



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

Análisis de la expresión del factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$) en hígados de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y probióticos, por PCR en tiempo real.

ALUMNA:

JAQUELINE MANCHOLA GÓMEZ

MATRÍCULA:

2182035518

ASESORES:

DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA

DR. JULIO ISABEL PÉREZ CARREÓN

Febrero, 2025

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
HÍGADO	5
DIETA OCCIDENTAL	10
ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.....	11
FISIOPATOLOGÍA DE LA EHGNA.....	12
ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO EN MÉXICO	15
MICROBIOTA INTESTINAL Y EL HÍGADO	16
MICROBIOTA EN EHGNA	17
PROBIOTICOS, PREBIOTICOS Y MICROBIOTA.....	18
PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS: SU APLICACIÓN EN EHGNA	18
CITOCINAS INFLAMATORIAS	19
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (<i>TNF-α</i>)	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
ANTECEDENTES	24
MATERIALES Y METODOS.....	26
MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	26
MODELO EXPERIMENTAL	27
PREPARACIÓN DE DIETAS	27
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	28
TINCIÓN DE TEJIDOS FRESCOS CON HEMATOXILINA & EOSINA	29
EXTRACCIÓN DE RNA DE HÍGADOS DE RATAS	29
OBTENCIÓN DE CDNA	30
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>TNF-α</i> POR PCR EN TIEMPO REAL.....	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
EVALUACIÓN DE LA GANANCIA DE PESO CORPORAL EN LAS RATAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES ...	32
EVALUACIÓN DE PRESENCIA DE COLESTEROL, TRIGLICÉRIDOS, GLUCOSA Y ENZIMAS DE DAÑO HEPÁTICO EN LAS BIOQUÍMICAS SANGUÍNEAS DE LAS RATAS	33
EVALUACIÓN DEL PESO DE LOS HÍGADOS DE LAS RATAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES	41
TINCIÓN DE TEJIDOS FRESCOS CON HEMATOXILINA & EOSINA (H&E).....	44
EXTRACCIÓN DE RNA DE HÍGADOS DE RATAS.....	46
CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>TNF-α</i>	48
CONCLUSIÓN	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

INTRODUCCIÓN

El hígado se interpone anatómicamente entre la corriente sanguínea porta proveniente del intestino y la circulación sistémica. Es el único órgano de la cavidad abdominal que tiene un doble sistema de aporte sanguíneo, la vena porta y la arteria hepática. La vena porta es el tronco final formado por la unión de las venas esplénica y mesentérica, y conduce al hígado toda la sangre procedente del bazo, el páncreas, el estómago, el duodeno, el intestino y el mesenterio (Ubeda, M., 2010). Es un órgano indispensable para el metabolismo lipídico, puesto que es capaz de captar el exceso de ácidos grasos de la circulación y oxidarlos mediante la β -oxidación (FAO) o bien acumularlos en forma de triglicéridos. Si alguna de las vías que llevan a cabo la regulación y control de este proceso se ve alterada, daría lugar a un desequilibrio entre la captación y eliminación de lípidos (homeostasis lipídica) lo que generaría la acumulación de grasa en los hepatocitos y posterior desarrollo del hígado graso no alcohólico (HGNA). Estas vías implicadas son cuatro: la captación de lípidos circulantes, lipogénesis *de novo*, oxidación de ácidos grasos llevada a cabo en las mitocondrias y peroxisomas de los hepatocitos, y la exportación de lípidos en lipoproteínas de muy baja densidad (secreción de VLDL) (Robledo, R., 2019).

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA) es una afección en la cual se acumula exceso de grasa en el hígado (Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales; 2021). Normalmente el hígado tiene 5 g de grasa por cada 100 g de peso, con una mayor abundancia de los fosfolípidos, que llegan a constituir aproximadamente hasta 50% del contenido total; en menos proporción, es decir, en 7%, se hallan los triglicéridos y el colesterol no esterificado. La condición indispensable para el desarrollo de HGNA es la retención de triglicéridos y ácidos grasos provenientes del tejido adiposo en los hepatocitos, los que se acumulan por la pérdida del balance entre la captación, la síntesis, la salida y la oxidación de los ácidos grasos libres (AGL), asociado a una disminución de la actividad de la insulina, cuya función es inhibir el metabolismo de los triglicéridos en el tejido adiposo, aumentar la síntesis intrahepática de AGL y de triglicéridos, e impedir la β -oxidación de los AGL en los hepatocitos (Del Valle, S., *et. al.*, 2015).

La historia natural del hígado graso se encuentra sincronizada con los componentes del síndrome metabólico, debido al efecto sinérgico entre mediadores proinflamatorios como la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- α*), secretado por las adipocinas (Almarza, J., 2010). La inflamación a nivel intestinal, tanto bacterias como virus interactúan

con una serie de receptores específicos que incluyen TLRs (toll-like receptors) y NLRs (nod-like receptors). Agregado a esto se presenta la interacción entre microorganismo y receptores, lo que puede producir activación de multi-complejos proteínicos citoplasmáticos, denominados en su conjunto inflamosoma, al que se le atribuye una propiedad de disminución de la grasa hepática. La disbiosis produce un patrón de activación de receptores anómalo, desencadenando en producción de citoquinas inflamatorias, como por ejemplo el *TNF- α* , defectos en función del inflamosoma y exacerbación de la disrupción de la barrera intestinal (Araneda, G., **et al.**, 2016).

La dieta es un factor de riesgo para la enfermedad de hígado graso no alcohólico, ya que una dieta alta en grasa aumenta la actividad de endocannabinoides, mediadores lipídicos que actúan sobre los receptores cannabinoides para alterar el metabolismo de los lípidos; una dieta alta en carbohidratos provoca sin duda un daño hepático. Consumir demasiados carbohidratos en la dieta es otra posible causa de esta enfermedad. Por otra parte, cuando combinamos un alto consumo de grasa y fructosa en la dieta esto provoca un mayor aumento de la inflamación y daño metabólico (Carvallo, P., **et al.**, 2017).

Los probióticos tienen la capacidad de regular y mejorar la disbiosis observada en pacientes con HGNA mejorando la disfunción de la barrera intestinal y evitando el paso de endotoxinas a nivel sistémico por lo que serían una buena estrategia terapéutica². Analizando lo anterior se planteó una dieta alta en grasa y fructosa para la alimentación de ratas Wistar macho durante 6 semanas, además de la administración de inulina como prebiótico para estimular el crecimiento y la actividad de bacterias potencialmente saludables para la función intestinal como el probiótico *Bifidobacterium sp.* Por lo cual, el propósito de esta investigación es hacer un análisis de la expresión del *TNF- α* como marcador de inflamación en hígados de rata alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, y su papel en el desarrollo del HGNA.

MARCO TEÓRICO

Hígado

El hígado es un órgano que se encuentra dentro de la cavidad abdominal por debajo del diafragma, su color característico es café-rojizo y su peso es alrededor de 1.5 kg en los adultos, consta de 4 lóbulos de los que destacan principalmente el lóbulo derecho e izquierdo los cuales están divididos por el ligamento falciforme (Cardoso, I., 2019). Este órgano es considerado multifuncional y de fisiología compleja; se encuentra irrigado por dos principales vías: la arteria hepática y la vena porta, mientras la arteria hepática aporta el oxígeno necesario a las células del órgano, la vena porta se encarga de brindar los nutrientes para el correcto funcionamiento (Figura 1) (Cardoso, I., 2019; Manterola, C., *et al.*, 2017). Esta conduce la sangre desde el tracto gastrointestinal y el bazo hasta el hígado. Posteriormente se ramifica en venas interlobares, segmentarias e interlobulillares, luego en vénulas portales preterminales y terminales que están rodeadas por escaso tejido conectivo y transportan sangre a los sinusoides hepáticos. Las ramas de la arteria hepática acompañan a las ramas de la vena porta y terminan en áreas porta en forma de arteriolas hepáticas terminales que drenan en los sinusoides hepáticos a través de ramitas de arteriosina. Cada área portal contiene una o más arteriolas hepáticas. Histológicamente, las arteriolas hepáticas terminales tienen una lámina elástica interna y una capa de células de músculo liso (Mamdouh, A., 2015).

Por otra parte, la arteria hepática, la vena porta, y junto con el ducto biliar forman la llamada triada porta, la síntesis de la bilis es propia del rol de los hepatocitos en el metabolismo de proteínas, grasas e hidratos de carbono y otros (Cardoso, I., 2019; Manterola, C., *et al.*, 2017).

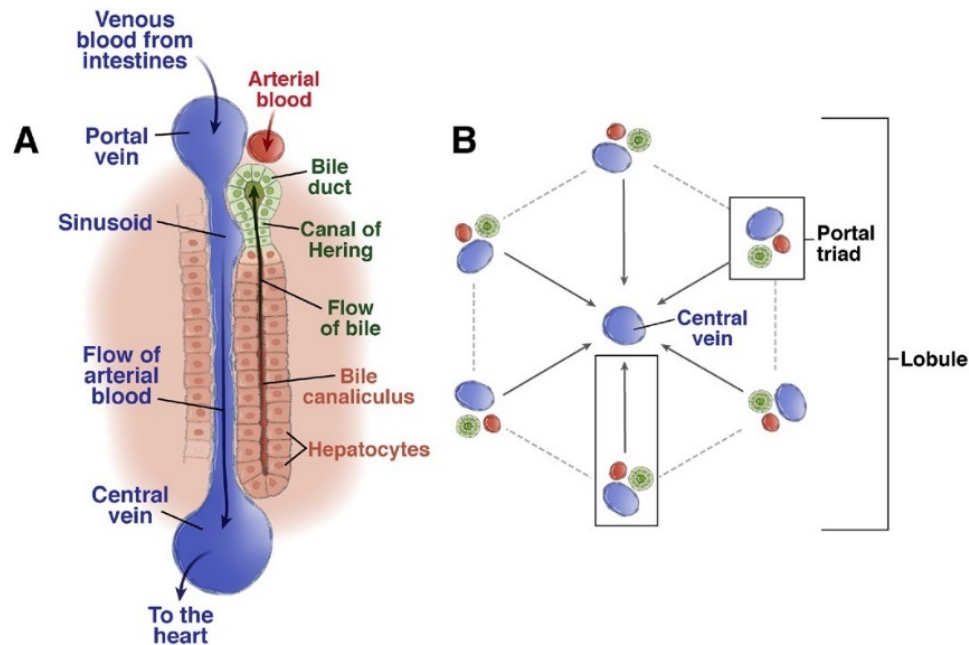


Figura 1. A) Estructura de la tríada portal, que consta de conducto biliar, arteria hepática y vena porta. La mezcla de sangre de la arteria hepática y la vena porta fluye por los hepatocitos a través de los sinusoides hasta la vena central. La bilis producida por los hepatocitos se recoge en los canalículos biliares y fluye hacia el conducto biliar. B) Cada lóbulo hepático consta de 1 vena central y 6 tríadas portales circundantes. (Fuente: Salama, H., *et al.*, 2008).

