

## El patrón de producción de citocinas proinflamatorias en el líquido ascítico de pacientes con cirrosis está relacionado con la etiología viral (VHC) o alcohólica

Ana Tapia-Abellán<sup>1</sup>, María Martínez-Esparza<sup>1\*</sup>, Antonio J. Ruiz-Alcaraz<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Dolores Fernández-Fernández<sup>1</sup>, Juan Francisco Rodríguez-Alcázar<sup>1</sup>, Cristina Martínez-Pascual<sup>2</sup>, Gonzalo Antón<sup>2</sup>, Manuel Miras-López<sup>2</sup>, Pilar García-Peñarrubia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Biología Molecular (B) e Inmunología. Universidad de Murcia, campus de Espinardo sn, 30100 Murcia.

<sup>2</sup> Unidad de Trasplante Hepático del Servicio de Aparato Digestivo, del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

\* correspondencia: maria@um.es

### Resumen

La histopatología de la cirrosis inducida por alcohol o infección con virus de hepatitis C (VHC) es muy similar, sin embargo el perfil de expresión génica relativa a la respuesta inmunitaria en el hígado, es diferente en función de la etiología de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es explorar las diferencias a nivel molecular, analizando el perfil inflamatorio del líquido ascítico y de macrófagos derivados de monocitos peritoneales de pacientes con cirrosis de ambas etiologías. Para ello estudiamos 45 pacientes con cirrosis y ascitis sin infección, distribuidos en función de la etiología de la enfermedad, VHC (n=15) o alcohol (n=30). Las citocinas se analizaron por ELISA en el líquido ascítico o en sobrenadantes de cultivo de macrófagos derivados de monocitos peritoneales aislados y estimulados *in vitro* con LPS, CpG oligodeoxinucleotidos o con la levadura *Candida albicans*.

El contenido celular de los líquidos ascíticos fue más abundante en la etiología VHC vs alcohol, mientras no encontramos diferencias en el contenido celular en la sangre de estos pacientes. Detectamos niveles más elevados de IL-10 y menores de IL-6 e IL-12 en ascitis del grupo VHC. Los niveles de citocinas referidos al número de macrófagos derivados de monocitos, mostraron además menores niveles para TNF- $\alpha$  e IL-6 en este grupo. Los macrófagos derivados de monocitos aislados mantuvieron su estado *in vitro* durante al menos 24h de cultivo en presencia o ausencia de estimulación. Existe un patrón diferencial de migración leucocitaria desde la sangre a la cavidad peritoneal dependiendo de la etiología viral o alcohólica. La cirrosis inducida por VHC se asocia con un menor perfil inflamatorio en el líquido ascítico en comparación con la etiología alcohólica. Estos resultados podrían contribuir a identificar potenciales dianas terapéuticas o diagnósticas para enfermedades hepáticas crónicas de diferentes etiologías.

### Abstract

The histopathology of alcohol and HCV induced cirrhosis is very similar, nonetheless immune response-related gene expression profiles in liver show differences according to the disease's etiology. The aim of this study is to explore differences at molecular level analyzing the inflammatory profile of ascitic fluid and peritoneal monocyte-derived macrophages from both etiologies in cirrhotic patients. To do so, we studied 45 patients with cirrhosis and non-infected ascites, distributed according to disease etiology, HCV (n=15) or alcohol (n=30). Cytokines were assessed by ELISA in ascitic fluid and supernatants from peritoneal monocyte-derived macrophages isolated and stimulated *in vitro* with LPS, CpG oligodeoxynucleotides or *Candida albicans* yeast cells. Results showed that, whereas no differences in peripheral blood cell subpopulations could be achieved, cellular content in ascitic fluid were more abundant in HCV vs alcohol etiology. Higher levels of IL-10 and lower levels of IL-6 and IL-12 were present in ascitic fluid from HCV group. Cytokines levels referred to the number of M-DM f ascites also revealed lower TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in patients of HCV etiology. Isolated peritoneal monocyte-derived macrophages kept their primed status *in vitro* for the extent of 24h culture in the presence or absence of stimulation. In conclusion, a different pattern of leukocyte migration from blood to peritoneal cavity in cirrhosis is observed depending on the viral or alcoholic etiology. Cirrhosis of HVC etiology is associated to decreased inflammatory profile in ascitic fluid compared with alcoholic etiology. These findings could contribute to indentifying potential prognostic or therapeutic targets for chronic liver diseases from different etiologies.

**Palabras clave:** ascitis, hígado, macrófagos

## Introducción

Las principales causas de enfermedades crónicas del hígado en la población de los países desarrollados son el alcoholismo (ALC) y la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) (Mas et al. 2010). La aparición de ascitis en los pacientes cirróticos suele ir asociada con el deterioro clínico del enfermo y un mal pronóstico de la enfermedad. Mientras que la tasa de mortalidad por cirrosis ha disminuido en los últimos treinta años (Chen et al. 2007), la tasa asociada a las infecciones por el VHC, que está directamente relacionada con la cirrosis ha ido incrementándose desde la década de los 90 (Wise et al. 2008). Para el abordaje clínico del enfermo cirrótico es importante conocer si la evolución de la enfermedad en estos pacientes depende de la etiología de la misma. A este respecto es importante destacar que la histopatología de la cirrosis inducida por alcohol (ALC-C) y la inducida por el VHC (VHC-C) es muy parecida, ya que ambas muestran el patrón típico de fibrosis hepática (Uchimura et al. 1995). No obstante, las diferencias y/o similitudes entre enfermedades hepáticas inducidas por alcohol- o VHC- a nivel molecular no están descritas adecuadamente (Lederer et al. 2006) y hasta donde nosotros sabemos, no existen datos comparativos entre células procedentes del líquido ascítico de los enfermos de cirrosis en función de estas etiologías.

