

# Complicaciones asociadas a traslocación bacteriana en trasplante hepático

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**FACULTAD:** CIENCIAS EXPERIMENTALES

**ÁREA DE CONOCIMIENTO:** INMUNOLOGÍA

**TITULACIÓN:** GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**ALUMNO:** GUILLEM VICENTE ORTIZ

**TUTOR ACADÉMICO:** RUBÉN FRANCÉS GUARINÓS

**CURSO ACADÉMICO:** 2015/ 2016



# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	4
2.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	5
2.1	Hipótesis.....	5
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1	Recogida de muestras .....	6
3.2	Tipo, procesamiento y conservación de muestras.....	7
3.3	Metodología Experimental.....	8
3.4	Análisis Estadístico .....	11
4.	RESULTADOS.....	12
4.1	Pacientes .....	12
4.2	Incidencia de la traslocación bacteriana .....	13
4.3	Respuesta inflamatoria a lo largo del estudio.....	14
4.4	Respuesta inflamatoria frente a traslocación bacteriana .....	16
5.	DISCUSIÓN.....	18
6.	CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA .....	18
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	19

## Resumen

El objetivo de este estudio experimental es el de analizar la incidencia de la traslocación bacteriana y determinar la respuesta inflamatoria en 20 pacientes cirróticos sometidos a trasplante hepático. Pensamos que un subgrupo de pacientes mostrará traslocación de antígenos bacterianos en sangre pudiendo comprometer su respuesta inmune y, por tanto, la evolución del trasplante. Los resultados confirman la existencia de traslocación bacteriana en un subgrupo de pacientes cirróticos y una tasa creciente en los días siguientes a la cirugía. Esto se asocia a una respuesta inflamatoria sistémica elevada y podría suponer un marcador de peor evolución del trasplante en pacientes con cirrosis.

## Summary

The aim of the present study has been to identify the translocation of bacterial DNA and the associated immune response in blood of decompensated cirrhotic patients undergoing liver transplant surgery. We hypothesize that a subgroup of these patients will show circulating bacterial DNA, which may compromise their inflammatory background and the liver transplant evolution. Our results confirm this hypothesis and show a 25% of bacterial translocation that is even increased during the following days after surgery in the preliminary series of studied patients. This fact is associated with an increased systemic inflammatory response and might constitute a molecular marker of worse evolution of liver transplant.

## Palabras clave

Traslocación bacteriana. Cirrosis. Trasplante hepático. Citoquinas proinflamatorias.

## 1. INTRODUCCIÓN

El hígado es fundamental en el funcionamiento del organismo, ya que participa en multitud de procesos químicos indispensables para la vida. La cirrosis es una enfermedad crónica, progresiva e irreversible que afecta al hígado y que consiste en la muerte progresiva del tejido hepático normal, que es sustituido por un tejido fibroso o cicatricial incapaz de ejercer las funciones del hígado <sup>1</sup>. La pérdida progresiva de funcionalidad hepática obliga finalmente a estos pacientes a someterse a un trasplante hepático como única posibilidad terapéutica. Los factores desencadenantes principales son el consumo de alcohol, las infecciones por hepatitis B, C o D y la acumulación de grasa en el hígado por motivos no relacionados con el alcohol <sup>2</sup>.

Las complicaciones asociadas a la cirrosis pueden comprometer seriamente la supervivencia de estas personas, acelerar la progresión de la enfermedad y la necesidad del trasplante. Algunas de las complicaciones más frecuentes son la aparición de ascitis, la peritonitis bacteriana espontánea, la encefalopatía hepática y la hipertensión portal <sup>3</sup>, que altera la hemodinámica de los pacientes pudiendo desarrollar un síndrome hepatorenal.

Muchas de las complicaciones que presentan los pacientes con cirrosis están directa o indirectamente relacionadas con el paso de bacterias comensales o de sus productos desde la luz intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos y a la circulación sistémica. Ese proceso, conocido como traslocación bacteriana, se explica por al menos tres posibles mecanismos: el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI), el incremento de la permeabilidad intestinal<sup>4</sup> y una actividad inmunológica deficiente <sup>5</sup>.

Diferentes estudios tanto en pacientes como en cirrosis experimental han demostrado un SBI relacionado con la progresión del daño hepático, produciendo una disbiosis intestinal que facilita los episodios de TB. Igualmente, la pérdida de la integridad de la barrera intestinal, evaluada por la pérdida de expresión de diferentes proteínas de unión estrecha como ocludina, claudinas, etc que aumentan la permeabilidad de la barrera y por tanto la tasa de TB <sup>6,7</sup>.

Finalmente, también hay estudios que demuestran la implicación de factores genéticos en la correcta respuesta inmunitaria durante la interacción entre la microbiota y el huésped. Así, polimorfismos en genes como NOD2, ATG16L1 o diferentes TLRs han mostrado una capacidad de respuesta alterada a procesos de TB en el ámbito de la cirrosis <sup>9</sup>.