El hígado humano tiene una estructura microscópica tridimensional compleja formada por elementos epiteliales y mesenquimales que se organizan en unidades repetitivas. La estructura microscópica puede conceptualizarse de varias maneras, como el acino y el lóbulo. El acino es una unidad que contiene un pequeño espacio porta en el centro y vénulas hepáticas terminales en la periferia, se trata de la unidad funcional más pequeña y se divide en tres zonas (Figura 2). La sangre del espacio porta fluye por estas zonas hasta llegar a la vénula, con un gradiente decreciente de oxígeno y nutrientes. Las zonas acinares 1, 2 y 3 corresponden, respectivamente, a las zonas periportal, media y pericentral del lóbulo (Krishna M., 2014).

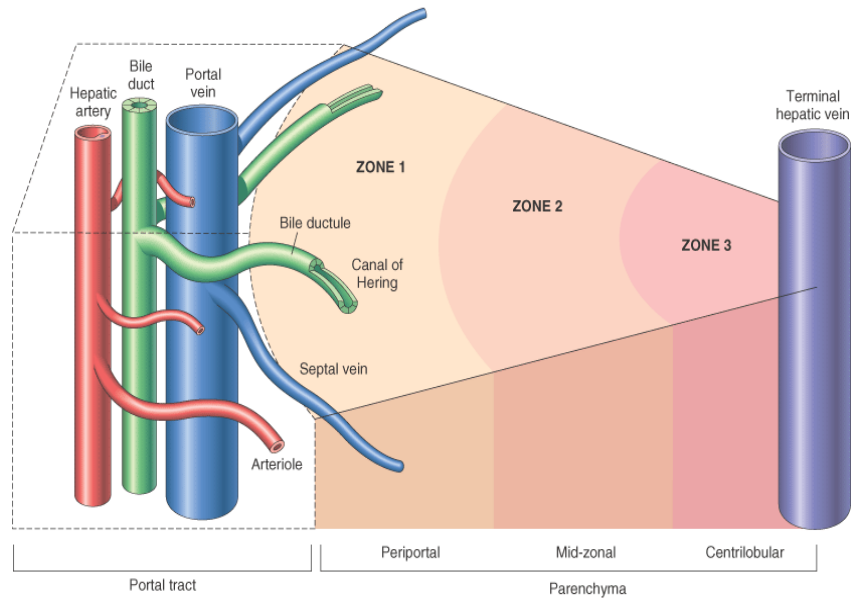


Figura 2. El acino hepático dispuesto alrededor de un tracto portal y una vena hepática terminal (vena central). Cada acino se divide en 3 zonas; la zona 1, incluye los hepatocitos periportales que reciben sangre con el mayor contenido de oxígeno, la zona 3, es la zona más periférica estrechamente relacionada con la vena central y recibe sangre con el menor contenido de oxígeno, y la zona 2, que es la región intermedia entre las zonas 1 y 3. (Fuente: Mamdouh, A., 2015)

Como alternativa, también puede utilizarse el concepto tradicional de lobulillo hepático, es la unidad estructural del hígado con un área hexagonal de tejido y contiene una única vena central que drena la sangre del lobulillo a través de la vena hepática que eventualmente drena en la vena cava inferior. En cada una de las 6 esquinas del hexágono se encuentra una tríada portal, que consta de tres estructuras: una vena porta (que transporta sangre rica en nutrientes desde los intestinos), una arteria hepática (que transporta sangre oxigenada desde el tronco celíaco desde la aorta abdominal), y un conducto biliar que drena la bilis (Figura 3). Esta red vascular establece un flujo sanguíneo unidireccional.

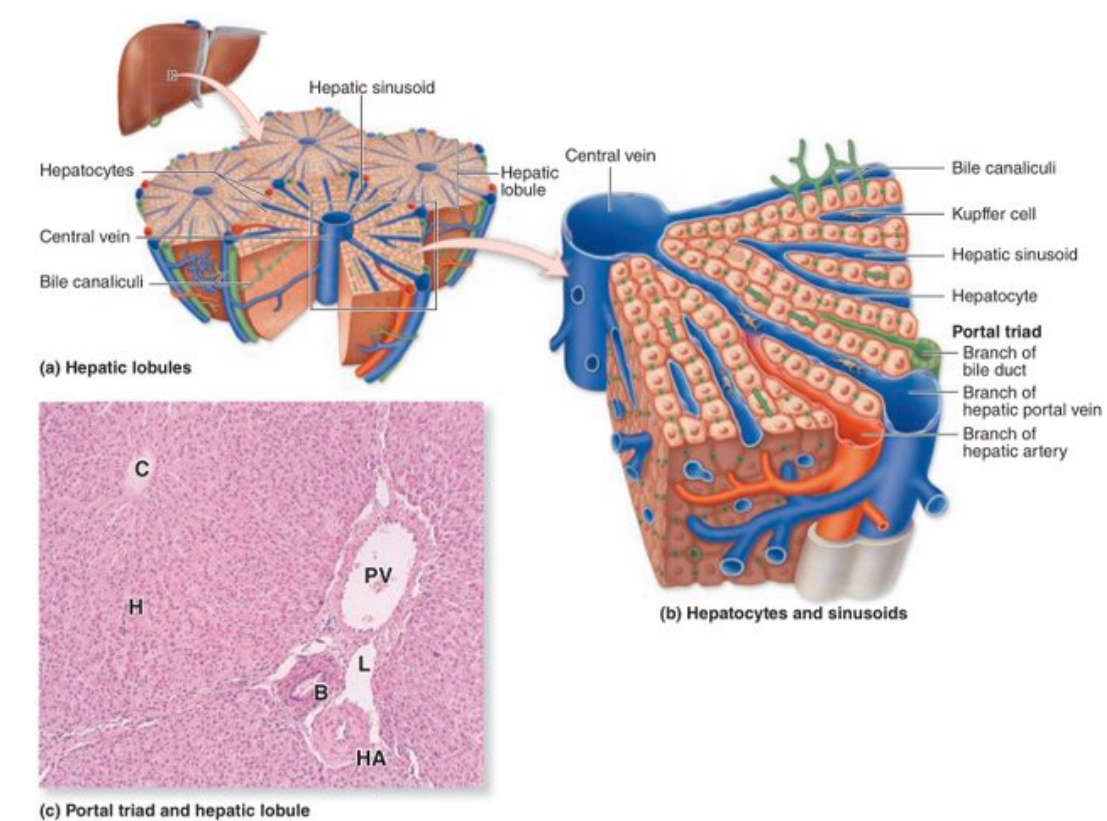


Figura 3. El lobulillo hepático. Se muestra la vena central y los conjuntos de vasos sanguíneos en su periferia. Los vasos sanguíneos se agrupan en el tejido conectivo de los espacios porta e incluyen una rama de la vena porta, de la arteria y del conducto biliar. Las triadas portales en cada esquina del hexágono, sinusoides y hepatocitos (Fuente: Mescher, A., 2013).

Las células que se encuentran en el hígado se dividen en dos principales grupos: las células parenquimatosas y las células no parenquimatosas, en el primer grupo se incluyen a los hepatocitos mientras que el segundo grupo está conformado por células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC), células de Kupffer (KC), natural killer (NK) y las células estrelladas hepáticas (Manterola, C., *et al.*, 2017).

Los hepatocitos suelen aparecer organizados en forma de cordones de una o dos células de grosor, separados por sinusoides. Son de forma poligonal, miden de 25 a 40 μm , y tienen un citoplasma eosinofílico abundante y un núcleo central. Su núcleo es redondo u ovalado y puede contener glucógeno. La membrana celular, que está parcialmente expuesta a los sinusoides (superficie basolateral), forma los canalículos biliares con el hepatocito

adyacente (superficie canalicular) y presenta una porción adyacente al canalículo que se une al hepatocito vecino mediante uniones especializadas (superficie lateral). El citoplasma contiene abundante retículo endoplasmático y glucógeno (Krishna M., 2014).

Los sinusoides son canales a través de los cuales fluye la sangre desde los espacios porta hasta la vénula hepática. Están revestidos por células endoteliales y células de Kupffer, que son una población especializada que pertenece al sistema fagocítico; las células de Kupffer descansan sobre una capa de reticulina. El revestimiento endotelial es una especie de lámina fenestrada que permite un fácil intercambio entre la sangre y los hepatocitos a través del espacio de Disse. Por el contrario, las células de Kupffer son irregulares y presentan extensiones citoplasmáticas que facilitan su función fagocítica. Además, recubriendo a los sinusoides hay linfocitos asociados al hígado (*pit cells*), que están en contacto con las células endoteliales o las células de Kupffer. Estas células también se encuentran en el espacio de Disse y presentan un fenotipo de linfocito T o fenotipo de célula tipo “natural killer”. El espacio de Disse es un compartimento situado entre las células endoteliales y los hepatocitos. Contiene plasma, tejido conectivo (colágeno de tipo 3) que forma el marco de reticulina y células estrelladas hepáticas (también llamadas “células de Ito”). Las células estrelladas, que pertenecen a la familia de los miofibroblastos y están íntimamente relacionadas con las terminaciones nerviosas pequeñas, desempeñan un importante papel en el control del flujo sanguíneo sinusoidal, la fibrogénesis y el almacenamiento de vitamina A (Krishna M., 2014) (Figura 4).

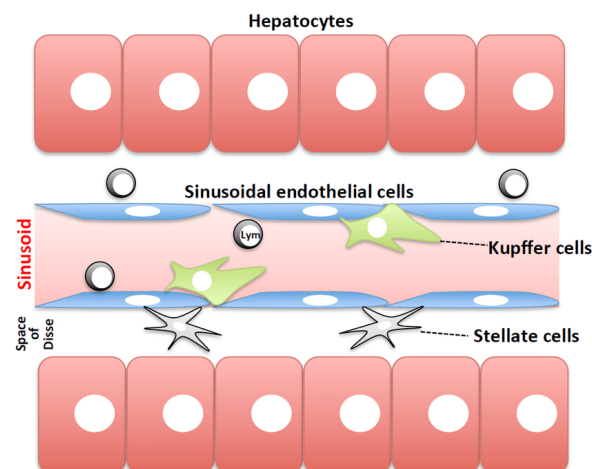


Figura 4. Estructura esquemática del hígado. La sangre circula dentro de los sinusoides en el hígado. Los sinusoides hepáticos están revestidos por células endoteliales sinusoidales y células de Kupffer. Los hepatocitos, o células parenquimatosas hepáticas, se localizan en el espacio de Disse, distantes del sinusoides. Las células natural killer (NK) y las células estrelladas son abundantes en el hígado. (Fuente: Tsutsui & Nishiguchi, 2014)

El hígado puede ser dañado de diversas maneras, ya sea por medio del abuso en el consumo de etanol; por ciertos virus como el de la hepatitis o por una dieta inadecuada, alta en carbohidratos y grasas; o por un defecto genético. La heredabilidad ha sido demostrada en varios estudios de secuenciación del exoma o asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome Wide Association Studies*) se han encontrado diversos genes involucrados en la susceptibilidad y progresión de la EHGNA y NASH (Aguilar, A, 2018).

