

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

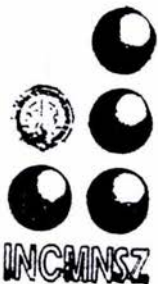
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y
NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION A CORTO PLAZO DE UN
PREPARADO CON LACTOBACILLUS CASEI (YAKULT) SOBRE LA
FLORA BACTERIANA INTESTINAL, PERMEABILIDAD INTESTINAL,
ENDOTOXINAS, CITOCINAS, AMONIO Y OXIDO NITRICO EN
PACIENTES CON HEPATOPATIA CRONICA.

ENSAYO CLINICO ANTES-DESPUES

P R O T O C O L O
PARA OBTENER LA MAESTRIA EN
C I E N C I A S M E D I C A S ,
ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD
P R E S E N T A D O
DR. ALDO TORRE DELGADILLO

TUTOR: DRA. FLORENCIA VARGAS VORACKOVA



MEXICO. D. F., 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

... a la Universidad...
... a difundir...
... de mi trabajo...
NOMBRE: Aldo Torre
Delgadillo
FECHA: 9/02/09
PA [Firma]

A mis padres y hermanos por ser quien son

A Mar el amor de mi vida y motivo diario

A mis profesores por su apoyo y confianza

INDICE

	Página
Antecedentes	4
Objetivos.....	10
Hipótesis.....	10
Marco referencial.....	11
Diseño.....	11
Muestra.....	12
Criterios de inclusión.....	12
Criterios de exclusión.....	12
Criterios de eliminación.....	13
Mediciones.....	14
Tolerancia y seguridad.....	24
Intervención experimental.....	26
Análisis.....	27
Etica.....	28
Variables operacionales.....	28
Calendarización.....	29
Factibilidad del estudio.....	30
Resultados.....	31
Discusión.....	61
Conclusiones.....	76
Bibliografía.....	83

ANTECEDENTES

La cirrosis hepática es una de las causas más importantes de muerte en México. Constituye la primera causa de muerte en hombres con edades entre 30 y 50 años. En aproximadamente el 50% de los casos, la enfermedad se encuentra relacionada al consumo de alcohol.

Bacterias Gram-negativas enteroinvasivas como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* enteroinvasiva son causas comunes de gastroenteritis. Debido a su capacidad de penetrar y destruir el epitelio colónico, estos agentes permiten la entrada de bacterias y toxinas bacterianas al hígado y circulación sistémica. El lipopolisacárido (LPS) de las endotoxinas bacterianas localizado en la parte externa de la membrana bacteriana induce estrés oxidativo hepático (1), y activa la síntesis de citocinas inflamatorias por células de Kupffer (CK) y monocitos, resultando en producción de citocinas inflamatorias incluyendo factor de necrosis tumoral (FNT), situaciones favorecidas por el sangrado gastrointestinal, hipotensión, y el edema de la mucosa intestinal (2). Tanto el estrés oxidativo como la inflamación se encuentran involucradas en la fibrosis hepática.

En animales experimentales, *Escherichia coli* aumenta la permeabilidad intestinal y *Lactobacillus spp.* antagoniza este efecto (3). En ratas cirróticas con ascitis, la traslocación bacteriana requiere la presencia simultánea de sobrecrecimiento bacteriano

intestinal y alteración severa en la permeabilidad intestinal. El sobrecrecimiento bacteriano intestinal de bacterias Gram-negativas es frecuente en cirrosis experimental, particularmente en animales con hipomotilidad intestinal (4), y traslocación bacteriana (5). En pacientes con hepatopatía crónica, la permeabilidad intestinal se encuentra aumentada y coexiste con el sobrecrecimiento bacteriano. La endotoxemia se encuentra elevada en los cirróticos, y se ha relacionado a la traslocación bacteriana y al paso de productos de la luz intestinal a sitios extraintestinales, jugando un rol en la patogénesis de infecciones bacterianas y formación de ascitis mediante vasodilatación arteriolar (6). Existe una mayor incidencia de endotoxemia, especialmente en pacientes que consumen grandes cantidades de alcohol, acompañado de niveles séricos mayores de citocinas (FNT α , IL-1, IL-6, IL-8) y óxido nítrico (7). Así mismo se ha asociado claramente los altos niveles de endotoxinas con encefalopatía y muerte (8).

Por otro lado se sabe que la endotoxemia presente en los pacientes con daño hepatocelular crónico provoca un estado constante de producción de citocinas por el sistema monocito-macrófago, y que su presencia en el líquido de ascitis o en circulación sistémica no depende de la presencia de infección (9).

Las citocinas se agrupan de acuerdo a su estructura o función en interleucinas, factores de crecimiento, interferones y citocinas quimiotácticas. Dentro de las citocinas de fase aguda o pro-inflamatorias la IL-1, IL-6, FNT α , e IFN γ son los de mayor interés, así como las

citocinas anti-inflamatorias como la IL-1 e IL-4. Se ha sugerido que el FNT α y la IL1 se asocian con consecuencias metabólicas involucradas en el daño hepático agudo y crónico inducido por alcohol, mientras que la IL-6 se relaciona con alteraciones hepáticas agudas.

Además de su contribución potencial para el desarrollo de fibrosis hepática, las bacterias intestinales se han asociado a dos complicaciones comunes de la cirrosis hepática, específicamente encefalopatía portal-sistémica (EPS), y peritonitis bacteriana espontánea (PBS). La EPS es un desorden neuropsiquiátrico y su severidad se encuentra directamente relacionada a los niveles de endotoxinas circulantes (10). Ha sido atribuida a la entrada de productos neurotóxicos, como amonio, a la circulación sistémica. Dado que los productos nitrogenados intestinales, en la presencia de ureasa bacteriana, pueden ser una importante fuente de amonio, el tratamiento actual para la EPS se basa en la restricción de proteínas animales en la dieta y la administración de laxantes, antibióticos y/o enemas evacuantes. La neomicina reduce la flora intestinal aeróbica donde son generadas las endotoxinas, mientras que la lactulosa ha demostrado inhibir la producción de FNT α en los macrófagos estimulados por endotoxinas (11). Estas medidas se acompañan, sin embargo, de efectos no deseables que deterioran el estado de salud del paciente y/o afectan su calidad de vida. Específicamente, las restricciones dietéticas agravan la desnutrición que está presente en los cirróticos, los laxantes causan flatulencia y diarrea, los antibióticos pueden producir toxicidad a órganos específicos y los enemas son aceptados limitadamente. Por otro lado la resistencia microbiana a los antibióticos es

un problema creciente, principalmente cuando la profilaxis microbiana es administrada por periodos de tiempo prolongado (12). La lactulosa y la lactosa se encuentran entre los laxantes comúnmente utilizados en pacientes con EPS. Ambos agentes son capaces de disminuir el pH intestinal, acelerar el tránsito intestinal, disminuir las cuentas totales bacterianas (incluyendo coliformes) y aumentar la proporción de lactobacilos y bifidobacterias (13). La lactulosa es asimismo capaz de disminuir la endotoxemia y traslocación bacteriana y prevenir el daño hepático inducido por D-galactosamina en animales experimentales (14).

La PBE es una complicación común en pacientes cirróticos con ascitis. Ha sido atribuida a bacteremias o al paso de bacterias intestinales al peritoneo, aunado a una función comprometida de los monocito-macrófagos hepáticos, así como niveles de complemento reducidos en el líquido de ascitis y sangre. Ante esto, la traslocación bacteriana de organismos entéricos a los linfáticos mesentéricos se relacionan con la infección en pacientes cirróticos, encontrando la traslocación en un 40% de sujetos con cirrosis, y hasta en un 80% en sujetos con cirrosis y ascitis, siendo este rubro mas frecuente en los estadios Child-Pugh C (15). Agentes responsables de ella son los coliformes, especialmente *Escherichia coli*. La PBE tiene una alta mortalidad y es tratada con antibióticos (16), la norfloxacin es el agente antimicrobiano comunmente usado, la administración por tiempo prolongado lleva a la emergencia de *Enterobacterias* resistentes a quinolonas, siendo dichos microorganismos causantes de infecciones sistémicas en los pacientes cirróticos.

Por otro lado, los cirróticos tienen una respuesta inmune alterada. Esto es debido a una disminución en la actividad de los monocitos, disminución en las cuentas de linfocitos T, baja secreción de IgA y bajos niveles de interleucina-2, interferon-alfa e interferon-gamma.

La composición de la flora intestinal depende de la producción de ácido y del mantenimiento de un pH bajo, formada por 100 trillones de bacterias viables, representando 100 o más especies bacterianas diferentes, y factores como la dieta, aspectos psicológicos (estrés), metabolismo de fármacos, envejecimiento, y respuesta inmunológica influyen en su equilibrio, por lo que aquellas especies que no son capaces de competir, son rápidamente eliminadas (17). Mediante la competencia por sitios de unión en células epiteliales y la secreción de sustancias antagonistas, *Lactobacillos* y bifidobacterias han demostrado ejercer una influencia específica en la respuesta del huésped hacia las infecciones. Actúan en contra de la actividad proinflamatoria de otras bacterias intestinales como *Bacteroides* o enterobacterias (18). La administración de *Lactobacillus casei* a animales experimentales reduce significativamente la colonización por *Salmonella typhimurium* y su traslocación a los ganglios linfáticos mesentéricos, bazo e hígado (19).

Los probióticos (tales como *Lactobacillos* y bifidobacterias) son comúnmente definidos como bacterias viables, con efecto benéfico en la salud del huésped, demostrando un bajo potencial patogénico. Se han reportado casos de bacteremia <0.5%, (20) y

endocarditis (21) secundarios a *Lactobacillos*. Estos casos fueron ocasionalmente fatales (22) y ocurrieron principalmente en pacientes de edad avanzada e inmunocomprometidos (23) que se encontraban recibiendo antibióticos de amplio espectro.

Por su acción inmunomoduladora y por el reforzamiento de la barrera mucosa intestinal (24), los probióticos pueden ser una medida profiláctica excelente para pacientes cirróticos, ya que ejercen su efecto a través del lograr el balance entre citocinas anti-inflamatorias e inflamatorias. En animales experimentales, la administración de *Lactobacillos* evita la traslocación de enterobacterias y anaerobios en el ciego e ileon terminal, mientras que en los cirróticos esta disminución en la traslocación parece ocurrir a nivel de la pared intestinal (25-26), así mismo la administración de *Lactobacillos* reduce significativamente los niveles de endotoxinas y la hepatopatía inducida por alcohol (27), y previene el daño hepático inducido por traslocación bacteriana y D-galactosamina (14).

Lactobacillus casei se encuentra en el intestino, y es capaz de sobrevivir durante el paso al tracto gastrointestinal, ya que es tolerante al efecto del jugo gástrico y sales biliares, es capaz de estimular la producción de IgA, la proliferación células plasmáticas y de linfocitos T.

La prevención de complicaciones como EPS y PBE puede mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Puede también reducir gastos relacionados con el

cuidado de la salud. Este impacto puede ser incluso más importante si se demuestra un efecto benéfico en los procesos inflamatorios involucrados en la fibrosis hepática.

OBJETIVOS

Determinar el efecto de una bebida con *Lactobacillus casei* en pacientes con cirrosis hepática con respecto a:

1. Microflora y permeabilidad intestinales, niveles de endotoxina y amonio en la sangre, expresión y secreción de citocinas por células plasmáticas mononucleares (IL-1, IL-6, TNF α , IL-10, IFN γ).
2. Citología del líquido ascítico, niveles de endotoxinas óxido nítrico, y citocinas en ascitis (IL-1, IL-6, TNF α , IL-10, IFN γ).
3. Mejoría clínica en el paciente mediante autoevaluación, validada por la aplicación de termómetro clínico.
4. Tolerancia y seguridad.

HIPÓTESIS

La administración de una bebida con *Lactobacillus casei* a pacientes con cirrosis hepática:

- i) Modifica la microflora intestinal e incrementa la proporción de *Lactobacillos*.
- ii) Disminuye la permeabilidad intestinal.

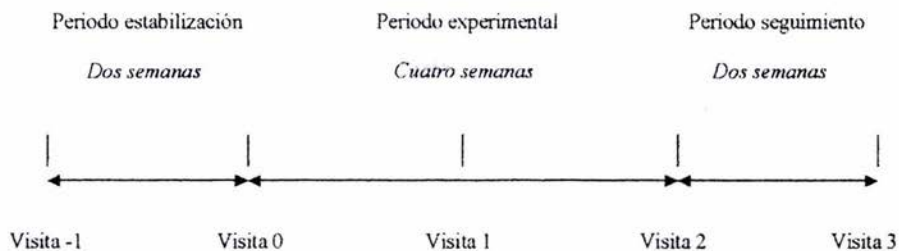
- iii) Disminuye los niveles de endotoxinas en sangre y ascitis.
- iv) Modifica la expresión y secreción de citocinas de células plasmáticas mononucleares (IL-1, IL-6, TNF α , IL-10, IFN γ) en sangre y ascitis.
- v) Disminuye los niveles de amonio en la sangre.

MARCO REFERENCIAL:

Se captaron pacientes de la consulta de hígado del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” que cumplieron con los criterios de inclusión y superaron la fase de mantenimiento de dieta.

DISEÑO

Ensayo clínico abierto, fase I/II. Aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de selección iniciaron con un esquema de 2 semanas para estabilización de la dieta. Se utilizó una dieta para cirróticos con una cantidad fija de productos lácteos y fibra durante todo el estudio. Posterior a la estabilización, se verificó el apego de los pacientes a los criterios de inclusión del estudio y una bebida con *Lactobacillus casei* fue administrada por un periodo experimental de cuatro semanas. Al final del periodo experimental, los pacientes fueron seguidos por dos semanas más. Las evaluaciones clínicas y de laboratorio se realizaron al inicio de la estabilización (visita -1), al inicio, mitad y final del periodo experimental (visitas 0,1,2) y al final del periodo de seguimiento (visita 3).