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

A lo largo de diferentes estudios en cohortes independientes de pacientes, nuestro grupo ha demostrado el desarrollo de episodios de traslocación bacteriana en aproximadamente un 35% de los pacientes con cirrosis descompensada y que este fenómeno se asocia con una respuesta inflamatoria incrementada <sup>6,10,11,12,13</sup>.

El objetivo principal del estudio es determinar si los pacientes con cirrosis sometidos a trasplante hepático desarrollan en los días posteriores al trasplante episodios de traslocación bacteriana que pudieran comprometer la evolución del injerto y del paciente.

El objetivo secundario es determinar la respuesta inflamatoria en los pacientes sometidos a trasplante hepático distribuidos por la presencia de antígenos bacterianos en sangre.

### 2.1 Hipótesis

Nuestra hipótesis es que una parte de los pacientes trasplantados mostrará traslocación de antígenos bacterianos en sangre y este hecho puede comprometer una respuesta inmunológica ya de por sí deprimida como consecuencia de la inmunosupresión post-trasplante.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron de forma consecutiva pacientes con cirrosis descompensada sometidos a trasplante hepático en la Unidad de Cirugía Digestiva del Hospital General Universitario de Alicante, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión recogidos por la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) para el trasplante hepático. El estudio se realizó de forma prospectiva.

El estudio cuenta con el informe favorable del CEIC del Hospital General Universitario de Alicante.

#### 3.1 Recogida de muestras

Para la realización de este estudio se ha llevado a cabo un seguimiento de los pacientes trasplantados cirróticos y sus donantes mediante la extracción de muestras de sangre en diferentes localizaciones y a diferentes tiempos:

1. Donante
2. Pre Trasplante vía periférica
3. Pre Trasplante vena Porta
4. Fin Trasplante vía periférica
5. 3 días después del Trasplante
6. 15 días después del Trasplante
7. 30 días después del Trasplante

### 3.2 Tipo, procesamiento y conservación de muestras

La sangre extraída de los trasplantados cirróticos y donantes se divide en los tubos de EDTA y suero.

En el caso de los tubos EDTA se divide la muestra a la mitad y se deja posar lentamente sobre la pared en tubos previamente preparados con Ficoll. La separación de linfocitos de sangre periférica mediante la centrifugación diferencial en un gradiente de densidad, con Ficoll-Hypaque, es una técnica rápida con una pureza superior al 90% y una viabilidad de prácticamente del 100%. Las células así obtenidas, que resulta ser la capa intermedia que queda después de un protocolo de centrifugación, se denominan frecuentemente PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells). La técnica fue descrita inicialmente por Boyum y también se utiliza para aislar linfocitos de otros fluidos e incluso de tejidos disociados.

En el caso de los tubos de suero, el procesamiento es más simple, y mediante un protocolo de centrifugación se puede recolectar directamente, pues lo que nos interesa es el líquido de color amarillento que queda depositado en la parte superior del tubo.

Una vez recogido, separado en tubos Eppendorf y tubos recolectores y clasificados tanto el suero como las células PBMC de cada muestra del paciente, el siguiente paso sería el almacenamiento para su posterior detección de fragmentos genómicos bacterianos y cuantificación de marcadores inflamatorios IL-6 y TNF- $\alpha$ . En el caso de los tubos Eppendorf, las muestras se guardan en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pues estos tubos serán sobre los que posteriormente (al cabo de unos días) se realice la detección y cuantificación. Los tubos recolectores se guardarán en ultracongeladores a  $-80^{\circ}\text{C}$  y estarán en todo momento disponibles y en muy buenas condiciones para realizar nuevos experimentos o repetir técnicas.

### 3.3 Metodología Experimental

Para la detección de fragmentos genómicos bacterianos se ha realizado la siguiente metodología experimental:

- **Contaje celular.** El contaje celular se realiza mediante una cámara de Neubauer o hemocitómetro, calculándose el número de células de 16 cuadrados correspondientes a un área de  $0,1\text{mm}^3$  (L). Finalmente, se multiplican las células contadas por  $10^4$  (y en su caso, por la dilución efectuada antes de la cuenta) para expresar la cantidad y concentración celular en millones de células/mL