Dieta Occidental

Se utiliza el término “dieta occidental” para un tipo de hábito alimenticio cada vez más extendido, caracterizado por el consumo excesivo de proteína de origen animal, alimentos procesados, grasas saturadas, azúcares refinados, junto a una escasa ingesta de fibra y vitaminas. Esta dieta, rica en calorías, se asocia al padecimiento de enfermedades como la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, dislipemias, cardiopatía isquémica, ictus y diferentes tipos de cáncer (Ursa, A., 2023).

La grasa es un macronutriente importante en la dieta occidental, es responsable del 35% de la ingesta calórica total. Una dieta rica en grasas puede conducir fácilmente a un consumo excesivo de alimento, aumenta la actividad de endocannabinoides, mediadores lipídicos que actúan sobre los receptores cannabinoides para alterar el metabolismo de los lípidos. Los receptores cannabinoides 1 (CB1) tienen efectos sobre el tejido adiposo y hepático; su estimulación aumenta la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo disminuyendo los niveles de adiponectina, aumentando la RI y disminuyendo la beta-oxidación de ácidos grasos (Carvallo, P., *et al.*, 2017). Una dieta rica en grasas puede llevar al desarrollo de la obesidad debido a la afectación del sistema homeostático (Díaz, D., *et al.*, 2018). La obesidad se define como una condición patológica que se caracteriza por el incremento de la masa corporal a expensas del compartimiento graso. Es considerada multifactorial, los elementos involucrados directamente sobre el desarrollo de esta son hábitos alimentarios inadecuados, sedentarismo y factores psicológicos; sin embargo, en los últimos años se ha reconocido que la interacción del genotipo y el estilo de vida pueden contribuir dramáticamente a la incidencia y prevalencia de la obesidad. Muchos de los mediadores fisiopatológicos de esta enfermedad desencadenan reacciones que alteran el funcionamiento hepático; la oferta de ácidos grasos provenientes del tejido adiposo incrementa el proceso de filtración (o infiltración) grasa y fibrosis del tejido hepático. Una de

las condiciones desencadenantes del desarrollo del hígado graso es el Síndrome Metabólico (SM), cuyo detonante fisiopatológico es la obesidad, en especial la de distribución central (Almarza, J., 2010).

El consumo de fructosa ha aumentado a nivel mundial en los últimos años, especialmente en países occidentales, esta es directamente metabolizada en el hígado y se transforma en glucosa, posteriormente es almacenada como glicógeno constituyéndose en una fuente de energía para los hepatocitos. Todo el exceso de fructosa se convierte en grasa lo que provoca resistencia a la insulina. Cuando las células se hacen resistentes a la insulina, el páncreas intenta regular los niveles de glicemia produciendo más insulina provocando mayor acumulación de tejido adiposo. También bloquea la acción de la leptina provocando sensación de hambre. Los niveles altos de insulina aumentan la presión arterial y disminuyen el HDL, provocando síndrome metabólico, obesidad y EHGNA (Carvalho, P., *et al.*, 2017).

Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es un trastorno metabólico que se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos de individuos sin consumo significativo de alcohol, de medicamentos hepatotóxicos, ni otras causas conocidas de esteatosis secundaria (Bernal, R. *et al.*, 2019).

En 1980 Ludwig y colaboradores acuñaron el término de esteatohepatitis no alcohólica para describir una serie de 20 pacientes evaluados en la Clínica Mayo a lo largo de diez años, quienes tenían evidencia histológica de hepatitis alcohólica sin historia de abuso de alcohol. Ludwig dividió a la EHGNA en dos grupos: EHGNA primaria asociada a la obesidad y EHGNA secundaria, la cual contempla complicaciones de cirugía bariátrica, fármacos, o se asocia con otras condiciones como la enfermedad de Wilson y la abetalipoproteinemia (Méndez, N., *et al.*, 2010).

La EHGNA es histológicamente categorizada como hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); el hígado graso se define como la acumulación de grasa en forma de triglicéridos en más del 5% de los hepatocitos demostrado por biopsia hepática, en ausencia de inflamación, fibrosis y un consumo de más de 30gr de alcohol al día (Beltran, A., *et al.*, 2015), y la esteatohepatitis se define como la presencia de esteatosis hepática e inflamación con daño hepatocelular (balonamiento de los hepatocitos) con o sin fibrosis. Se

le conoce también como NASH (non alcoholic steatohepatitis), la cual puede progresar a cirrosis, falla hepática y a carcinoma hepatocelular (HCC) (Castro, L., & Silva, G., 2015).

Los métodos diagnóstico para la EHGNA más utilizados en estudios clínicos son: ecografía abdominal, espectroscopía por resonancia magnética, medición de aminotransferasas y biopsia hepática que es considerada el “gold standard”. La prevalencia en población hispánica se ha estimado a nivel mundial entre 20-30%. En población de alto riesgo ésta alcanzaría el 50% en pacientes con sobrepeso, hasta el 95% en obesos, 70% en diabéticos tipo 2 y 50% en pacientes con dislipidemia (De Olivera, C., *et al.*, 2019).

Fisiopatología de la EHGNA

La fisiopatología básica de la EHGNA está asociada principalmente al estilo de vida (dieta y actividad física), raza, factores genéticos; la disbiosis intestinal puede contribuir a la liberación de endotoxinas y a la circulación portal, las cuales a su encuentro con el sistema inmunológico del hígado promueven y perpetúan inflamación con el posterior desarrollo de EHNA. La suma de los mecanismos con disfunción mitocondrial y estrés oxidativo causan la muerte de los hepatocitos, la posterior activación de las células estrelladas y el depósito de colágeno con el desarrollo de fibrosis y con el tiempo cirrosis hepática. El estímulo inflamatorio mantenido puede eventualmente causar cáncer hepatocelular, incluso sin la presencia de cirrosis; niveles altos de leptina, la cual es una citocina secretada por el tejido adiposo con un importante papel en la regulación del peso corporal. Altos niveles de leptina se asocian a una secreción reducida de insulina, al incremento en la gluconeogénesis y al consumo reducido de glucosa que finalmente causa hiperglucemia y resistencia a la insulina (Delgado, H., 2018).

La historia natural del hígado graso en individuos obesos está sincronizada con la patogénesis de la obesidad, el Síndrome metabólico (SM) y la diabetes mellitus tipo 2 debido a un efecto sinérgico entre los mediadores proinflamatorios característicos de estas condiciones. Aproximadamente 90% de los pacientes con HGNA tienen al menos una de las características del síndrome metabólico y 30% cumple con los tres criterios diagnósticos propuestos por el Programa Nacional de Educación en Colesterol (NECP/ATP III) (tabla 1). El rasgo distintivo del síndrome metabólico es la resistencia a la insulina (Uscanga, L., *et al.*, 2008).

Tabla 1. Definición de Síndrome metabólico para su diagnóstico clínico, de acuerdo con el Programa Nacional de Educación en Colesterol.

Obesidad	Perímetro abdominal > 88 cm en mujeres > 102 cm en hombres
Hipertrigliceridemia	> 150 mg/dL
Colesterol HDL	< 40 mg/dL en hombres < 50 mg/dL en mujeres
Hipertensión arterial	130/85 mmHg o diagnóstico previo
Diabetes mellitus o glucosa	110 mg/dL

Como sabemos el hígado capta de forma eficiente el colesterol de origen dietético transportado en forma de quilomicrones (QM) y el de origen endógeno, proveniente de los órganos periféricos, transportado por lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). El colesterol, así como los demás componentes lipídicos de la dieta, es absorbido por los enterocitos en el intestino delgado. Una vez dentro de los enterocitos, el colesterol es esterificado e incorporado, junto con los triglicéridos procedentes de la dieta de los QM, los cuales pasan a los canales linfáticos y después a la circulación sanguínea por la vena subclavia. Las lipoproteínas van descargando sus triglicéridos principalmente en el tejido adiposo (donde se almacena como reserva) y en musculo (aportando energía), debido a la presencia de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) en células endoteliales de los capilares que irrigan estos tejidos. La LPL hidroliza los triglicéridos, lo que permite la entrada de los ácidos grasos libres resultantes al interior de dichos tejidos (Figura 5) (Hernández, A., 2014).

Los ácidos grasos libres son el combustible principal oxidativo en el hígado; sin embargo, elevadas cantidades de carbohidratos y lípidos inducen cambios significativos en el metabolismo intermediario hepático. Los niveles altos de glucosa y de insulina estimulan la síntesis de AGL a partir de glucosa e inhiben la β -oxidación de AGL, redirigiendo a estos hacia la formación de triglicéridos. La acumulación de triglicéridos en el hígado se produce cuando se favorece la lipogénesis neta en lugar de la lipólisis. Así, la esteatosis hepática no alcohólica se produce cuando la síntesis de AGL por los hepatocitos excede el catabolismo (Hernández, A., 2014).

Una vez que se ha desarrollado la EHGNA, el hígado es sensibilizado y, por lo tanto, la respuesta inflamatoria se puede acelerar debido a una variedad de estímulos como el estrés oxidativo que origina la liberación de catepsinas lisosomales, la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico y la apoptosis celular, citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa), produciendo así la inflamación que activa a las células 2 estrelladas (células de Ito o adipocitos hepáticos) y el depósito de colágeno en los sinusoides hepáticos, siendo muy variable la posibilidad del hígado de recuperarse de este daño. Esto puede resultar en muerte celular necrótica, apoptosis y conducir a esteatohepatitis y, posteriormente, a fibrosis. Lo cual a su vez predispone a la aparición de cirrosis y en muchos casos puede derivar a hepatocarcinoma (Robledo, R., 2019).