MUESTRA

Solamente se incluyeron pacientes cirróticos estadio Child B en el estudio. El diagnóstico de cirrosis hepática se sustentó clínicamente (historia clínica, exploración física), bioquímicamente (pruebas de función hepática), radiográficamente (ultrasonido, gammagrafía) y/o histológicamente (biopsia). Adicionalmente, los pacientes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- I) Hombre o mujer.
- II) Edad entre 18 y 65 años,
- III) Estadio Child B de hepatopatía crónica por alcohol, virus C de hepatitis o CBP.
- IV) Hepatopatía con presencia o ausencia de ascitis.
- V) Consentimiento escrito.

Los candidatos fueron excluidos si durante el periodo de estabilización:

- I) No cumplieron con las instrucciones de dieta definidas.

- II) Desarrollaron complicaciones que requirieron antibióticos, terapia inmune, laxantes, lactosa, lactulosa o benzoato de sodio.
- III) Aquellos pacientes cuyo análisis de líquido ascítico mostró I) >500 leucocitos/ μL con 50% neutrófilos, o II) <1 g/dL de proteínas.
- IV) Presencia de enfermedades crónico concomitantes (Diabetes mellitus, cardiopatía, insuficiencia renal).
- V) Presencia de enfermedades inmunológicas.
- VI) Presencia de malnutrición severa (IMC < 20).
- VI) Presencia de tratamiento con antibióticos, laxantes o inmune en el mes precedente del estudio.

Criterios de eliminación:

- I) Desarrollo de PBE durante el estudio.
- II) Desarrollo de EPS durante el estudio.
- III) Presencia de cualquier proceso infeccioso que ameritó tratamiento antimicrobiano.

Este ensayo clínico fue un estudio piloto. No existía información que sustente la determinación de un tamaño de muestra específico. Bajo el supuesto del “todo o el nada” (todos cambian o ninguno cambia) con una probabilidad a priori de 0.5 de cambio

en los parámetros estudiados se requirió un mínimo de 6 pacientes. Para un mayor poder estadístico se incluyeron 12 pacientes en el estudio, seis de ellos con ascitis. Se anticipó que dos de los pacientes se retirarían del estudio durante el período de seguimiento.

MEDICIONES

Evaluación clínica. La historia y la exploración física evaluó la enfermedad hepática y la presencia de EPS, PBE y efectos adversos.

Estado nutricional. Se evaluó por antropometría y niveles séricos de albúmina. Estos últimos fueron determinados en el Laboratorio Central del Instituto. Las mediciones se realizaron acorde a la calendarización establecida, anexando cuestionarios en los cuales se mostró al paciente los alimentos que contienen *Lactobacillos*, así como aquellos con contenido rico en fibra (frutas, cereales, verdura y leguminosas). Las hojas de recolección se anexaron al protocolo.

Citología sanguínea y pruebas de función hepática. Se realizó citología sanguínea completa (eritrocitos, hemoglobina, índice de sedimentación globular, leucocitos) y pruebas de función hepática (bilirrubinas total y directa, ALT, AST, fosfatasa alcalina) en el Laboratorio Central del Instituto.

Microbiología fecal. Se determinó la presencia de bacterias aeróbicas , bifidobacterias, *Lactobacillos* y enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*) en muestras fecales en el Laboratorio Central del Instituto.

Se tomó la cantidad necesaria para cubrir la punta de un abatelenguas (del tamaño de una haba) y se colocó en los viales proporcionados por el médico al paciente (uno con agente reductor, otro sin agente reductor, y uno control). En el caso de que las heces estuvieran formadas se suspendieron con el abatelenguas sin tirar el medio proporcionado. Si las heces fueron líquidas, se cerraron los viales y agitó. La muestra se tomó antes de la visita al médico, de lo contrario se tomó la muestra de la última evacuación, refrigerando la muestra hasta la visita al médico.

Se tomaron dos gramos de muestra fecal colectados de la parte interna de las heces y se colocaron inmediatamente en frascos pre-pesados con 17ml de medio de transporte (MT). Las muestras fueron pesadas y almacenadas a 4 ± 1 °C. En 6 horas las muestras se homogeneizaron en medio anaerobio, colocadas en criotubos (2ml) y almacenadas posteriormente en nitrógeno líquido. Después se descongeló la muestra y se hicieron diluciones 10 veces consecutivas con salino fisiológico. Diluciones de 0.1ml se separaron a medios de agar diferentes: Agar Eugon para bifidobacterias, Agar Rogosa en *Lactobacillus*, y Agar glucosa-violeta para enterobacterias. Todos estos medios se incubaron posteriormente anaeróbica o aeróbicamente a 24-37°C, con conteo posterior de microorganismos viables por gramo de materia fecal.

Amonio sanguíneo. Se determino en el Laboratorio Central del Instituto. Se tomaron 4ml de sangre periférica, sin torniquete. La muestra se procesó en la hora siguiente, transportada en hielo, y centrifugada en frío. Se utilizó el sistema SYNCHRON CX (Bekman Instruments, Inc), bajo control de cambio de absorbancia a 340 nm, lo cual es proporcional a la concentración de amoniaco en la muestra, siendo los constituyentes del reactivo para procesar el amoniaco alfa-cetoglutarato 1.72 mmol /L, ADP 0.36 mmol/L, NADPH 0.22 mmol/L, y GLDH (hígado de res) > 35 U/L.

Se tomó en cuenta que el amoniaco atmosférico puede producir resultados falsamente elevados, al igual que el fumar, y la presencia de iones de amonio en los anticoagulantes.

Permeabilidad intestinal. Se determinó gracias a la prueba de lactulosa:manitol llevada a cabo en el laboratorio de Fisiología Nutricional del Instituto. El manitol es un monómero, rápidamente absorbido y que actúa como marcador de captación transcelular.

La lactulosa es un dímero, que sólo es absorbido ligeramente y sirve como marcador de integridad de la mucosa. El paciente debió tener ayuno de 11 a 12 horas precedente a la recolección de muestra de orina (ésta será la primera de la mañana), guardando en el refrigerador y etiquetada como frasco #1. Posterior a esto se tomó el jarabe (lactulosa:manitol), y al cabo de una hora el paciente bebió toda el agua que pudo durante las siguientes 6 hrs. No tomó otras bebidas ni alimentos durante el

tiempo que duró el estudio. La muestra de orina se empezó a coleccionar en un frasco marcado como #2 y se guardó en el refrigerador, cada vez que orinó se saco el frasco y deposito la muestra, volviendo a refrigerar.

El reporte de la prueba incluye porcentaje de recobro de lactulosa, manitol y la relación lactulosa: manitol. (valores normales 0.017 – 0.034).

Bajos niveles de manitol:lactulosa indican malabsorción, niveles elevados son indicativos de permeabilidad incrementada.

Se evitó comer o beber previo o durante el estudio sustancias que contengan fructosa (frutas, jugos, bebidas con endulzantes, chocolate, miel). Colateralmente el paciente puedo referir diarrea y/o dolor de estómago.

Citología y microbiología de ascitis. El líquido de ascitis fue analizado para la determinación de cuentas de leucocitos, cuentas de PMN, cultivos, proteínas y albúmina (muestra de 20ml de ascitis). Los cultivos de líquido ascítico fueron realizados utilizando tanto métodos convencionales de cultivo como inoculación en botellas para cultivo sanguíneo para aerobios y anaerobios. Estos estudios se realizaron en los Laboratorios Central y de Microbiología del Instituto.

Endotoxinas en sangre y ascitis. Se determinaron usando el método cromogénico Limulus de lisado amebocítico. La muestra tomada fue de 20ml de sangre, 15 para citocinas y 5 para endotoxinas. La muestra se tomo en ayunas, y se transportó en medio con LPS (QCL-1000), obteniendo mononucleares, y cultivo de los mismos en 24hrs.

Citocinas en sangre y ascitis. La expresión y secreción de IL-1, IL-6, IL-10, TNF α , e IFN γ se determinaron en monocitos de la sangre y ascitis. La expresión de estas citocinas se determino por RT-PCR y la secreción por paquetes comerciales de ELISA. Los estudios se realizaron en el Departamento de Gastroenterología del Instituto. La muestra tomada fue de 10ml de líquido de ascitis.

Expresión de citocinas:

Transcriptasa reversa: La reacción de transcriptasa reversa se llevó a cabo con mezclas del RNA obtenido y el RNA estándar del plásmido pQA-1.

Se tomaron 2 μ l del RNA y se colocaron en un tubo para PCR. El RNA fue desnaturalizado durante 5 minutos a 70 °c y enfriado rápidamente en hielo. Posteriormente se agregaron 100ng de oligonucleótido iniciador (Oligo d(T)), 50U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (Gibco-BRL) y 0.5M de cada uno de los 4 desoxinucleótidos trifosfato (Gibco-BRL) en volumen final de 20 μ l.

La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos a 42 °c seguida de 5 minutos a 95°c en un termociclador programado (Perkin-Elmer Co, Norwalk, CT, USA).

Como parámetro de comparación inter e intraensayo se utilizó el plásmido pQA-1 para la cuantificación de la proteína estructural B2-microglobulina.

Reacción en cadena de la polimerasa: El producto de la reacción de transcriptasa reversa fue dividido en dos partes. El DNAc se mezcló con 30pM de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido para las distintas citocinas, 0.5M de desoxinucleótidos trifosfato y 2U de TaqDNA polimerasa (Perkin-Elmer). Las condiciones de amplificación fueron de 1 ciclo a 94°C por 5 minutos, 57°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos (94°C por 1 min., 57°C por 1 min., y 72°C por 5 minutos), finalmente un ciclo de 94°C por 1 min., 57°C por 1 min., y 72°C por 5 min., todo esto en un termociclador programado. Los productos amplificados se corrieron en electroforesis en geles de agarosa al 1% con 0.05 µg/ml en bromuro de etidio y fueron fotografiados sobre un transluminador de luz UV con película Polaroid.

Los primers utilizados fueron:

IL-1β: sense: 5' GGATATGGAGCAACAAGTGG 3'

antisense: 5' ATGTACCAGTTGGGGAAGTGG 3' 263 pb.

IL-10: sense: 5' TTGCAGCCTTCCTGATT 3'

antisense: 5' AACTTCTCCACAACCCTCTG 3' 247 pb.

FNT- α : sense: 5' ACAAGCCTGTAGCCCATGTT 3'

antisense: 5' AAAGTAGACCTGCCCAGACT 3' 427 pb.

IFN- γ : sense: 5' GCAGAGCCAAATTGTCTCCT 3'

antisense: 5' ATGCTCTTCGACCTCGAAAC 3' 290 pb.

B2 microglobulina: sense: 5' CCAGCAGAGAATGGAAAGTC 3'

antisense: 5' GATGCTGCTTACATGTCTCG 3' 268 pb.

Todas estas citocinas están incluidas en el plásmido pQA-1 (humano), el cual es un control interno y tienen un peso molecular de 370 pb.

Control interno de RNA: EL RNA que se empleó como control interno se sintetizó a partir del plásmido pQA-1. Primeramente el plásmido fue linearizado con 10U de endonucleasa de restricción Eco R1 durante 60 minutos a 33°C.

Posteriormente se verificó la ruptura del plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en solución 0.05X de tris-boratos-EDTA y ribosonda con 400ng del plásmido mediante acción de 50U de la enzima T7 RNA polimerasa en presencia de 2.5mM de cada uno de los 4 nucleótidos trifosfato y 40U de inhibidor de RNAasa. Después de incubar por 60 minutos a 37°C, se agregaron 32U de DNAasa y el RNA se purificó secuencialmente con fenol y cloroformo : alcohol isoamílico. Por último, el RNA

obtenido se precipitó con etanol. La pureza se verificó en un gel de agarosa al 1% con formaldehído y 0.05 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. La ribosonda o RNA estándar se cuantificó también por el método antes descrito.

Óxido nítrico en sangre periférica y ascitis. Las muestras de ascitis fueron colectadas en tubos de vidrio cubiertos con silicón sin aditivos y almacenados bajo congelación hasta el día del análisis. Los niveles de óxido nítrico se midieron por quimioluminiscencia (Nitric Oxide Analyzer 270B, Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, EUA) en el Laboratorio de Hemodinámica Hepática en West Haven VA (29). Se tomó 1ml en ascitis en tubos especiales con EDTA al 10%, y 1 ml en suero.

TERMÓMETRO CLINICO: Se mostró al paciente 4 escenarios hipotéticos en orden de gravedad con fundamento patológico de Cirrosis, de tal manera que el paciente 1 fue el menos grave, y el 4 el más grave. En base a esto, y el análisis de los escenarios clínicos por el paciente, éste se asignó el mas representativo de su condición actual.

Paciente 1:

- 1.- No tiene problemas para caminar.
- 2.- No tiene problemas para hacer su cuidado personal (bañarse, vestirse, comer, etc).
- 3.- No tiene problemas para hacer todas sus actividades en la casa y/o trabajo.
- 4.- No tiene problemas para convivir, disfrutar y relacionarse con sus familiares y amigos.

- 5.- Nunca se siente ansioso, de mal humor ni deprimido.
- 6.- No tiene molestias relacionadas con los medicamentos. (náusea, dolor abdominal, flatulencia, mareo, etc.).
- 7.- Nunca se le olvidan las cosas ni las personas.
- 8.- No está hinchado de las piernas ni del vientre.
- 9.- Nunca se siente cansancio.
- 10.- En general no se siente enfermo.

Paciente 2:

- 1.- Tiene pocos problemas para caminar.
- 2.- Tiene pocos problemas para hacer su cuidado personal (bañarse, vestirse, comer, etc.).
- 3.- Tiene pocos problemas para hacer todas sus actividades en la casa y/o trabajo.
- 4.- Tiene pocos problemas para convivir, disfrutar o relacionarse con sus familiares y amigos.
- 5.- Pocas veces se siente ansioso, de mal humor y deprimido.
- 6.- Tiene molestias mínimas relacionadas con los medicamentos (náuseas, dolor abdominal, flatulencia, mare, etc.).
- 7.- Pocas veces se le olvidan las cosas, los lugares y/o las personas.
- 8.- Está un poco hinchado de las piernas y/o del vientre.
- 9.- Pocas veces se siente cansado.
- 10.- En general se siente un poco enfermo.