El estudio de los perfiles de transcripción global con “microarrays” en biopsias hepáticas de pacientes con cirrosis mostró que algunos genes se expresan de modo diferencial en ALC-C y VHC-C. Muchos de los cambios de expresión génica observados en hígados con cirrosis inducida por VHC fueron relacionados con la activación de la respuesta inmunitaria innata antiviral, mientras que los diferentes mecanismos observados entre el daño hepático crónico debido a VHC o etanol pueden estar más relacionados con la regulación del metabolismo lipídico y la activación de macrófagos, que causa la acumulación de componentes de la matriz extracelular (Mas et al. 2010, Lederer et al. 2006). Además, varios estudios han demostrado que la exposición al alcohol activa la inmunidad innata e induce varias citocinas proinflamatorias, entre las que se incluye el TNF- $\alpha$ , que producen daño hepatocelular. La activación de la inmunidad innata también causa altos niveles de intermediarios hepatoprotectores, tales como IL-6, y citocinas antiinflamatorias, como IL-10, que desempeñan un papel importante en la mejoría del daño hepático producido por el alcohol y la inflamación (Miller et al. 2011). Sin embargo, la exposición crónica al alcohol atenúa las rutas de señalización intracelular activadas por dichas citocinas, limitando su potencial antiinflamatorio y sus efectos hepatoprotectores, contribuyendo al desarrollo de Enfermedad Hepática Aguda (EHA) (McClain et al. 2004).

Los macrófagos derivados de monocitos (M-DM) juegan un papel importante como células presentadoras de antígeno de la respuesta inmunitaria establecida frente a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), entre los que se incluyen el ADN bacteriano y el LPS (Heller et al. 2000). A este respecto se ha descrito que los macrófagos peritoneales de pacientes con cirrosis y ascitis con presencia de ADN bacteriano presentan una respuesta inmunitaria celular activada y una sobreproducción de óxido nítrico mediada por la expresión de la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (Frances et al. 2004) y nuestro grupo ha descrito recientemente en M-DM peritoneales de pacientes con cirrosis y ascitis un estado de alerta o activación basal, que está relacionado con altos niveles de fosforilación de ERK y secreción de IL-6 (Ruiz-Alcaraz et al. 2011). En este estudio nos hemos centrado en el análisis del perfil inflamatorio de M-DM peritoneales aislados de ascitis de pacientes con ALC-C o VHC-C para comprobar si el estatus inmunitario y los mecanismos inflamatorios que subyacen en los estadios finales de la cirrosis hepática presentan características diferentes en función del agente etiológico que causó la patología, y comparar estos resultados con estudios previos llevados a cabo en biopsias hepáticas o sangre periférica.

## Material y Métodos

### *Pacientes*

Los pacientes admitidos en el estudio procedieron de la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante (España) o de la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (España). La cirrosis fue diagnosticada por hallazgos histológicos,

clínicos, de laboratorio y/o ultrasonográficos. Estos pacientes presentaban cirrosis hepática descompensada y fueron sometidos a paracentesis evacuadora debido al elevado volumen de ascitis presente en la cavidad abdominal.

Los criterios de exclusión del estudio fueron: la presencia de cultivos positivos de sangre o AF, niveles detectables de LPS en el líquido ascítico, un recuento de células polimorfonucleares (PMN) en AF igual o superior a 250/ $\mu$ l (Albillos et al. 1990), signos o síntomas del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Rangel-Frausto et al. 1995), hemorragia gastrointestinal, hepatocarcinoma celular siguiendo los criterios de Milan (Mazzaferro et al. 1996) y/o trombosis portal, trasplante hepático previo, *Shunt* Porto-sistémico Transyugular Intrahepático, hepatitis alcohólica, tratamiento con norfloxacin como profilaxis de peritonitis bacteriana espontánea, edad superior a 80 o inferior a 18 años, otra etiología distinta a la ingesta alcohólica o infección por VHC y renuncia a participar en el estudio. Los comités éticos (el Comité Ético de Investigación Clínica, del Hospital General de Alicante, Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca" de Murcia y el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia) aprobaron el protocolo de estudio y todos los pacientes fueron informados y consintieron ser incluidos en el estudio.

### *Muestras de ascitis y sangre*

La sangre periférica y la ascitis de estos pacientes fueron recogidas de pacientes con cirrosis requiriéndose un elevado volumen de ascitis para la admisión en el estudio. El líquido ascítico (AF) se obtuvo en condiciones asépticas mediante paracentesis evacuadora siempre y cuando estuviera clínicamente indicado y en ningún caso para obtener muestras de estudio (Runyon 1986).

Todos los pacientes recibieron albúmina intravenosa tras la paracentesis (8g/l ascitis) como protocolo de rutina, si el volumen de ascitis evacuado fue mayor de 5 L. La sangre fue obtenida para estudio hematológico de rutina, bioquímico y de coagulación. Así mismo también se realizaron análisis bioquímicos de rutina a las muestras de ascitis. Tanto la sangre como parte de esta ascitis fue inoculada en frascos de cultivo de sangre aeróbicos y anaeróbicos con un volumen final de 10 ml cada uno (Runyon et al. 1988). Muestras de sangre y AF se inocularon bajo condiciones asépticas en tubos estériles Vacutainer SST II tubes (BD Diagnostics, Belgium), que nunca fueron expuestos al aire libre. El contenido celular del mismo se obtuvo mediante centrifugación del AF a 1500 rpm durante 10 min en botes de capacidad de 600 ml cada uno.

### *Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM)*

Las células obtenidas del AF fueron lavadas tampón fosfato salino (PBS) y resuspendidas en DMEM con glutaMAX (GIBCO Invitrogen, Paisley, UK), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal, previamente descomplementado por calentamiento a 56° C durante 30 minutos, y con 50 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomina (Flow Laboratories, Irvine, Gran Bretaña). Nos referiremos a este medio de cultivo completo como MCC en adelante.