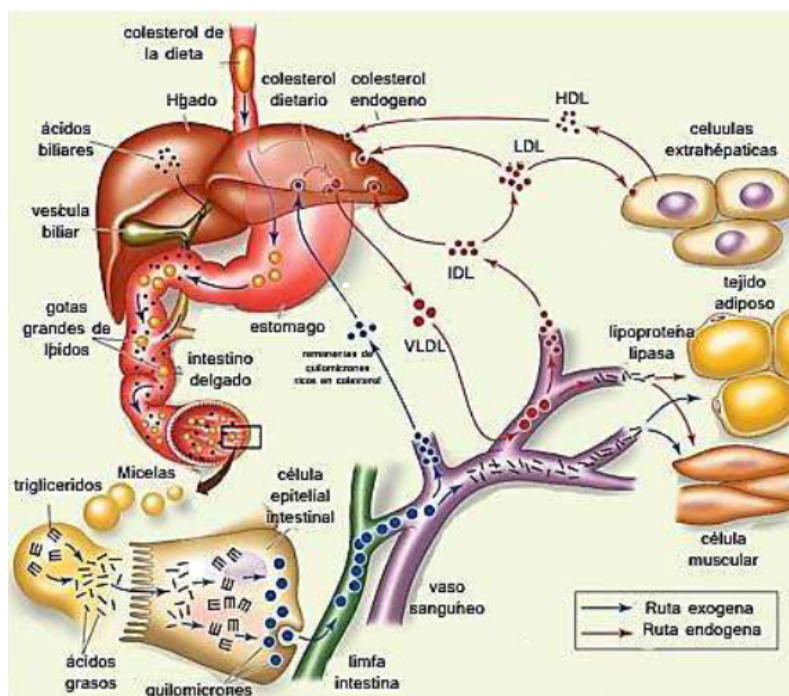


Figura 5. Esquema del metabolismo de grasas. IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: lipoproteínas de baja densidad; QM: quilomicrones; LPL: lipoproteína lipasa; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (Fuente: Hernández, A., 2014).

Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico en México

El hígado graso es una enfermedad considerada problema de salud pública en México por tener una elevada incidencia por obesidad. Para tratarlo, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) brinda atención multidisciplinaria con especialistas en nutrición, gastroenterología y medicina interna para revertir el proceso inflamatorio y recuperar la funcionalidad de este órgano (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2022).

En el 2008, la Asociación Mexicana de Gastroenterología elaboró las guías de diagnóstico y tratamiento de la hepatopatía grasa no alcohólica, el HGNA es la causa más común de enfermedad hepática crónica en países occidentales. La esteatosis hepática simple es la alteración más frecuente del hígado. En México, una estimación aproximada es la publicada por Lizardi y colaboradores., quienes analizaron 2,503 ultrasonidos en personas que asistieron a una revisión clínica de rutina. En 427 (14%) encontraron cambios morfológicos sugerentes de esteatosis. La prevalencia de esteatohepatitis, evaluada en tres estudios mexicanos, varió de 4.6 a 15.7%. Como en otras publicaciones, el factor de riesgo más común fue el síndrome metabólico (Uscanga, L., *et al.*, 2008).

En agosto de 2017 la Asociación Mexicana de Gastroenterología y la Asociación Mexicana de Hepatología acordaron llevar a cabo el Consenso Mexicano Sobre la Enfermedad por Hígado Graso No Alcohólico y convocaron a 6 coordinadores y 29 participantes adicionales que integraron el grupo de consenso; ellos realizaron una revisión actualizada del tema, evaluaron la evidencia, elaboraron enunciados y los discutieron hasta alcanzar acuerdos.

En 2022 la doctora Laura Serrano Alejandri, jefe de Área adscrita a Enlace y Vinculación de la División de Hospitales de Segundo Nivel, explicó que el tratamiento que otorga el Seguro Social consiste en un programa de alimentación saludable con el plato del buen comer, terapia nutricia individualizada a personas con otros padecimientos asociados; reducción de peso y realizar actividad física. Destacó que personal profesional de Nutrición asesora y monitorea a los pacientes en todos los niveles de atención del IMSS, que se complementa con la vigilancia del médico gastroenterólogo y/o internista, si existe evidencia de complicaciones o proceso inflamatorio hepático, para identificar factores agregados. La especialista invitó a la población a ser consciente en su autocuidado, bajar de peso, evitar sedentarismo, correcta alimentación, limitar ingesta de azúcares refinados y harinas, acudir a consulta a la Unidad de Medicina Familiar, realizar las detecciones prioritarias de

PREVENIMSS, acciones que permiten prevenir y atender oportunamente las enfermedades hepáticas (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2022).

Microbiota intestinal y el hígado

La microbiota se refiere a los microorganismos que colonizan el cuerpo humano y animal. Estos microorganismos se pueden clasificar según su comportamiento en comensales, mutualistas y patógenos. Tiene funciones específicas para el organismo y puede considerarse como un órgano que impacta tanto en la salud como en la enfermedad. La colonización inicial del sistema digestivo por microorganismos se produce debido a la exposición de la descendencia al microbioma vaginal de la madre y cambia con el tiempo según la ingesta dietética en la microbiota de un adulto. Se estima que el microbioma intestinal humano comprende entre 10 y 100 billones de microorganismos, principalmente bacterias. Entre los grupos bacterianos más comunes se encuentran *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, mientras que la mayoría de *Archaea* es *Euryarchaeota* (Mesquida, M., *et al.*, 2023).

Hay una relación anatómica y funcional entre la microbiota y el hígado, el eje intestino-hígado, el intestino posee la superficie de revestimiento epitelial más grande del cuerpo y funciona como una interfase entre el medio externo y el medio interno del organismo. Debido a que la permeabilidad intestinal es un proceso biológico que incluye la interacción del sistema inmunitario con varias sustancias en la región luminal, así como su ingreso altamente regulado a través del tracto digestivo y acompañado de una variedad de efectos metabólicos particularmente relevantes para el hígado. El epitelio del intestino constituye una barrera dinámica, semipermeable y reversible que permite el paso de moléculas por difusión facilitada o diferencia de gradientes, cuando su integridad se ve afectada es capaz de adaptarse en respuesta a cambios ambientales e internos teniendo un disbalance entre la microbiota intestinal, la integridad de la mucosa colónica y el sistema inmune, esto es un factor de riesgo en el desarrollo y progresión de hígado graso no alcohólico y la obesidad (Robledo, R., 2019, Mesquida, M., *et al.*, 2023).

En los últimos años, se ha postulado que cambios en la microbiota intestinal pueden desencadenar alteraciones metabólicas como la diabetes, la obesidad o el síndrome metabólico.

Microbiota en EHGNA

Como se mencionó anteriormente el hígado graso no alcohólico es causado por muchos factores como el exceso de calorías, la obesidad y la falta de ejercicio; y se desarrolla por diferentes mecanismos los cuales incluyen la exposición a citoquinas inflamatorias, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo, la lipotoxicidad debida principalmente a los ácidos grasos libres, y la predisposición genética, no obstante, la exposición del hígado a las endotoxinas de las bacterias intestinales, asociada a inflamación persistente del hígado, la disbiosis intestinal (con elevada proporción de *Firmicutes/Bacteroidetes*) y la permeabilidad intestinal, contribuyen a la progresión de la enfermedad a esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis, cirrosis, y eventualmente a carcinoma hepatocelular (HCC). Se ha encontrado que la permeabilidad intestinal se correlaciona con la gravedad de la enfermedad hepática e interrupción de las uniones estrechas, además, se han identificado niveles más altos de endotoxinas en la sangre de pacientes con EHGNA como medida indirecta del aumento de la translocación de bacterias (Villalobos, M., 2023, Gómez, E., *et al.*, 2015).

Para comprender el papel de la microbiota en EHGNA, un estudio prospectivo transversal evaluó la composición de la microbiota en un grupo de pacientes con EHGNA diagnosticados mediante biopsia y sujetos controles, encontrando que los primeros tuvieron menor porcentaje de *Bacteroidetes* en comparación a esteatosis simple y controles, independiente del índice de masa corporal (IMC) y del tipo de dieta. Asimismo, se ha descrito una microbiota intestinal especial para esteatosis simple, EHNA, fibrosis y HCC, caracterizándose por una disminución relativa gradual de la diversidad de la microbiota intestinal, que es independiente de IMC y la resistencia a la insulina. Estas diferencias han llevado a que distintos autores planteen los siguientes mecanismos de acción de la microbiota intestinal sobre la enfermedad HGNA: i) aumento de la disponibilidad y absorción de energía por la digestión de polisacáridos, formación y absorción de monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta; ii) aumento de la permeabilidad intestinal lo cual contribuye a la activación de una cascada proinflamatoria; iii) aumento de marcadores de diferenciación del sistema inmune; iv) disminución de disponibilidad de ácidos biliares lo cual aumentaría la permeabilidad intestinal; v) reducción de colina disponible, contribuyendo a una alteración en el metabolismo lipídico y vi) aumento de la producción de etanol endógeno (Tumani, M., *et al.*, 2021).

Probióticos, prebióticos y microbiota

La OMS define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”. Los probióticos pueden tener efectos en varios aspectos de la fisiología, como la digestión, el metabolismo y la inmunología. Estos son capaces de mejorar la función de la barrera intestinal, disminuir la endotoxemia y, en consecuencia, aliviar la inflamación crónica (Mesquida, M., *et al.*, 2023).

Por otro lado, los prebióticos se define como ingredientes no digeribles de la dieta (generalmente fibras), cuya administración modifica el medio intestinal, lo que a su vez estimularía selectivamente el crecimiento y la actividad de determinadas bacterias intestinales que tienen el potencial de mejorar la salud del huésped (Soriano, G., *et al.*, 2013), además ejerce un efecto protector contra la endotoxemia asociada a la obesidad, favorecer la disminución de peso corporal y provoca sensación de saciedad (Robledo, R., 2019). Se ha informado que la inulina (INU), un tipo de fibra dietética no digerible que se encuentra en una hierba *alcachofa de Jerusalén* muestra un efecto beneficioso al regular la comunidad microbiana intestinal. Un mayor número de estudios han demostrado que la INU atenúa los trastornos metabólicos al mejorar los lípidos séricos, la glucosa en sangre en ayunas y la resistencia a la insulina al restaurar la composición de la microbiota intestinal (Bao, T., *et al.*, 2020).

Existen evidencias de la eficacia de las bacterias probióticas en ciertas patologías, y suficientes estudios experimentales en otras para justificar posibles mecanismos de acción que faciliten el desarrollo de microorganismos más efectivos, así como para definir los límites de su efectividad (Robledo, R., 2019).