Paciente 3:

- 1.- Tiene muchos problemas para caminar.
- 2.- Tiene muchos problemas para hacer su cuidado personal (bañarse, vestirse, comer, etc.).
- 3.- Tiene muchos problemas para hacer sus actividades en la casa y/o trabajo.
- 4.- Tiene muchos problemas para convivir, disfrutar o relacionarse con sus familiares y amigos.
- 5.- Muchas veces se siente ansioso, de mal humor y deprimido.
- 6.- Tiene molestias importantes relacionadas con los medicamentos (náusea, dolor abdominal, flatulencia, mareo, etc.).
- 7.- Muchas veces se le olvidan las cosas, los lugares y/o las personas.
- 8.- Esta bastante hinchado de las piernas y del vientre.
- 9.- Muchas veces se siente cansado.
- 10.- En general se siente bastante enfermo.

Paciente 4:

- 1.- No puede caminar, esta en cama gran parte del día.
- 2.- No puede hacer su cuidado personal sin ayuda de otras personas (bañarse, vestirse, comer, etc.).
- 3.- No puede hacer sus actividades en la casa y/o trabajo.
- 4.- No puede convivir, disfrutar ni relacionarse con sus familiares y amigos.

- 5.- Siempre esta ansioso, de mal humor y deprimido.
- 6.- Tiene molestias muy importantes relacionadas con los medicamentos (náuseas, dolor abdominal flatulencia, mareo, etc.).
- 7.- Casi siempre se le olvidan las cosas, los lugares y/o las personas.
- 8.- Esta muy hinchado de las piernas y del vientre.
- 9.- Siempre esta cansado.
- 10.- En general se siente muy enfermo.

TOLERANCIA Y SEGURIDAD: Se realizaron evaluaciones clínicas y bioquímicas con este propósito en cada visita. Acordemente, se evaluó la presencia de náusea, vómito, distensión abdominal y dolor, flatulencia, diarrea y fiebre. Se revisaron los estudios de citología sanguínea, pruebas de función hepática y amonio sanguíneo. Así mismo se evaluó mediante prueba de conexión numérica de Conn la presencia o no de encefalopatía con respecto a visitas previas.

Esta prueba consiste en la demostración inicial al paciente de números distribuidos aleatoriamente en desorden (1-25) y la unión de ellos mediante línea horizontal, siendo la forma de evaluar la siguiente:

Grado de encefalopatía:	Tiempo en segundos:
0 Nula	15 a 30 segundos.
1 Leve	31 a 50 segundos.

2 Moderada	51 a 80 segundos.
3 Severa	81 a 120 segundos.
4.- Coma	No aplicable

Las mediciones fueron tomadas siguiendo la siguiente calendarización:

Medición	Visita -1	Visita 0	Visita 1	Visita 2	Visita 3
Evaluación clínica	X	X	X	X	X
Estado nutricional	X	X		X	X
Citología sanguínea	X	X	X	X	X
Pruebas de función hepática	X	X	X	X	X
Microbiología fecal	X	X	X	X	X
	Visita -1	Visita 0	Visita 1	Visita 2	Visita 3
Amonio sanguíneo	X	X	X	X	X
Permeabilidad intestinal		X		X	X
Citología, microbiología, endotoxinas, citocinas & óxido nítrico de ascitis		X		X	
Citocinas & endotoxinas en sangre		X		X	X
Tolerancia y seguridad		X	X	X	X

Se realizó un esfuerzo para que en pacientes que se retiraron del estudio, pudieran obtener todas las evaluaciones de la visita 2.

INTERVENCIÓN EXPERIMENTAL

En las visitas 0 y 1, los pacientes recibieron 20 botellas con una bebida de *Lactobacillus casei*. Cada botella de 80 mL contenía 8×10^9 *Lactobacillos* viables. Se pidió una verificación de las cuentas *Lactobacillos*. Con el fin de mejorar el cumplimiento del esquema y evitar contaminación, se utilizaron botellas sin etiquetas comerciales. Se dieron a los pacientes instrucciones para tomar el contenido de una botella tres veces por día (una después del desayuno, una después de la comida y una después de la cena) durante los siguientes 15 días.

Cuentas de *Lactobacillos* de 8×10^9 han demostrado ser suficientes para inducir cambios en la microflora intestinal (30-1). Debido a los efectos inmunoestimuladores de estos microorganismos, la cantidad en que fueron administradas es crítica, especialmente en pacientes inmunocomprometidos como los de este estudio.

Se han observado cambios clínicos significantes después de administración de *Lactobacillos* por 15 a 28 días. Específicamente, agentes probióticos administrados por 15 días inducen cambios en la microflora intestinal (32). *Lactobacillus acidophilus* y

bifidobacterias administradas por 28 días reducen la infiltración colónica inflamatoria debida a infección (33).

La administración de la bebida con *Lactobacillus casei* se suspendió si el paciente desarrolló EPS, PBE o una condición infecciosa que requirió antibióticos.

Durante todo el estudio (ocho semanas), los pacientes estuvieron bajo una dieta que de 0.8 g de proteína por kg de peso corporal, fija en productos lácteos y fibra. Se desarrollaron menús individuales tomando en cuenta las preferencias de alimentación de cada individuo.

ANÁLISIS

Las variables cualitativas fueron sintetizadas para cada visita en forma de frecuencias.

Las variables cuantitativas se sintetizaron para cada visita en forma de medias de medianas y rangos. Las comparaciones entre las visitas 0, 2 y 3 serán llevadas a cabo gracias a la prueba de Wilcoxon.

ÉTICA

El protocolo fue sometido para aprobación y registro al Comité de Investigación y Bioética del Instituto, con clave asignada GAS 085 99 001.

Se le informo sobre el estudio y se pidió que firmará una carta de consentimiento a todo individuo que se incluyó. La carta de consentimiento se elaboró de acuerdo a las recomendaciones de Helsinki, los requisitos de la Secretaría de Salud y el formato del Comité de Bioética del Instituto.

Los riesgos involucrados en el manejo de sangre, líquido de ascitis y heces durante el estudio son mínimos o nulos. Se llevó un estricto control de eventos infecciosos durante todo el estudio. La presentación de tan sólo un evento de sepsis debida a *Lactobacillus casei* determinó la terminación del estudio.

VARIABLES OPERACIONALES:

Probiótico: Definido como bacteria viable, en cultivo sencillo o mixto, que tiene efecto benéfico en la salud del huésped.

Endotoxina: Sustancia producida por bacterias, capaz de causar daño en el huésped.

Endotoxemia: Endotoxinas circulantes en la sangre.

Citocinas: Células con inmunológicas con capacidad proinflamatoria.

Termómetro clínico: Método descriptivo de autoevaluación personal aplicado a padecimientos crónicos-degenerativos.

Cirrosis Hepática: Entidad caracterizada por reducción en la función tisular hepática y por desorganización de la arquitectura vascular y lobular.

Permeabilidad intestinal: Función inherente al intestino que condiciona permeación de compuestos tóxicos y macromoléculas.

Bacteria aeróbica: Aquélla que necesita de oxígeno para su crecimiento.

Bacteria anaeróbica: Aquélla que no necesita de oxígeno para su crecimiento.

CALENDARIZACIÓN

De acuerdo a la siguiente calendarización, el estudio se planeó para ser terminado en dos años (Marzo 2001 – Febrero 2003).

- | | |
|-----------------------------------|-----------|
| 1.- Fase de preparación y ajuste: | 3 meses. |
| 2.- Ejecución del proyecto: | 12 meses. |
| 3.- Procesamiento de muestras: | 3 meses. |
| 4.- Estructuración de tesis: | 6 meses. |

FACTIBILIDAD DEL ESTUDIO

El estudio fue factible, se contó con el número de pacientes y patología buscada, así como el apoyo económico para la administración de la maniobra y realización de pruebas. (Yakult Onza Co., Ltd. (Japan) and Yakult, S.A. de C.V. (México).

La parte de laboratorio se realizó en el laboratorio de Gastroenterología contando con todo el equipo necesario, la estandarización de las pruebas, y reproducibilidad en las Q.F.B que forman parte del estudio.

RESULTADOS:

a.- Datos demográficos:

Catorce pacientes entraron al estudio siendo excluidos 2 durante el mismo ambos a la visita 1 debido a sangrado de tubo digestivo alto en el caso del pacientes con CHPN, y encefalopatía en el caso de cirrosis por alcohol. Los datos demográficos de los 14 pacientes fueron los siguientes:

Tabla 1 A.- Datos demográficos:

	Sin ascitis (n=7)	Ascitis (n=7)	Total (n=14)
Sexo	5 M / 2 H	0 M / 7 H	5 M / 9 H
Edad	46 años (32-57)	51 años (34-65)	48.5 (32-65)
Entidad	4VHC/2 OH/ 1CBP	3 VHC / 4 OH	7 VHC / 6OH/ 1CBP
Eliminados	-----	1 VHC / 1 OH	-----

b.- Prueba de conexión numérica:

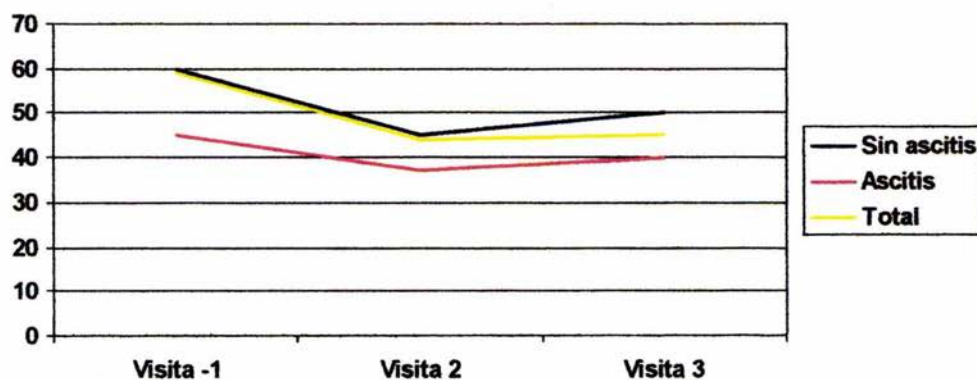
En lo referente a la prueba de conexión numérica (Conn) esta mostró mejoría de la visita inicial (Visita -1) a la visita 2 catalogada como fin de la maniobra experimental, y

retorno mínimo a valores mayores al final de la visita 3 de seguimiento.

Tabla 2 A.- Prueba de conexión numérica.

	Visita -1	Visita 2	Visita 3
Sin ascitis	60 segundos	45 segundos	50 segundos
Ascitis	45 segundos	37 segundos	40 segundos
Total	59 segundos	44.5 segundos	45 segundos

En la siguiente gráfica a manera de medianas se grafican la evolución en las visitas arriba mencionadas de los tres grupos.



Visita -1 vs. 2: $p = 0.009$

Visita -1 vs. 3: $p = 0.005$

Valores de p aplicable al grupo total, con significancia individual conservada.

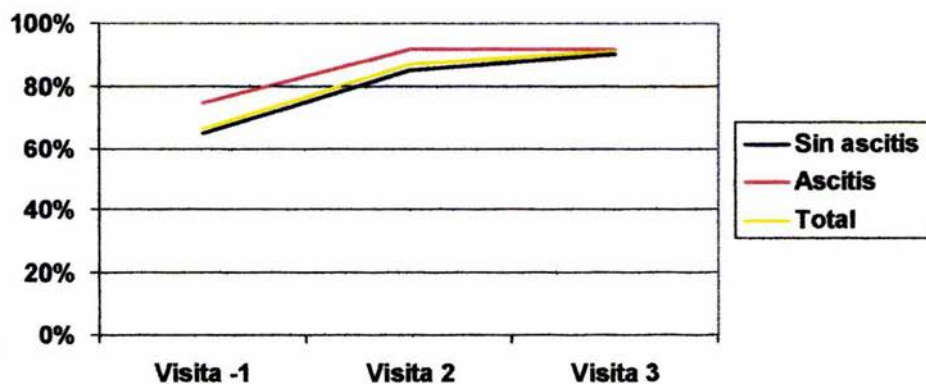
c.- Calidad de vida (Termómetro clínico):

Con respecto al termómetro clínico la mejoría es franca a partir de la visita - 1 con mejoría porcentual al final de la visita experimental, la cual se mantiene o prolonga a la visita de seguimiento.

Tabla 3 A.- Termómetro clínico.

	Visita -1	Visita 2	Visita 3
Sin ascitis	65%	85%	90%
Ascitis	75%	92%	92%
Total	66.5%	86.5%	91%

A continuación se grafican las medianas los 3 grupos:



Visita -1 vs. 2: $p = 0.05$

Visita -1 vs. 3: $p = 0.04$

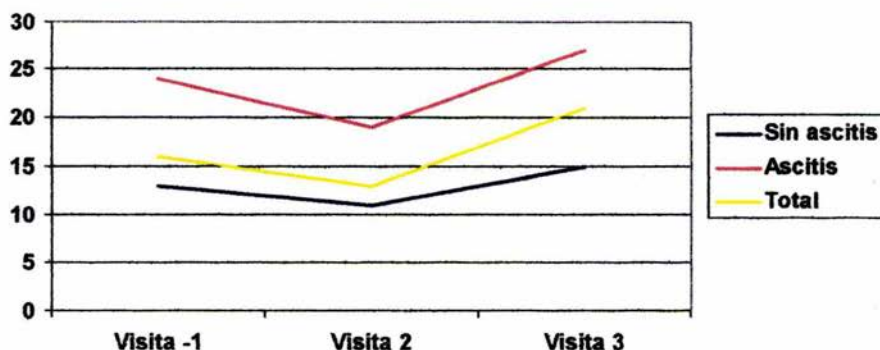
d.- Parámetros de laboratorio:

Los parámetros de laboratorio no mostraron variaciones significativas con respecto a la biometría hemática, no así en lo referente a la velocidad de sedimentación globular, encontrando durante el período experimental un descenso en la misma, con elevación posterior, incluso a valores por arriba del basal al terminar el período de seguimiento.

Tabla 4 A.- Velocidad de sedimentación globular.

