamente más elevada (87%) respecto al grupo de ratas sanas con un peso de 450-500 g, grupo en el que no hubo mortalidad (0%,  $p \leq 0.05$ ). Estas ratas, por tanto, son capaces de desarrollar mecanismos para resolver la infección por *E. coli* a las concentraciones estudiadas.

Una vez comprobada la virulencia de la cepa se procedió a desarrollar el primer estudio donde se evaluó la mortalidad a corto plazo de ratas con cirrosis y ascitis. Utilizamos el modelo experimental de ratas cirróticas de Runyon y colaboradores <sup>(184)</sup> con administración intragástrica de CCl<sub>4</sub> para conseguir ratas cirróticas con ascitis (determinada por paracentesis), no infectadas (estudio por cultivo microbiológico), para así poder estudiar el efecto de la administración de *E. coli*. Evaluamos el efecto de la administración de diferentes concentraciones de *E. coli* sobre la mortalidad a corto plazo, debido a que observamos que si superaban las primeras 48 horas ya no había mortalidad debido a la infección. En ratas cirróticas con ascitis que recibieron la concentración de 10<sup>9</sup> ufc/ml de *E. coli* se observó un aumento de la mortalidad respecto a las que recibieron 10<sup>8</sup> ufc/ml de *E. coli*, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (58,3% vs 30%, pNS). Sin embargo, la mortalidad observada respecto a las ratas control con peso similar sí alcanzó significación estadística (45% vs 0% p≤0.05). Esto es compatible probablemente, con la existencia de un notable deterioro de los mecanismos de defensa de los animales cirróticos, de forma similar a lo que se ha descrito en pacientes con cirrosis avanzada <sup>(28, 182)</sup>. La mortalidad en las ratas sanas con bacteriemia inducida se piensa que está directamente relacionada con el volumen de líquido inyectado en la cavidad peritoneal <sup>(183)</sup>, lo que sugiere que la mortalidad en ratas cirróticas con ascitis con PBI podría depender también del volumen de líquido ascítico.

La respuesta inflamatoria peritoneal observada en las ratas cirróticas con ascitis a las que se les inoculó *E. coli*, fue una respuesta inflamatoria rápida después de la inyección de *E. coli* (pico a las 4 horas tras la inoculación) similar a lo observado previamente en ratas sanas <sup>(183, 185)</sup>. La presencia de ascitis no afectó a la respuesta inflamatoria peritoneal, más marcada de lo que generalmente se observa en pacientes cirróticos con PBE <sup>(176, 186)</sup>.

## **Protocolo 2: Modelo de PBI en ratas sin ascitis**

El segundo protocolo tenía por objetivo inducir PBI en ratas cirróticas sin ascitis mediante la administración intraperitoneal de *E. coli*.

Se estudió el efecto de la administración de diferentes concentraciones de *E. coli* (10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> ufc) en diferentes diluciones de agua estéril (1 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml).

Los resultados observados en las ratas con cirrosis sin ascitis mostraron que la mortalidad a corto plazo dependía de la concentración de *E. coli* administrada. En aquellas ratas que no se les administraba *E. coli* no observamos mortalidad en el periodo estudiado. Independientemente del volumen administrado, a concentraciones bajas de *E. coli* (10<sup>7</sup> ufc/ml), solo una rata falleció (1/13; 7.7%), y cuando se inoculó 10<sup>8</sup> ufc/ml de *E. coli* esta concentración del inóculo se observó que era capaz de causar una mortalidad ya relevante, pero significativamente menor a la que se produce al inocular 10<sup>9</sup> ufc/ml (23/37; 63% vs 35/37; 95%; p <0.01).

En contraste con estudios anteriores en ratas no cirróticas <sup>(175, 183)</sup>, en nuestro estudio la mortalidad no se vio afectada por el volumen de agua estéril inoculado en ratas sin ascitis, probablemente debido a que la mortalidad al administrar 1 ml a la concentración de  $10^9$  ufc/ml de *E. coli* fue prácticamente del 100% independientemente del volumen total. Sin embargo, las ratas cirróticas que fueron inoculadas con  $10^8$  ufc de *E. coli* mostraron una tendencia a una mayor mortalidad cuando el inóculo se diluyó en volúmenes mayores. Es probable que si se aumentara el número de animales con este enfoque experimental, esta tendencia alcanzara la significación estadística.

La respuesta de PMN peritoneales se produjo rápidamente después de la inyección de *E. coli*, al igual que en el grupo con ascitis. La respuesta producida por los PMN durante las primeras horas después de la infección fue independiente de la concentración del inóculo, pero se observó un aumento significativo a las 24 horas en las ratas inoculadas con la concentración más elevada de *E. coli* ( $10^9$  ufc/ml) respecto a las concentraciones más bajas ( $10^7$  ó  $10^8$  ufc/ml), en las que no había una disminución progresiva de recuento de PMN en el líquido ascítico. Estos datos sugieren que en las primeras fases de la infección, independientemente de la concentración del inóculo, existe una respuesta leucocitaria como respuesta a la infección. Si se infectan con un inóculo a concentración baja, las ratas cirróticas tienen capacidad para controlar la infección, pero a concentraciones elevadas del inóculo la respuesta inicial de PMN no es suficiente, por lo que se observó en aquellas ratas infectadas con  $10^9$  ufc/ml de *E. coli* un segundo pico de PMN en líquido ascítico pasadas las 6 horas, posiblemente como respuesta a la persistencia de la infección (Figura 2).

Al comparar ambos protocolos (ratas con ascitis y sin ascitis con PBI), la mortalidad en los animales cirróticos sin ascitis era significativamente mayor respecto a aquellos que habían desarrollado ascitis, independiente del inóculo de *E. coli*. Estos hallazgos se podrían explicar al menos en parte por tres mecanismos: En primer lugar, el líquido ascítico tiene una capacidad bactericida intrínseca <sup>(187)</sup> y la probabilidad de desarrollar un episodio PBE está directamente relacionada con la actividad antimicrobiana del líquido ascítico <sup>(55, 188, 189)</sup>. Los pacientes con baja actividad opsónica del líquido ascítico <sup>(188)</sup> o con niveles bajos de proteínas totales en el líquido ascítico muestran una mayor incidencia de PBE durante el seguimiento <sup>(55, 189)</sup>. Posiblemente aquellas ratas del estudio con cirrosis sin ascitis a las que se les inoculó *E. coli* diluido en agua, carecerían de mecanismos intrínsecos bactericidas del líquido ascítico. En segundo lugar, en estudios experimentales de nuestro grupo se han observado tanto en ratas bajo la inducción de cirrosis, como en aquellas en que ya es evidente la presencia de ascitis, la presencia de fragmentos de genoma bacteriano en sangre y líquido ascítico <sup>(49)</sup>. En estudios en pacientes con cirrosis se ha observado que una marcada respuesta inflamatoria peritoneal <sup>(190)</sup> puede aumentar la actividad bactericida en la cavidad peritoneal <sup>(191)</sup>. Esto corroboraría la menor mortalidad en los animales que ya habían desarrollado ascitis en el momento de la inoculación. Sin embargo, en el

presente estudio, no hemos evaluado la actividad antimicrobiana del líquido ascítico en las ratas cirróticas.