Probióticos y prebióticos: su aplicación en EHGNA

Se ha demostrado que los probióticos que contienen diferentes especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son capaces de modificar la microbiota intestinal, las citocinas inflamatorias y la permeabilidad intestinal en pacientes con EHGNA (Mesquida, M., *et al.*, 2023). Los probióticos representan una estrategia factible dada la íntima relación que existe entre el microbiota intestinal, los productos microbianos, y el hígado a través del sistema porta. Entre otros efectos pueden regular el crecimiento bacteriano, suprimir bacterias patógenas, además de que tienen propiedades inmunomoduladoras y son capaces de reforzar la barrera mucosa (Bao, T., *et al.*, 2020). En situación de disbiosis, los

carbohidratos ingeridos con la dieta serán fermentados a ácidos grasos de cadena corta los cuales pueden ser alterados produciendo incrementos de lipopolisacáridos (LPS) en la circulación portal de la salida de bacterias intestinales producida por un aumento en la permeabilidad intestinal. Si se altera la microbiota, disminuye la capa de moco colónico, incrementa la permeabilidad de la barrera mucosa del intestino y la susceptibilidad a los patógenos que atraviesan la barrera intestinal dando lugar a endotoxemia (por altos niveles de LPS) en sangre (Robledo, R., 2019).

En un estudio realizado en 2023 por Zhandong Yang y colaboradores demostraron que la ingesta de inulina alivió la esteatosis hepática probablemente al regular la composición y función de la microbiota intestinal y al restaurar la integridad de la barrera intestinal, lo que puede proporcionar una noción novedosa para la prevención y el tratamiento de la EHGNA en el futuro (Zhandong, Y., *et al.*, 2023).

En casi todos los estudios, independientemente del probiótico administrado, se ha observado la regulación negativa de los genes relacionados con la lipogénesis y la regulación positiva de los relacionados con la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos. En este sentido, la administración oral de probióticos produce un aumento en la expresión de genes, como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), el coactivador-1 α de PPAR γ (PGC1 α) y la carnitina palmitoiltransferasa-1 α (CPT1 α), y una disminución en genes como la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1 (SREBP-1), la sintetasa de ácidos grasos (FAS), la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC) y la coenzima A desaturasa 1 (SCD1) en comparación con los grupos HFD, lo que conduce a menos esteatosis hepática. PPAR α es el principal factor que controla la oxidación de los ácidos grasos producidos en las mitocondrias y, por lo tanto, su activación después de la ingestión de probióticos puede aumentar la tasa de β -oxidación de los ácidos grasos hepáticos y reducir la esteatosis (Mesquida, M., *et al.*, 2023).

Citocinas inflamatorias

La inflamación es una respuesta inmunitaria ante agresiones tanto exógenas como endógenas, un daño en el organismo que puede ser causado por agentes de distinta naturaleza, ya sean mecánicos (un golpe o una fractura), infecciosos (alguna bacteria o virus), químicos (por contacto con alguna sustancia agresiva), entre otros; por lo que se considera una de las maneras en las que el cuerpo reacciona contra una infección, lesión u otras afecciones médicas (Gross, V., *et al.*, 2023).

Entre las moléculas que conducen a la inflamación se encuentran las citocinas, estas son un grupo de proteínas y glucoproteínas que pueden ser producidas tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. En la respuesta inmunitaria innata dichas hormonas se originan principalmente por los fagocitos mononucleares, por lo que se conocen como monoquinas; en tanto, las linfoquinas son las citocinas producidas por los linfocitos T activados en la respuesta inmunitaria adquirida. En ambas fases, estas moléculas son secretadas con la finalidad de mediar y regular las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Cabe señalar que la secreción de citocinas es un proceso breve y autolimitado; la expresión de muchos de sus receptores está regulada por señales específicas (Gross, V., *et al.*, 2023).

Entonces, las citocinas se agrupan con base en su función: las secretadas por linfocitos Th1 (T colaboradores o helper tipo 1) con función proinflamatoria: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2) e IL-6; Th2 antiinflamatorio: IL-4, IL-10 e IL-13 y Th17 proinflamatorio crónico: IL-17, IL-22, IL-23, entre muchas otras (Cisneros, R., *et al.*, 2017).

Las citocinas constituyen una compleja red de interacciones que conecta distintos tipos celulares y en la cual cada una de las citocinas actúa al inducir o suprimir su propia síntesis o la de otras citocinas o sus receptores. Por otro lado, todo ello define una red dotada de gran flexibilidad y capaz de compensar la falta de uno de sus componentes. De igual manera, debe considerarse que la solubilización de los receptores de las citocinas tras su unión con la correspondiente citocina interviene también en este entramado biológico, y pueden actuar como inhibidores de la correspondiente citocina (como sucede con los receptores solubles de la IL-2 o del TNF, por ejemplo) o como agonistas (como el receptor soluble de la IL-6) (Filella, X., *et al.*, 2002).

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una de las tantas proteínas que conforman la superfamilia de citoquinas que presentan un rol preponderante en la regulación de la inflamación, la inmunidad adaptativa, la apoptosis y la respuesta autoinmune (Valle, J., 2022). Esta citoquina es secretada principalmente por células del sistema inmune, tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T, principalmente CD4+ (Sijia Lu, *et al.*, 2022). Si bien estas células son capaces de producir TNF- α , la célula que es considerada como productor primario de esta citoquina son los macrófagos (Valle, J., 2022).

En diversos estudios se ha demostrado una relación entre el índice de masa corporal, el grado de esteatosis, y la gravedad de la lesión hepática. Sin embargo, la distribución de la grasa corporal parece ser más importante en el desarrollo de esteatosis que la masa adiposa total (Bernal, R. *et al.*, 2019). El tejido adiposo secreta hormonas y citocinas que modulan la resistencia a la insulina y cascada inflamatoria, en el HGNA. Por ejemplo, el *TNF- α* tiene funciones extremadamente amplias en la homeostasis de los tejidos y su transducción de señales posteriores, regula la activación y proliferación celular, la muerte celular, la inflamación, el inmunometabolismo, así como la producción de muchas otras citoquinas (Sijia Lu, *et al.*, 2022).

La inflamación del hígado se considera una de las características distintivas para cambiar la transición de EHGNA a EHNA. Numerosas líneas de evidencia indican que el sistema *TNF- α* puede estar involucrado en la progresión de EHNA. En pacientes con este padecimiento, el nivel de *TNF- α* está elevado en suero, hígado y tejido adiposo, lo que sugiere una posible correlación entre sus niveles y la gravedad de esta enfermedad. El *TNF- α* es un regulador inflamatorio principal bien establecido debido a sus funciones clásicas en la activación de la vía intracelular del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Sijia Lu, *et al.*, 2022). Esta señalización sucede cuando el *TNF- α* se une a TNFR1, el cual es uno de sus receptores triméricos de membrana. El NF- κ B, se encuentra en interacción con sus inhibidores en el citoplasma; una vez liberado NF- κ B de sus inhibidores a través de la fosforilación mediada por varias cinasas, se transloca al núcleo celular, y expresa genes involucrados con la síntesis de proteínas relacionadas con la maduración de la respuesta inmune innata, la adaptativa, la inflamación y la autoinmunidad (Fragoso, J., *et al.*, 2014).

Durante el desarrollo de EHNA, las células Kupffer (KC) desempeñan funciones importantes en la modulación de la expresión de *TNF- α* . Las KC son macrófagos residentes en el hígado y están ubicados en la sinusoide hepática, que representan casi el 15% de la población total de células hepáticas. A nivel celular, las KC desempeñan un papel clave en la respuesta a la inflamación, y otros tipos de células, incluidos los hepatocitos, los monocitos y los neutrófilos, también contribuyen a la respuesta a la inflamación en el hígado. En resumen, los hepatocitos y las KC son las fuentes principales de producción de *TNF- α* en la etapa inicial de EHNA, mientras que los monocitos y macrófagos infiltrados contribuyen más tarde al círculo vicioso de la cascada de señalización de *TNF- α* en la progresión de EHNA (Sijia Lu, *et al.*, 2022).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es considerada la patología hepática más común en países occidentales, afecta entre 10 y 24% de la población general, porcentaje que oscila entre 58 y 74% en personas obesas⁵. En México estudios poblacionales han estimado una prevalencia de alrededor de 17.05% en población asintomática. La prevalencia y severidad del HGNA se correlacionan con el grado de obesidad (Krishna M., 2014).

En las enfermedades hepáticas, las alteraciones en la microbiota intestinal y los mecanismos de respuesta inflamatoria desempeñan un papel importante en la progresión de la enfermedad y el desarrollo de complicaciones, por lo que una dieta alta en grasas podría acelerar el proceso de inflamación, lo que implica el desencadenamiento de reacciones donde están involucradas células como monocitos, macrófagos y células dendríticas que liberan citocinas como el *TNF- α* , que actúa como un mediador importante de la respuesta inmunitaria e inflamatoria, por lo que es importante detectarlo en las fases tempranas de los procesos de inflamación y respuesta inmune. El análisis de la expresión de este *TNF- α* en un modelo curso temporal, permitirá indagar si el consumo de probióticos tiene un efecto sobre su expresión y el desarrollo de esta enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del factor de necrosis tumoral (*TNF- α*) como marcador de inflamación en hígados de rata alimentadas con dieta alta en grasa y probióticos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Inducir daño hepático en ratas mediante el modelo experimental de dieta alta en grasa y fructosa.
- Observar el efecto de la administración de *Bifidobacterium sp.*, en la formación de vesículas lipídicas en el hígado.
- Determinar por PCR en tiempo real, los niveles de expresión del gen *TNF- α* en hígados de los diferentes grupos experimentales.
- Correlacionar la expresión del gen *TNF- α* con la formación de vesículas lipídicas en los diferentes grupos experimentales.

ANTECEDENTES

Las bifidobacterias son habitantes naturales del tracto gastrointestinal (TGI) que representan del 3-10 % en la microbiota del adulto y el 90% en los infantes alimentados con leche materna. Este grupo bacteriano tiene un papel vital en el balance microbiano intestinal y en la modulación de la respuesta inmune del huésped. La suplementación con *Bifidobacterium sp.* ha generado mayor producción de anticuerpos clase IgA y cambios en la inmunidad mediada por células, incluyendo la presentación de antígenos. Está comprobado que los probióticos son capaces de reducir la respuesta inmune inflamatoria (induciendo la apoptosis de células T inflamatorias) y de suprimir la expansión clonal de células T; además, en la regulación de la respuesta inmune, el efecto de la interacción de la microbiota gastrointestinal con el sistema inmune asociado al intestino no radica sólo en un impacto directo a nivel sistémico, sino también en un impacto indirecto, basado en el correcto equilibrio de un sistema de mucosas ampliamente expuesto al exterior y con funciones determinantes para el correcto funcionamiento metabólico e inmunológico (Alarcón, P., *et al.*, 2016).

Se ha observado que las cepas del género *Bifidobacterium* ejercen efectos benéficos contra la obesidad en modelos animales alimentados con dieta alta en grasa, ya que mejoran la acumulación de grasa visceral y la sensibilidad a la insulina del síndrome metabólico (Chen, J., *et al.*, 2011). Por ejemplo, se informó que *B. pseudocatenulatum* redujo los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y glucosa, disminuyó la resistencia a la insulina y mejoró la tolerancia a la glucosa en ratones obesos. Además, disminuyó la esteatosis hepática y la cantidad de adipocitos más grandes y la cantidad de micelas grasas en enterocitos de ratones alimentados con dietas altas en grasa. La administración de la cepa aumentó las bifidobacterias y redujo las enterobacterias y las propiedades inflamatorias del contenido intestinal en ratones alimentados con HFD (Gauffin, P., *et al.*, 2013).

