

Morgan Ramón Landreau

Identificación de cepas bacterianas sin capacidad inflamatoria sobre células de Kupffer de rata con ligadura biliar

Tutor: Rubén Francés

Departamento de Medicina Clínica (Hospital General de Alicante) área de Inmunología

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2015-2016

Resumen

Para controlar la aparición de complicaciones clínicas relevantes durante la evolución de la cirrosis se han establecido varias estrategias terapéuticas que inciden en reducir la respuesta inflamatoria excesiva. Entre ellas se encuentra el uso de probióticos. En el presente estudio hemos evaluado el efecto de 6 nuevas cepas bacterianas sobre la respuesta inflamatoria en células de Kupffer de rata cirrótica, para validar su potencialidad como nuevos agentes homeostáticos, determinando las concentraciones de TNF-alfa, MCP-1 e IL-6 en sobrenadantes de cultivos con dichas células. Se indujo cirrosis a un grupo de ratas Sprague-Dawley por ligadura del conducto biliar. Cuatro semanas después de la ligadura se llevaron a cabo las laparotomías para la extracción de órganos. Tras el aislamiento y el cultivo de las células se cuantificaron las citocinas mencionadas mediante ELISA. Se concluyó que el cultivo con la cepa número 2 no incrementaba los niveles de producción de TNF- α , MCP-1 e IL-6 respecto a los producidos por células no estimuladas. Estos resultados sugieren el potencial de dicha cepa como agente homeostático y su posible utilidad en pacientes con cirrosis.

Abstract

In order to control the occurrence of relevant clinical complications in the development of cirrhosis, several therapeutic strategies have been established in order to reduce the excessive inflammatory response. The use of probiotics is one among them. In this study, we have evaluated the effect of 6 new bacterial strains on the inflammatory response in Kupffer cells of cirrhotic rats in order to validate their potential as new homeostatic agent, determining the concentrations of TNF-alpha, MCP-1 and IL-6 in supernatants of cultures with this cells. Cirrhosis was induced in a group of Sprague-Dawley rats by bile duct ligation. Four weeks later, laparotomies were performed for the extraction of organs. After cell isolation and culture, cytokine quantification was performed by ELISA. We concluded that the culture with strain 2 did not increase the levels of TNF-alpha, MCP-1 and IL-6 compared to those produced by unstimulated cells. This results suggest the homeostatic role of this strain and its potential use in cirrhosis.

Palabras clave: cirrosis, probiótico, inflamación, citocinas.

Índice

Resumen.....	1
Palabras clave.....	1
Introducción.....	3
Antecedentes y objetivos.....	4
Animales y métodos.....	5
<i>Animales</i>	5
<i>Medios y reactivos</i>	7
<i>Laboratorio</i>	8
<i>Cultivos</i>	8
<i>ELISAs</i>	9
<i>Análisis estadístico</i>	9
Resultados.....	9
<i>Características de los animales</i>	9
<i>ELISAs</i>	10
Discusión.....	11
Conclusiones y proyección futura.....	12
Bibliografía.....	13

- *Introducción*

La cirrosis es una enfermedad hepática crónica en la que se generan depósitos de fibras de colágeno, delimitando nódulos que aíslan áreas del tejido hepático, dificultando la relación entre los hepatocitos y los vasos sanguíneos, lo cual produce la degeneración acelerada de las células del tejido.

En general, los casos de cirrosis suelen requerir el trasplante hepático. Sin embargo, a menudo surgen complicaciones conforme progresa la enfermedad, tanto en etapas tempranas como en etapas tardías (1). Algunas de estas complicaciones pueden ser la hipertensión portal (HP), encefalopatía hepática (EH), síndrome hepatorenal (SHR) o la peritonitis bacteriana espontánea (PBE). Todas ellas están relacionadas con el paso de las bacterias comensales desde la luz intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos y a la circulación sistémica.

Los mecanismos que explican este fenómeno conocido como traslocación bacteriana (TB) incluyen el aumento de la permeabilidad intestinal (2), una disbiosis en la composición de la microbiota intestinal y una alteración del sistema inmunitario, ya que se incrementa la exposición del hígado a los productos microbianos, y las señales de inflamación provenientes del intestino. Como elemento central en estos tres mecanismos se encuentra la respuesta inflamatoria, susceptible de modificar la homeostasis intestinal.