En tercer lugar, la gran sobrecarga de líquido inyectado en la cavidad peritoneal también podría contribuir a la mayor mortalidad en las ratas con cirrosis que no han desarrollado ascitis en comparación con las que presentaban ascitis, observando una tendencia a una mayor mortalidad en las ratas sin ascitis inoculadas con  $10^8$  ufc/ml con volúmenes crecientes. Sin embargo, este efecto no se observó en ratas cirróticas infectadas con  $10^9$  ufc/ml debido a que la concentración de *E. coli* de  $10^9$  ufc/ml es tan elevada que produce una mortalidad de casi el 100% independientemente del volumen que se inocule. Esto nos lleva a pensar que, aparte del efecto del volumen del líquido, es importante también la concentración de bacterias en la infección. Hemos observado que a concentraciones muy bajas de bacterias no hay mortalidad y sin embargo a concentraciones crecientes va aumentando hasta llegar al 100%.

El efecto del volumen del líquido en la cavidad abdominal ya se ha estudiado en diversos trabajos en los que se observa que el volumen del líquido ascítico de la cavidad abdominal puede diluir las opsoninas y obstaculizar la fagocitosis<sup>(183, 192)</sup>, debido a que los fagocitos solo fagocitan bacterias ante cantidades suficientes de opsoninas. También se ha observado en diferentes estudios que cuanto mayor es el volumen de líquido en la cavidad peritoneal, si las bacterias no han sido eliminadas en las primeras fases, porque han escapado del aclaramiento y la fagocitosis, las bacterias tienen una mayor capacidad de multiplicarse en la cavidad peritoneal al encontrarse en un medio más idóneo<sup>(183)</sup>. En un estudio se administraron volúmenes similares de agua por sonda orogástrica para evaluar la capacidad para excretar agua libre en las ratas cirróticas con ascitis pero no apreciaron una mayor mortalidad<sup>(193)</sup>.

### **Protocolo 3. Efecto de la administración de un tratamiento antibiótico sobre la mortalidad y la respuesta de PMN en ratas cirróticas con PBI**

En esta parte del estudio se utilizaron ratas cirróticas sin ascitis con PBI a las que se les inoculó 1 ml a la concentración de  $10^8$  ó  $10^9$  ufc/ml de *E. coli*, en un volumen de 20 ml para comprobar el efecto de la administración de un tratamiento antibiótico (ceftriaxona) sobre la mortalidad y la respuesta de PMN en el líquido peritoneal.

Se observó que todas las ratas cirróticas infectadas con una concentración inicial de  $10^8$  ufc en 1 ml de *E. coli* en un volumen de 20 ml y tratadas con ceftriaxona sobrevivieron a la infección, mientras que solo el 27% de las ratas infectadas con  $10^9$  ufc en 1 ml de *E. coli* y 20 ml sobrevivieron ( $p \leq 0.01$ ). Estos datos sugieren que el tratamiento antibiótico es eficaz en este modelo de PBI, al igual que en pacientes con PBE<sup>(61, 182)</sup>. Sin embargo, hemos observado que la concentración del inóculo es importante para solventar la infección y que las ratas infectadas con un inóculo alto probablemente requieren otras estrategias adicionales para resolver la infección.

## ▪ ESTUDIO 2:

### ***Estudio del efecto de la administración de un tratamiento antibiótico asociado o no a un inmunomodulador anti-TNF $\alpha$ sobre la mortalidad en ratas cirróticas con PBI***

En este estudio evaluamos una nueva estrategia terapéutica para intentar reducir la mortalidad durante los episodios de peritonitis bacteriana en ratas con cirrosis. Utilizamos el modelo que desarrollamos en el primer estudio de esta Tesis Doctoral de PBI en ratas con cirrosis sin ascitis, a las que se les inoculó 20 ml de agua en la cavidad peritoneal y 1 ml de agua con una concentración de  $10^9$  ufc/ml de *E. coli*.

Los objetivos de este estudio se centraron en estudiar el efecto de la administración de anti-TNF $\alpha$  mAb (anticuerpo monoclonal que bloquea el TNF $\alpha$ ) con o sin antibiótico (ceftriaxona) en la respuesta inflamatoria y en la mortalidad en el modelo de ratas cirróticas con PBI.

En el grupo de ratas a las que se les inoculó una concentración de  $10^9$  ufc de *E. coli* en 1 ml y 20 ml de agua en la cavidad peritoneal y que no recibieron tratamiento, la mortalidad fue del 100% (15/15), igual que la obtenida en el estudio 1 de nuestra Tesis en ratas cirróticas sin ascitis y con PBI a la misma dosis. También la mortalidad fue del 100% en el grupo que recibió solo anti-TNF $\alpha$  (15/15). Por lo tanto, la administración de anti-TNF $\alpha$  en este modelo no conseguía reducir la mortalidad por sí sola.

La administración de ceftriaxona sola redujo la mortalidad a un 73.3% (11/15), sin alcanzar significación estadística. Sin embargo, la administración de ceftriaxona combinada con anti-TNF $\alpha$  redujo la mortalidad al 53.3% (8/15;  $p < 0.01$  respecto al grupo de ratas que no recibió tratamiento antibiótico).