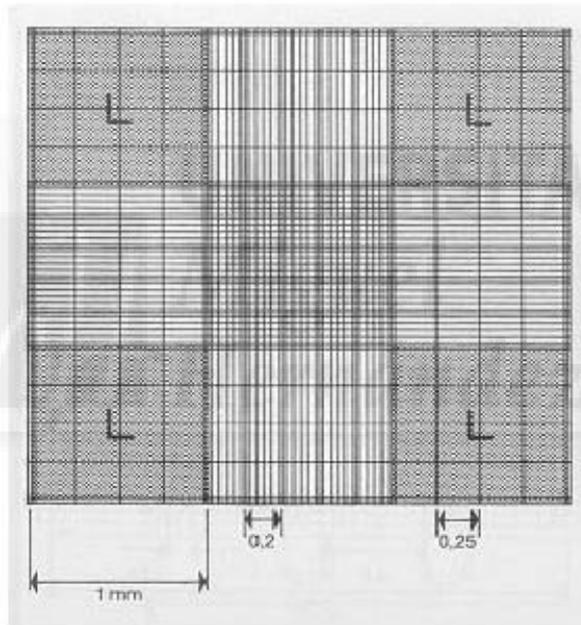


Imagen 1. Cámara Neubauer

- **Extracción de Ácidos Nucleicos.** La extracción de ácidos nucleicos, que consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN basándose en sus características fisicoquímicas, se realizó tras lisis celular mediante un protocolo estandarizado de cromatografía de afinidad en columna (Qiagen). El ADN se eluyó en agua bidestilada. La concentración y pureza del ADN se determinó por Nanodrop.



Imagen 2. Kit de extracción Qiagen

- **Amplificación** de los fragmentos genómicos bacterianos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región conservada del 16S rRNA de procariontes. Los primers utilizados fueron: 5'-AGAG-TTTGATCATGGCTCAG-3' y 5'-ACGCGACTGCTGCTGGCAC-3'.

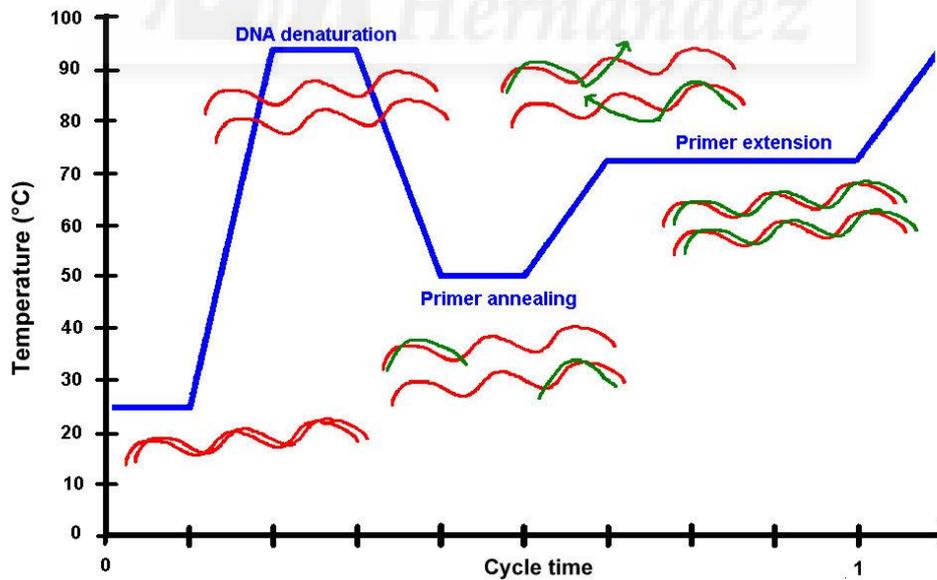


Imagen 3. Ciclos de PCR

- **Separación de fragmentos** mediante electroforesis en gel de agarosa y detección por luz UV con safeview.

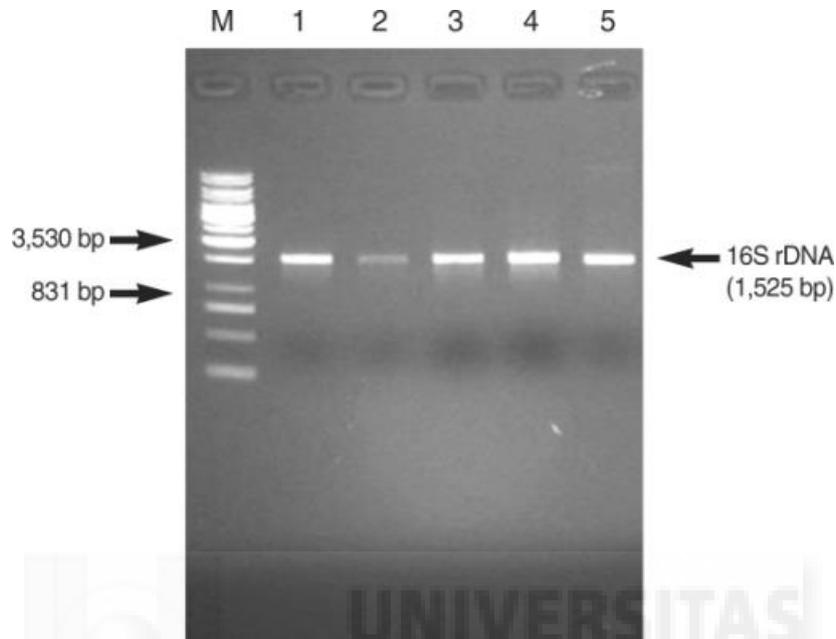


Imagen 4. Visualización de fragmentos genómicos

Para la **cuantificación de los marcadores inflamatorios IL-6 y TNF- $\alpha$**  en suero se ha realizado la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) durante 3 días seguidos. El primer día se realiza el “coating” en el cual se le añade el anticuerpo de captura junto con el “coating buffer”, dejándolo toda la noche en la nevera a 4°C. El segundo día se realiza el lavado y se prepara y añade a las placas la curva estándar y las muestras por duplicado, dejándolo de nuevo en la nevera durante toda la noche.