Por tanto, varias estrategias terapéuticas han incidido en reducir la respuesta inflamatoria excesiva en estos pacientes como herramienta para reducir los episodios de TB y, por tanto, controlar la aparición de complicaciones clínicas relevantes durante la evolución de la cirrosis. Una de las estrategias de mayor interés biológico en este ámbito se basa en reorganizar y restaurar la composición de la microbiota intestinal para mejorar la homeostasis (3). Así, el uso de probióticos surgió como alternativa a las estrategias antibióticas en el tratamiento y prevención de las complicaciones infecciosas de la cirrosis, ya que la terapia antibiótica continuada presenta problemas secundarios como la aparición de cepas multiresistentes. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la

salud del hospedador, contribuyendo al equilibrio de la microbiota intestinal del huésped, y a potenciar el sistema inmune (4).

La intervención en el ecosistema intestinal es considerada, por tanto, una estrategia potencial para tratar enfermedades hepáticas y sus complicaciones aunque, de momento, se limita a un uso experimental debido a la variabilidad de los datos obtenidos hasta el momento y a la heterogeneidad de la microbiota intestinal entre individuos. Las cepas de probióticos más utilizadas son las pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Algunas cepas de *Bifidobacterium* parece que están implicadas en la protección del huésped, previniendo el incremento de la permeabilidad intestinal y promoviendo un entorno de microvellosidades más sano, mientras que otras cepas del género *Lactobacillus* se han visto involucradas en la mejora de los mecanismos de defensa inmunitaria.

- ***Antecedentes y objetivos***

Nuestro grupo ha trabajado en los últimos años con la cepa *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765, obteniendo resultados positivos. En uno de los estudios, se observó que los ratones cirróticos a los que se les había administrado dicha cepa de forma oral, presentaban una disminución en los niveles de translocación de ADN bacteriano y de endotoxinas en suero, una mejora en la expresión de los marcadores de integridad de la barrera intestinal, y el incremento en los niveles de expresión génica de varios mediadores antiinflamatorios comparado con animales tratados con placebo (5).

En otro estudio, se evaluó la interacción entre esta cepa de *Bifidobacterium* y los linfocitos intestinales de ratones con cirrosis. Se observó una disminución en la expresión de los receptores de quimiocinas proinflamatorias CCR6, CCR9, CXCR3 y CXCR6 en dichos linfocitos, dependiente de la concentración de la bifidobacteria, una reducción de la permeabilidad intestinal y un descenso de la carga de antígenos bacterianos en el hígado, pudiendo concluir así que esta cepa mejoraba la homeostasis intestinal y prevenía las complicaciones derivadas del paso de antígenos bacterianos procedentes del intestino en cirrosis experimental. En este estudio se comprobó,

además, que el perfil de seguridad y función hepáticos en animales que recibían el probiótico era adecuado (6).

Finalmente, decidimos explorar el efecto de la bifidobacteria sobre el fenotipo y la función de macrófagos en pacientes con cirrosis. En las células estimuladas por la bifidobacteria se observó una morfología diferente de los macrófagos, un incremento en la expresión de CD206, CD163 y CD16, un cambio significativo en el patrón de secreción de citoquinas, y modificaciones fenotípicas y funcionales hacia un perfil antiinflamatorio opuesto al inducido por la progresión de la cirrosis. De esta forma concluimos que la cepa inducía una transición morfológica, fenotípica y funcional hacia un perfil antiinflamatorio en monocitos y macrófagos de pacientes con cirrosis que pueden ayudar en el control sostenido de la inflamación en la cirrosis descompensada (7).

Teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos, el presente estudio plantea el cribado de 6 nuevas cepas en la inducción de un perfil anti-inflamatorio en células de Kupffer de rata cirrótica para validar su potencialidad como nuevos agentes probióticos. Nuestra hipótesis es que el cultivo de células de Kupffer de rata cirrótica con las cepas de estudio disminuirá la secreción de citocinas proinflamatorias en el medio. Nuestro objetivo es determinar las concentraciones de TNF-alfa, IL-6 y MCP-1 en sobrenadantes de cultivo de células de Kupffer de rata con cirrosis inducida por ligadura del conducto biliar estimuladas con cepas bacterianas.