A nivel experimental, Li y colaboradores, en el año 2013 observaron en ratones obesos que la combinación de probióticos VSL#3 disminuye el daño histológico hepático, la concentración hepática de ácidos grasos y los niveles séricos de transaminasas. También han demostrado estos autores que VSL#3 reduce la resistencia a la insulina y la expresión de vías de señalización reguladas por TNF- α que participan en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Bao, T., *et al.*, 2020). Las mayores limitantes de los estudios con probióticos a la fecha es que son de pocos pacientes, no evaluaron desenlace histopatológico, y

utilizaron cepas y dosis distintas. Se necesita evidencia más consistente para conocer los mecanismos de los probióticos en los procesos de inflamación y respuesta inmune (Robledo, R., 2019).

En el 2019 la autora Cynthia Garfias Noguez realizó la caracterización de un producto granulado con protección entérica, a base de *bifidobacterium sp.* observando su efecto en la formación de inclusiones lípidicas en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa durante 3 semanas, demostró que la administración del producto granulado a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (HFD+P) evitó el aumento elevado de peso mostrado por las ratas alimentadas con dieta alta en grasa sin tratamiento (HFD), el cual fue de 53.1% vs 69.9% respectivamente; y explicó que debido a la duración del experimento no fue posible observar diferencias significativas en la presencia de grasa o glucosa en sangre, así como la sobre expresión de enzimas de daño hepático (Garfias, C., 2019).

Dan Zhao y colaboradores (2020) realizaron un estudio donde exploraron los efectos de *Bifidobacterium longum* DD98 (*B. longum* DD98) enriquecido con selenio sobre las alteraciones metabólicas y las lesiones hepáticas asociadas con la obesidad en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD). Después de seis semanas, todos los tratamientos redujeron el peso corporal en ayunas, mejoraron la tolerancia a la glucosa y los síntomas de hiperlipidemia. *B. longum* DD98 exhibió efectos anti-obesidad más fuertes que otros tratamientos. También, equilibró el trastorno de los lípidos hepáticos y suprimió la esteatosis hepática. El efecto beneficioso de esta cepa puede resultar eficaz para mejorar los trastornos metabólicos y los daños hepáticos en el desarrollo de la obesidad (Dan Zhao, *et al.*, 2020).

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Bifidobacterium sp., se cultivó en medio MRS suplementado con cisteína al 0.05%. El medio MRS-C se colocó en frascos viales y para generar las condiciones de anaerobiosis se burbujeó con CO₂, los frascos se cerraron herméticamente con tapones de hule y arillo de metal, posteriormente se esterizaron a 15 lb/in² de presión por 15 min.

Para activar la cepa, se utilizó una alícuota de *Bifidobacterium* sp. conservada en glicerol al 30%, la cual se centrifugó para eliminar el glicerol, se realizaron 2 lavados con medio MRS-C para eliminar el exceso. Estas células se inocularon en los medios y se incubaron a 37 °C con agitación orbital a 180 rpm durante 24 horas.

Una vez activadas las bacterias, se transfirió el 10% del volumen total de las bacterias activadas a medios de cultivo nuevos, los cuales fueron incubados a 37 °C con agitación orbital a 180 rpm de 24 a 48 horas dependiendo del crecimiento que se observara.

A partir de estos cultivos, las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con agua purificada para eliminar el exceso de medio MRS-C, posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 15 mL de agua purificada (agua que beben los animales de experimentación).

Para conocer la concentración de microorganismos vivos en la suspensión, se realizó una cuenta viable para lo cual, se tomaron 100 µL de la suspensión de *Bifidobacterium* sp., y se colocaron en un tubo eppendorf, al cual se le agregaron 900 µL de solución salina fisiológica (SSF) a partir del cual se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10⁻⁶; las diluciones se plaquearon por triplicado en cajas Petri con agar MRS-C, se incubaron en anaerobiosis dentro de una bolsa, sistema *Gaspak EZ pouch* (BD), y se incubaron durante 48 horas a 37 °C; pasado el tiempo se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las diluciones donde se desarrollaron entre 30 y 300 UFC y se procedió a realizar los cálculos para conocer la concentración de bacterias en los cultivos, expresada en [UFC/mL].

En tubos cónicos de 5 mL se colocó el volumen necesario de la suspensión de *Bifidobacterium* sp., para administrar a cada rata la concentración aproximada de 9.8x10⁹ UFC/rata.

Modelo experimental

Se utilizaron 24 ratas macho Wistar con un peso inicial aproximado de 200 g procedentes de la Unidad de Producción y Experimentación Animal-Bioterio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Las ratas se mantuvieron en un ambiente climatizado a una temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de luz/obscuridad de 12 X 12, y con acceso “*ad libitum*” a alimento y agua.

La duración del modelo experimental fue de 6 semanas, las ratas fueron divididas en 5 grupos experimentales de forma aleatoria; dos grupos control correspondientes a dieta normal (DN) y dieta alta en grasa (HFD); los 3 grupos restantes corresponden a los tratamientos, dieta alta en grasa y la administración de *Bifidobacterium* sp., (HFD-BB); dieta alta en grasa y la administración de inulina (HFD-INU); y por último dieta alta en grasa y la administración de *Bifidobacterium* sp., e inulina (HFD-BB-INU). Aunque el alimento se dejó *ad libitum*, diariamente se colocaron aproximadamente 30 g/rata para evitar desperdicios. La administración de *Bifidobacterium* sp., fue a una concentración aproximada de 9.8×10^9 UFC/rata y de inulina (150 mg/kg de rata), a los respectivos grupos, por medio de una cánula intragástrica 3 veces por semana (Tabla 2).

Preparación de dietas

La composición de la dieta normal (DN) fue el alimento: Rat Diet 5012 molido. La dieta alta en grasa (HFD-DN) contenía: 46% de alimento molido Rat Diet 5012, 16% de fructosa, 16% de Manteca de cerdo, 22% de Caseína, y 0.1% de Vitaminas y Minerales (Pérez-Ramírez, 2017). Los polvos y la manteca se mezclaron hasta obtener el alimento homogéneo.

Tabla 2. Grupos y tratamientos administrados a cada grupo experimental.

Grupo	Nomenclatura	Composición Dieta y administración
Dieta Normal	DN	Alimento: Rat Diet 5012 (4% Grasas, 22% Proteínas, 5% Fibra, 12% Humedad, 8% Cenizas)
Dieta Alta en Grasa	HFD	46% alimento Rat Diet 5012 + (16% Fructosa, 16% Manteca de cerdo, 22% Caseína, 0.1% Vitaminas y Minerales)
Dieta Alta en Grasa + <i>Bifidobacterium sp.</i>	HFD-BB	Administración 3 veces por semana Concentración: 9.8×10^9 UFC/rata
Dieta Alta en Grasa + Inulina	HFD-INU	Administración 3 veces por semana 150 mg/kg de rata
Dieta Alta en Grasa + <i>Bifidobacterium sp.</i> + Inulina	HFD-BB-INU	Administración 3 veces por semana Concentración de <i>Bifidobacterium sp.</i> : 9.8×10^9 UFC/rata Inulina: 150 mg/kg de rata

Obtención de Muestras

Las ratas macho Wistar se anestesiaron por inhalación con isoflurano, se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca, los sueros obtenidos se analizaron por químicas sanguíneas. Se extrajo el hígado completo el cual se lavó con SSF, se pesó y se capturó una imagen junto con una etiqueta con el número de rata, peso corporal de la rata, el peso del hígado y la fecha del sacrificio; se registraron las características macroscópicas del mismo. Una parte del hígado se cortó en trozos pequeños para fijarlo en corchos con adhesivo tissue tek®, congelándolos inmediatamente en 2-metil butano enfriado en hielo seco y se guardaron en bolsas Ziploc® previamente etiquetadas en ultracongelador a -70 °C hasta su uso.

Tinción de tejidos frescos con Hematoxilina & Eosina

Se realizó esta técnica histológica para analizar las estructuras del tejido hepático y observar las vesículas lipídicas en los hígados de todos los grupos experimentales. Se realizaron cortes de los hígados congelados de 10 μm de grosor en un criostato (Leica), posteriormente se adhirieron en portaobjetos para realizar la tinción en Hematoxilina & Eosina. Los cortes se dejaron secar 10 minutos antes de comenzar la tinción. Se fijaron con formalina al 10% durante 15 minutos y se lavaron con agua destilada por un minuto. Antes de cada paso se dejó secar perfectamente el tejido. Después, se colocaron en isopropanol al 40% durante 5 segundos para hidratar el tejido y que los reactivos acuosos penetraran fácilmente en las células, se lavaron con agua destilada. Se sumergieron en la hematoxilina al 40% durante aproximadamente un minuto, luego se lavaron con agua destilada por goteo hasta quitar el exceso de hematoxilina en el tejido. Se sumergieron nuevamente en isopropanol al 40% durante 5 segundos para eliminar el exceso de colorante y mejorar el contraste y se lavaron con agua destilada. Después se sumergieron en eosina durante 2 minutos, se lavaron con agua destilada por un minuto y por último se lavaron con agua del grifo por un minuto. Se dejaron secar y se montaron con un medio acuoso.

Las laminillas se observarán en el microscopio para su análisis.

Extracción de RNA de hígados de ratas

Se seleccionaron de forma aleatoria tres muestras de hígado de cada grupo experimental, se tomaron aproximadamente 25 mg de cada hígado y se colocaron en un mortero previamente congelado en hielo seco, el tejido se homogenizó con 600 μL de buffer RLT. Posteriormente, la extracción de RNA se llevó a cabo con el Kit RNeasy mini de Qiagen®. Se siguieron las instrucciones del proveedor colocando 700 μL de alcohol 70% (adhiera RNA a columna) al lisado aclarado, se homogenizó. Se colocó la mezcla en la columna, se dejó permear durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó. Se desechó el centrifugado y se agregaron a la columna 700 μL de buffer RW1, se dejó permear 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugo 15 s a 10,000 rpm. Se desechó el centrifugado, se colocaron 500 μL de buffer RPE y se centrifugó. Nuevamente se desechó el centrifugado y se colocaron 500 μL de buffer RPE, se centrifugo 2 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Se cambió la columna a un microtubo recolector nuevo y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. Se cambio la columna a un microtubo de 1.5 mL para el final de la recolección.