Se contó el número de células y se determinó la proporción de los M-DM en la suspensión celular mediante criterios de tamaño, morfología y expresión de marcadores de superficie específicos por citometría de flujo. Se empleó el anticuerpo de ratón anti-humano CD14-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA) y el anticuerpo de ratón IgG1-FITC como isotipo control (BD-Pharmingen, NJ, USA). Una vez conocido el porcentaje de macrófagos peritoneales presentes en la muestra, estos fueron sembrados a una concentración de  $0.2 \times 10^6$  M-DM/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano para cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Tras incubación durante la noche a 37°C en MCC, se eliminaron las células no adherentes mediante lavados con MCC. La pureza de M-DM en los cultivos celulares fue mayor al 95%.

Las células se estimularon durante 24 h con LPS (*E. coli* serotype 0111.B4, Sigma Aldrich Co, Saint Luis, Missouri, USA) a una concentración de 0.1  $\mu$ g/ml; con *C. albicans* HK (Heat Killed), inactivada por calor mediante tratamiento 20 minutos a 100°C, de la cepa SC5314 a un ratio 1:5; o con oligodeoxinucleótido fósforotioato sintético (ODN) a 1  $\mu$ g/ml, cuya secuencia fue 5'TGA CTG TGA ACG TTC GAG ATG A 3'(TriLink BioTechnologies, San Diego, CA, USA). Posteriormente se

procedió a la recogida de los sobrenadantes de cultivo, que fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### *Análisis del contenido de citocinas mediante ELISA*

La cuantificación de citocinas de los AF de los pacientes o los sobrenadantes de cultivos de los macrófagos se llevó a cabo mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays), utilizando kits específicos comerciales [R&D Systems (Minneapolis, USA) y eBioscences (San Diego, USA)], para, IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ . Los ensayos se realizaron por triplicado siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *Determinación de viabilidad celular*

La viabilidad celular de las muestras biológicas se estudió mediante la técnica de exclusión con azul tripán y recuento celular con un hemocitómetro Neubauer, o mediante ensayo con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU). Para determinar la viabilidad mediante MTT, se incubaron las células con 2mg/ml de MTT a  $37^{\circ}\text{C}$  4 h. Tras adición de 100-150  $\mu\text{l}$  de isopropanol (Probus, Barcelona), HCl (Probus) a 0.04N y Tween-20 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU) al 0.1%, se midió la absorbancia a 550nm.

#### *Análisis estadístico*

Para la representación gráfica de los resultados se empleó el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) y para el tratamiento estadístico de los datos el software de análisis estadístico SPSS 19.0 (Chicago, IL, USA).

Las variables categóricas se expresaron con frecuencias o porcentajes. Las variables continuas se expresaron con la mediana y el rango intercuartílico (IQR) y se representaron gráficamente como diagramas de caja, donde la parte superior e inferior de la caja se corresponde con el percentil 25 y 75 respectivamente y la banda dentro de la caja se corresponde con el percentil 50, es decir, la mediana. Las líneas verticales que sobresalen de la caja, denominadas bigotes, se extienden respectivamente hasta el valor mínimo y máximo del conjunto de datos, siempre que estos valores no difieran en más de una vez y media del IQR. Los datos atípicos se mostraron como círculos fuera de las cajas.

Las diferencias estadísticas fueron analizadas usando el Test de rangos de Wilcoxon si las muestras estaban relacionadas, o la U de Mann-Whitney si las muestras eran independientes. Todos los valores de probabilidad (P) fueron de dos colas y menores de 0.05 para considerarse estadísticamente significativos.

Este estudio cumple las directrices STROBE y EQUATOR sobre investigación en salud (Simera et al. 2010).