- *Animales y métodos*

Animales

A un conjunto de ratas Sprague-Dawley (todas machos) se las incluyó en un protocolo de inducción de cirrosis por obstrucción del conducto biliar. Se guardaron en una sala a temperatura constante de 21°C y expuestas a un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Con un peso de entre 350-360 g, se las alimentó con comida estándar para roedores. Los animales recibieron los cuidados de acuerdo con los criterios descritos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Todos los procedimientos

se llevaron a cabo en el Servicio de Experimentación Animal de la UMH en el Campus de San Juan de Alicante.

Los animales fueron operados por una veterinaria experimentada utilizando material estéril, con la finalidad de obstruir su conducto biliar y, de esta forma, inducirles una cirrosis hepática experimental. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (250 μ l) y Xilacina (170 μ l). Se ligó el conducto biliar común a dos niveles diferentes con sutura de seda 5-0, y se seccionó el conducto entre dichas ligaduras. La pared abdominal se cerró con sutura de seda 5-0.

Cuatro semanas después de la ligadura se llevaron a cabo las laparotomías para la extracción de órganos. Se anestesió al animal administrándole de manera intraperitoneal una mezcla de Xilacina y Ketamina, según su peso (alrededor de 355 g):

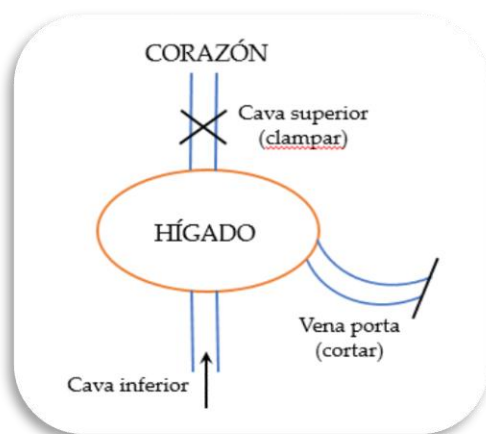
Ketamina: $(75 \text{ mg} \cdot 355 \text{ g}) / 1000 \text{ g} = 26,62 \text{ mg}$

$(26,62 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}) / 100 \text{ mg} = 0,25 \text{ ml} = 250 \mu\text{l}$

Xilacina: $(10 \text{ mg} \cdot 355 \text{ g}) / 1000 \text{ g} = 3,55 \text{ mg}$

$(3,55 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}) / 20 \text{ mg} = 0,17 \text{ ml} = 170 \mu\text{l}$

Una vez dormida la rata, se abrió la zona media y se localizó el hígado, se separó la arteria de la vena, se clampó la cava superior por la zona más cercana al hígado para introducir en la cava inferior una aguja de 21G curvada unida a una jeringuilla de 20 ml, para que al cortar posteriormente la vena porta se pudiera comenzar con la perfusión (se adjunta un dibujo a modo de esquema).



A continuación se perfundió el hígado con 50 ml de buffer de perfusión atemperado (se tuvo que pasar al menos 100 ml para que llegase a todos los lóbulos hepáticos). La Colagenasa I sólo se añade para los hígados cirróticos, se utiliza para eliminar las células circulantes del tejido al tiempo que las enzimas facilitan la posterior disgregación mecánica. Hay que mantener un ritmo constante de entrada y tener cuidado con las posibles burbujas de aire. Las enzimas y el Mg^{2+} , previamente alícuotado, deben añadirse al buffer en el momento del uso.

Cuando el hígado deja de cambiar de color, se extrae el órgano y se pasa a un falcon de 50 ml con RP10, y a hielo.

Medios y Reactivos

Para preparar los buffers necesarios se trabajó a partir de las soluciones stock (conservadas a $-20^{\circ}C$) de la DNasa I, Colagenasa IV, Colagenasa I y Cloruro magnésico y se prepararon las alícuotas de manera que hubiera 2 de cada componente para el buffer de perfusión (100 ml), y una de cada para el buffer de digestión (50 ml).