Finalmente, el último día se lava, se añade el anticuerpo de detección, el conjugado de Avidina - HRP (horseradish peroxidase) y el sustrato TMB para posteriormente leer, copiar y analizar los resultados a 450 nm.

# ELISA

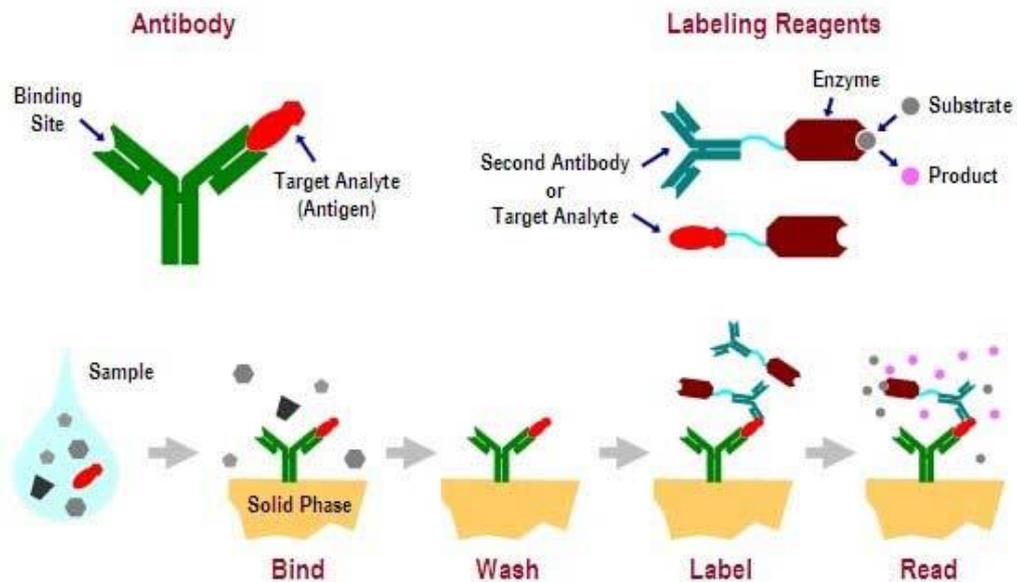


Imagen 5. Esquema de ELISA

## 3.4 Análisis Estadístico

Se realizará un análisis descriptivo de las variables recogidas en el estudio y estratificadas en los grupos de pacientes distribuidos por la presencia de ADN bacteriano. Las variables continuas se describirán usando media y desviación estándar. Las categóricas se describirán usando el número de casos por categoría y valores porcentuales. Las comparaciones para identificar diferencias en variables cuantitativas entre los grupos se realizará usando el test de ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Bonferroni si se cumple la hipótesis de normalidad, en caso contrario se utilizarán test no paramétricos. Las comparaciones en el caso de variables categóricas se efectuarán llevando a cabo el test de la Chi cuadrado. Se considerará significativo un valor  $p < 0.05$ . Todos los análisis se realizarán usando el programa SPSS versión 16.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Pacientes

El estudio de la presencia de fragmentos genómicos bacterianos y la concentración en pg/ $\mu$ L de los marcadores inflamatorios IL-6 y TNF- $\alpha$  se realizó en 20 pacientes consecutivos trasplantados. Sus características clínicas se describen en la Tabla 1.

Variable	Media $\pm$ SD o N (%)
<b>Edad (años)</b>	57.4 $\pm$ 8.1
<b>Género (masculino/femenino)</b>	14/6
<b>Puntuación MELD</b>	16.4 $\pm$ 6.2
<b>Etiología</b>	
Alcohol	9 (44%)
VHC	4 (21%)
Alcohol + VHC	4 (19%)
Otros	3 (16%)
<b>CHC (no/sí)</b>	10 (49%) / 10 (51%)
<b>Ascitis refractaria previa (no/sí)</b>	16 (81%) / 4 (19%)
<b>Episodios de PBE previos (no/sí)</b>	18 (90%) / 2 (10%)
<b>Hemorragia digestiva previa (no/sí)</b>	15 (73%) / 5 (23%)
<b>DPIT (no/sí)</b>	19 (97%) / 1 (3%)
<b>Encefalopatía hepática previa (no/sí)</b>	13 (64%) / 7 (36%)
<b>SID - (no/sí)</b>	15 (74%) / 5 (26%)
<b>Anti-VHC (no/sí)</b>	19 (93%) / 1 (7%)
<b>Uso de beta-bloqueantes (no/sí)</b>	11 (55%) / 9 (45%)
<b>Uso de antibióticos (no/sí)</b>	19 (98%) / 1 (2%)
<b>Uso de PPIs (no/sí)</b>	12 (60%) / 8 (40%)