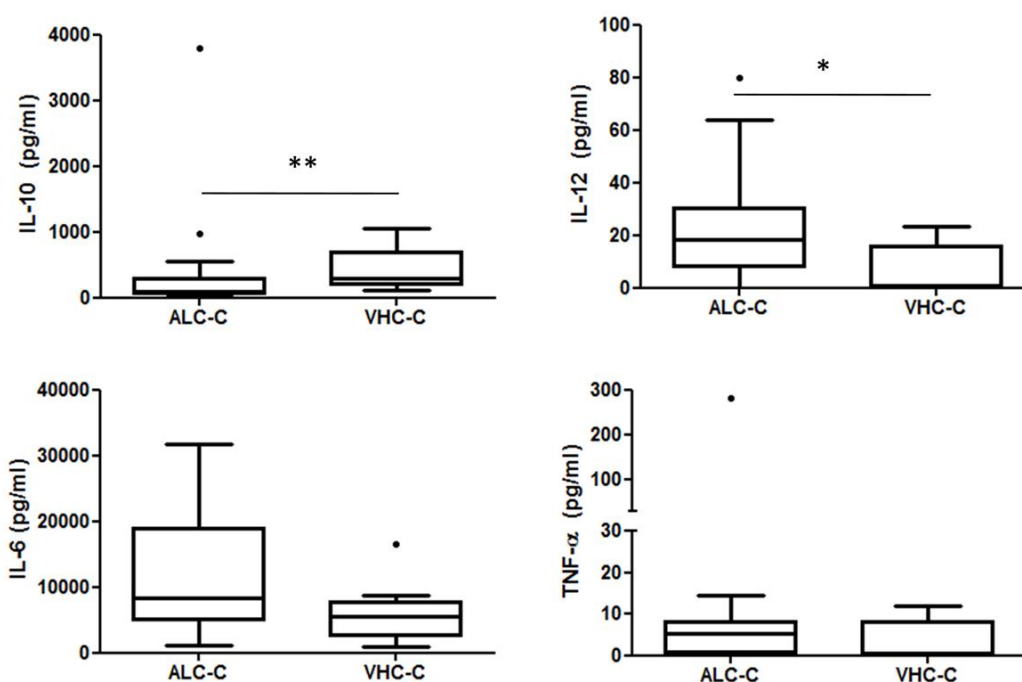
## **Resultados**

### *Características basales de los pacientes*

Para llevar a cabo este estudio analizamos una serie consecutiva de 61 pacientes con cirrosis y ascitis. 16 pacientes se excluyeron debido a episodios de hemorragia gastrointestinal en las 2 semanas previas (n=2), ascitis con cultivo-positivo (n=3), carcinoma hepatocelular (n=2), etiología mixta alcohólica y viral (n=4), etiología por infección con el virus de la hepatitis B (n=1) o uso continuado de norfloxacina como profilaxis secundaria de peritonitis bacteriana espontánea (n=4). Finalmente se incluyeron en el estudio 45 pacientes que cumplían los criterios de inclusión, y se distribuyeron de acuerdo con la etiología de la enfermedad, VHC-C (n=15) o ALC-C (n=30). Las características clínicas y analíticas de los pacientes se muestran en la Tabla 1. Los cultivos de sangre y ascitis fueron negativos en todos los casos. Ninguno de los pacientes falleció durante el periodo de hospitalización ni desarrolló peritonitis bacteriana espontánea.

**Tabla 1.** Características clínicas y analíticas de los pacientes incluidos en el estudio (pacientes con cirrosis y ascitis con cultivo-negativo, n=45). Las variables continuas se expresan como mediana (rango intercuartílico IQR) y las variables categóricas como porcentajes. WBC: white blood cells (células blancas de la sangre); Test U de Mann-Whitney \*P<0.05.

	<b>ALC-C (30)</b>	<b>VHC-C (15)</b>
Edad	58.5 (12.5)	58 (24)
Sexo masculino n (%)	30 (100.0)	14 (93.3)
Episodios previos de ascitis n (%)	25 (83.3)	13 (86.6)
Child-Pugh (puntuación)	10 (3)	9 (3)
Meld (puntuación)	14.5 (10)	14 (5)
Bilirrubina (mg/dl)	2.7 (3)	1.85 (1.7)
Albúmina (g/dl)	2.9 (1.1)	2.85 (0.9)
Quick (%)	64 (18)	54 (24)
Creatinina sérica (mg/dl)	1.07 (1.2)	1 (0.5)
Sodio sérico (mEq/l)	134 (6.3)	136 (7)
INR	1.45 (0.3)	1.46 (0.6)
WBC/mm <sup>3</sup> en sangre	4260 (2400)	3930 (4040)
WBC/mm <sup>3</sup> en ascitis	21.29 (47.4)	49 (82.8)
Proteínas totales en ascitis (g/dl)	1.7 (0.3)	1.6 (1)



**Figura 1.** Niveles de citocinas pro- y antiinflamatorias en ascitis de pacientes con VHC-C o ALC-C. La concentración de citocinas en ascitis de pacientes con VHC-C (n=15) o ALC-C (n=30) se determinó por ELISA. Los resultados se expresan en pg/ml y se representan como diagramas de cajas. Los círculos fuera de las cajas corresponden a "outliers". La mediana y el IQR (percentil 75-percentil 25) se indican en cada caja. Test U de Mann-Whitney \* P< 0.05, \*\* P< 0.01.

Como muestra la Tabla 1, el número absoluto de leucocitos en el líquido ascítico de pacientes con VHC-C fue significativamente mayor que el de los pacientes con ALC-C, mientras que estas diferencias no se detectaron en la sangre periférica de los pacientes. No se detectaron

otras diferencias con respecto al resto de características clínicas y analíticas analizadas entre los dos grupos de pacientes estudiados.

La evolución clínica de los pacientes analizados a lo largo de seis meses fueron las siguientes, tres pacientes con ALC-C y uno con VHC-C fallecieron. Las causas fueron insuficiencia hepática en el grupo ALC-C (n=2) y fallo renal (n=1), mientras que el fallecimiento en el grupo VHC-C fue debido a un fallo renal (n=1).

*Los niveles de citocinas antiinflamatorias son mayores, mientras que los de proinflamatorias son menores en ascitis de pacientes con VHC-C*

La Figura 1 muestra la concentración en pg/ml de IL-10, IL-12, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los resultados mostraron que la ascitis de pacientes con VHC-C contiene menor cantidad de citocinas proinflamatorias, aunque la diferencia entre ambos grupos solo resultó estadísticamente significativa en el caso de IL-12. Los resultados también pusieron de manifiesto que los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 en la ascitis de pacientes con VHC-C fueron estadísticamente superiores a los de enfermos con ALC-C.

*Los M-DM peritoneales de la ascitis de pacientes cirróticos mantienen el perfil de citocinas secretadas in vitro.*