	Visita -1	Visita 2	Visita 3
Sin ascitis	13	11	15
Ascitis	24	19	27
Total	16	13	21

El patrón evidente en la tabla superior se ejemplifica adecuadamente en la siguiente gráfica.



Las pruebas de funcionamiento hepático mostraron variaciones con respecto a las aminotransferasas, siendo evidente en el grupo de sin ascitis una elevación tanto de AST como ALT durante la fase experimental con escasa modificación posterior a los 15 días de seguimiento. En el grupo de ascitis se presentó descenso de ambas aminotransferasas al final del período experimental, con prolongación durante el seguimiento para la AST, y aumento en una unidad para la ALT. En lo referente a fosfatasa alcalina, bilirrubinas totales y globulinas no hubo cambios significativos.

Tabla 4 B.- Transaminasas:

AST / ALT	Visita -1	Visita 2	Visita 3
Sin ascitis	63 / 50	87 / 65	88 / 62
Ascitis	64 / 33	45 / 24	39 / 25
Total	65.5 / 47.5	82 / 52	78 / 54.5

e- Parámetros de laboratorio y dieta:

La albúmina mostró cambios mínimos a l final del período experimental , situación que se compara a continuación con los niveles de amoniaco, que en el grupo sin ascitis disminuyen importantemente de 38.7 a 21.6 en la visita 2, con retorno a valores por arriba del basal al final del período de seguimiento, cambios evidentes en el grupo con ascitis

donde los valores aumentan progresivamente hasta el final del periodo experimental, y se continúan al periodo de seguimiento.

En la siguiente tabla se grafican los datos mencionados, así como el apego a la dieta referido por el paciente a manera de porcentaje, y el apego real calculado por el apego a la lista de alimentos consumidos reportados por el pacientes, siendo apego adecuado por arriba de 65%.

Tabla 4 C.- Relación de albúmina, amoníaco y dieta (sin ascitis).

Sin ascitis	Visita -1	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Albúmina	2.8	2.8	2.9	2.8
Amoníaco	38.7	38.4	21.6	43
Dieta real		73%	73%	79%
Dieta verbal		90%	90%	100%

En lo referente al grupo con ascitis los resultados son los siguientes:

Tabla 4 D.- Relación de albúmina, amoníaco y dieta (grupo con ascitis).

Ascitis	Visita -1	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Albúmina	2.4	2.5	2.7	2.5
Amoníaco	28.4	19.1	34	42.9
Apego real		87%	88%	71%
Apego verbal		90%	90%	100%

En este grupo la albúmina al término de la maniobra experimental mejora en 0.3 gr/dL, no así el amoníaco que al final de dicha visita incrementó sus valores por arriba del basal. Al comparar el grupo total conservamos la ganancia marginal de la albúmina al final de la visita de seguimiento, con mínimo descenso del amoníaco.

Tabla 4 E.- Relación de albúmina, amoníaco y dieta (grupo total).

Total	Visita -1	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Albúmina	2.7	2.75	2.85	2.8
Amoníaco	36.2	30.85	34.5	35.6
Apego real		77.5%	75%	75%
Apego verbal		90%	90%	92.5%

Al analizar el apego a la dieta y tratando de establecer que los niveles de amoníaco sean paralelos en aumento o descenso a las proteínas ingeridas en la dieta, se correlacionó los gramos de proteína ingeridos desde la visita 0 denominada inicio del período experimental hasta el fin de la visita 3 o período de seguimiento. (resultados expresados en medianas).

Tabla 4 F.- Relación de amoníaco e ingesta de proteínas (grupo total).

	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Amoníaco	30.85	34.3	35.6
Gr. de proteína	59.1	61.1	62.1

f.- Microflora intestinal:

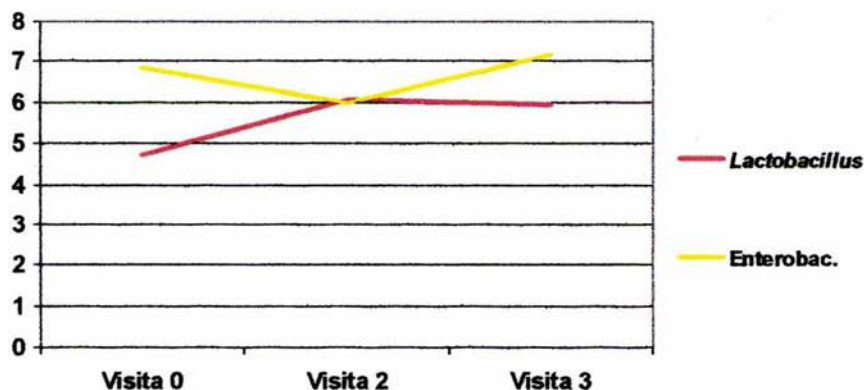
A nivel de la microflora intestinal cambios significativos se encontraron en ambos grupos, siendo reflejados en el grupo total, con aumento en la flora de *Lactobacillus* totales durante la fase de experimentación y descenso de los mismos al final de la visita de seguimiento, contrastado con una disminución de la enterobacterias al final de la visita 2, y ascenso posterior en la visita 3. (resultados expresados en log., ej: 1 log. = 1,000.000)

Tabla 5 A.- Microflora intestinal (grupo sin ascitis).

Sin ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
<i>Lactobacillus</i>	4.73	6.07	5.94
Enterobacterias	6.875	6.005	7.18
Dieta real	73%	73%	79%

$p < 0.05$ *Lactobacillus* visita 0 vs. 2.

La siguiente tabla ejemplifica el patrón de la microflora intestinal en los pacientes sin ascitis, siendo los resultados expresados en logaritmo.

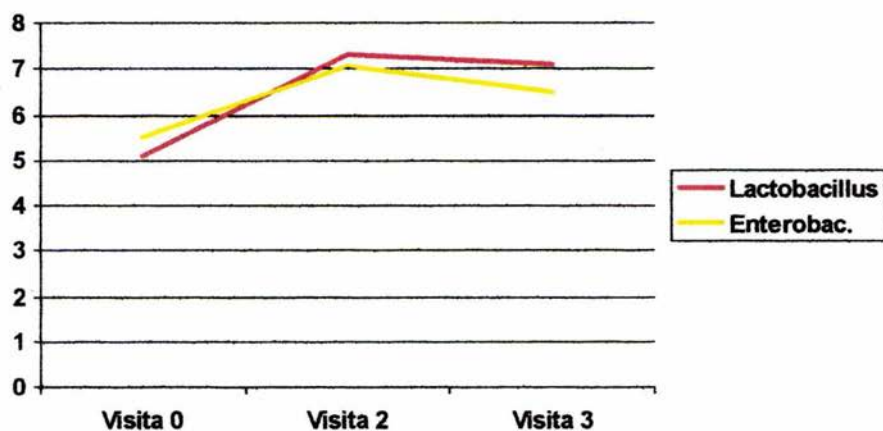


A continuación se muestra la tabla y el gráfico del grupo con ascitis.

Tabla 5 B.- Microflora intestinal (grupo con ascitis).

Ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
<i>Lactobacillus</i>	5.1	7.34	7.10
Enterobacterias	5.51	7.07	6.51
Dieta real	87%	88%	71%

$p < 0.05$ *Lactobacillus* visita 0 vs. 2 y 0 vs. 3. Enterobacterias Visita 0 vs.2 y 0 vs. 3.



Si bien el patrón en los pacientes con ascitis difiere al observado en los sin ascitis y grupo total, las cuentas finales de *Lactobacillus* muestran un ascenso constante durante el período de experimentación, con mantenimiento de dichas cifras en el período de

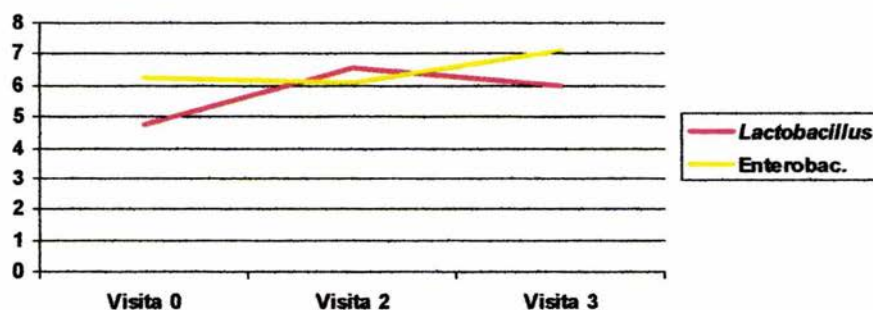
seguimiento, contrastado con el descenso en este período de las cuentas de enterobacterias a niveles por debajo de los *Lactobacillus*.

Tabla 5 C.- Microflora intestinal (grupo total).

Total	Visita 0	Visita 2	Visita 3
<i>Lactobacillus</i>	4.76	6.56	5.99
Enterobacterias	6.25	6.10	7.11
Dieta real	77.5%	75%	75%

$p < 0.05$ *Lactobacillus* visita 0 vs. 2.

La evolución de la microflora intestinal en el grupo total se gráfica a continuación:



Cuando se juntan ambos grupos se establece que durante la administración del *Lactobacillus* se logra colonización del mismo, con descenso gradual de las

enterobacterias, situación que se revierte al término de la maniobra experimental. Viendo un descenso de los *Lactobacillus*, con valores finales por arriba del inicial, y un ascenso incluso por arriba del basal de las enterobacterias.

Al evaluar mediante rangos la proporción de *Lactobacillus* y enterobacterias (L/E) se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 5 D.- Relación de colonización intestinal L/E (grupo sin ascitis).

Sin ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Lacto. / Entero.	.533	.727	.792

En este grupo se logra evidenciar una colonización a cargo de los *Lactobacillus* con predominio sobre las enterobacterias, situación demostrada por el aumento en el rango alcanzando una $p < 0.05$ (Visita 0 vs. 2, y 0 vs. 3).

Lo importante en la gráfica es la colonización aparentemente mantenida durante el período de seguimiento (visita 3).

Tabla 5 E.- Relación de colonización intestinal L/E (grupo con ascitis).

Ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Lacto. / Entero.	.906	1.038	.990

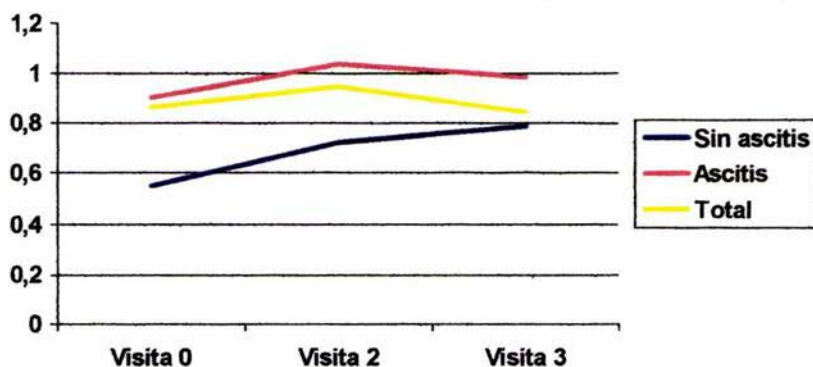
En el grupo con ascitis también se logra una colonización durante el periodo experimental, con descenso posterior una vez que se suspende la maniobra, pero manteniendo rango de *Lactobacillus* / enterobacterias superior al basal al termino de la visita de seguimiento.

Tabla 5 F.- Relación de colonización intestinal L/E (grupo total).

Total	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Lacto. / Entero.	.864	.952	.846

De igual manera que al comparar el grupo sin ascitis se logra durante en el período de la maniobra experimental una colonización superior de *Lactobacillus* sobre enterobacterias, situación que disminuye durante la fase de seguimiento.

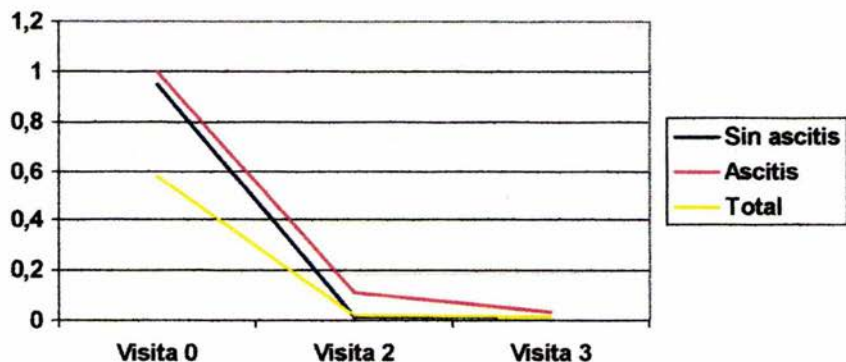
La siguiente gráfica muestra los 3 grupos en relación al rango L/E:



f.- Permeabilidad intestinal:

La permeabilidad intestinal se vio modificada en ambos grupos: en el sin ascitis cifras iniciales de índice lactulosa/manitol de 0.23 (visita 0) descendieron a 0.015 y 0.015 en las visitas 2 y 3 respectivamente. En cuanto al grupo con ascitis en la visita 0 los valores fueron 0.36, con valores posteriores de 0.108 y 0.035 en las visitas 2 y 3 respectivamente. Por último en lo referente al grupo total valores reportados como mediana de 0.24 a la visita 0, descienden a 0.017 y 0.015 en las visitas 2 y 3. Los valores normales de permeabilidad se reportan en 0.016, producto del porcentaje recobrado en orina de lactulosa/manitol.

La siguiente gráfica muestra los valores de los 3 grupos con referencia a la permeabilidad intestinal:



Sin ascitis: Visita 0 vs. 2: $p < 0.05$, Ascitis: Visita 0 vs. 2: $p < 0.005$, Total: Visita 0 vs. 2: $p < 0.0005$

h.- Secreción de citocinas en células mononucleares plasmáticas:

En el grupo sin ascitis la IL-1 mostró valores iniciales de 241.8 pg/mL (35.5 – 502.1 pg/mL), que descienden a 359.64 (39.2 – 2013.6 pg/mL) al término de la visita 2, y descenso posterior a 94.01 (32.9 – 501.3 pg/mL) al final del seguimiento.