Se colocaron 35 μ L de agua libre de RNAsas directamente en la columna y se dejó permear por un minuto y medio a temperatura ambiente, se centrifugo 1 min a 10,000 rpm. Al terminar de centrifugarse se tomó centrifugado con micropipeta y se colocó nuevamente en la columna. Se centrifugó 1 min a 10,000 rpm. Una vez purificado, el RNA se cuantificó en un Nanodrop® y se verificó la integridad en gel de agarosa al 1.5%.

Obtención de cDNA

A partir del RNA total extraído de las muestras de hígado se sintetizó cDNA de acuerdo con las instrucciones del kit *High Capacity RNA-to-cDNA* de Applied Biosystems®. Se prepararon las muestras de RNA para tener la concentración correspondiente a 750 ng de RNA en 9 μ L de agua libre de RNAsas. Por otra parte, en un tubo nuevo estéril de 1.5 mL, se preparó el Mix de reacción tomando 10 μ L de *RT buffer Mix* (2x) y 1 μ L *RT Enzyme Mix* (20x). Se transfirieron los 11 μ L del Mix de reacción en tubos de PCR y se agregaron 9 μ L del RNA y se homogeneizó. Se llevaron al termociclador bajo las siguientes condiciones, primer paso a 37 °C durante 60 minutos, segundo paso a 95 °C durante 6 minutos y por último a 4 °C durante 25 minutos. Al término de la reacción se agregaron 180 μ L de agua libre de RNAsas a cada una de las muestras y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Análisis de expresión del gen *TNF- α* por PCR en tiempo real

Se cuantificó la expresión relativa de el gen *TNF- α* y se incluyó el gen 18sRNA para normalizar la expresión del gen de interés.

Cada reacción de PCR de 15 μ L incluyó 6.75 μ L de cDNA, 0.75 μ L de Sonda TaqMan® (ID: Rn00562055_m1) de Thermo Fisher Scientific® y 7.5 μ L de *Universal PCR Master Mix* de la misma marca. Cada muestra fue analizada por triplicado. Para cada placa se usó un control negativo (NTC, por sus siglas en inglés), para el cual se adicionaron todos los componentes de la reacción de qPCR excepto por el cDNA que se sustituyó por agua libre de nucleasas. La reacción de amplificación consistió en un primer paso de 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 60°C. Se llevo a cabo en el equipo Step One Plus de Applied Biosystems®.

Los niveles de expresión fueron calculados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis unidireccional de varianza (ANOVA), con una significancia de $p < 0.05$ y posterior prueba de Tukey para comparación entre grupos con el software GraphPad Prism 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la ganancia de peso corporal en las ratas de los grupos experimentales

La figura 6 muestra los resultados sobre el impacto de las dietas y los tratamientos en el peso de las ratas; podemos observar que al inicio del experimento las ratas pesaban entre 150-180 gramos, al cabo de 6 semanas las ratas alimentadas con dieta normal aumentaron un 40.46% de su peso y las ratas alimentadas con dieta alta en grasa aumentaron 50.34%, presentando entre ambas dietas que no hay una diferencia significativa ($P>0.05$).

En el caso del grupo control (HFD) respecto a los otros grupos experimentales; las ratas tratadas con *Bifidobacterium sp.* (HFD-BB), las tratadas con inulina (HFD-INU) y las tratadas con *Bifidobacterium sp.* e inulina (HFD-BB-INU), se puede observar que no hay una diferencia significativa, ya que, tuvieron un aumento porcentual de 50.34%, 45.58%, 49.29% y 49.84% respectivamente, esto se puede deber a que el porcentaje de grasa en su dieta no es suficiente para marcar una diferencia a nivel peso corporal.

Tabla 3. Pesos iniciales de las ratas macho Wistar.

# DE RATA	DN (g)	HFD (g)	HFD-BB (g)	HFD-INU (g)	HFD-BB-INU (g)
1	196	184	168	157	169
2	250	159	158	174	181
3	215	173	158	186	158
4	233	174	168	172	178
5	232	-	173	167	172

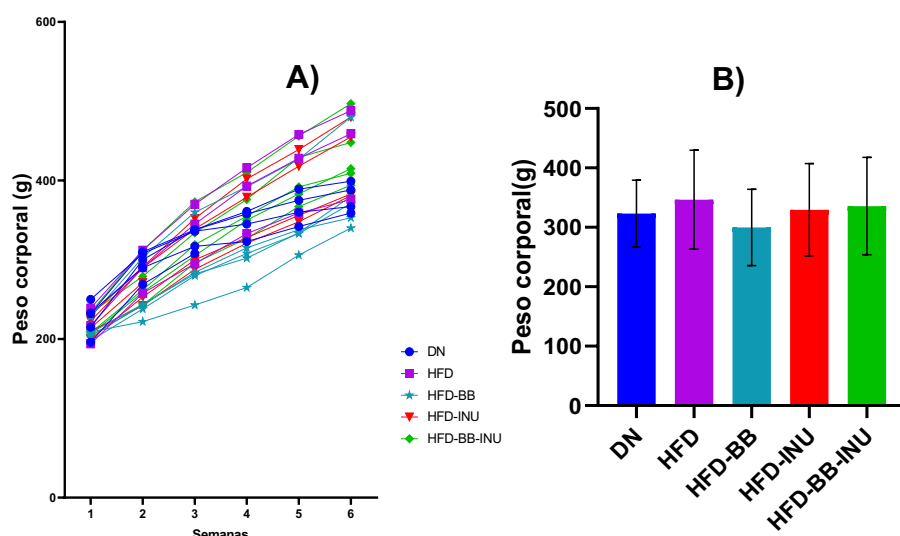


Figura 6. A) Aumento del peso corporal durante 6 semanas de las ratas alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa tratadas con *Bifidobacterium* sp. (HFD-BB), dieta alta en grasa tratadas con inulina (HFD-INU) y dieta alta en grasa tratadas con *Bifidobacterium* sp. e inulina (HFD-BB-INU). B) No se muestra diferencia significativa ($P > 0.05$) en el peso corporal final de los grupos experimentales.

Evaluación de presencia de colesterol, triglicéridos, glucosa y enzimas de daño hepático en las bioquímicas sanguíneas de las ratas

Triglicéridos

De acuerdo con la figura 7 podemos observar que no existe una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los valores del grupo control (dieta normal) vs los tratamientos; si bien es importante mencionar que se muestra una reducción del nivel sérico de triglicéridos cuando se administró *Bifidobacterium* sp. e inulina con dieta alta en grasa; ya que el valor para DN es de 109 mg/dL y para HFD-BB-INU es de 100 mg/dL; esto demuestra como el prebiótico promovió selectivamente la proliferación y actividad de las bifidobacterias, se redujo la vía de síntesis de ácidos grasos, disminuyendo la acumulación de triglicéridos (Tabla 4).

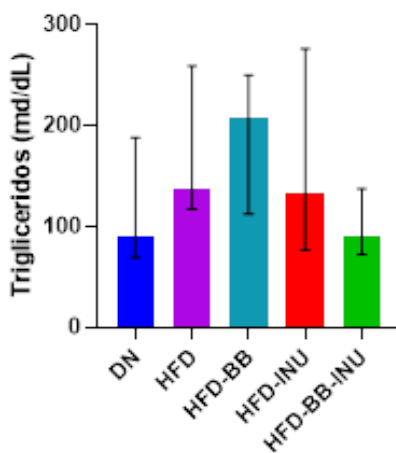


Figura 7. Grafica de los valores séricos de triglicéridos en sangre de ratas Wistar.

Tabla 4. Resultados de los valores séricos de triglicéridos (mg/dL) en sangre de cada grupo experimental.

Triglicéridos (mg/dL)					
Rata	DN	HFD	HFD-BB	HFD-INU	HFD-BB-INU
1	*	117	250	76	137
2	69	259	112	*	89
3	71	136	174	276	87
4	108	*1	208	188	72
5	188	*1	220	79	115
Promedio	109.00	170.67	192.80	154.75	100.00

*Este valor no se tiene debido a que la rata falleció

*1 Este valor no se tiene porque el grupo tenía una n=3

Colesterol

Los resultados de la concentración plasmática de colesterol mostraron que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las medias del grupo control (dieta normal) vs los tratamientos (Figura 8). Se realizó una comparación entre grupos y se observó que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la población alimentada con dieta normal (DN) y el grupo alimentado con una dieta alta en grasa, *Bifidobacterium* sp. e inulina (HFD-BB-INU).

Es interesante mencionar que en la población que fue alimentada con dieta alta en grasa y *Bifidobacterium sp.* se observó una disminución de los valores séricos de colesterol (HFD-BB) en comparación con el grupo HFD; esto debido a la actividad del probiótico al favorecer la regulación de la lipogénesis del hígado; el valor obtenido para HFD-BB fue de 68.40 mg/dL vs los 74.67 mg/dL de HFD.

La población que obtuvo los valores séricos de colesterol más bajos fue la alimentada con dieta alta en grasa, *Bifidobacterium sp.* e inulina (63.40 mg/dL) debido a la combinación de probiótico y prebiótico se obtuvo una disminución del colesterol, debido a que la inulina estimula el crecimiento y la actividad de las *Bifidobacterium sp.* para la función intestinal y, además, actúa como un sinergista probiótico al mejorar la sobrevivencia, la implantación y el crecimiento de estas bacterias.

Los valores séricos de colesterol de cada rata Wistar se muestran en la tabla 5.

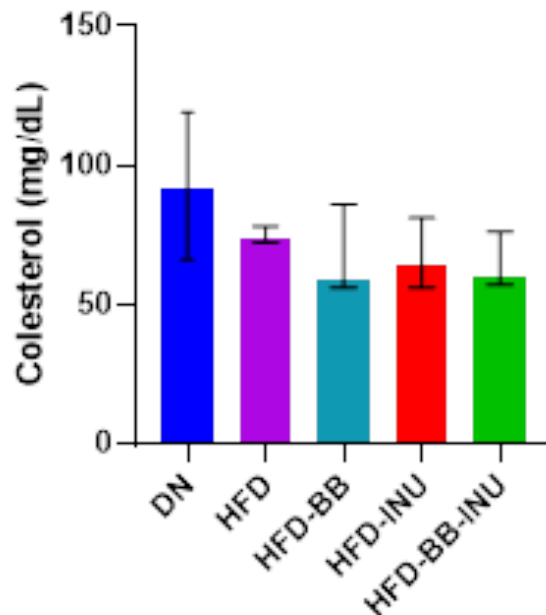


Figura 8. Grafica de los valores séricos de colesterol en sangre de ratas Wistar.

Tabla 5. Resultados de los valores séricos de colesterol (mg/dL) en sangre de cada grupo experimental.