Realizamos una evaluación de los grupos de ratas que no recibieron tratamiento antibiótico (sin tratamiento y aquellos que recibieron anti-TNF $\alpha$ ) y aquellos que sí recibieron tratamiento antibiótico (los que recibieron ceftriaxona sola y/o conjuntamente con anti-TNF $\alpha$ ). Las ratas con PBI que no recibieron tratamiento antibiótico inoculadas con  $10^9$  ufc en 1 ml de *E. coli* en un volumen de 20 ml presentaron una mortalidad del 100%, mientras que en aquellas que recibieron tratamiento antibiótico con o sin anti-TNF $\alpha$  la mortalidad disminuyó a un 63% (21/30;  $p < 0.001$ ). Por lo tanto, podemos sugerir que la administración conjunta de anti-TNF $\alpha$  y una cefalosporina de tercera generación reduce la mortalidad en este modelo experimental, probablemente debido a la acción del antibiótico y a la acción moduladora de la respuesta inflamatoria por la administración del anti-TNF $\alpha$ . Sin embargo, este beneficio no fue estadísticamente significativo si comparamos ratas tratadas solo con ceftriaxona respecto a aquellas sin tratar (73% vs 100%; pNS). Por lo tanto, la acción conjunta puede ejercer algún beneficio para reducir la mortalidad en este modelo experimental y abre el camino a seguir investigando sobre esta acción bajo nuevas perspectivas.

Probablemente, serían necesarios estudios adicionales incluyendo más animales para evaluar si la asociación de la terapia antibiótica junto al anti-TNF $\alpha$  podría ser un posible enfoque terapéutico para reducir la mortalidad en pacientes cirróticos con PBE.

Dado que el TNF $\alpha$  es parte de la respuesta inmunitaria normal frente a las infecciones bacterianas, es necesario estudiar en profundidad si la administración de anti-TNF $\alpha$  podría dar lugar a un aumento del riesgo de sobreinfecciones bacterianas. En el presente estudio no observamos sobreinfecciones en aquellas ratas tratadas con antibióticos y anti-TNF $\alpha$  respecto a las tratadas solo con antibiótico, sino más bien una tendencia a todo lo contrario en aquellas ratas que sobrevivieron. En las ratas supervivientes se realizaron cultivos de muestras de la laparotomía para estudio de la TB. Tres de las 4 ratas tratadas con ceftriaxona presentaban TB respecto a solo 1/7 del grupo que recibieron anti-TNF $\alpha$  junto a ceftriaxona ( $p=0.08$ ). Estos resultados son similares a otros reportados previamente por nuestro grupo <sup>(194)</sup>, que demostraron que la administración de anti-TNF $\alpha$  en ratas con cirrosis y ascitis estéril disminuía la incidencia de TB a GLM respecto al grupo de ratas no tratadas. Por ello, se debe ser prudentes a la hora de recomendar inmunomoduladores como el anti-TNF $\alpha$  una vez la infección está establecida. Estudios futuros deberían clarificar mejor esta observación.

Actualmente aparte del anti-TNF $\alpha$  también se están estudiando otro tipo de inhibidores de TNF $\alpha$ , como moléculas no monoclonales relacionadas con derivados de la xantina tales como la pentoxifilina <sup>(195)</sup> o el receptor de serotonina 5-hidroxitriptamina (2A) o agonistas tales como 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina <sup>(196)</sup>. Estas nuevas estrategias terapéuticas se podrían utilizar para evaluar los resultados obtenidos en esta Tesis en terapias con o sin antibióticos con estos nuevos tipos de inmunomoduladores y ver su posible utilización en la clínica.

Los resultados analíticos destacados en este estudio revelan, en primer lugar, que el NOx fue el único parámetro analítico a las 4 horas postinfección que mostró diferencias estadísticamente significativas entre aquellas ratas que sobrevivieron y las que no. Se observó un aumento significativo de los niveles de NOx en aquellas ratas que no sobrevivieron ( $125.46 \pm 62.0$  nmols/ml) respecto a aquellas ratas que sobrevivieron ( $84.96 \pm 26.9$  nmols/ml;  $p \leq 0.05$ ). Estos resultados son similares a los que se ha observado en pacientes con PBE <sup>(178)</sup>, y podría estar relacionado con episodios repetidos de TB y estimulación de la respuesta inmune antes de la inyección intraperitoneal con *E. coli*. Diversos estudios han demostrado que productos bacterianos como lipopolisacárido o el ADN bacteriano son capaces de estimular la respuesta inmune a través de receptores TLR4 y 9, respectivamente <sup>(190, 197)</sup>, y que niveles de NOx más elevados se correlacionan con trastornos hemodinámicos graves, lo que podría tener valor predictivo de mortalidad. Estudios en pacientes con PBE también han observado niveles elevados de NOx y de TNF $\alpha$  durante los episodios de PBE. Estos marcadores serían por lo tanto útiles para predecir complicaciones tales como la insuficiencia renal y la mortalidad <sup>(93, 178, 198, 199)</sup>. En

estudios realizados por nuestro grupo se han detectado episodios de TB en muestras secuenciales de sangre de pacientes con PBE en tratamiento con antibióticos, mediante la determinación de la presencia de fragmentos de ADN bacteriano en sangre. En dicho estudio se observó que los niveles de ADN bacteriano se relacionan de forma directa y significativa con citoquinas proinflamatorias y NOx<sup>(177)</sup>. En otro estudio de Lopez-Talavera en un modelo en ratas con hipertensión portal, el anti-TNF $\alpha$  parece disminuir las alteraciones hemodinámicas<sup>(200)</sup>, así como reducir los episodios de TB en un modelo de cirrosis<sup>(194)</sup>. Estos datos sugieren que la modulación de la respuesta inflamatoria podría mejorar la supervivencia, apoyando nuestra hipótesis de que el uso de un anti-TNF $\alpha$  selectivo contra TNF $\alpha$  junto con un antibiótico como ceftriaxona sería capaz de disminuir la mortalidad en pacientes con PBE.

En segundo lugar, si comparamos los niveles de TNF $\alpha$  entre las 4 horas postinfección y los obtenidos en la laparotomía en aquellos animales que sobrevivieron, observamos que disminuyeron los niveles de TNF $\alpha$  tras recibir ceftriaxona sola o en combinación con anti-TNF $\alpha$ , aunque los resultados solo alcanzaron significación estadística en el grupo de tratamiento que recibió ceftriaxona y anti-TNF $\alpha$  ( $p \leq 0.05$ ). No se alcanzó significación estadística en el grupo tratado solo con ceftriaxona. Esto es debido seguramente a la especificidad del anti-TNF $\alpha$  mAb utilizado en esta investigación que permite disminuir los niveles de TNF $\alpha$ , consiguiendo conjuntamente con el tratamiento antibiótico una disminución del estado proinflamatorio una vez resuelta la infección. La administración de ceftriaxona y anti-TNF $\alpha$  en un modelo de PBI, por tanto, disminuye los niveles séricos de TNF $\alpha$ . Sin embargo, en el presente estudio no se observan diferencias significativas en la supervivencia en las ratas cirróticas con PBI tratadas con antibióticos asociados o no a la administración de anti-TNF $\alpha$ . Serían necesarios estudios adicionales que incluyeran más animales para evaluar si la asociación de antibiótico y anti-TNF $\alpha$  podría ser útil para reducir la mortalidad en ratas cirróticas con PBI, antes que esta combinación terapéutica pueda ser evaluada en estudios clínicos.