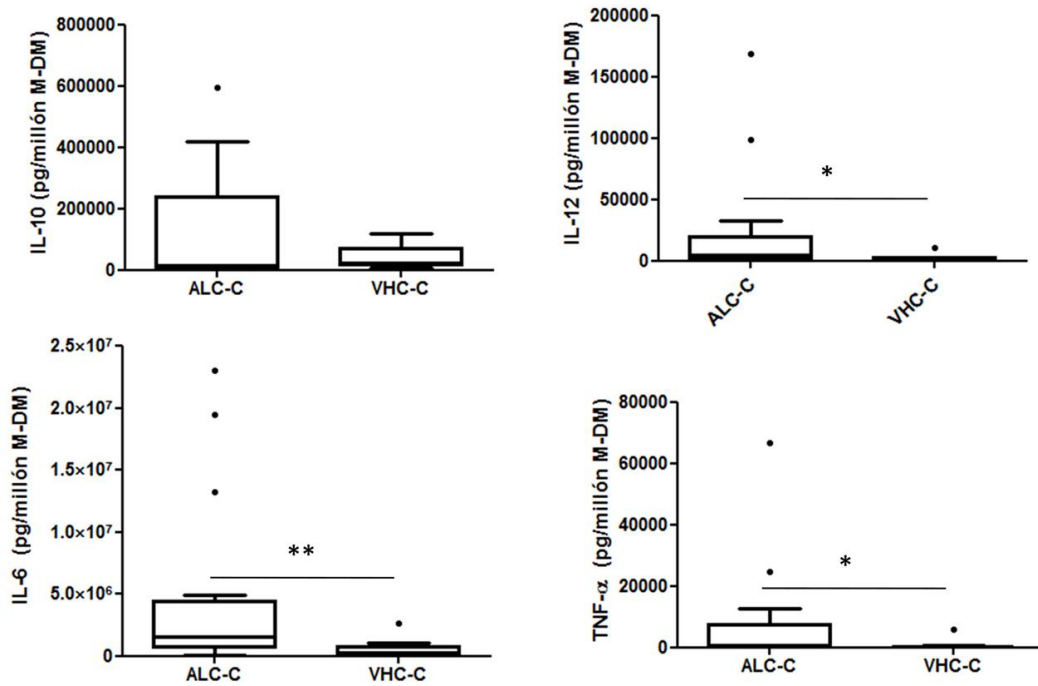
Para comparar la capacidad de producir citocinas de los M-DM peritoneales de pacientes con VHC-C y ALC-C exploramos a continuación, la contribución relativa de los M-DM contenidos en el líquido ascítico de los pacientes cirróticos de ambas etiologías. En primer lugar, determinamos la contribución relativa de los M-DM contenidos en la ascitis al total de cada citocina determinada en dichos líquidos. Para ello referimos la concentración de cada citocina al número de M-DM por ml contenido en dicho volumen (Fig. 2). Posteriormente analizamos la producción basal de citocinas en cultivos de M-DM aislados de ascitis e incubados durante 24h (Fig. 3).

Los resultados revelaron que los M-DM procedentes del grupo de pacientes con VHC-C producen *in vitro*, cantidades significativamente menores de IL-12, IL-6 y TNF- $\alpha$ , que los de pacientes con ALC-C (Fig. 3). Estos datos son consistentes con los niveles de citocinas obtenidos directamente de las ascitis (Fig. 2), lo que indica que los M-DM están “preactivados” por el microambiente patológico, y mantienen el perfil secretor, que es más pro-inflamatorio en el caso del grupo con ALC-C.

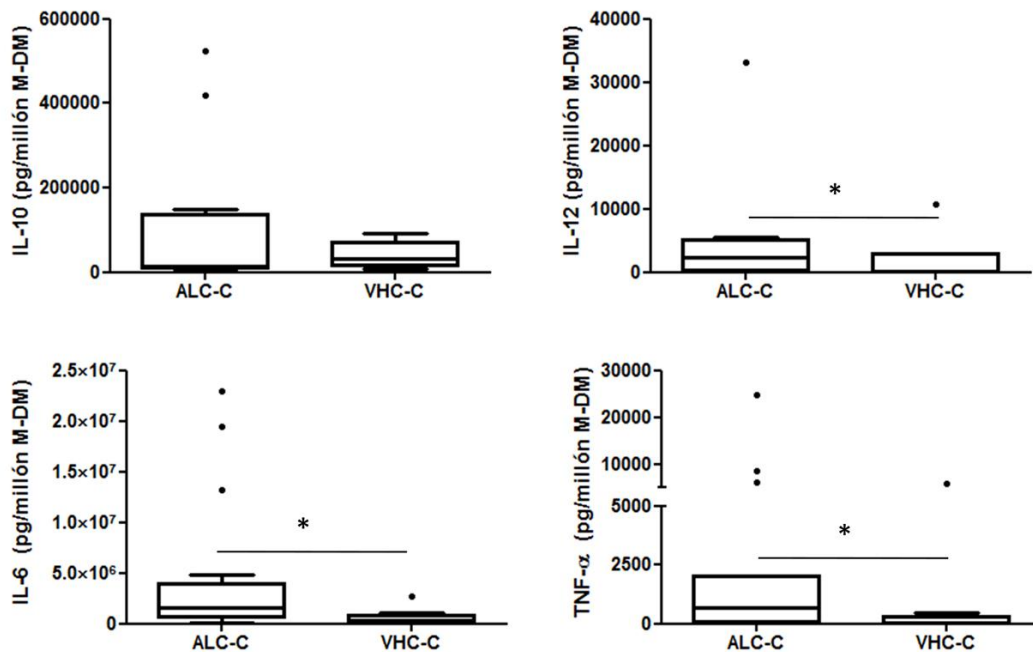
No se detectaron diferencias significativas entre los niveles de secreción de IL-10 de los dos grupos de pacientes, con respecto a los M-DM cultivados *in vitro*, ni tampoco con respecto a los M-DM presentes en ascitis. Esto indica que los M-DM no constituyen la población celular responsable mayoritaria de las diferencias de esta citocina detectada en las ascitis de los dos grupos de pacientes.