La IL-6 con valores iniciales de 3763.5 pg/mL (592.7 – 5498.8), a 4072.5 (135.3 – 6003.6 pg/mL), y descenso final en 1741.5 (45.6 – 4494 pg/mL) al término de la visita 3.

La IL-10 basalmente presentó valores de 76.9 pg/mL (6.4 – 584.7), a 41.3 al término del período experimental (0 – 497.2), y terminar en 0 pg/mL en la visita 3 (0 – 13 pg/mL).

El FNT α con valores iniciales de 470.45pg/mL (109 – 4096.2), aumentó a 516.6 pg/mL (43.2 – 1639.2), con descenso posterior al término de la visita 3 a 88.91 pg/mL (57.7 – 1713.7) Por último el IFN γ no alcanzó valores de mediana en ninguna visita con valores de (0 – 95.1 pg/mL) en la visita 0, (0 – 172.2) en visita 2, y (0 – 0 pg/mL) al final del periodo de seguimiento.

Tabla 6 A.- Secreción de citocinas (grupo sin ascitis).

Sin ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
IL-1 *	241.8	359.64	94.01
IL-6 **	3763.5	4072.5	1741.5
FNT alpha ***	470.45	516.55	88.91
INF gamma	0	0	0
IL-10 ****	76.89	41.3	0

*, **, ***, **** Visita 0 vs. 3: p = 0.004.

Con respecto al grupo con ascitis los resultados son los siguientes:

La IL-1 mostró valores basales de 39.9 pg/mL (35.4 – 1236.3), de 58.7 pg/mL (6.3 – 151.8) al final de la visita 2, y de 19.1 pg/mL (0 – 127.5) al término del periodo de

seguimiento. La IL-6 por su parte valores basales de 1751.4 pg/mL (762.7 – 9913.4), que descienden a 1421.6 (157.9 – 4061.9 pg/mL) a la visita 2, y de 595 pg/mL (473.8 – 2825) al término de la visita 3. El FNT α con valores basales de 98.59 pg/mL (31.7 – 7628.7), que descienden a 67.43 (35 – 703.3) al final de la visita 2, y a 25.68 pg/mL (0 – 513.4) al término del período de seguimiento. La IL-10 con valores iniciales de 5.36 pg/mL (0 – 915.9), que descienden a 0 pg/mL (0 – 13) y 0 pg/mL (0 – 2.9) al final de las visitas 2 y 3. Por último el IFN γ con valores iniciales de 0 pg/mL (0 – 297.5), que se mantienen en 0 pg/mL (0 – 4.5) y 0 pg/mL (0-0) durante las visitas experimentales y de seguimiento.

Tabla 6 B.- Secreción de citocinas (grupo con ascitis).

Ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
IL-1	39.90	58.71	19.11
IL-6 *	1751.43	1421.63	595
FNT alpha **	98.59	67.43	25.68
IFN gamma	0	0	0
IL-10	5.36	0	0

*, ** Visita 0 vs. 3: $p = 0.05$

Por último en el grupo total los valores iniciales de IL-1 fueron de 220.6 pg/mL (35.5 – 1236.3), que descienden 148.3 pg/mL (6.3 – 2013.6 pg/mL), y a 45.9 pg/mL (0 – 501.3

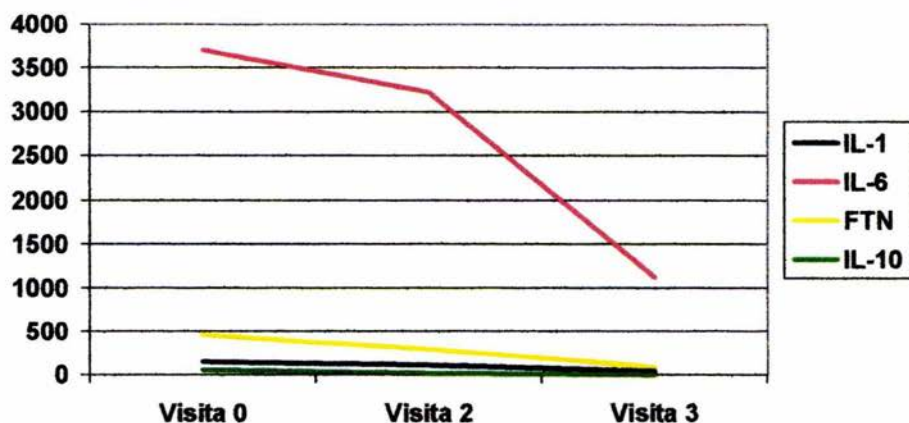
pg/mL) al término de las visitas 2 y 3. La IL-6 mostró una disminución de 3704.2 pg/mL (592.7 – 9913.4) a 3220.7 pg/mL (135.3 – 6003.6), y 1552.4 pg/mL (45.6 – 4494) en los periodos correspondientes. La IL-10 con valores basales de 54.7 pg/mL (0 – 916) que descienden a 14.6 pg/mL (0 – 497.2), y a 0 pg/mL (0 – 154.5) al término de las visitas 2 y 3. El FNT α con valores iniciales de 462 pg/mL (31.7 – 7628.3), que descienden a 301.4 pg/mL (35 – 1639.2) y a 85 pg/mL (0 – 1713.7) en las visitas subsecuentes. Por último el IFN γ con niveles de 0 pg/mL en la visita inicial (0 – 297.5) que se mantienen en las visitas 2 (0 – 172.2) y 3 (0 – 0).

Tabla 6 C.- Secreción de citocinas (grupo total).

Grupo Total	Visita 0	Visita 2	Visita 3
IL-1 *	220.6	148.3	45.9
IL-6 **	3704.2	3220.7	1552.4
IL-10 ***	54.7	14.6	0
FNT α ****	462	301.4	85
IFN γ	0	0	0

p significativa comparando visita 0 vs. 3 : * p = 0.009, ** p = 0.02, *** p = 0.008, **** p = 0.01.

En la siguiente gráfica se muestra el patrón de interleucinas en el grupo total.



i.- Secreción de citocinas en ascitis:

IL-1 valores iniciales de 1.2 pg/mL (0 – 11.6) en la visita 0 y de 1.8 pg/mL (0 – 6.6) al final de la visita 2 ($p= 0.84$). La IL-6 con valor inicial de 3813 pg/mL (337.8 – 9623.6) que desciende a 3373.7 pg/mL (781.2 – 9850.7) ($p= 0.14$). La IL-10 mostró 194.8 pg/mL en la visita inicial y ascenso posterior a 208.2 pg/mL (0 – 293.9) al término de la visita 2 ($p= 0.09$). Los valores de FNT α de 0 pg/mL (0 – 20.5) y de 0 pg/mL (0 – 8.2) en las visitas correspondientes ($p= 0.31$). Y por último el IFN γ con valores en la visita 0 de 0 pg/mL (0 – 1.3) que se mantienen en 0 pg/mL (0 – 2) ($p= 0.16$).

Tabla 7 A.- Secreción de citocinas en líquido de ascitis:

Grupo Total	Visita 0	Visita 2
IL-1	1.2	1.8
IL-6	3813	3373.7
FNT α	0	0
IL-10	194.8	208.2
IFN γ	0	0

j.- Correlación entre endotoxemia y citocinas en células mononucleares:

Utilizando en índice de correlación de Spearman obtenemos los siguientes resultados:

Se observó correlación entre citocinas, no así entre citocinas y endotoxinas.

Tabla 8 A.- Correlación entre endotoxinas y citocinas Visita 0:

Visita 0	Endotoxinas	IL-1	IL-10	IL-6	FNT α
Endotoxina	1.0				
IL-1	-0.046	1.0			
IL-10	-0.007	0.875*	1.0		
IL-6	0.084	0.809*	0.904*	1.0	
FNT α	0.161	0.893*	0.907*	0.874*	1.0

* Correlación significativa de 0.01 a dos colas.

Tabla 8 B.- Correlación entre endotoxinas y citocinas; Visita 2:

Visita 2	Endotoxinas	IL-1	IL-10	IL-6	FNT α
Endotoxinas	1.0				
IL-1	0.371	1.0			
IL-10	0.182	0.944	1.0		
IL-6	0.413	0.692	0.538	1.0	
FNT α	0.524	0.804	0.678	0.902	1.0

* Correlación significativa a dos colas ($p < 0.05$)

k.- Expresión de citocinas:

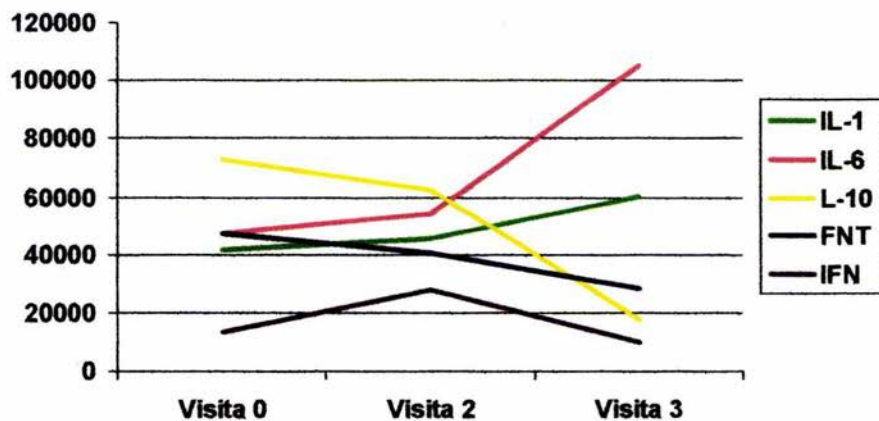
Los valores obtenidos en la expresión de citocinas tanto en el grupo con ascitis, sin ascitis

y total son los siguientes expresados a manera de medianas (moléculas $\times 10^5$).

Tabla 9 A.- Expresión de citocinas (grupo sin ascitis):

Sin ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Interleucina 1	41713	45139.2	60282
Interleucina 6	47251.4	64243.1	104906.5
Interleucina 10	72819.5	62602.9	17749.8
FNT alpha	47122.2	40645.8	28027.1
Interferon gamma	13527.8	27457.8	9878.4

A continuación se gráfica la expresión de citocinas en el grupo sin ascitis:



Al comparar en el grupo sin ascitis la expresión y secreción obtenemos los siguientes resultados:

Tabla 9 B.- Comparación de expresión y secreción de citocinas (sin ascitis):

Sin ascitis	IL-1 Visita 0	IL-1 Visita 2	IL-1 Visita 3
Secreción	241.8	359.64	94.1
Expresión	41713	45139.2	60282

Sin ascitis	IL-6 Visita 0	IL-6 Visita 2	IL-6 Visita 3
Secreción	3763.5	4072.5	1741.5
Expresión	47251.4	64243.1	104906.5

Sin ascitis	FNT Visita 0	FNT Visita 2	FNT Visita 3
Secreción	470.45	516.55	88.91
Expresión	47122.2	40645.8	28027.1

Sin ascitis	IL-10 Visita 0	IL-10 Visita 2	IL-10 Visita 3
Secreción	76.8	41.3	0
Expresión	72819.5	62802.9	17749.8

Sin ascitis	IFN Visita 0	IFN Visita 2	IFN Visita 3
Secreción	0	0	0
Expresión	13527.8	27457.8	9878.4

En ninguno los casos sin ascitis se guarda una correlación lineal de la secreción con la expresión tanto de citocinas inflamatorias, guardando solo relación con las anti-inflamatorias.

A continuación se muestra las expresiones totales de los sujetos con ascitis, resultados expresados a manera de medianas (moléculas $\times 10^5$).

Tabla 9 C.- Expresión de citocinas (grupo con ascitis):

Con ascitis	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Interleucina 1	327508.8	141768.6	278514.2
Interleucina 6	94518.9	52708.8	128135.9
Interleucina 10	63619.6	98925.6	58671.1
FNT alpha	119408.1	60667.1	229170
Interferon gamma	45161.6	2815.3	26178

Cuando se compara la secreción y expresión en este grupo de pacientes obtenemos los siguientes resultados:

Tabla 9 D.- Comparación de expresión y secreción de citocinas (grupo con ascitis):

Ascitis	IL-1 Visita 0	IL-1 Visita 2	IL-1 Visita 3
Secreción	39.9	58.71	19.11
Expresión	327508.8	141768.6	278514.2

Ascitis	IL-6 Visita 0	IL-6 Visita 2	IL-6 Visita 3
Secreción	1751.43	1421.63	595
Expresión	94518.9	52708.8	128135.9

Ascitis	FNT Visita 0	FNT Visita 2	FNT Visita 3
Secreción	98.59	67.43	25.68
Expresión	119408.1	60667.1	229170

Ascitis	IL-10 Visita 0	IL-10 Visita 2	IL-10 Visita3
Secreción	5.36	0	0
Expresión	63619.6	98925.6	58671.1

Ascitis	IFN Visita 0	IFN Visita 2	IFN Visita 3
Secreción	0	91.89	0
Expresión	45161.6	2815.3	26178

De igual modo que en el grupo sin ascitis no hay una correlación lineal entre la secreción y expresión de citocinas tanto inflamatorias como anti-inflamatorias, pero es evidente que el IFN gamma se expresa, contrario a la pobre secreción. Pero cabe hacer mención que al termino de la administración del probiótico la expresión de todas la citocinas inflamatorias ha disminuido, con un aumento de la anti-inflamatoria.