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes

## 4.2 Incidencia de la traslocación bacteriana

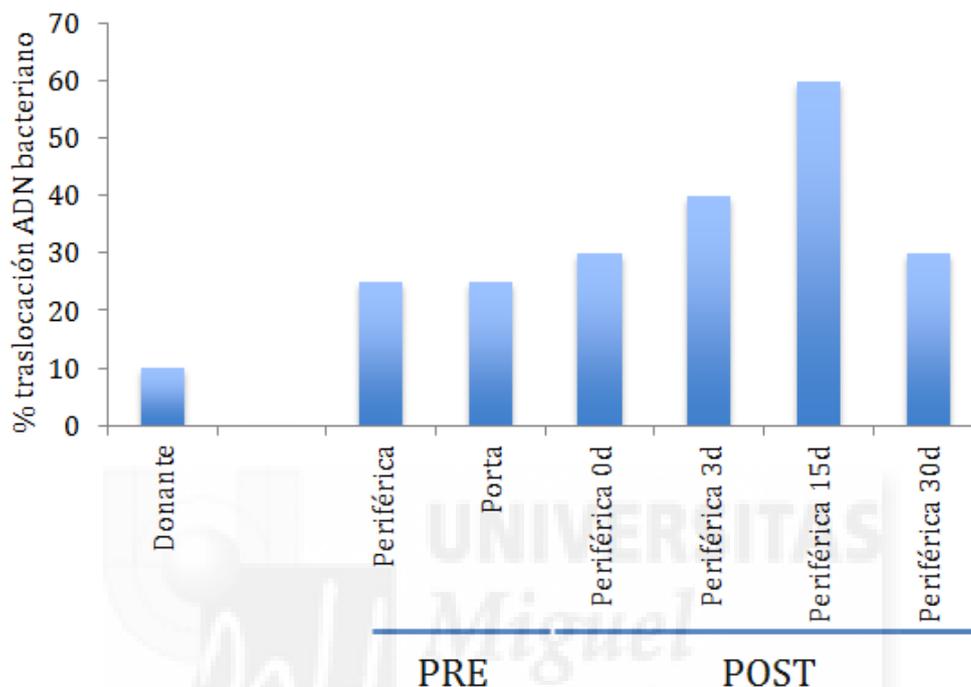


Gráfico 1. % Traslocación bacteriana a lo largo del estudio de los pacientes

Uno de nuestros objetivos principales en este estudio es el de determinar si los pacientes con cirrosis sometidos a trasplante hepático desarrollan, en los días posteriores al trasplante, episodios de traslocación bacteriana. En el *Gráfico 1* podemos observar que el porcentaje de episodios de traslocación bacteriana en los pacientes cirróticos sometidos a trasplante es del 25% tanto en vía periférica como en vena porta. La tasa de aparición de estos episodios aumenta en los días posteriores a la cirugía. Además, al cabo de un mes el número de pacientes con traslocación bacteriana se reduce hasta valores similares a los del momento del trasplante. Cabe destacar que aproximadamente, un 10% de los donantes tienen fragmentos genómicos bacterianos circulantes en sangre.