*Los M-DM peritoneales aislados de ascitis de pacientes cirróticos son capaces de responder a la estimulación in vitro con varios estímulos microbianos.*

La peritonitis bacteriana espontánea originada por la traslocación de bacterias intestinales y productos derivados de las mismas, tales como LPS o ADN bacteriano, es una de las mayores complicaciones que ponen en peligro la vida del paciente con cirrosis. Por esto, la cualidad e intensidad de la respuesta inmunitaria en el peritoneo desempeña un papel crucial en el pronóstico de estos pacientes. Para avanzar en el conocimiento de la respuesta de los M-DM peritoneales de pacientes con cirrosis a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), estudiamos la capacidad de M-DM aislados de responder a LPS, CpG-ODNs sintéticos y *C. albicans* muerta por calor, como ejemplos de estímulos capaces de iniciar la activación y fagocitosis a través de diferentes receptores de PAMPs (PRRs). Con este fin, determinamos las citocinas producidas por los M-DM cultivados durante 24h en presencia de los estímulos mencionados. Los resultados mostrados en la Tabla 2 revelaron que esta población celular es capaz de reconocer y responder más allá del nivel basal a diferentes PAMPs, aunque los grados de significado estadístico variaron en función de la citocina analizada y del estímulo específico aplicado en cada caso. Los resultados mostrados en la Tabla 2 apuntan en primer lugar hacia una respuesta fuertemente significativa de producción de TNF- $\alpha$  en presencia de LPS y *C. albicans* en M-DM de



**Figura 2.** Niveles de citocinas producidas por Macrófagos Derivados de Monocitos de ascitis de pacientes con VHC-C o ALC-C. La concentración de citocinas en ascitis de pacientes con VHC-C (n=15) o ALC-C (n=30) se determinó por ELISA y estos datos se relacionaron con la concentración de M-DM presentes en la ascitis. Los resultados se expresan en pg/10<sup>6</sup> M-DM y se representan como diagramas de cajas. Los círculos fuera de las cajas corresponden a “outliers”. Test de U Mann-Whitney \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.



**Figura 3.** Niveles de citocinas producidas por Macrófagos Derivados de Monocitos de ascitis de pacientes con VHC-C o ALC-C. Los M-DM presentes en ascitis se aislaron como se indica en la sección de Métodos y la concentración de citocinas en el sobrenadante de los cultivos de 24 horas se determinó por ELISA. Los resultados se expresan en pg/10<sup>6</sup> M-DM y se representan como diagramas de cajas. Los círculos fuera de las cajas corresponden a “outliers”. Test de U Mann-Whitney \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

**Tabla 2.** Respuesta de Macrófagos Derivados de Monocitos a la estimulación *in vitro*. Resultados expresados como mediana (IQR). Test U de Mann-Whitney: \*P<0.05 entre ALC-C and VHC-C; Test de rangos de Wilcoxon: <sup>a</sup>P <0.05 entre control y tratamientos.

Citocinas	Etiología	Incremento de activación		
		LPS	ODN	<i>C. albicans</i>
TNF- $\alpha$	ALC-C	89.26 (204.5) <sup>a</sup>	0.89 (1.7)	170.92 (374.6) <sup>a</sup>
	VHC-C	97.61 (163.9) <sup>a</sup>	2.42 (4.9)	4334.96 (595.4) <sup>a</sup>
IL-6	ALC-C	2.73 (3.5) <sup>a</sup>	0.84 (5.8)	3.35 (10.4) <sup>a</sup>
	VHC-C	5.97 (19.6) <sup>*,a</sup>	1.26 (7.2) <sup>*,a</sup>	5.68 (37.2) <sup>*,a</sup>
IL-10	ALC-C	9.06 (6.2) <sup>a</sup>	0.77 (0.6)	13.7 (24.5) <sup>a</sup>
	VHC-C	11.33 (13.9) <sup>a</sup>	1.4 (2.6) <sup>*,a</sup>	223.4 (45.3) <sup>a</sup>
IL-12	ALC-C	1.75 (3.4) <sup>a</sup>	2.1 (8.4)	3.7 (6.6) <sup>a, *</sup>
	VHC-C	3.15 (4.8)	6.6 (17.4)	1.93 (1.1)
IL-1 $\beta$	ALC-C	20.21 (63) <sup>a</sup>	1.5 (10)	46.85 (135.6) <sup>a</sup>
	VHC-C	10.89 (24.7) <sup>a</sup>	2.11 (2.73)	15.4 (28.5) <sup>a</sup>

ambos grupos de pacientes. En segundo lugar, la secreción de IL-6 e IL-10 se incrementó de modo significativo ante todos los estímulos ensayados, excepto en el caso de los M-DM de pacientes con ALC-C cultivados en presencia de ODN. En tercer lugar, los incrementos relativos de IL-6 fueron mayores significativamente en M-DM de pacientes con VHC-C con los tres estímulos ensayados, mientras que el incremento de la IL-10 fue significativo únicamente en el grupo de pacientes con VHC-C estimulados con ODN. Finalmente, el incremento en la secreción de IL-12 solamente resultó significativo en M-DM obtenidos de pacientes con ALC-C estimulados con LPS y *C. albicans*.

## Discusión

La investigación clínica sobre la mayoría de las enfermedades humanas está en gran parte basada en muestras obtenidas por procedimientos quirúrgicos o agresivos en pacientes gravemente enfermos. Esto implica el empleo de muestras de conveniencia de un tamaño limitado, en lugar de muestras más grandes obtenidas al azar entre la población. Por lo tanto, la limitación principal de este tipo de estudios sobre el estado inmunitario en ascitis de pacientes cirróticos es la naturaleza y el tamaño de la muestra.