El modelo experimental de PBI es una herramienta útil para evaluar la eficacia del tratamiento combinado de un antibiótico con un inmunomodulador y podría ser de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias en estos pacientes.



**CONCLUSIONES**

**ESTUDIO 1:*****Desarrollo de un nuevo modelo experimental de cirrosis y peritonitis bacteriana inducida mediante la inoculación intraperitoneal de E. coli***

- ✓ Desarrollamos un nuevo modelo experimental de peritonitis bacteriana inducida en ratas cirróticas con o sin ascitis que es fácilmente reproducible, mediante la inoculación intraperitoneal de *E. coli*, el microorganismo más común en pacientes con cirrosis y PBE.
- ✓ La inoculación intraperitoneal de *E. coli* produce una rápida respuesta polimorfonuclear en la cavidad peritoneal tanto en ratas cirróticas con o sin ascitis.
- ✓ La mortalidad tanto de las ratas control como de las ratas con cirrosis con o sin ascitis depende directamente de la concentración del inóculo.
- ✓ En el modelo de peritonitis inducida en ratas cirróticas sin ascitis, la mortalidad está relacionada tanto con la concentración del inóculo como con el volumen inoculado.
- ✓ La mortalidad de las ratas cirróticas con peritonitis bacteriana inducida fue significativamente superior en ratas sin ascitis que en aquellas con ascitis.

---

▪ **ESTUDIO 2:**

***Estudio del efecto de la administración de un tratamiento antibiótico asociado o no a un inmunomodulador anti-TNF $\alpha$  sobre la mortalidad en ratas cirróticas con peritonitis bacteriana inducida***

- ✓ El tratamiento con ceftriaxona reduce la mortalidad en un 28.6% en el modelo experimental de ratas cirróticas sin ascitis con peritonitis bacteriana inducida inoculadas con  $10^9$  ufc/ml de *E. coli* en 20 ml de agua estéril.
- ✓ La administración de anti-TNF $\alpha$  solo no modifica la mortalidad en este modelo experimental respecto al grupo tratado con placebo.
- ✓ La asociación de ceftriaxona y anti-TNF $\alpha$  reduce significativamente la mortalidad en comparación con el tratamiento anti-TNF $\alpha$  solo y el grupo placebo.
- ✓ La administración de ceftriaxona y anti-TNF $\alpha$  disminuye los niveles séricos de TNF $\alpha$ .

**COMUNICACIONES EN  
CONGRESOS**

**▪ CONGRESOS NACIONALES:**

- ***Desenvolupament d'un nou model experimental de cirrosis i peritonitis bacteriana induïda per l'administració intraperitoneal d'E.coli***

E.Sánchez, M.Chiva, G.Soriano, T.Llovet\*\*, J.M.González\*, C.Muñoz\*, X. Song\*\*\*, J.Such\*, J.Balanzó, C.Guarner.

Secció d' Hepatologia, Servei de Patologia Digestiva, \*\*Servei de Microbiologia, Hospital de Sant Pau, Barcelona, \*Unitat d'Hepatologia, Hospital General de Alacant, Alacant, \*\*\*Research and Development Centocor, Malvern (PA)

**XIII Congrés de la societat catalana de digestologia, Seva, 2004**

- ***Efecte de l'administració d'anti-TNF $\alpha$  i ceftriaxona envers la mortalitat en rates cirròtiques amb peritonitis bacteriana induïda***

M.Chiva, E.Sánchez, G.Soriano, T.Llovet\*\*, J.M.González\*, B.Lozano\*, R.Francés\*, C.Muñoz\*, X. Song\*\*\*, J.Such\*, J.Balanzó, C.Guarner.

Secció d' Hepatologia, Servei de Patologia Digestiva, \*\*Servei de Microbiologia, Hospital de Sant Pau, Barcelona, \*Unitat d'Hepatologia, Hospital General de Alacant, Alacant, \*\*\*Research and Development Centocor, Malvern (PA)

**XIII Congrés de la societat catalana de digestología, Seva, 2004**

- ***Desarrollo de un modelo experimental de cirrosis y peritonitis bacteriana inducida por la administración intraperitoneal de E.coli***

E.Sánchez, M.Chiva, G.Soriano, T.Llovet\*\*, J.M.González\*, C.Muñoz\*, X. Song\*\*\*, J.Such\*, J.Balanzó, C.Guarner.

Sección de Hepatología, Servicio de Patología Digestiva, \*\*Servicio de Microbiología, Hospital de Sant Pau, Barcelona, \*Unitat de Hepatología, Hospital General de Alacant, Alacant, \*\*\*Research and Development Centocor, Malvern (PA)

**XXIX Congreso de la asociación española de estudio del hígado, Madrid, 2004**

- ***Efecto de la administración de ANTI-TNF $\alpha$  y CEFTRIAXONA sobre la mortalidad en ratas cirróticas con peritonitis bacteriana inducida.***

M.Chiva, E.Sánchez, G.Soriano, T.Llovet\*\*, J.M.González\*, B.Lozano\*, R.Francés\*, C.Muñoz\*, X. Song\*\*\*, J.Such\*, J.Balanzó, C.Guarner.

Sección de Hepatología, Servicio de Patología Digestiva, \*\*Servicio de Microbiología, Hospital de Sant Pau, Barcelona, \*Unidad de Hepatología, Hospital General de Alicante, Alicante, \*\*\*Research and Development Centocor, Malvern (PA)

**XXIX Congreso de la asociación española de estudio del hígado, Madrid, 2004**

**▪ CONGRESOS INTERNACIONALES:**

- ***Development of an experimental model of induced bacterial peritonitis in rats with cirrhosis by intraperitoneal administration of E.coli***

E.Sánchez, M.Chiva, G.Soriano, T.Llovet\*\*, J.M.González\*, J.Mercè\*\*\*, C.Muñoz\*, X. Song\*\*\*\*, J.Such\*, J.Balanzó, C.Guarner.