- Stock DNasa I a 10 mg/ml → 50 mg + 5 ml H_2O (50 alícuotas de 100 μ l)
- Stock Colagenasa IV a 200 mg/ml → 250 mg + 1,25 HBSS (25 " de 50 μ l)
- Stock Colagenasa I a 50 mg/ml → 500 mg + 10 ml HBSS (10 " de 1 ml)
- Stock Cloruro magnésico 1M → (2 alícuotas de 250 μ l)

La DNasa necesita Mg^{2+} para su correcto funcionamiento. El HBSS contiene Ca^{2+} y Mg^{2+} . En el caso del buffer de perfusión, se utiliza HBSS (48,6 ml) para enrasar hasta 50 ml la mezcla, mientras que en el buffer de digestión, lo que se utiliza es RPMI libre. El resto de componentes para los dos tipos de buffer son iguales. Se preparó un buffer de perfusión (100 ml) y uno de digestión (50 ml), para cada una de las ratas, y el procedimiento seguido fue igual para todas ellas.

❖ *RP10:*

Su preparación se realiza siempre en campana, y para obtener 500 ml de RP10 se necesitan 50 ml de FBS/FCS al 10% + 5 ml de Penicilina/Estreptomicina al 1% + 5 ml de L-Glutamina al 1% + 440 ml de RPMI.

Laboratorio

La digestión del tejido hepático se produjo, primero, de forma mecánica, cortando el hígado con tijeras en trozos pequeños dentro del falcon.

La masa resultante se centrifugó 10 min a 1300 rpm y a 4°C. Se retiró el sobrenadante con cuidado con una pipeta, y se resuspendió en buffer de digestión para enrasar en 50 ml. Unos 50 ml de RPMI libre se metieron en el baño a 37°C justo al llegar al laboratorio, para que el buffer de digestión estuviera a temperatura de uso. Las enzimas y el Mg²⁺, previamente alicuotados, se añadieron en el momento de uso, de la misma forma que con el buffer de perfusión. La Colagenasa I, también se añadió sólo para los hígados cirróticos, y se utilizó para digerir enzimáticamente el tejido hepático.

La mezcla anterior se incubó en agitación, a 37°C y durante 1 hora. Dicha mezcla se pasó por la columna de tamices. Se lavó con RPMI libre y se centrifugaron los falcons. Se conservó el sobrenadante donde se encontraban los hepatocitos y se centrifugó.

Los pellets se lisaron con 10 ml de solución de lisado. Tras centrifugar, se resuspendió en 10 ml de RP10 y se llevó a cabo el conteo de células para realizar la separación de las células de Kupffer con anticuerpos específicos de hematíes (Anti CD68:PE y Anti PE).

Se procedió a su purificación mediante columnas de separación magnética, siguiendo las instrucciones. La fracción negativa de cada tubo se volvió a pasar por la columna para intentar maximizar el número de células de Kupffer que se recogían.

Finalmente, se contaron las células y se resuspendieron en 4 ml de RP10. De esta forma, se tenían aproximadamente 4 M de células en 4 ml, por lo que la cantidad de muestra a coger para que en cada pocillo se tuviesen 0,5 M de células, eran 0,5 ml/ pocillo.

Cultivos

Las placas contenían las células (0,5x10⁶) junto RP10 sólo (controles), RP10 + LPS (100 ng/ml), o RP10 + UFC de cada una de las cepas según correspondiera (del 1 al 6). Éstas se mantuvieron en cultivo durante 48 horas y a 37°C en estufa, tras lo cual se resuspendió cada pocillo, y se pasó su contenido a distintos Eppendorfs, los cuales se

centrifugaron para que precipitaran las células, y se recogió el sobrenadante. Se pasaron a Eppendorfs limpios y se guardaron en nevera.

ELISAs

La realización de ELISAs para medir los niveles del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la proteína quimioatrayente de monocito 1 (MCP-I) y la interleuquina 6 (IL-6), se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (R&D).

Para cuantificar las muestras, se obtuvo una curva de calibrado para cada citocina, de acuerdo con las siguientes concentraciones:

	<i>Estándar</i> (pg/ml)	<i>Tubo 1</i> (pg/ml)	<i>Tubo 2</i> (pg/ml)	<i>Tubo 3</i> (pg/ml)	<i>Tubo 4</i> (pg/ml)	<i>Tubo 5</i> (pg/ml)	<i>Tubo 6</i> (pg/ml)	<i>Calibrator</i> <i>Diluent</i>
<i>IL-6</i>	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	0
<i>TNF-α</i>	800	400	200	100	50	25	12,5	0
<i>MCP-1</i>	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0

La absorbancia se midió en un lector automático de placas a 450 nm, realizando una corrección a 560 nm.