Tabla 9 E.- Expresión de citocinas (grupo total) :

Total	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Interleucina 1	175237.5	74634.3	67030.2
Interleucina 6	52536.1	58475.9	119395.9
Interleucina 10	68219.5	66551.5	37321.4
FNT alpha	91046.1	50656.4	79258.2
Interferon gamma	13609.2	7330.7	17824.9

Al comparar los grupos totales en secreción y expresión obtenemos los siguientes resultados:

Tabla 9 F.- Comparación de expresión y secreción (grupo total):

Total	IL-1 Visita 0	IL-1 Visita 2	IL-1 Visita 3
Secreción	199.37	58.71	19.11
Expresión	175237.5	74634.3	67030.4

Total	IL-6 Visita 0	IL-6 Visita 2	IL-6 Visita 3
Secreción	3763.5	3211	1190
Expresión	52536.1	58475.9	119395.9

Total	FNT Visita 0	FNT Visita 2	FNT Visita 3
Secreción	500	221	258
Expresión	91046.1	50656.4	79258.2

Total	IL-10 Visita 0	IL-10 Visita 2	IL-10 Visita 3
Secreción	76	0	0
Expresión	68219.5	66551.5	37321.4

Total	INF Visita 0	IFN Visita 2	IFN Visita 3
Secreción	0	0	0
Expresión	13609.2	7330.7	17824.9

Al comparar el grupo total hay una correlación lineal de citocinas tanto inflamatorias como anti-inflamatorias, salvedad de la IL-6 que muestra un ascenso constante en la expresión vs. descenso en la secreción.

I.- Endotoxemia:

La endotoxemia circulante en el grupo total mostró una disminución con la administración de *Lactobacillus casei* cepa Shirota de 10.15 pg/mL (1.4 – 25.9 pg / mL) a 7.96 pg /mL al final del período experimental (1.3 – 14.4 pg/mL) (p= 0.4802), con niveles de 8.81 al final de la visita de seguimiento (1.2 – 15.1 pg/mL) (p= 0.3882).

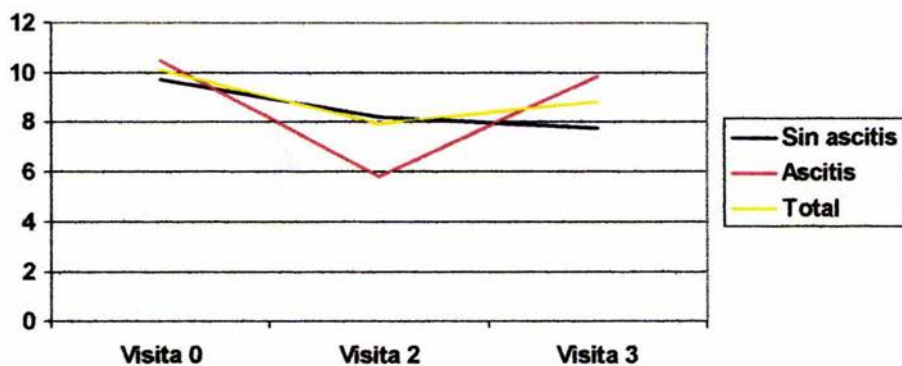
En lo referente al grupo sin ascitis los valores iniciales en sangre periférica de endotoxinas fueron 9.77 pg/mL (5.4 – 25.9 pg/mL), para valores al final de la visita 2 de 8.20 (3.0 – 14.4 pg/mL), y de 7.74 al final de la visita 3 (4.2 – 12.8 pg/mL).

Por último el grupo con ascitis mostró valores iniciales de 10.15 pg/mL (1.4 – 20.3 pg/mL), que descienden a 5.81 (1.3 – 11.3 pg/mL) al término de la administración de *Lactobacillus*, con ascenso posterior a 9.89 (1.2 – 15.1 pg/mL) al término de la visita de seguimiento.

Tabla 10 A.- Valores de endotoxemia en los 3 grupos:

	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Sin ascitis	9.77	8.20	7.74
Ascitis	10.53	5.81	9.89
Total	10.15	7.96	8.81

A continuación se grafican los datos obtenidos en este grupo:



La medición de endotoxinas en el líquido de ascitis mostró valores iniciales a la visita 0 de 14.9 pg/mL (0.5 – 31.2), que descienden a 8.7 pg/mL (1.3 – 11.3) ($p=0.0679$).

m.- Oxido Nítrico:

El óxido nítrico mostró descenso marginal en los tres grupos al final del período de seguimiento con respecto a la visita 0, con la característica de un ascenso durante el período experimental.

Tabla 11 A.- Valores promedio de óxido nítrico en los 3 grupos:

	Visita 0	Visita 2	Visita 3
Sin ascitis	34.77	53.57	33.61
Ascitis	50.24	57.94	49
Total	39.84	55.75	37.87

n.- Citoquímico y óxido nítrico en líquido de ascitis:

En lo referente al análisis del líquido de ascitis el patrón citoquímico no mostró cambios importantes en lo referente a la suma total de leucocitos, polimorfonucleares, DHL, y microproteínas.

En lo referente al óxido nítrico valores iniciales de 51.3 con ascenso posterior al término del periodo experimental de 57.1

DISCUSIÓN:

La cirrosis hepática con hipertensión portal se asocia con circulación hiperdinámica caracterizada por vasodilatación (VD) generalizada e incremento en el gasto cardíaco y flujo sanguíneo regional; la VD causa hipotensión arterial, hipovolemia relativa con activación del sistema nervioso simpático, sistema renina-angiotensina-aldosterona, y secreción no osmótica de arginina-vasopresina (34). Entre los mediadores de la circulación hiperdinámica el óxido nítrico (ON) ha sido propuesto como el principal, involucrado en el control del tono vascular, es sintetizado por diferentes células en 3 isoformas de la sintetasa de ON, 2 constitutivas y una inducible; la forma inducible produce ON en endotelio y músculo liso, así como en hepatocitos y macrófagos en respuesta a diferentes estímulos como son los lipopolisacáridos bacterianos y varias citocinas (35), sin excluir la producción incrementada por el daño oxidativo secundario al compromiso de la pared intestinal, lo cual incrementa la actividad simpática y producción de ON subsecuente.

Se ha postulado también que el sobrecrecimiento bacteriano altera la permeabilidad intestinal, y que la translocación bacteriana común en todo paciente cirrótico y más evidente en aquellos con ascitis condiciona un estímulo continuo sobre el sistema inmune

(15). Esta acción lleva a la presencia de endotoxemia circulante la cual vía torrente portal activa las células de Kupffer, que a su vez estimulan la producción de monocitos, linfocitos y citocinas pro-inflamatorias que exacerbaban la progresión del compromiso hemodinámico en el paciente cirrótico, condicionan progresión de la fibrosis, y lo hacen más propenso a procesos infecciosos (36).

Por su acción inmunomoduladora y por el reforzamiento de la barrera mucosa intestinal (24), los probióticos pueden ser una medida profiláctica excelente para pacientes cirróticos, ya que ejercen su efecto a través de lograr el balance entre citocinas anti-inflamatorias e inflamatorias. En animales experimentales, la administración de *Lactobacillos* evita la translocación de enterobacterias y anaerobios en el ciego e ileon terminal, mientras que en los cirróticos esta disminución en la translocación parece ocurrir a nivel de la pared intestinal (25-26), así mismo la administración de *Lactobacillos* reduce significativamente los niveles de endotoxinas y la hepatopatía inducida por alcohol (27), y previene el daño hepático inducido por translocación bacteriana y D-galactosamina (14). En los pacientes no alcohólicos los resultados son contradictorios, y la mayoría de estudios son en modelos experimentales de cirrosis (37).

De las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus casei* se encuentra en el intestino, y es capaz de sobrevivir durante el paso al tracto gastrointestinal, ya que es tolerante al efecto del jugo gástrico y sales biliares, es capaz de estimular la producción de IgA, la proliferación células plasmáticas y de linfocitos T, con lo cual se asegura colonización hasta intestino grueso.

Un objetivo del estudio fue el lograr colonización con *Lactobacillus casei* y modificaciones a nivel de la microflora intestinal, conociendo que la microflora intestinal gradualmente aumenta a través del tracto gastrointestinal, siendo un contenido aproximado de 10^5 a nivel de ileon, y de 10^{12} a nivel de colon, donde se ha llegado a estimar que existen al menos 500 especies diferentes de microbacterias, siendo la dieta el mayor contribuyente en esta composición.

Se administró 28 días el probiótico, tiempo suficiente para evidenciar cambios a nivel de inmunomodulación, y sustentado en información que reporta incremento en la cuenta de *Lactobacillus* en un 21% a los 3 días de iniciada la toma, y de 53.8% a los 7 días, con porcentajes incrementados en cuentas de *Lactobacillus* en 52.5% y 32.2% a los 3 y 6 días de suspender el mismo, y disminución secundaria en las bacterias Gram negativas de 43.1 % antes de la administración del probiótico a 29.4 y 14.7% a los 3 y 7 días de su toma (38), permaneciendo este último grupo bajo en su número de cuentas una vez que se suspende la administración de *Lactobacillus*.

Los resultados obtenidos son acorde a lo publicado, en los tres grupos de estudio se logró colonización con *Lactobacillus* siendo mas evidente en el grupo con ascitis con un incremento logarítmico de 2.2, y con cuentas que disminuyen al término de la visita de seguimiento pero que mantienen sus valores por arriba del basal. En lo referente a las Enterobacterias el descenso es evidente en el grupo sin ascitis, con un aumento posterior

al término de la administración del probiótico, cambios semejantes se ven en el grupo total, no así en los pacientes con ascitis donde en ascenso de las Enterobacterias es gradual durante el período experimental, para posteriormente descender al término del seguimiento, ante tal situación la comparación de rangos *Lactobacillus* / Enterobacterias es de utilidad encontrando colonización y efecto positivo en los 3 grupos, y rangos superiores al basal al término del seguimiento, situación que hace evidente que a 14 días de terminada la administración del probiótico el efecto positivo sobre la microflora intestinal aún es evidente. Durante todo el período del estudio los pacientes presentaron porcentajes de apego a la dieta superiores al 75%, situación que excluye una colonización secundaria por productos lácteos contenidos en la dieta del paciente.

Por su parte la permeabilidad intestinal incrementada ha sido confirmada en múltiples estudios (39-40), siendo también entidades conocidas el edema de la pared intestinal secundario a la hipertensión portal, la hipoalbuminemia y malnutrición situaciones que favorecen esta el aumento (41). Esta alteración en la barrera intestinal lleva a que microorganismos entéricos producto de la translocación bacteriana en los ganglios linfáticos mesentéricos (40% de casos de cirrosis con ascitis y 80% de casos de PBE) lleguen a las células de Kupffer (CK) que son los macrófagos residentes en el hígado y se localizan principalmente en las regiones periportales. En condiciones normales son capaces de detoxificar pequeñas cantidades de endotoxinas derivadas del intestino, mediante la producción de PGE₂ lo que previene a nivel del microambiente hepático la producción excesiva de FNT α (42-43). Pero ante una depuración alterada a las sustancias tóxicas mas evidente conforme avanza la hepatopatía secreten mediadores

químicos y citocinas como prostaglandinas, leucotrienos, FNT, e interleucinas, exacerbando la progresión de la fibrosis, presencia de PBE, y encefalopatía hepática entre otras entidades (44).

Ante esto la administración de *Lactobacillus casei* disminuyó en los 3 grupos los porcentajes de permeabilidad intestinal, elevados todos a la visita basal; 0.23 en el grupo sin ascitis, 0.36 en el grupo con ascitis, y 0.24 en el grupo total (valores normales 0.016), porcentajes que de entrada apoyan la hipótesis de mayor compromiso en el grupo de pacientes con ascitis, situación muy probablemente mediada por óxido nítrico a través de su forma endotelial. Al término de la maniobra experimental el grupo sin ascitis normaliza el porcentaje de permeabilidad, el grupo total muestra una franca tendencia hacia la normalización, y el grupo con ascitis disminuye en más del 50% la misma, pero los resultados más importantes se observan posterior a los 15 días de haber suspendido la maniobra donde los valores en el grupo sin ascitis se mantienen dentro de la normalidad, el grupo total la alcanza, y el grupo con ascitis disminuye nuevamente en más del 50% con respecto a su valor previo los valores de permeabilidad y muestra una tendencia hacia la normalidad. Estos hallazgos apoyan no solo el hecho de un efecto persistente de los *Lactobacillus*, lo cual a 14 días de haber suspendido la maniobra no se puede sustentar del todo, ya que los microorganismos viables colonizantes deben en estos momentos ser alrededor de un 25%, pero sí mostrando gran acción inmunomoduladora a nivel de citocinas pro-inflamatorias, y probablemente a nivel de ON disminuyendo el insulto permanente en la mucosa, y estabilizando la microflora intestinal.

Es bien conocido que los pacientes con cirrosis tienen niveles elevados de endotoxinas en plasma, situación relacionada con la translocación bacteriana y el paso de productos bacterianos desde el lumen intestinal a sitios extraintestinales, ante lo cual la endotoxemia interviene en la patogénesis de las infecciones bacterianas y condiciona la formación de ascitis (45).

La endotoxemia es fluctuante y no necesariamente corresponde con los niveles de citocinas inflamatorias (46), teniendo comportamiento diferente en los estados agudos y crónicos. La estimulación aguda de los lipopolisacáridos bacterianos condiciona su unión a las CK mediante un receptor específico (LBP), estimulando a los macrófagos hepáticos a unir dicho complejo a el receptor CD14 localizado en las mismas CK, siendo este una glicoproteína de membrana de 55 kD expresada también por monocitos y macrófagos (47). La activación de este complejo provoca la translocación del factor nuclear kB del núcleo seguido de la activación de citocinas inflamatorias, prostanoides, y otros mediadores solubles (48). La endotoxemia aguda incrementa marcadamente la expresión de LBP y el RNAm de CD14, incremento no visto después de la estimulación crónica de las endotoxinas (49)

La incidencia estimada de endotoxemia portal oscila entre un 0 y 96% (50), en sangre periférica entre un 0 y 59% (51), y en aquellos sin enfermedad hepática entre 0 y 79% (52), con las concentraciones mayores en la circulación portal, y relacionando los niveles

periféricos con el estadio Child-Pugh, creatinina sérica, depuración de creatinina, y ascitis detectable (53).

En la patogénesis de la encefalopatía hepática (EH) el amonio tiene un rol principal. La hiperamonemia no depende de una producción solamente de las bacterias intestinales a través de la ureasa bacteriana, ya que también tejidos como el muscular y renal son fuentes esenciales de su producción. El amonio portal derivado de la actividad de la ureasa bacteriana y de la deamidación por la glutamina a nivel del intestino delgado son el sustrato para la síntesis de la urea en el hígado. En la enfermedad aguda y crónica, un incremento en los niveles arteriales de amonio es evidente, pero no existe una correlación lineal entre los niveles sanguíneos y el estado mental del paciente cirrótico (54), estableciendo estudios recientes el corregir el valor del amonio al pH sanguíneo para tener una relación más exacta (55).