Liver Section, Department of Gastroenterology, \*\*Department of Microbiology, \*\*\*Department of Biochemistry, Hospital de Sant Pau, Barcelona (Spain), \*Liver Unit, Hospital General de Alicante, Alicante (Spain), \*\*\*\*Research and Development Centocor, Malvern (PA, USA)

**The liver meeting 2004 AASLD**

- ***Effect of anti-TNF $\alpha$  and ceftriaxone administration on mortality in cirrhotic rats with induced bacterial peritonitis***

M.Chiva, E.Sánchez, G.Soriano, T.Llovet\*\*, J.M.González\*, B.Lozano\*, FJ. Sancho\*\*\*, F. Blanco\*\*\*\*, C.Muñoz\*, X. Song\*\*\*\*\*, J.Such\*, J.Balanzó, C.Guarner.

Liver Section, Department of Gastroenterology, \*\*Department of Microbiology, \*\*\*Department of Pathology, \*\*\*\*Department of Biochemistry, Hospital de Sant Pau, Barcelona (Spain), \*Liver Unit, Hospital General de Alicante, Alicante (Spain), \*\*\*\*\*Research and Development Centocor, Malvern (PA, USA)

**The liver meeting 2004 AASLD**

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Garcia-Alvarez A, Serra-Majem L, Ribas-Barba L, Castell C, Foz M, Uauy R, Plasencia A, et al. Obesity and overweight trends in Catalonia, Spain (1992-2003): gender and socio-economic determinants. *Public Health Nutr* 2007;10:1368-1378.
2. Gutierrez-Fisac JL. [Alcohol consumption indicators in Spain]. *Med Clin (Barc)* 1995;104:544-550.
3. Rakoski MO, McCammon RJ, Piette JD, Iwashyna TJ, Marrero JA, Lok AS, Langa KM, et al. Burden of cirrhosis on older Americans and their families: analysis of the health and retirement study. *Hepatology* 2012;55:184-191.
4. Poynard T, Ratziu V, Benhamou Y, Opolon P, Cacoub P, Bedossa P. Natural history of HCV infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:211-228.
5. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*;51:1445-1449.
6. Fordtran's S. *Gastrointestinal and Liver Disease*. Philadelphia PA, USA, 2006.
7. Rozman F. *Medicina Interna*. Barcelona: Elsevier, 2012.
8. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014.
9. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, Washington MK, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* 2013;381:468-475.
10. Morgan TR, Ghany MG, Kim HY, Snow KK, Shiffman ML, De Santo JL, Lee WM, et al. Outcome of sustained virological responders with histologically advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010;52:833-844.
11. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35:140-148.
12. Borzio M, Salerno F, Piantoni L, Cazzaniga M, Angeli P, Bissoli F, Boccia S, et al. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001;33:41-48.
13. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, Stadlbauer V, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol* 2014;60:1310-1324.
14. Fernandez J, Gustot T. Management of bacterial infections in cirrhosis. *J Hepatol* 2012;56 Suppl 1:S1-12.
15. Novella M, Sola R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, Coll S, et al. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997;25:532-536.
16. Ortiz J, Vila MC, Soriano G, Minana J, Gana J, Mirelis B, Novella MT, et al. Infections caused by *Escherichia coli* resistant to norfloxacin in hospitalized cirrhotic patients. *Hepatology* 1999;29:1064-1069.
17. Fernandez J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, de Lope CR, Roca D, Pavesi M, et al. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 2012;55:1551-1561.
18. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002;137:791-797.



19. Ariza X, Castellote J, Lora-Tamayo J, Girbau A, Salord S, Rota R, Ariza J, et al. Risk factors for resistance to ceftriaxone and its impact on mortality in community, healthcare and nosocomial spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 2012;56:825-832.
20. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403-411.
21. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998;28:1187-1190.
22. Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2012;33:31-39.
23. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433.
24. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992;23:217-244.
25. Cuenca S, Sanchez E, Santiago A, El Khader I, Panda S, Vidal S, Camilo Nieto J, et al. Microbiome composition by pyrosequencing in mesenteric lymph nodes of rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. *J Innate Immun* 2014;6:263-271.
26. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60:197-209.
27. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000;31:43-48.
28. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997;26:1372-1378.
29. Bauer TM, Steinbruckner B, Brinkmann FE, Ditzen AK, Schwacha H, Aponte JJ, Pelz K, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2962-2967.
30. Morencos FC, de las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995;40:1252-1256.
31. Pande C, Kumar A, Sarin SK. Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:1273-1281.
32. Casafont Morencos F, de las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1996;41:552-556.
33. Pardo A, Bartoli R, Lorenzo-Zuniga V, Planas R, Vinado B, Riba J, Cabre E, et al. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:858-863.
34. Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, Peng L, Zhao G, Downes M, Yu RT, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3920-3925.
35. Shindo M, Ken A, Okuno T. Varying incidence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C responding differently to interferon therapy. *Cancer* 1999;85:1943-1950.
36. Teltschik Z, Wiest R, Beisner J, Nuding S, Hofmann C, Schoelmerich J, Bevins CL, et al. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology* 2012;55:1154-1163.

37. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96-105.
38. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998;27:669-674; quiz 675-666.
39. Garcia-Tsao G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:257-275.
40. Follo A, Llovet JM, Navasa M, Planas R, Forns X, Francitorra A, Rimola A, et al. Renal impairment after spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. *Hepatology* 1994;20:1495-1501.
41. Wiest R, Groszmann RJ. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis* 1999;19:411-426.
42. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478-491.
43. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008;48:322-335.
44. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009;27:147-163.
45. Pradere JP, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2010;30:232-244.
46. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994;20:1359-1363.
47. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991;337:776-778.
48. Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, Thyssen L, Gentemann M, Grunhage F, Lammert F, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:1010-1016.
49. Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Sola-Vera J, et al. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:371-376.
50. Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:145-150.
51. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993;18:1139-1143.
52. Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005;54:556-563.
53. Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-217.
54. Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alia C, Gallen M, Vila MC, Coll S, et al. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology* 1993;104:1133-1138.
55. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988;6:80-84.

56. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Rodes J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988;8:27-31.
57. Senzolo M, Agarwal S, Zappoli P, Vibhakorn S, Mallett S, Burroughs AK. Heparin-like effect contributes to the coagulopathy in patients with acute liver failure undergoing liver transplantation. *Liver Int* 2009;29:754-759.
58. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, Mandorfer M, Heinisch BB, Hayden H, Lammert F, et al. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013;58:911-921.
59. Rasaratnam B, Kaye D, Jennings G, Dudley F, Chin-Dusting J. The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2003;139:186-193.
60. Navasa M, Casafont F, Clemente G, Guarner C, de la Mata M, Planas R, Sola R, et al. [Consensus on spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis: diagnosis, treatment, and prophylaxis]. *Gastroenterol Hepatol* 2001;24:37-46.
61. Felisart J, Rimola A, Arroyo V, Perez-Ayuso RM, Quintero E, Gines P, Rodes J. Cefotaxime is more effective than is ampicillin-tobramycin in cirrhotics with severe infections. *Hepatology* 1985;5:457-462.
62. Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vargas V, Rimola A, Marco F, et al. Randomized, comparative study of oral ofloxacin versus intravenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1996;111:1011-1017.
63. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, Castells L, et al. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 1999;341:403-409.
64. Poca M, Concepcion M, Casas M, Alvarez-Urturi C, Gordillo J, Hernandez-Gea V, Roman E, et al. Role of albumin treatment in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:309-315.
65. Hoefs J. Noninvasive measurement of nutrient portal blood shunting. *Hepatology* 1983;3:464-465.
66. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986;6:252-262.
67. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 2000;182:526-533.
68. Chiva M, Soriano G, Rochat I, Peralta C, Rochat F, Llovet T, Mirelis B, et al. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002;37:456-462.
69. Bauer TM, Fernandez J, Navasa M, Vila J, Rodes J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002;36:501-506.
70. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R, Hofmann AF, Vinado B, Hagey LR, Hernandez JM, et al. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 2003;37:551-557.
71. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-274.
72. Lopez-Talavera JC, Levitzki A, Martinez M, Gazit A, Esteban R, Guardia J. Tyrosine kinase inhibition ameliorates the hyperdynamic state and decreases nitric oxide production in cirrhotic rats with portal hypertension and ascites. *J Clin Invest* 1997;100:664-670.

73. Munoz J, Albillos A, Perez-Paramo M, Rossi I, Alvarez-Mon M. Factors mediating the hemodynamic effects of tumor necrosis factor-alpha in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999;276:G687-693.
74. Albillos A, Nieto M, Ubeda M, Munoz L, Fraile B, Reyes E, Lledo L, et al. The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrhosis. *Gut*;59:943-952.
75. Munoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledo L, Monserrat J, Sanz E, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:411-419.
76. Albillos A, Nieto M, Ubeda M, Munoz L, Fraile B, Reyes E, Lledo L, et al. The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrhosis. *Gut* 2010;59:943-952.
77. Giron JA, Alvarez-Mon M, Menendez-Caro JL, Abreu L, Albillos A, Manzano L, Durantez A. Increased spontaneous and lymphokine-conditioned IgA and IgG synthesis by B cells from alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1992;16:664-670.
78. Tilg H, Vogel W, Wiedermann CJ, Shapiro L, Herold M, Judmaier G, Dinarello CA. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists in liver disease. *Hepatology* 1993;18:1132-1138.
79. Albillos A, Hera Ad Ade L, Reyes E, Monserrat J, Munoz L, Nieto M, Prieto A, et al. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-631.
80. Heller J, Sogni P, Barriere E, Tazi KA, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, Bories PN, et al. Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 2000;33:376-381.
81. von Baehr V, Docke WD, Plauth M, Liebenthal C, Kupferling S, Lochs H, Baumgarten R, et al. 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 desensitisation. *Gut* 2000;47:281-287.
82. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997;385:729-733.
83. Riordan SM, Skinner N, Nagree A, McCallum H, McIver CJ, Kurtovic J, Hamilton JA, et al. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:1154-1164.
84. Kitamura K, Nakamoto Y, Akiyama M, Fujii C, Kondo T, Kobayashi K, Kaneko S, et al. Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Lab Invest* 2002;82:571-583.
85. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717-1725.
86. Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3127-3131.
87. Tazi KA, Bieche I, Paradis V, Guichard C, Laurendeau I, Dargere D, Legrand A, et al. In vivo altered unfolded protein response and apoptosis in livers from lipopolysaccharide-challenged cirrhotic rats. *J Hepatol* 2007;46:1075-1088.

88. Tarrats N, Moles A, Morales A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Mari M. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatology* 2011;54:319-327.
89. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999;104:1223-1233.
90. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol* 2012;590:447-458.
91. Taylor CT, Dzus AL, Colgan SP. Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology* 1998;114:657-668.
92. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G367-376.
93. Navasa M, Follo A, Filella X, Jimenez W, Francitorra A, Planas R, Rimola A, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 1998;27:1227-1232.
94. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907-916.
95. Haak-Frendscho M, Marsters SA, Mordenti J, Brady S, Gillett NA, Chen SA, Ashkenazi A. Inhibition of TNF by a TNF receptor immunoadhesin. Comparison to an anti-TNF monoclonal antibody. *J Immunol* 1994;152:1347-1353.
96. van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-135.
97. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340:1398-1405.
98. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Cawkwell GD, Silverman ED, Nocton JJ, Stein LD, et al. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. N Engl J Med* 2000;342:763-769.
99. Brandt J, Haibel H, Cornely D, Golder W, Gonzalez J, Reddig J, Thriene W, et al. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum* 2000;43:1346-1352.
100. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, VanderStoep A, Finck B, Burge DJ. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 2000;356:385-390.
101. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 2001;357:1842-1847.
102. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:364-371.
103. Kavanaugh AF, Schulze-Koops H, Davis LS, Lipsky PE. Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 1997;40:849-853.
104. Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature* 1991;349:293-299.