Análisis estadístico

Se realizará un análisis descriptivo de las variables recogidas en el estudio. Las variables continuas se describirán usando media y desviación estándar. 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. Se considerará significativo un valor $p < 0,05$. Todos los análisis se realizarán usando el programa SPSS versión 16.0.

- **Resultados**

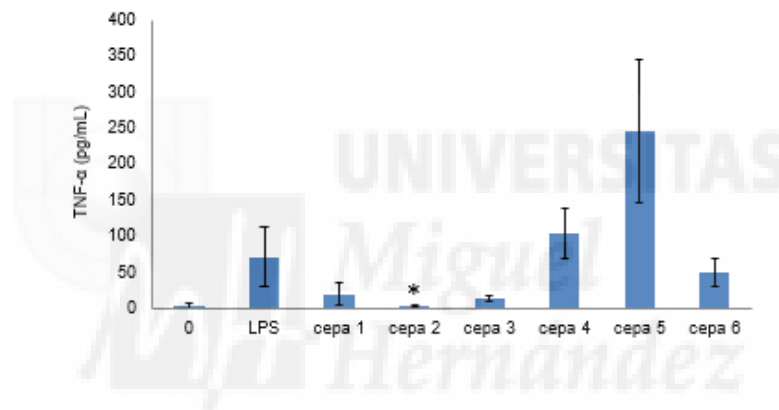
Características de los animales

Cuatro animales murieron durante el protocolo de inducción de cirrosis en las semanas siguientes, y a las 6 restantes se les pudo realizar una laparotomía. La cirrosis se confirmó histológicamente por las deposiciones de colágeno.

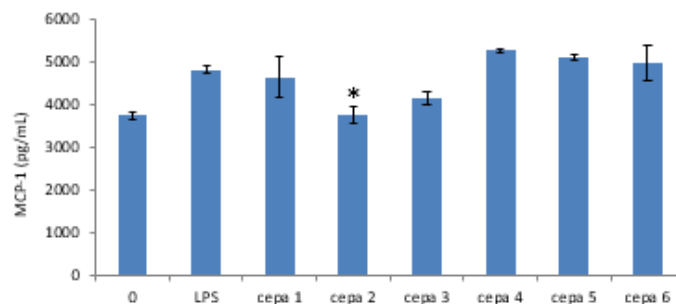
Se realizaron los procedimientos previos sobre las muestras, incluidas la incubación con anticuerpo y la separación magnética. El rendimiento medio de la separación fue de $4,14 \pm 0,02 \times 10^6$ células.

ELISAs

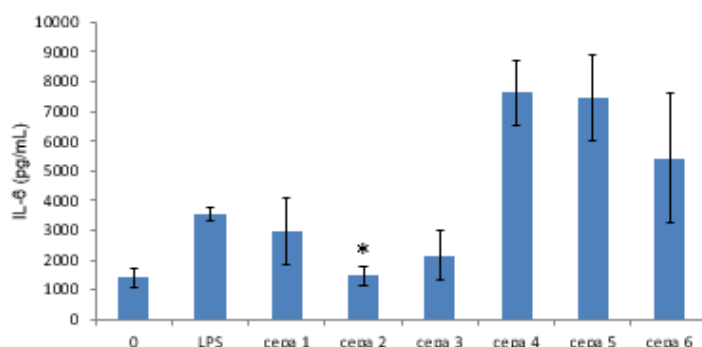
A continuación se muestra el resultado para las distintas citocinas obtenido tras la realización de los ELISAs.



En el caso del TNF- α , se observan niveles bajos en la producción del factor de necrosis tumoral en las cepas 1, 2 y 3 cultivadas junto a los macrófagos de las ratas cirróticas. Estos valores son menores que los observados cuando se estimula con LPS. Sin embargo, la cepa 2 es la única cuyo valor es muy similar al obtenido en condiciones sin estímulo y significativamente inferior al resto de condiciones.