En nuestro estudio son evidentes cifras normales de amonio durante todo el tiempo ($\text{NI} < 60 \text{ meq/mL}$). Si bien el grupo sin ascitis durante la aplicación del probiótico mostró un descenso de casi 50% no se ve manifestado en la exploración física del paciente, pero si en la calidad de vida expresada por la aplicación de la prueba de conexión numérica en la cual hay mejoría substancial, situación extrapolada a los tres grupos, y que hablan de pacientes con encefalopatía subclínica en los cuales maniobras preventivas pueden evitar

la progresión a encefalopatía clínicamente evidente. Es bien sabido que la neurotoxicidad del amonio es diferente en la hiperamonemia aguda y crónica, con afección fundamental a nivel del astrocito, lugar en el cual existe la detoxificación continua de la hiperamonemia mediante el intercambio con glutamina, situación que involucra la acción de osmolitos cerebrales como mio-inositol, colina y taurina para evitar el desbalance osmótico a nivel celular, situación que en estudios futuros puede ser confirmada mediante la realización de pruebas neuropsicológicas y estudios de resonancia magnética con espectrometría para confirmar los cambios a nivel osmolitos (56)

La depuración de endotoxinas por los hepatocitos y su excreción a través de la bilis se ve más comprometida en los estadios avanzados de la cirrosis donde el compromiso de la hemodinámica esplácica y sistémica es mayor, por lo que la captación de endotoxinas por los macrófagos esplénicos y las células mononucleares está incrementada en los estadios iniciales de la cirrosis, situación aun compensada por las CK y el sistema retículo-endotelial, pero cuya depuración se encuentra comprometida en mayor proporción en estadios avanzados de la cirrosis, situación atribuida a el mayor número de corto-circuitos sistémicos, con mayor acción de los macrófagos extrahepáticos, lo que condiciona una secreción continua de FNT α y otras citocinas (54).

Los resultados obtenidos muestran un descenso en la endotoxemia de los 3 grupos con efecto superior al término de la administración del probiótico en el grupo con ascitis logrando una disminución con respecto a su valor basal de 45%, pero con ascenso

posterior al suspender el *Lactobacillus casei*, situación no evidente en el grupo total y sin ascitis, donde una vez terminada la administración de *Lactobacillus* el descenso es constante, pero es importante el evidenciar que pese a aumentar sus valores el grupo con ascitis al término de la visita de seguimiento no se alcanzan los valores basales. Estos hallazgos confirman la colonización bacteriana lograda por los *Lactobacillus* en los tres grupos, y a la vez demuestra lo ya reportado en la literatura, una mayor endotoxemia y permeabilidad intestinal en los pacientes con ascitis, lo que explica el descenso mayor en este grupo al provocar modificación en las citocinas pro-inflamatorias e inflamatorias, así como modificaciones indirectas en la síntesis de ON, secundarias a la activación del sistema monocito/macrófago, el cual incrementa la depuración de las endotoxinas.

Las citocinas se encuentran sistémicamente elevadas en el paciente con daño hepatocelular crónico, su producción puede ser intermitente, induciendo la mayoría síntesis de proteínas a través de activación de receptores y señales de transducción (55), siendo procesos que persisten por horas después de su activación.

Por su parte las citocinas y la endotoxemia se encuentran involucradas en la producción de ON, siendo la citocina primordial el FNT α . Así mismo la endotoxemia es capaz de producir IL-10 en monocitos, citocina que ha demostrado reducir el LPS inducido por la síntesis de FNT α , IL-1, IL-6 e IL-8, en un efecto contraregulador, y que por los resultados obtenidos en nuestro estudio para ser el rol que juega esta interleucina.

La IL-6 por su parte es responsable de la producción de reactantes de fase aguda en el hepatocito, es sintetizada por una variedad de células, incluyendo linfocitos, monocito-macrófago, queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos (56). Es directamente estimulada por endotoxinas, pero el FNT α es el principal inductor de su síntesis, situación nuevamente evidenciada en los 3 grupos de estudio el tener una correlación lineal (57). La IL-6 no es un inductor de la SONi, sus concentraciones se correlacionan con las resistencias vasculares sistémicas sugiriendo su rol en la vasodilatación, y potenciando su efecto el FNT α . La elevación de la IL-6 no es dependiente del grado de severidad hepática, pero se ha sugerido su rol patogénico en la encefalopatía (58), y esto verse reflejado en las secreción a nivel del líquido de ascitis, sin lograr el efecto paralelo en el FNT α , pero si explicando el mayor compromiso hiperdinámico en este grupo de pacientes.

La respuesta inflamatoria a cargo de citocinas también se ha visto involucrada en el aumento de la permeabilidad intestinal, siendo principalmente el IFN γ en acción sinérgica con la IL-1 y el FNT α inductores directos de la expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible (SONi) a nivel de la monocapa enterocítica (59)

En nuestro estudio el IFN γ no se detectó niveles. Se ha publicado que la producción de IFN γ por células linfoides al contacto con BAL, es dependiente de la producción de citocinas pro-interferon producidas por células accesorias como los macrófagos. También

se ha propuesto que la integridad de la pared celular es un factor crítico en la determinación de la capacidad de inducción de interferón por BAL (60), situaciones que en este estudio se pudieron haber presentado a nivel local, a nivel del epitelio intestinal, lo cual provocó no traducción a nivel sistémico.

Lo interesante en este estudio con respecto a la administración del *Lactobacillus casei* es la disminución generalizada en citocinas pro y anti-inflamatorias, lo cual traduce su efecto inmunomodulador. Este efecto parece lograrse a través de 2 patrones. El primero de ellos se observa en sujetos con niveles basales bajos de endotoxinas (<10 pg/mL), donde la administración del probiótico induce producción de citocinas y su suspensión determina un decremento importante en los niveles por debajo del basal. Un segundo patrón se observa en sujetos con niveles basales de endotoxinas altos (> 10 pg/mL) donde la administración de *Lactobacillus* se acompaña de un decremento en la secreción de citocinas, mismo que se mantiene o tiende a suprimirse con la suspensión. Estos patrones de respuesta sugieren estados de inmunidad distintos. Estos cambios en la inmunidad pueden deberse a factores diversos como la tolerancia a los niveles crónicamente elevados de endotoxinas, a la progresión del daño hepático (61).

Por último a nivel de líquido de ascitis no hay reportes en humanos de la secreción de citocinas, se han reportado tanto aumento de citocinas inflamatorias como anti-inflamatorias a nivel de modelos experimentales (62). Nosotros observamos y hemos

comentado el predominio de la IL-6 en este grupo de pacientes lo cual explica el efecto vasodilatador predominante de citocina, situación quizá coadyuvada por el aumento marginal de ON al final de la administración del preparado de *Lactobacillus*, pero debiendo hacer mención en el efecto contra-regulador que intenta realizar la IL-10 durante este período de tiempo.

La expresión de citocinas a nivel del grupo sin ascitis no guarda relación alguna con los patrones de secreción salvedad de la IL-10, a nivel del grupo con ascitis el comportamiento parece ser en espejo, con disminución de todas las citocinas inflamatorias al término de la administración del probiótico, y con ascenso al término de la maniobra de la IL-10, mientras que en el grupo total todos los patrones correlacionan con descenso al final de la administración de *Lactobacillus*, y ascenso posterior en la IL-6, FNT α e IFN γ , con descenso de la IL-1 y la IL-10. Lo destacable de estos resultados es la inmunomodulación lograda por la administración de *Lactobacillus*, con efecto favorable en disminuir el proceso inflamatorio, y el confirmar la expresión de IFN γ . La no correlación en la mayoría de los casos con la secreción es un evento esperable, ya que el estímulo de excreción es controlado hasta cierto punto, no así la secreción que se ve modificada por un numerosos eventos traduccionales como muy probablemente lo es en este estudio.

Bajo condiciones fisiológicas y controladas las sintetetas de óxido nítrico generan ON. Tres isoformas son conocidas, la inducible, endotelial y neuronal. La isoforma inducible

es sintetizada de novo en los macrófagos, células de músculo liso vascular, hepatocitos, células estelares hepáticas, situación presente después de la inducción por lipopolisacáridos y citocinas inflamatorias. Su sobreexpresión sintetiza grandes cantidades de ON por periodos de tiempo prolongados, independientemente del estímulo hemodinámico o mecánico (63). La forma endotelial en contraste produce ON por periodos de tiempo cortos en respuesta a varios estimulantes endógenos y exógenos, incluyendo estímulo físico (64). Una cascada de eventos y vías de señalización regulan este proceso, con activación adicional de receptores dependientes de proteína G. Específicamente la producción de ON derivado de la sintetasa endotelial tiene su acción en los sinusoides hepáticos, situación requerida para mantener la microcirculación hepática (65). Por último la isoforma neuronal se expresa constitutivamente en el cerebro.

Por su lado los niveles de ON elevados en el cirrótico también pueden elevarse por ingesta dietética, síntesis endógena e insuficiente eliminación renal (66). El ON generado en el cirrótico parece ser producido a través de la expresión de la sintetasa endotelial de ON o por un incremento en su actividad, siendo una tendencia lineal conforme avanza la hepatopatía, lo cual puede ser condicionante en la formación de ascitis, y esto ser secundario a los niveles de LPS bacteriano y citocinas inflamatorias producidas por los macrófagos peritoneales es mayor proporción en los pacientes con ascitis, y cifras aun mas elevadas se ven en los pacientes infectados, lo cual favorece la translocación bacteriana y recurrencia de PBE en estos pacientes, donde la acción de la sintetasa de óxido nítrico inducible también puede estar involucrada (67).

Los resultados obtenidos en el estudio son difíciles de interpretar, ya que contamos con valores de ON totales, no identificamos isoformas situación que hubiera dado sustento a nuestras hipótesis, ante esto es evidente un descenso marginal al final del periodo de seguimiento en los 3 grupos con un aumento intermedio al final de la administración del *Lactobacillus*, situación evidente también en la determinación de ON directamente del líquido de ascitis. El efecto de estas modificaciones sobre el grupo tratado es aventurado establecerlo, ya que si hablamos de un aumento de los niveles de ON durante la maniobra experimental, el determinar si este aumento es benéfico a nivel de la microcirculación hepática situación mediada por una expresión mayor de la isoforma endotelial, y una disminución en los parámetros de estrés oxidativo sería factible, o si esto aumento el patrón hemodinámico en los pacientes y empeoró la vasodilatación esplácnica situación imposible de saber al no contar con estudios hemodinámicos es precisamente una limitante del estudio.

En el contexto de ser pacientes donde se excluyó procesos infecciosos, la dieta fue controlada, y no hubo estímulos externos para una mayor producción de ON extrahepática los valores elevados de ON al término de la maniobra experimental bien pueden representar sucesos a nivel de la microcirculación hepática, con la repercusión positiva en el paciente, apoyada por el descenso al término del estudio de las citocinas inflamatorias y antiinflamatorias.

La calidad de vida se ve ampliamente beneficiada. Se sabe que las enfermedades hepáticas crónicas reducen la calidad de vida en los pacientes a situaciones comparables con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la insuficiencia cardiaca (68). También es sabido que dentro de los pacientes con hepatopatía crónica aquellos con daño colestásico tienen mayor compromiso con su calidad de vida. En nuestro estudio la aplicación de un cuestionario validado para establecer percepción de mejoría física, laboral, y personal mostró elevaciones consistentes con todos los pacientes con porcentajes superiores en promedio al 20% con respecto al basal, situación de gran importancia, ya que estos hallazgos se sitúan por arriba de los encontrados en pacientes con reumáticos, neumópatas y cardiópatas.

Por último la administración del *Lactobacillus casei* no mostró efecto secundario alguno que suspendiera su uso, varios estudios en la literatura confirmar su seguridad, y los reportes aislados de endocarditis no corresponden a la administración de la cepa en cuestión, sino a los hábitos alimenticios del paciente en turno (69), siendo por lo tanto una seguridad total en su administración. Los efectos colaterales encontrados fueron mayormente distensión abdominal y meteorismo, parámetros que no contraindicaron el continuar con el estudio.

CONCLUSIONES

La administración de un preparado con *Lactobacillus casei* por 28 días en pacientes con daño hepatocelular estadio Child-Pugh B induce:

1.- Microflora intestinal:

1.1.- Cambios en la microflora intestinal tanto el grupo de cirróticos con ascitis, sin ascitis y grupo total, siendo evidente la colonización durante la maniobra experimental con *Lactobacillus* en los tres grupos, con un patrón de descenso en Enterobacterias y posterior ascenso al suspender la maniobra en el grupo total y sin ascitis, y con un ascenso inicial seguido de descenso en el grupo con ascitis.

1.2.- El rango de *Lactobacillus* / enterobacterias en los tres grupos muestra predominio y colonización de los probióticos.

1.3.- Durante la administración de la maniobra el apego a la dieta de los pacientes se mantuvo por arriba del 75% condición establecida para descartar modificaciones endógenas de la microflora intestinal.

2.- Permeabilidad intestinal:

2.1.- La permeabilidad intestinal se modifica en ambos grupos, siendo mayor la afección inicial en el grupo con ascitis, y con una mejoría tendiente a la normalidad, mientras que en el grupo con ascitis alcanza cifras normales.

2.2.- La permeabilidad en el grupo sin ascitis normaliza al final del período experimental, y se mantiene durante el seguimiento.

2.3.- En el grupo con ascitis los valores muestran un descenso constante, con tendencia a la normalidad.

2.4.- Por último el grupo total alcanza valores normales de permeabilidad al final del período de seguimiento.

3.- Endotoxemia:

3.1.- Descenso de la endotoxemia en los 3 grupos, a valores por debajo del basal al final de la visita de seguimiento (visita 3).

3.2- Dos patrones identificados: Descenso gradual al final del período experimental, con ascenso posterior sin alcanzar los valores basales en los grupos de ascitis y total.