105. Sugiyama E, Kuroda A, Taki H, Ikemoto M, Hori T, Yamashita N, Maruyama M, et al. Interleukin 10 cooperates with interleukin 4 to suppress inflammatory cytokine production by freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 1995;22:2020-2026.
106. Isomaki P, Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med* 1997;29:499-507.
107. van Roon JA, van Roy JL, Duits A, Lafeber FP, Bijlsma JW. Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T helper-1 activation is inhibited by interleukin-4. *Ann Rheum Dis* 1995;54:836-840.
108. Chin-Dusting JP, Rasaratnam B, Jennings GL, Dudley FJ. Effect of fluoroquinolone on the enhanced nitric oxide-induced peripheral vasodilation seen in cirrhosis. *Ann Intern Med* 1997;127:985-988.
109. Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997;26:1530-1537.
110. De la Hera A AA, Reyes E, Nieto M, Muñoz L, Del Amo J, Escoll P, Revilla G, Ranz I, Mallo A, Sanz E, Alvarez Mon M. . Novel immunotherapy strategies in cirrosis: Benefit of selective modulation of monocyte TNF $\alpha$  production by the oral immune response modifier AM3. *Immunology and the liver: Immunotherapy 2004: Acción Médica S.A, 2004: 265-269.*
111. Varela J, Navarro Pico ML, Guerrero A, Garcia F, Gimenez Gallego G, Pivel JP. Identification and characterization of the peptidic component of the immunomodulatory glycoconjugate Immunoferon. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24:471-480.
112. Sidwell RW, Huffman JH, Barnard DL, Smee DF, Warren RP, Chirigos MA, Kende M, et al. Antiviral and immunomodulating inhibitors of experimentally-induced Punta Toro virus infections. *Antiviral Res* 1994;25:105-122.
113. Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, Martinez B, Monserrat J, Izquierdo JL, Callol L, et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (inmunoferon). *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1578-1583.
114. Reyes E, Prieto A, de la Hera A, de Lucas P, Alvarez-Sala R, Alvarez-Sala JL, Alvarez-Mon M. Treatment with AM3 restores defective T-cell function in COPD patients. *Chest* 2006;129:527-535.
115. Martin-Vilchez S, Molina-Jimenez F, Alonso-Lebrero JL, Sanz-Cameno P, Rodriguez-Munoz Y, Benedicto I, Roda-Navarro P, et al. AM3, a natural glycoconjugate, induces the functional maturation of human dendritic cells. *Br J Pharmacol* 2008;154:698-708.
116. Brieva A, Guerrero A, Alonso-Lebrero JL, Pivel JP. Immunoferon, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF-alpha production and inflammatory responses. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1979-1987.
117. Brieva A, Guerrero A, Pivel JP. Inmunoferon, a glycoconjugate of natural origin, regulates the liver response to inflammation and inhibits TNF-alpha production by an HPA axis-dependent mechanism. *Int Immunopharmacol* 2002;2:807-813.
118. Perez-Garcia R, Perez-Garcia A, Verbeelen D, Bernstein ED, Villarrubia VG, Alvarez-Mon M. AM3 (Immunoferon) as an adjuvant to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002;61:1845-1852.
119. Alvarez-Mon M, Miravittles M, Morera J, Callol L, Alvarez-Sala JL. Treatment with the immunomodulator AM3 improves the health-related quality of life of patients with COPD. *Chest* 2005;127:1212-1218.
120. Cameron OR KW. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol* 1936;42:1-2

121. Korpassy B, Kovacs K. Experimental liver cirrhosis in rats produced by prolonged subcutaneous administration of solutions of tannic acid. *Br J Exp Pathol* 1949;30:266-272, 262 pl.
122. Levy M. Sodium retention in dogs with cirrhosis and ascites: efferent mechanisms. *Am J Physiol* 1977;233:F586-592.
123. Levy M. Sodium retention and ascites formation in dogs with experimental portal cirrhosis. *Am J Physiol* 1977;233:F572-585.
124. Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7:90-97.
125. Domenicali M, Caraceni P, Principe A, Pertosa AM, Ros J, Chieco P, Trevisani F, et al. A novel sodium overload test predicting ascites decompensation in rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. *J Hepatol* 2005;43:92-97.
126. Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 1989;10:501-510.
127. Zimmermann H, Fellay M, Zimmermann A. Hepatic stellate cells (Ito cells) but not collagen IV may partly be responsible for lower portal pressure after reversing secondary biliary cirrhosis in the rat. *J Hepatol* 1997;26:158-166.
128. Liu Y, Meyer C, Xu C, Weng H, Hellerbrand C, ten Dijke P, Dooley S. Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;304:G449-468.
129. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013;6:19.
130. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983;244:G52-57.
131. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1984;87:1120-1126.
132. Fernandez-Munoz D, Caramelo C, Santos JC, Blanchart A, Hernando L, Lopez-Novoa JM. Systemic and splanchnic hemodynamic disturbances in conscious rats with experimental liver cirrhosis without ascites. *Am J Physiol* 1985;249:G316-320.
133. Jimenez W, Martinez-Pardo A, Arroyo V, Bruix J, Rimola A, Gaya J, Rivera F, et al. Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology* 1985;5:245-250.
134. Caramelo C, Fernandez-Munoz D, Santos JC, Blanchart A, Rodriguez-Puyol D, Lopez-Novoa JM, Hernando L. Effect of volume expansion on hemodynamics, capillary permeability and renal function in conscious, cirrhotic rats. *Hepatology* 1986;6:129-134.
135. Reichen J, Egger B, Ohara N, Zeltner TB, Zysset T, Zimmermann A. Determinants of hepatic function in liver cirrhosis in the rat. Multivariate analysis. *J Clin Invest* 1988;82:2069-2076.
136. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Cabre E, Jimenez M, Urban A, Ojanguren I, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994;35:1648-1652.
137. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841.

138. Casafont F, Sanchez E, Martin L, Agüero J, Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 1997;25:1334-1337.
139. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:319-333.
140. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2007;25:185-209.
141. Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;153:109-118.
142. Slater TF, Cheeseman KH, Ingold KU. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;311:633-645.
143. Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1998;153:515-525.
144. Cameron Jr kW. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver degeneration. *J. pathol Bacteriol* 1936;42:1-21.
145. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Fukui K, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003;125:1796-1807.
146. Burns RC, Wu Y, Sitzmann JV. Role of cirrhosis in the hemodynamic response to hemorrhage in portal hypertension. *Surgery* 1995;117:488-493.
147. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990;10:56-65.
148. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassarre M, Lucchetti G, Quarta C, Patti C, et al. A novel model of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J Hepatol* 2009;51:991-999.
149. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suarez-Cuenca JA, Trejo-Solis C, Lopez V, Sanchez-Sevilla L, Yanez L, et al. Adenosine reverses a preestablished CCl<sub>4</sub>-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001;34:677-687.
150. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982;83:1183-1190.
151. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, Fox IJ. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:851-857.
152. Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, Rodes J. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* 2002;122:387-393.
153. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G567-574.
154. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792-796.
155. Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:1719-1724.



156. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Vinado B, Perez J, Cabre E, Arnal J, et al. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996;23:781-787.
157. Llovet JM, Bartoli R, March F, Planas R, Vinado B, Cabre E, Arnal J, et al. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998;28:307-313.
158. Guarner C, Runyon BA, Heck M, Young S, Sheikh MY. Effect of long-term trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on ascites formation, bacterial translocation, spontaneous bacterial peritonitis, and survival in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:1957-1962.
159. Runyon BA, McHutchison JG, Antillon MR, Akriviadis EA, Montano AA. Short-course versus long-course antibiotic treatment of spontaneous bacterial peritonitis. A randomized controlled study of 100 patients. *Gastroenterology* 1991;100:1737-1742.
160. Ubeda M, Munoz L, Borrero MJ, Diaz D, Frances R, Monserrat J, Lario M, et al. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis. *Hepatology* 2010;52:2086-2095.
161. Blumberg H, McCollum EV. The Prevention by Choline of Liver Cirrhosis in Rats on High Fat, Low Protein Diets. *Science* 1941;93:598-599.
162. Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2009;137:1467-1477 e1465.
163. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90:196-203.
164. Paronetto F, Popper H. Aggravation of hepatic lesions in mice by in vivo localization of immune complexes (Auer hepatitis). *Am J Pathol* 1965;47:549-563.
165. Paronetto F, Popper H. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. *Am J Pathol* 1966;49:1087-1101.
166. Wahl SM, Hunt DA, Allen JB, Wilder RL, Paglia L, Hand AR. Bacterial cell wall-induced hepatic granulomas. An in vivo model of T cell-dependent fibrosis. *J Exp Med* 1986;163:884-902.
167. Leduc LH. Sulfaguanidine protection of mouse liver from carbon tetrachloride-induced necrosis. *Lab Invest* 1973;29:186-196.
168. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002;37:206-213.
169. Berres ML, Koenen RR, Rueland A, Zaldivar MM, Heinrichs D, Sahin H, Schmitz P, et al. Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2010;120:4129-4140.
170. Roderfeld M, Rath T, Voswinckel R, Dierkes C, Dietrich H, Zahner D, Graf J, et al. Bone marrow transplantation demonstrates medullar origin of CD34+ fibrocytes and ameliorates hepatic fibrosis in Abcb4-/- mice. *Hepatology* 2010;51:267-276.
171. Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, et al. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007;132:282-293.
172. Lopez-Novoa JM, Rengel MA, Hernando L. Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 1980;238:F353-357.

173. Bosch-Marce M, Jimenez W, Angeli P, Leivas A, Claria J, Graziotto A, Arroyo V, et al. Aquaretic effect of the kappa-opioid agonist RU 51599 in cirrhotic rats with ascites and water retention. *Gastroenterology* 1995;109:217-223.
174. Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, et al. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 1993;18:367-372.
175. Bosch J. Effect of pharmacological agents on portal hypertension: a haemodynamic appraisal. *Clin Gastroenterol* 1985;14:169-184.
176. Toledo C, Salmeron JM, Rimola A, Navasa M, Arroyo V, Llach J, Gines A, et al. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 1993;17:251-257.
177. Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, Cano R, Moreu R, Pascual S, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008;47:978-985.
178. Such J, Hillebrand DJ, Guarner C, Berk L, Zapater P, Westengard J, Peralta C, et al. Nitric oxide in ascitic fluid is an independent predictor of the development of renal impairment in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:571-577.
179. Such J, Hillebrand DJ, Guarner C, Berk L, Zapater P, Westengard J, Peralta C, et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and nitric oxide in sterile ascitic fluid and serum from patients with cirrhosis who subsequently develop ascitic fluid infection. *Dig Dis Sci* 2001;46:2360-2366.
180. Sanchez E, Such J, Chiva MT, Soriano G, Llovet T, Merce J, Sancho F, et al. Development of an experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhotic rats with or without ascites. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1230-1236.
181. Sanchez E, Frances R, Soriano G, Mirelis B, Sancho FJ, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, et al. Modulation of inflammatory response in a cirrhotic rat model with induced bacterial peritonitis. *PLoS One* 2013;8:e59692.
182. Guarner C, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Gastroenterologist* 1995;3:311-328.
183. Dunn DL, Barke RA, Ahrenholz DH, Humphrey EW, Simmons RL. The adjuvant effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis. Mechanism and clinical implications. *Ann Surg* 1984;199:37-43.
184. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:489-493.
185. Dunn DL, Barke RA, Knight NB, Humphrey EW, Simmons RL. Role of resident macrophages, peripheral neutrophils, and translymphatic absorption in bacterial clearance from the peritoneal cavity. *Infect Immun* 1985;49:257-264.
186. Llovet JM, Planas R, Morillas R, Quer JC, Cabre E, Boix J, Humbert P, et al. Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993;88:388-392.
187. Fromkes JJ, Thomas FB, Mekhjian HS, Evans M. Antimicrobial activity of human ascitic fluid. *Gastroenterology* 1977;73:668-672.
188. Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1988;8:632-635.
189. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986;91:1343-1346.

190. Frances R, Munoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, Pascual S, Perez-Mateo M, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004;53:860-864.
191. Utaisincharoen P, Kespichayawattana W, Anuntagool N, Chaisuriya P, Pichyangkul S, Krieg AM, Sirisinha S. CpG ODN enhances uptake of bacteria by mouse macrophages. *Clin Exp Immunol* 2003;132:70-75.
192. Ahrenholz DH. Effect of intraperitoneal fluid on mortality of *Escherichia coli* peritonitis. *Surg Forum* 1979;30:483-484.
193. Claria J, Jimenez W, Arroyo V, Guarner F, Lopez C, La Villa G, Asbert M, et al. Blockade of the hydroosmotic effect of vasopressin normalizes water excretion in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1989;97:1294-1299.
194. Frances R, Chiva M, Sanchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, et al. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007;46:797-803.
195. Marques LJ, Zheng L, Poulakis N, Guzman J, Costabel U. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:508-511.
196. Yu B, Becnel J, Zerfaoui M, Rohatgi R, Boulares AH, Nichols CD. Serotonin 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced inflammation with extraordinary potency. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;327:316-323.
197. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000;12:20-26.
198. Garcia-Tsao G, Angulo P, Garcia JC, Groszmann RJ, Cadelina GW. The diagnostic and predictive value of ascites nitric oxide levels in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998;28:17-21.
199. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993;104:1492-1497.
200. Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995;108:761-767.