En el caso de MCP-1, los datos se presentan de forma muy similar a los anteriores, es decir, que los niveles más bajos en la producción de MCP-1 se corresponden con la cepa 2, cuyos valores son significativamente inferiores a los observados en los sobrenadantes de los cultivos con el resto de cepas.



Finalmente, los datos obtenidos para IL-6 confirman que la cepa 2 presenta valores significativamente inferiores al resto de cepas y similar a las condiciones no estimuladas en la producción de IL-6.

Discusión

Las células de Kupffer aisladas de rata cirrótica han mostrado que los niveles de los tres mediadores inflamatorios evaluados (TNF-alfa, IL-6 y MCP-1) varían en los sobrenadantes dependiendo de las cepas con las que son cultivadas. De todas las cepas evaluadas, la Cepa 2 es la única que muestra niveles de citocinas significativamente inferiores a los mostrados en los sobrenadantes de células cultivadas con LPS y similares a los obtenidos en células no estimuladas.

Esto supondría un primer paso para considerar el uso de dicha cepa como suplemento terapéutico en el manejo de la cirrosis. Sin embargo, para poder confirmar el efecto homeostático de la cepa, habría que cultivar las células con mediadores anti-inflamatorios como IL-10 o TGF-beta. Si la cepa mostrara un aumento en la secreción de estos mediadores en los sobrenadantes de los cultivos sería beneficioso en la cirrosis hepática, ya que al modular la respuesta inflamatoria se controlaría la homeostasis intestinal, reduciendo la permeabilidad de la barrera y los episodios de traslocación bacteriana.

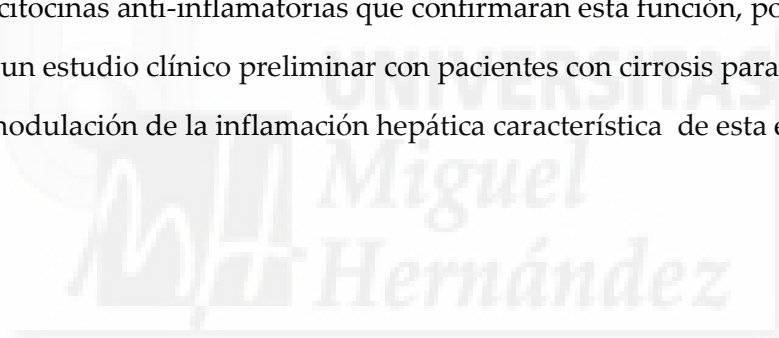
La mejora en la homeostasis intestinal y la reducción de episodios de traslocación bacteriana podría reducir la aparición de complicaciones clínicas relevantes durante la evolución de la enfermedad.

- *Conclusiones y proyección futura*

Del presente estudio se concluye que:

1. El estímulo de células de Kupffer de rata con cirrosis inducida por obstrucción del conducto biliar con la cepa número 2 no aumenta los niveles de producción de TNF- α , MCP-1 e IL-6, con lo que se modula la respuesta inflamatoria.
2. Los resultados obtenidos sugieren la potencialidad de la cepa 2 como agente homeostático en condiciones inflamatorias.

La realización de más estudios con la cepa, incluidos los destinados a evaluar la secreción de citocinas anti-inflamatorias que confirmaran esta función, podrían llevar al diseño de un estudio clínico preliminar con pacientes con cirrosis para evaluar su efecto en la modulación de la inflamación hepática característica de esta enfermedad.



- **Bibliografía**

1. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* (2005)
2. Pascual S, Such J, Esteban A, et al. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* (2003)
3. Jennifer E. Lambert, Jill A. Parnell, Bertus Eksteen, Maitreyi Raman, et al. (2015) Gut microbiota manipulation with prebiotics in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial protocol. *BMC Gastroenterology*.
4. Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP). Declaraciones consecuentes del VI Workshop de Probióticos, Prebióticos y Salud. *Evidencia Científica*. (2015)
5. Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Moya A, Peiro G, Zapater P, et al. (2014) Protective effect of Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int*.
6. Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Moya A, Peiro G, Zapater P, et al. (2015) Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrosis. *European Journal of Nutrition*.
7. Moratalla A, Caparrós E, Juanola O, Portune K, Puig-Kröger A, et al. (2015) Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 induces an M2 anti-inflammatory transition in macrophages from patients with cirrosis. *Journal of Hepatology*.