Para reducir al mínimo esta limitación procesamos muestras consecutivas obtenidas de pacientes cirróticos de dos instituciones diferentes durante un período de tres años. Aplicamos una prueba estadística robusta para asegurar que las diferencias observadas eran significativas. Sin embargo, esto no soluciona la pregunta de fondo acerca de si los resultados observados en muestras de conveniencia pueden ser generalizados a una población más grande. Nuestros resultados muestran primero, que en comparación con ALC-C, la ascitis asociada a VHC-C contiene un número considerablemente más alto de leucocitos, aunque estos hallazgos no concuerdan con la distribución de poblaciones celulares de la sangre periférica. Esto indica que el número absoluto de células en ascitis de pacientes cirróticos varían con la causa subyacente y no reflejan la situación de la sangre periférica. A este respecto, es importante comentar que la mayoría de estudios sobre células inmunitarias en la cirrosis humana han sido realizados en muestras de sangre, principalmente debido a la dificultad para obtener y manipular los líquidos ascíticos (Ferri et al. 2011, Li et al. 2010) y en menor grado, en biopsias de hígado (Lemmers et al. 2009, Bonacini et al. 2007). Por esto resulta interesante explorar estos parámetros en el líquido ascítico para permitir extrapolar los datos sobre células inmunitarias de los tres susodichos tipos de muestras para comprender mejor los mecanismos que subyacen en la patogénesis de daño hepático, y permitan a los médicos clínicos evaluar los riesgos y el pronóstico asociado a diversos tipos de tratamientos.



Nuestros resultados también mostraron que la ascitis de pacientes con VHC-C presenta una concentración considerablemente inferior de citocina pro-inflamatoria IL-12, y un nivel significativo más alto de citocina anti-inflamatoria IL-10 comparado con el grupo de pacientes con ALC-C, lo cual sugiere un perfil predominante Th2/Treg en la patogénesis de la cirrosis por HCV avanzada. De hecho, se ha descrito que VHC por sí mismo induce células intrahepáticas Tr1 (Delhem et al. 2008), expande la población de Treg en la periferia en pacientes con aminotransferasas normales (Ferri et al. 2011) y afecta la función de células dendríticas, cambiando el perfil de citocinas hacia un fenotipo inhibitorio con un predominio de IL-10 y factor transformante de crecimiento beta, impidiendo la maduración celular e inhibiendo la capacidad aloestimulante (Osna 2009). Sin embargo, cuando los niveles de citocinas fueron comparados con el número de M-DM contenidos en ascitis de estos pacientes, o secretados *in vitro* por M-DM peritoneales aislados, además de las diferencias detectadas en IL-12, la concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  también variaron significativamente entre ambos grupos de pacientes. Se pueden extraer tres conclusiones de estos resultados. Primero, los resultados indican que los M-DM están "pre-activados" *in vivo* de manera diferente en función del entorno fisiopatológico, y conservan su perfil inflamatorio de diferenciación durante al menos 24 horas, que es más pro-inflamatorio en el caso de los pacientes con ALC-C. Este "estado de alerta" podría proporcionar una ventaja a la hora de prevenir el desarrollo de PBE en acontecimientos intermitentes de traslocación intestinal bacteriana en pacientes con ALC-C. Segundo, confirman la existencia de un estado predominantemente inhibitorio en los M-DM peritoneales de las etapas finales del daño hepático inducido por VHC comparado con el de los pacientes con ALC-C (Sreenarasimhaiah et al. 2003), cuya finalidad podría ser la de evitar una descompensación originada por una respuesta inmunitaria descontrolada. Tercero, la pérdida de diferencias significativas en los niveles de IL-10 en lo que concierne a los M-DM peritoneales, sugiere que otras células inmunitarias contribuirían al aporte total de esta citocina anti-inflamatoria en la ascitis del grupo de pacientes con VHC-C, sobre todo subpoblaciones de linfocitos T reguladores. Sin embargo, esto no significa que los M-DM de pacientes con VHC-C estén funcionalmente agotados o sean tolerantes a la endotoxina (Lin et al. 2007), ya que sí son capaces de responder más allá del nivel basal de pre-activación al estímulo ejercido por varios agonistas de PAMP. De hecho, el aumento relativo de la secreción de IL-6 y en los M-DM estimulados *in vitro* con LPS fue más alto en pacientes con VHC-C que en pacientes con ALC-C.

Los mismos resultados fueron obtenidos acerca de la secreción de IL-6 inducida por ODN y *C. albicans*, y de IL-10 inducida por ODN en el grupo de pacientes con VHC-C. Los hallazgos descritos también apuntan hacia la existencia de una expresión diferencial y/o una sensibilidad a los ligandos de PRRs en los M-DM de ascitis en ambos tipos de pacientes cirróticos. En apoyo de esta hipótesis, la clara regulación positiva de TLRs ha sido descrita en muestras de pacientes con la infección por VHC (Dolganiuc et al. 2006, Mozer-Lisewska et al. 2005) y daño hepático inducido por ALC (revisado por (Seki & Brenner 2008)).

Una de las complicaciones principales que ponen en peligro la supervivencia de los enfermos cirróticos es la PBE que está causada por la traslocación de bacterias intestinales y sus productos como el LPS o el ADN bacteriano (Such & Runyon 1998). Frente a esta patología, la calidad y la intensidad de la respuesta inmunitaria en la cavidad peritoneal probablemente ejercen un papel crucial en el pronóstico de estos pacientes clínicamente comprometidos. El perfil inflamatorio más débil en las ascitis de pacientes con VHC-C en comparación con el de la etiología alcohólica también podría ser el resultado de una hipotética menor frecuencia de traslocación de bacterias intestinales en los pacientes con VHC-C.