### 4.3 Respuesta inflamatoria a lo largo del estudio

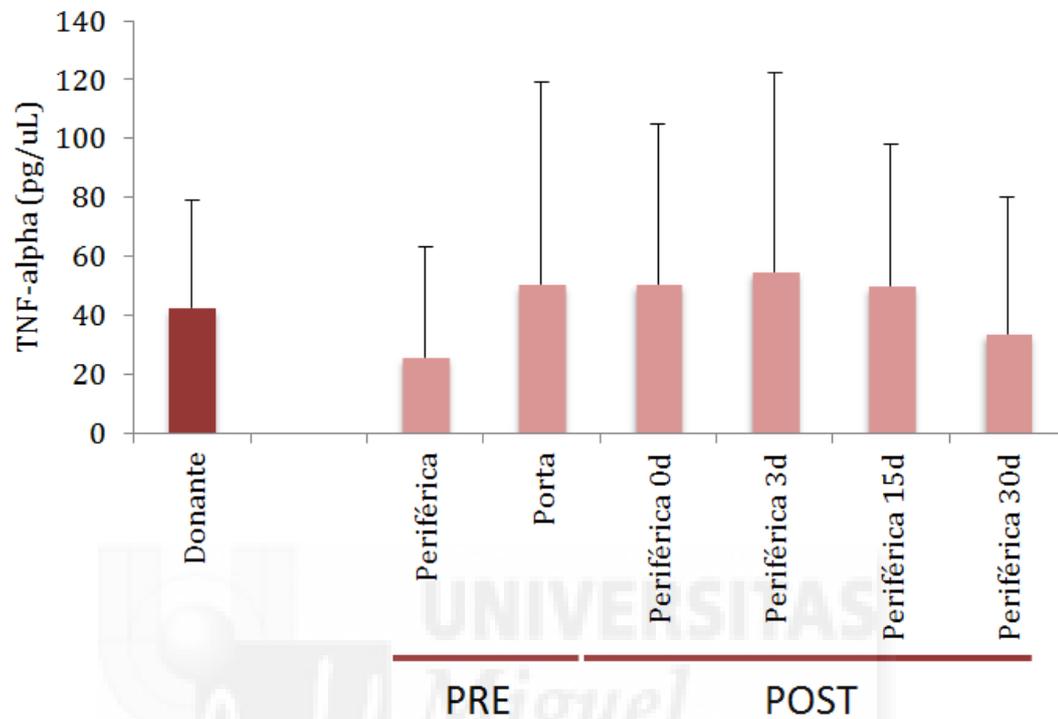


Gráfico 2. Concentración (pg/ $\mu$ L) TNF- $\alpha$  a lo largo del estudio de los pacientes

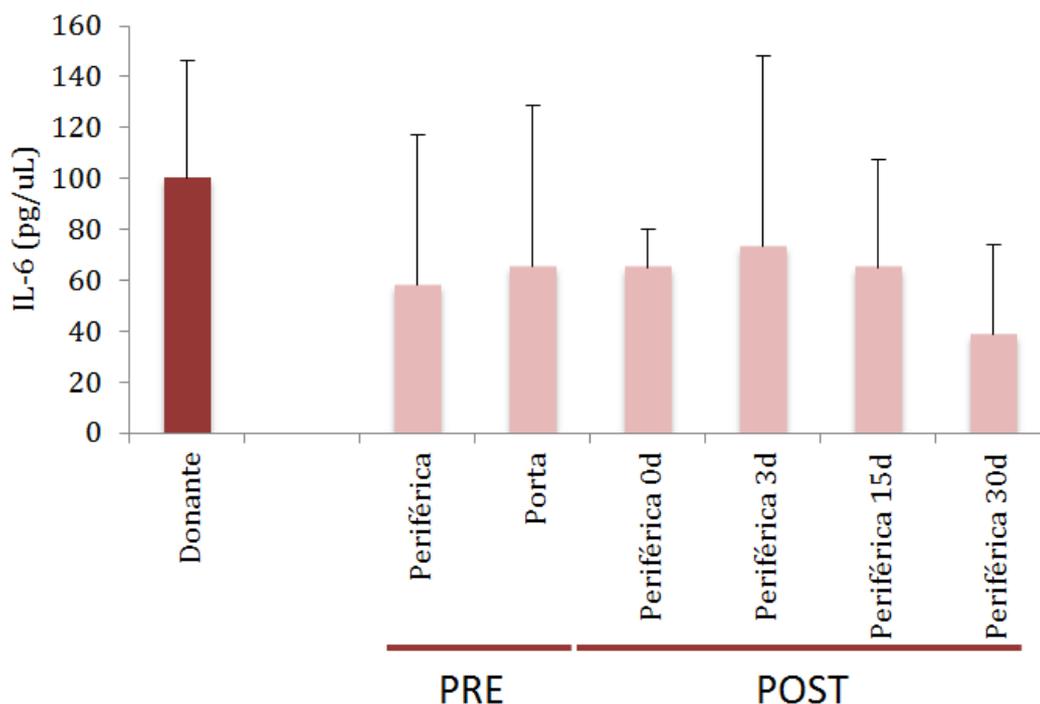


Gráfico 3. Concentración (pg/ $\mu$ L) IL-6 a lo largo del estudio de los pacientes

La determinación de las concentraciones de citoquinas proinflamatorias o antígenos bacterianos en sangre como IL-6 y TNF- $\alpha$  es una de las formas más efectivas de cuantificar una posible respuesta inflamatoria en los pacientes. Si representamos las concentraciones de estos marcadores inflamatorios en las diferentes muestras de sangre tomadas tanto de los pacientes como de los donantes (*Gráfico 2* y *Gráfico 3*), se observa una ausencia de diferencias significativas entre los diferentes puntos, aunque se aprecia una alta variabilidad en los resultados.

Sin embargo, atendiendo a nuestra hipótesis y explicando esta dispersión, una parte de los pacientes trasplantados mostrará, en teoría, una mayor concentración de antígenos bacterianos como consecuencia de los episodios de traslocación bacteriana.