3.3.- Descenso progresivo en el grupo sin ascitis hasta la visita 3 al final del período de seguimiento.

3.4.- En el líquido de ascitis de igual manera disminuyen las endotoxinas con respecto a la visita basal al término de la maniobra experimental.

4.- Amoníaco:

4.1.- Valores de amoníaco siempre dentro de la normalidad y sin modificaciones dietéticas que pudieran influir en sus valores, esto en base al porcentaje de apego real individual.

4.2.- El grupo sin ascitis muestra un descenso en los valores de amoníaco al final del período de experimentación (visita 2), con un aumento posterior importante al final de la visita de seguimiento.

4.3.- EL grupo con ascitis muestra un descenso inicial a la mitad del período experimental con aumento posterior gradual en las visitas 2 y 3.

4.4.- El grupo total evidencia un descenso en la primera parte del período experimental, con ascenso posterior al final de las visitas 2 y 3, pero sin alcanzar los valores basales.

5.- Expresión de citocinas:

5.1.- No se logra identificar patrón alguno que correlacione con citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias, y no hay correlación entre la expresión y la secreción, salvedad del grupo total al término de la maniobra experimental.

5.2.- En el grupo con ascitis es evidente un patrón de descenso con posterior ascenso de todas las citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, y FNT α), con un efecto contrario de la IL-10, por su parte el IFN γ parece conservar el patrón observado en las citocinas inflamatorias.

5.3.- Al comparar el grupo sin ascitis no se logra identificar algún patrón de ascenso o descenso, pero es evidente que dos de las tres citocinas inflamatorias medidas aumentan progresivamente (IL-1, IL-6), no así el FNT α , el cual al igual que la IL-10 muestra un descenso progresivo. En lo referente al IFN γ un aumento benéfico se logra evidenciar durante la maniobra, con descenso posterior al suspender la misma.

5.4.- En el grupo total las IL1 y 10 muestran un descenso constante, con valores finales por debajo del basal, por otro lado el FNT α y el IFN γ muestran un descenso inicial, con aumento posterior al terminar la maniobra experimental, y por último la IL-6 muestra un ascenso constante aun al término de la maniobra.

5.5.- La no correlación de la expresión con la secreción es esperable, ya la expresión es un estímulo constante, regulado, mientras que múltiples procesos traduccionales pueden ocurrir antes del momento de la secreción.

6.- Secreción de citocinas:

6.1.- Se logran identificar cambios semejantes en los tres grupos, siendo los resultados de todas las citocinas tanto inflamatorias como anti-inflamatorias menores al término de la visita de seguimiento (visita 3) con respecto a las basales (visita 0).

6.2.- Patrón de ascenso inicial con descenso posterior en el grupo sin ascitis.

6.3.- Patrón de descenso continuo desde el inicio del período experimental en el grupo con ascitis.

6.4.- Con respecto a la IL-10 conocida por su actividad anti-inflamatoria en ambos grupos al igual que el total muestra un descenso persistente desde la visita 0 de inicio al período experimental hasta el fin de la visita 3 o de seguimiento.

6.5.- El patrón observado en el grupo total es un descenso permanente tanto del grupo de citocinas inflamatorias como anti-inflamatorias, con valores al final de la visita de seguimiento por abajo del basal inicial.

6.6.- La secreción del FNT α y del IFN γ en el líquido de ascitis no es evidente, las citocinas inflamatorias IL-1 e IL-6 muestran descenso con respecto a sus valores basales al final de la visita 2, mientras que la IL-10 mantiene sus valores.

7.- Oxido nítrico:

7.1.- El óxido nítrico mostró un descenso marginal al final del período de seguimiento, pero con la característica en los 3 grupos de un aumento al final del período experimental (visita 2).

7.2.- A nivel de líquido de ascitis hay un aumento marginal al término de la visita 2.

8.- Calidad de vida (termómetro clínico y encefalopatía subclínica) :

8.1.- Mejoría en significativa tanto en el termómetro clínico como en la encefalopatía subclínica.

8.2.- La prueba de Conn con valores normales en los tres grupos muestra mejoría importante, siendo mas evidente en el grupo sin ascitis y en el total, situación evidente y permanente al término de la visita 3.

8.3.- El termómetro clínico muestra mejoría clínica importante en los 3 grupos de manera significativa, con percepción de la misma aún al final del periodo experimental.

8.- Efectos colaterales y tolerancia:

8.1.- Ningún paciente abandonó el estudio por efectos colaterales o intolerancia a la fórmula.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Portoles MT, Ainaga MJ, Pagani R. The induction of lipid peroxidation by *E. coli* lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1158:287-292.
- 2.- Simpson KJ, Lukas NW, Colletti L, et al. Cytokines and the liver. *J Hepatol* 1997; 26:1120- 1130.
- 3.- Garcia-Lafuente A, Antolín M, Crespo E, et al. Improvement of colonic barrier function by colonization with lactobacilli in the rat. *Gastroenterology* 1998; 114:A1096.
- 4.- Pérez-Páramo M, Muñoz J, Freile I, et al. Propranolol accelerates intestinal transit time and decreases bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1998; 28:510A.
- 5.- Casafont F, Sánchez E, Almohalla C, et al. Bacterial translocation in experimental cirrhosis. Role of intestinal bacterial overgrowth. *Hepatology* 1998; 28:666A.
- 6.- van Deventer SJH, Cate JW, Tytgat GNJ. Intestinal endotoxemia. Clinical significance. *Gastroenterology* 1988; 94: 825-831.
- 7.- Fukui H, Brauner B, Bode JC et al. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease. Reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol* 1991; 12: 162-9.
- 8.- Mela L, Miller LD, Diaco JF, et al. Effect of *E. coli* endotoxin on mitochondrial energy-linked functions. *Surgery* 1970; 68: 541-9.

- 9.- Blum HE, Bode CH, Bode J Ch. Et al. Gut and the liver. Kluwer Academics Publishers. Gran Bretaña, 1998: 203-36.
- 10.- Bigatello LM, Broitman SA, Fattori L, et al. Endotoxemia, encephalopathy, and mortality in cirrhotic patients. *Am J Gastroenterol* 1987; 82:11-15.
- 11.- Greve JW, Gouma DJ, van Leeuwen PAM et al. Lactulose inhibits endotoxina induced tumor necrosis factor production by monocytes. An in vitro study. *Gut* 1990; 31: 198-203.
- 12.- Kaye KS, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical managment. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14: 293-319.
- 13.- Conn HO, Lieberthal MM. Mechanisms of action of lactulose. *The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose*. DLLSA.: Williams & Wilkins. 1979:278-294.
- 14.- Kasravi FB, Adawi D, Molin G, et al. Effect of oral supplementation of lactobacilli on bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *J Hepatol* 1997; 26:417-424.
- 15.- Cirera I, Bauer TM, Navasa M, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 32-7.
- 16.- Fleckenstein JF, Diehl AM. Complications of chronic liver disease. En Grendell JH, McQuaid KR, Friedman SL (eds). *Current Diagnosis & Treatment in Gastroenterology*. DLLSA.: Appleton & Lange. 1996:558-570.
- 17.- Wolin MJ. Metabolic interaction among intestinal microorganisms. *Am J Clin Nutr* 1974; 27:1320-1324.

- 18.- Videla S, Vilaseca J, García-Lafuente A, et al. Dietary inulin prevents distal colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). *Gastroenterology* 1998; 114:A765.
- 19.- Hudault S, Lievin V, Bernet-Camard MF, Servin AL. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella Typhimurium* C5 infection. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:513-518.
- 20.- Saxelin M, Chuang NH, Chassy B, et al. Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989- 1992. *Clin Infect Dis* 1996; 22:564-566.
- 21.- Husni RN, Gordon SM, Washington JA, Longworth DL. Lactobacillus bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin Infect Dis* 1997; 25:1048-1055.
- 22.- Antony SJ, Stratton CW, Dummer JS. Lactobacillus bacteremia: description of the clinical course in adult patients without endocarditis. *Clin Infect Dis* 1996; 23:773-778.
- 23.- Horwitch CA, Furseth HA, Larson AM, et al. Lactobacillemia in three patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1995; 21:1460-1462.
- 24.- Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier - Successful strains for future challenges. *Antonie v Leeuwenhoek* 1996; 70:347-358.
- 25.- DePetrino SF, DeJorrat MEBB, DeBudeguer MV, Perdigno G. Influence of the oral administration of different lactic acid bacteria on intestinal microflora and IgA-secreting cells in mice treated with ampicillin. *Food Agricult Immunol* 1997; 9:265-275.

- 26.- García-Tsao G, Fa-Yauh L, Barden GE, et al. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995; 108: 1835-41.
- 27.- Nanji AA, Khettry U, Hossein-Sadrzader SM. Lactobacillus feedin reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. *P Soc Exp Biol Med* 1994; 205:243-247.
- 28.- Perdigon G, Medici M, Bibas Bonet de Jorrat ME, et al. Immunomodulating effects of lactic acid bacteria on mucosal and humoral immunity. *Int J Immunother* 1993; 9:29-52.
- 29.- Garcia-Tsao G, Angulo P, Garcia JC, et al. The diagnostic and predictive value of ascites nitric oxide levels in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 28:17-21.
- 30.- Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:1231-1233.
- 31.- Tanaka R. Lactobacillus, Bifidobacterium, and intestinal infectious diarrhea. *Healthist* 1997; 120:121-128.
- 32.- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, et al. Maintenance treatment of chronic pouchitis: A randomised placebo-controlled, double-blind trial with a new probiotic preparation. *Gastroenterology* 1998; 114:A487.
- 33.- DeSimone C, Ciardi A, Grassi A, et al. Effect of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14:331-340.

- 34.- Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: Pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994; 20: 1359-63.
- 35.- Moncada S, Higgins A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 18: 1139-43.
- 36.- Rimola A, Navasa M. Infections in liver disease. In: Bircher, J. textbook of clinical hepatology. 2nd 1999: 1861-1874.
- 37.- Bauer T, Fernández J, Navasa M et al. Failure of *Lactobacillus spp.* To prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; (36): 501-6.
- 38.- Aritaki S and Ishikawa T. application of milk fermented by *Lactobacillus acidophilus* in the pediatric field. *J Jpn Pediatr Soc* 1962; 66: 125-30.
- 39.- Mathurin P, Gao Deng Q, Keshavarzian A, et al. Exacerbation of alcoholic liver injury enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 2000; 32: 1008-17.
- 40.- Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000; 32: 742-7.
- 41.- Keshavarzian A, Holmes W, Patel M et al. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: A possible mechanisms for alcohol-induced liver damage. *Am J Gastroenterol* 1998; 94: 200-7.
- 42.- Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology and therapeutic implications. *JPEN* 1986, 10: 227-38.

- 43.- Callery MP, Mangino MJ, Flye MW. A biologic basis for limited Kupffer cell reactivity to portal derived endotoxin. *Surgery* 1991, August: 221-30
- 44.- Nathan C. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-26.
- 45.- Chiva M, Soriano G, Rochat I et al. Effect of *Lactobacillus johnsonii* Lal and antioxidants on intestinal biota and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 37: 456-62.
- 46.- V von Baehr, WD Döcke, M Plauth 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 desensitization. *Gut* 2000; 47: 281-7.
- 47.- Gressner AM. Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Clin Chem Clin Bio* 1991; 29: 293-311.
- 48.- Kielian TL, Blecha F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. *Immunopharmacology* 1995; 29: 187-205.
- 49.- Harri A, Jarvelainen, Che Fang, magnus Ingelman Sunderberg et al. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Hepatology* 1999; 29: 5; 1503-10.
- 50.- Fulenwider JT, Sibley C, Stein ST et al. Endotoxemia of cirrhosis: an observation not substantiated. *Gastroenterology* 1980; 78: 1001-4.
- 51.- Triger DR, Boyer TD, Levin J. Portal and systemic bacteremia and endotoxemia in liver disease. *Gut* 1978; 19: 935-9.
- 52.- Bailey ME. Endotoxin bile salts and renal function in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1976; 63; 774-8.

- 53.-Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 232-6.
- 54.- Nakatani Y, Fukui H, Kitano H et al. Endotoxin clearance and its relation to hepatic and renal disturbances in rts with liver cirrhosis. *Liver* 2001; 21: 64-70.
- 55.- Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions. An overview. *Hepatology* 1996; 23: 909-16.
- 56.- Van Snick J. Interleukin 6: an overview. *Blood* 1989; 74: 1-10.
- 57.- Maher JC, Friedman SL. Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver. *Sem Liver Dis* 1993; 13: 13-20.
- 58.- Genesca J, Gonzalez A, Segura R et al. Interleukin-6, Nitric Oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 169-77.
- 59.- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD 14 receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPs binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-33.
- 60.- Croos ML, Stevenson LM, Gill HS et al. Anti-allergy properties of fermentred foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int immunopharmacol* 2001; 185: 891-901.
- 61.- Chan CC, Hwang SJ, Lee FY et al. Prognostic value of plasma endotoxin levels in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32 (9): 942-6.

- 62.- Matzusaki T. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 133-40.
- 63.- Sessa W. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31: 131-143.
- 64.- Takahashi M, Ishida T, Traub O et al. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J Vas Res* 1997; 34: 212-9.
- 65.- Cadelina G, Shah V, Choo K et al. Elevated portal pressure in mice with targeted disruption of the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2000; 32: A1202.
- 66.- Castillo L, deRojasTC, Chapman TE et al. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 193-7.
- 67.- Wladimiro Jiménez, Josefa Ros, Manuel Morales-Ruiz et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in peritoneal macrophages of cirrhotic patients. *Hepatology* 1999; 3: 670-7.
- 68 - Younossi Z, Boparai N, Price LL et al. Health related quality of life in chronic liver disease: The impact of type and severity of disease. *Am J Gastrol* 2001;96; 7: 2199-2205.
- 69.- Avlami A, Kordossis T, Vrizedis N et al. *Lactobacillus rhamnosus* endocarditis complicating colonoscopy. *J Infect* 2001; 42: 283-5.