Nuestros resultados indican la necesidad de realizar estudios adicionales con un tamaño mayor de muestras clínicas que permitan averiguar si las diferencias en el estatus inflamatorio de los M-DM peritoneales podría influenciar la evolución clínica de estos pacientes más allá de los seis meses e incluso la tolerancia al hígado trasplantado.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Unidad de Trasplante Hepático del Servicio de Aparato Digestivo, del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), a la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante, y al CIBERehd del Instituto de Salud Carlos III (Madrid), la cesión de las muestras así como los datos clínicos asociados a estos pacientes. Agradecemos a Antonio Maurandi López, de la sección de Estadística, del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, su ayuda con la estadística de este trabajo. Este estudio ha sido financiado por el proyecto 11926/PI/09 de la Fundación Séneca. Ana Tapia-Abellán es becaria de la Fundación Séneca (12302/FPI/09), Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

## Referencias

- Albillos A, Cuervas-Mons V, Millan I, Cantón T, Montes J, Barrios C, Garrido A & Escartín P. 1990. Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 98 (1): 134-140.
- Bonacini M, Govindarajan S, Kohla M, Lai MM & Lindsay KL. 2007. Intrahepatic lymphocyte phenotypes in hepatitis C virus infection: a comparison between cirrhotic and non-cirrhotic livers. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* 53 (1): 1-7.
- Chen CM, Yoon YH, Yi HY & Lucas DL. 2007. Alcohol and hepatitis C mortality among males and females in the United States: a life table analysis. *Alcohol Clinical and Experimental Research* 31 (2): 285-292.
- Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, Miroux C, Morales O, Francois V, Groux H, Auriault C & Pancre V. 2008. Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. *Bulletin du Cancer* 95 (11): 1029-1038.
- Dolganiuc A, Garcia C, Kodys K & Szabo G. 2006. Distinct Toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection. *World Journal of Gastroenterology* 12 (8): 1198-1204.
- Ferri S, Lalanne C, Lanzoni G, Bassi M, Asioli S, Cipriano V, Pappas G, Muratori P, Lenzi M & Muratori L. 2011. Redistribution of regulatory T-cells across the evolving stages of chronic hepatitis C. *Digestive and Liver Disease* 43 (10): 807-13.
- Francés R, Muñoz C, Zapater P, Uceda F, Gascón I, Pascual S, Pérez-Mateo M & Such J. 2004. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 53 (6): 860-864.
- Heller J, Sogni P, Barriere E, Tazi KA, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, Bories P N, Poirel O, Moreau R & Lebrec D. 2000. Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 33 (3): 376-381.
- Lederer SL, Walters KA, Proll S, Paeper B, Robinson S, Boix L, Fausto N, Bruix J & Katze MG. 2006. Distinct cellular responses differentiating alcohol- and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Virology Journal* 3: 98.
- Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Marechal R, Degre D, Demetter P, de NP, Geerts A, Quertinmont E, Vercruysse V, Le MO & Deviere J. 2009. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 49 (2): 646-657.
- Li WY, Jiang YF, Jin QL, Zhang H, Feng XW & Niu JQ. 2010. Immunologic characterization of posthepatitis cirrhosis caused by HBV and HCV infection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 138237.
- Lin CY, Tsai IF, Ho YP, Huang CT, Lin YC, Lin CJ, Tseng SC, Lin WP, Chen WT & Sheen IS. 2007. Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology* 46 (5): 816-826.
- Mas VR, Fassnacht R, Archer KJ & Maluf D. 2010. Molecular mechanisms involved in the interaction effects of alcohol and hepatitis C virus in liver cirrhosis. *Molecular Medicine* 16 (7-8): 287-297.
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A & Gennari L. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 334 (11): 693-699.
- McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB & Deaciuc I. 2004. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (3): G497-G502.
- Miller AM, Horiguchi N, Jeong WI, Radaeva S & Gao B. 2011. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines. *Alcohol Clinical and Experimental Research* 35 (5): 787-793.
- Mozer-Lisewska I, Sluzewski W, Kaczmarek M, Jenek R, Szczepanski M, Figlerowicz M, Kowala-Piaskowska A & Zeromski J. 2005. Tissue localization of Toll-like receptors in biopsy specimens of liver from children infected with hepatitis C virus. *Scandinavian Journal of Immunology* 62 (4): 407-412.
- Oсна NA. 2009. Hepatitis C virus and ethanol alter antigen presentation in liver cells. *World Journal of Gastroenterology* 15 (10): 1201-1208.

- Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS & Wenzel RP. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *Journal of American Medical Association* 273 (2): 117-123.
- Ruiz-Alcaraz AJ, Martínez-Esparza M, Cano R, Hernández-Caselles T, Recarti C, Llanos L, Zapater P, Tapia-Abellán A, Martín-Orozco E, Pérez-Mateo M, Such J, García-Penarrubia P & Francés R. 2011. Peritoneal macrophage priming in cirrhosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion. *European Journal of Clinical Investigation* 41 (1): 8-15.
- Runyon BA. 1986. Paracentesis of ascitic fluid. A safe procedure. *Archives of Internal Medicine* 146 (11): 2259-2261.
- Runyon BA, Canawati HN & Akriviadis EA. 1988. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 95 (5): 1351-1355.
- Seki E & Brenner DA. 2008. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 48 (1): 322-335.
- Simera I, Moher D, Hoey J, Schulz KF & Altman DG. 2010. A catalogue of reporting guidelines for health research. *European Journal of Clinical Investigation* 40 (1): 35-53.
- Sreenarasimhaiah J, Jaramillo A, Crippin J, Lisker-Melman M, Chapman WC & Mohanakumar T. 2003. Lack of optimal T-cell reactivity against the hepatitis C virus is associated with the development of fibrosis/cirrhosis during chronic hepatitis. *Human Immunology* 64(2): 224-230.
- Such J & Runyon BA. 1998. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clinical Infectious Diseases* 27 (4): 669-674.
- Uchimura Y, Sata M, Kage M, Abe H & Tanikawa K. 1995. A histopathological study of alcoholics with chronic HCV infection: comparison with chronic hepatitis C and alcoholic liver disease. *Liver* 15(6): 300-306.
- Wise M, Bialek S, Finelli L, Bell BP & Sorvillo F. 2008. Changing trends in hepatitis C-related mortality in the United States 1995-2004. *Hepatology* 47(4): 1128-1135.