**4.4 Respuesta inflamatoria frente a traslocación bacteriana**

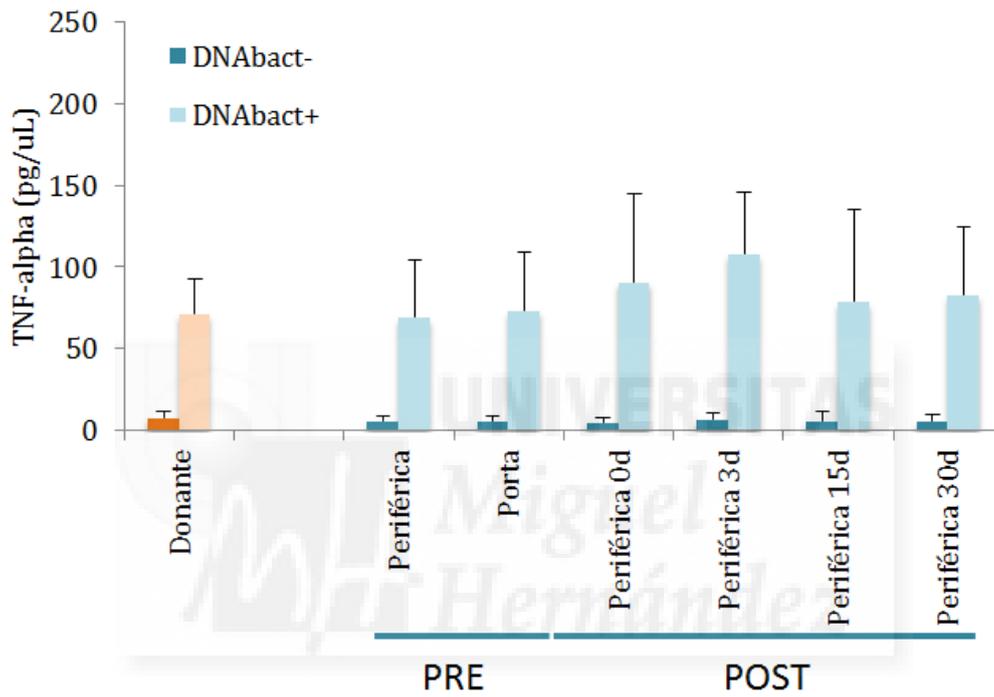


Gráfico 4. Concentración (pg/μL) TNF-α en función de la presencia de fragmentos genómicos bacterianos

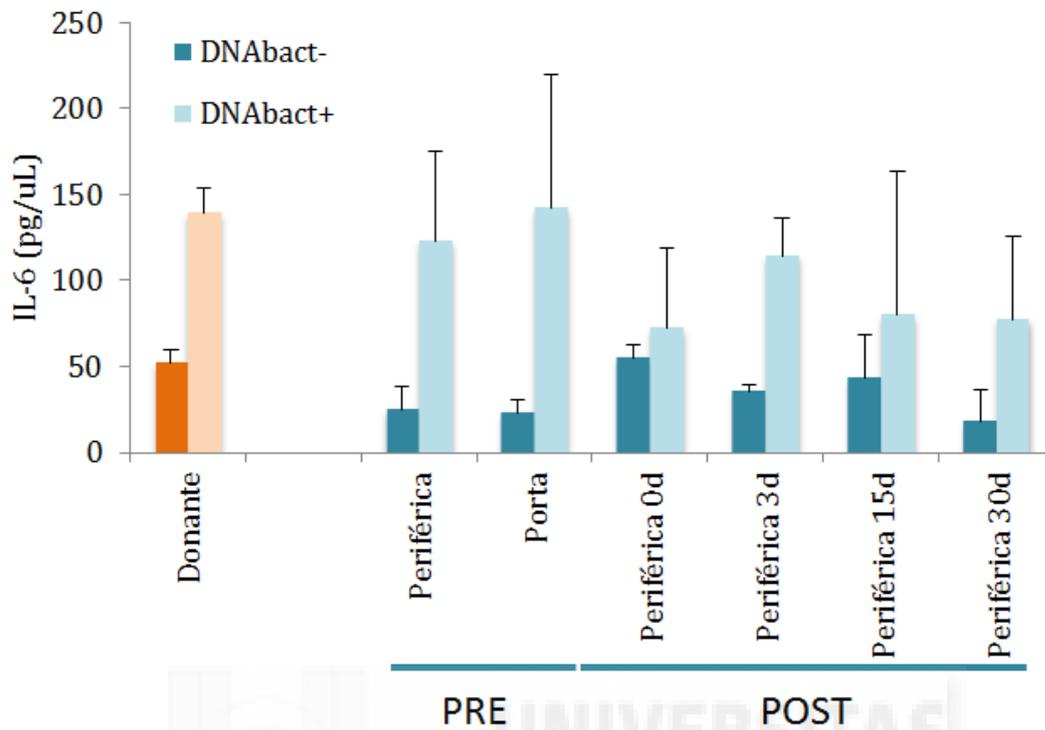


Gráfico 5. Concentración (pg/μL) IL-6 en función de la presencia de fragmentos genómicos bacterianos

Tanto en el Gráfico 4 como en el Gráfico 5 podemos observar, en primer lugar, una disminución significativa en la dispersión de los datos distribuidos por la presencia o ausencia de traslocación bacteriana. Por un lado, en el Gráfico 4 podemos observar que los que no presentan fragmentos genómicos bacterianos (*DNAbact-*) poseen unos niveles del marcador inflamatorio TNF- $\alpha$  significativamente más bajos. De la misma forma, en el Gráfico 5 observamos también unos niveles de la citoquina IL-6 menores, en los pacientes que no presentaban fragmentos genómicos bacterianos en sangre.

## 5. DISCUSIÓN

Los pacientes que padecen un estado muy avanzado de cirrosis hepática presentan una gran cantidad de complicaciones clínicas que comprometen seriamente la supervivencia de los mismos. En la mayoría de los casos, la progresión de la enfermedad obliga a estos pacientes a someterse a un trasplante hepático que no está exento de complicaciones. Algunas de estas complicaciones se derivan del paso de bacterias o sus productos desde la luz intestinal a la circulación sistémica. Este hecho es especialmente relevante en pacientes trasplantados debido a las terapias inmunosupresoras que habitualmente tienen establecidos estos pacientes para evitar el rechazo al injerto.

En este estudio se pretendía evidenciar los episodios de traslocación bacteriana en pacientes cirróticos trasplantados y si dichos episodios podían estar relacionados con una respuesta inflamatoria sistémica elevada. Los resultados obtenidos confirman ambos extremos. Sería, por tanto, razonable la búsqueda de una correlación entre los episodios de traslocación bacteriana de este subgrupo de pacientes, su respuesta inflamatoria sistémica y las complicaciones asociadas a esta enfermedad y al trasplante hepático. La demostración de esta posible correlación justificaría el uso de tratamientos profilácticos antibióticos en los pacientes que van a ser sometidos a trasplante hepático.

## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- Los pacientes con cirrosis sometidos a TH están expuestos a la traslocación de antígenos bacterianos como el DNA a la circulación sistémica en los días posteriores a la cirugía.
- La traslocación de estos antígenos se asocia a una respuesta inflamatoria sistémica elevada, pudiendo comprometer el cuadro clínico del paciente en el periodo post-trasplante.

En resumen, es necesario profundizar en estudios de prevención y de valoración de las consecuencias clínicas que los episodios de traslocación bacteriana tienen en los pacientes. Una posible estrategia de futuro sería la implementación de una profilaxis antibiótica inicial en todos los pacientes. En cualquier caso, ésta o cualquier otra estrategia tendría que ser validada en estudios diseñados específicamente para tal fin.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

[1] Lee, UE. & Friedman, SL., Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011, abril; 25:195-206.

[2] Lefton, HB., Rosa, A. & Cohen, M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med Clin North Am.* 2009, Julio; 93:787-99.

[3] Rahimi, RS. & Rockey, DC. Complications of cirrhosis. *Curr. Opin. Gastroenterology.* 2012, mayo; 28(3):223-9

[4] Pascual, S., Such, J., Esteban, A., Zapater, P... & Perez-Mateo, M. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepato-gastroenterology.* 2003, septiembre; 50(53):1482-6

[5] Martínez, E. Study of the factors that may be involved in the variability of the inflammatory response in cirrhotic patients with bacterial traslocation. Tesis doctoral del departamento de medicina clínica. 2014, Universidad Miguel Hernández.

[6] Gómez-Hurtado, I., Such J., Sanz, Y. & Francés R. Gut microbiota-related complications in cirrosis. *World Journal of Gastroenterology.* 2014, mayo 19; 20(42): 15624-15631

[7] Pedro, Z., González-navajas, JM., Such J. & Francés R. Immunomodulating effects of antibiotics used in the prophylaxis of bacterial infections in advanced cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2015, agosto 31; 21(41):11493-11501

[8] Tsiaoussis, GI., Assimakopoulos, SF., Tsamandas, AC., Triantos, CK & Thomopoulos, KC. Intestinal barrier dysfunction in cirrhosis: Current concepts in pathophysiology and clinical implications. *World Journal of Hepatology*. 2015, agosto 18; 7(17):2058-2068

[9] Gutiérrez, A., Scharl, M., Sempere, L., Holler, E... & Francés, R. Genetic susceptibility to increased bacterial translocation influences the response to biological therapy in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2014, febrero; 63(2):272-80

[10] Gonzalez-Navajas JM., Bellot P., Francés R., Zapater P... & Such J. Presence of bacterial DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin. *J Hepatology*. 2008, enero; 48(1): 61-7

[11] Francés R., Benlloch S., Zapater P., Gonzalez JM... & Such J. A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology*. 2004, febrero; 39:484-491

[12] Bellot, P., Garcia-Pagan, JC., Francés, R., Abraldes, J... & Bosch, J. Bacterial translocation induces proinflammatory cytokines and worsens systemic hemodynamics in cirrhotic patients with ascites. *J. Hepatol*. 2009; 50(1):41

[13] Francés, R., Gonzalez-Navajas, JM., Zapater, P., Muñoz, C... & Such, J. Translocation of bacterial DNA from Gram-positive microorganisms is associated with a species-specific inflammatory response in serum and ascetic fluid of patients with cirrhosis. *Clin. Exp. Immunology*. 2007; 150:230-237