Colesterol (mg/dL)					
Rata	DN	HFD	HFD-BB	HFD-INU	HFD-BB-INU
1	*	74	86	57	57
2	85	72	56	*	60
3	99	78	59	72	67
4	66	*1	57	81	57
5	119	*1	84	56	76
Promedio	92.25	74.67	68.40	126.67	63.40

*Este valor no se tiene debido a que la rata falleció

*1 Este valor no se tiene porque el grupo tenía una n=3

Glucosa

Los resultados de la concentración plasmática de la glucosa mostraron que no hay diferencia significativa ($P>0.05$) entre las medias del grupo control (dieta normal) vs los tratamientos, como se observa en la figura 9. Si bien es importante mencionar que se muestra un aumento del nivel sérico de glucosa cuando se administraron los diferentes tratamientos con dieta alta en grasa; ya que, el valor para HFD es de 179.33 mg/dL; mientras que para HFD-BB es de 266.80 mg/dL, HFD-INU es de 451.67 mg/dL y para HFD-BB-INU es de 253.60 mg/dL (Tabla 6).

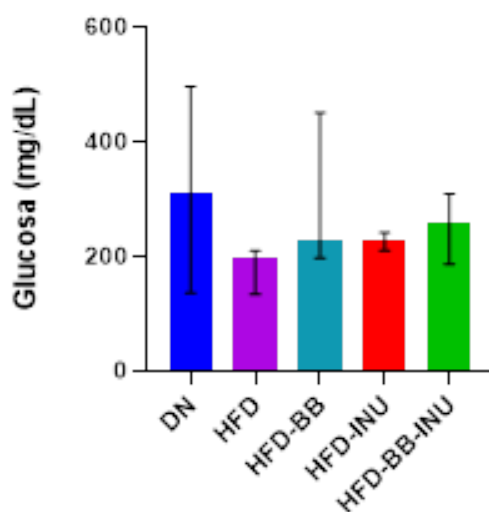


Figura 9. Grafica de los valores séricos de glucosa en sangre de ratas Wistar.

Tabla 6. Resultados de los valores séricos de glucosa (mg/dL) en sangre de cada grupo experimental.

Glucosa (mg/dL)					
Rata	DN	HFD	HFD-BB	HFD-INU	HFD-BB-INU
1	*	196	197	226	260
2	367	133	228	*	209
3	257	209	207	210	308
4	136	*1	450	241	186
5	495	*1	252	226	305
Promedio	313.75	179.33	266.80	451.67	253.60

*Este valor no se tiene debido a que la rata falleció

*1 Este valor no se tiene porque el grupo tenía una n=3

Enzimas de daño hepático

Aspartato Aminotransferasa (AST)

Los resultados de la concentración plasmática de aspartato aminotransferasa mostraron que no hay diferencia significativa ($P>0.05$) entre las medias del grupo control (dieta normal) vs los tratamientos (Figura 10). Es interesante mencionar que en todas las poblaciones hubo una disminución de los valores séricos de AST en comparación con dieta alta en grasa (HFD); esto debido a la actividad del probiótico al favorecer la regulación de la lipogénesis del hígado; el valor obtenido para HFD-BB fue de 121.20 mg/dL vs los 178.33 mg/dL de HFD (Tabla 7).

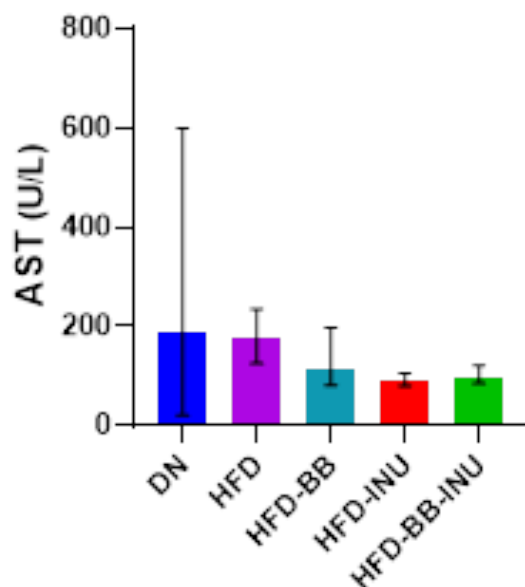


Figura 10. Grafica de los valores séricos de aspartato aminotransferasa en sangre de ratas Wistar.

Tabla 7. Resultados de los valores séricos de aspartato aminotransferasa (U/L) en sangre de cada grupo experimental.

Aspartato aminotransferasa (U/L)					
Rata	DN	HFD	HFD-BB	HFD-INU	HFD-BB-INU
1	*	175	197	99	85
2	21	125	81	*	111
3	600	235	113	80	93
4	30	*1	85	84	95
5	350	*1	130	105	121
Promedio	250.25	178.33	121.20	92.00	101.00

*Este valor no se tiene debido a que la rata falleció

*1 Este valor no se tiene porque el grupo tenía una n=3

Alanina Aminotransferasa (ALT)

Los resultados de la concentración plasmática de alanina aminotransferasa mostraron que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las medias del grupo control (dieta normal) vs los tratamientos, como se observa en la figura 11; lo cual nos indica que no hay evidencia de algún daño hepático.

Los valores séricos de ALT de cada rata Wistar se muestran en la tabla 8.

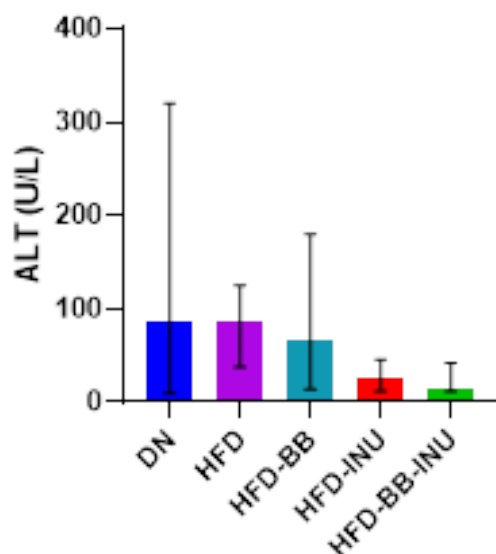


Figura 11. Grafica de los valores séricos de alanina aminotransferasa en sangre de ratas Wistar.

Tabla 8. Resultados de los valores séricos de alanina aminotransferasa (U/L) en sangre de cada grupo experimental.

Alanina aminotransferasa (U/L)					
Rata	DN	HFD	HFD-BB	HFD-INU	HFD-BB-INU
1	*	86	51	12	13
2	12	38	73	*	12
3	320	125	180	46	30
4	10	*1	65	15	42
5	160	*1	14	35	13
Promedio	125.50	83.00	76.60	27.00	22.00

*Este valor no se tiene debido a que la rata falleció

*1 Este valor no se tiene porque el grupo tenía una n=3

Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT)

Los resultados de la concentración plasmática de GGT mostraron que hay diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las medias del grupo control (dieta normal) vs los tratamientos de HFD y HFD-BB debido a que sus valores séricos son de 0 U/L (Figura 12).

Los valores séricos de GGT de cada rata Wistar se muestran en la tabla 9.

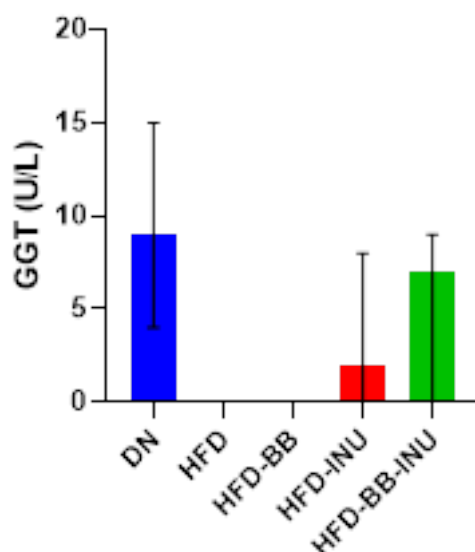


Figura 12. Grafica de los valores séricos de GGT en sangre de ratas Wistar.

Tabla 9. Resultados de los valores séricos de GGT (U/L) en sangre de cada grupo experimental.

GGT (U/L)					
Rata	DN	HFD	HFD-BB	HFD-INU	HFD-BB-INU
1	*	0	0	0	0
2	8	0	0	*	0
3	15	0	0	0	7
4	10	*1	0	8	8
5	4	*1	0	4	9
Promedio	9.25	0	0	2	4.8

*Este valor no se tiene debido a que la rata falleció

*1 Este valor no se tiene porque el grupo tenía una n=3

Evaluación del peso de los hígados de las ratas de los diferentes grupos experimentales

La tabla 10 que muestra los pesos de los hígados extraídos de las ratas Wistar macho se observa que la dieta HFD promovió la acumulación de lípidos en el hígado favoreciendo la ganancia de peso; sin embargo, el análisis de varianza y de acuerdo con la figura 13, no hay diferencia significativa entre el peso de los hígados ($P=0.2997$).

Tabla 10. Pesos de los hígados extraídos de las ratas macho Wistar.

PESO HÍGADO (g)					
# DE RATA	DN	HFD	HFD-BB	HFD-INU	HFD-BB-INU
1	-	19.94	14.99	14.76	15.35
2	13.67	16.11	16.35	-	16.51
3	14.68	18.47	14.63	17.43	13.82
4	15.13	-	14.64	18.25	14.01
5	16.22	-	17.33	12.3	13.23

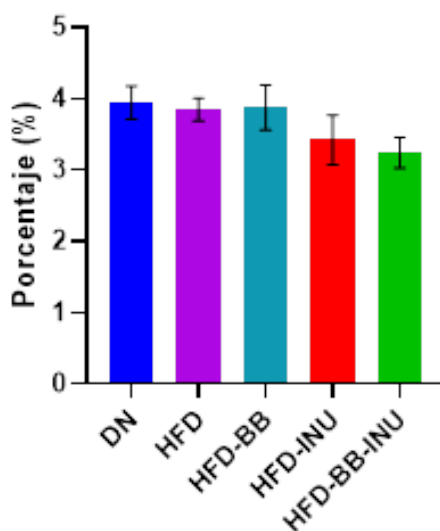


Figura 13. Porcentaje del peso de los hígados con respecto al peso de las ratas alimentadas con dieta normal (DN), dieta alta en grasa (HFD), dieta alta en grasa tratadas con *Bifidobacterium* sp. (HFD-BB), dieta alta en grasa tratadas con inulina (HFD-INU) y dieta alta en grasa tratadas con *Bifidobacterium* sp. e inulina (HFD-BB-INU).

En las figuras 14, 15, 16, 17 y 18 se observa el aspecto macroscópico de cada uno de los hígados extraídos de cada grupo experimental. La apariencia de los hígados con respecto al grupo control no presentan daño, tomando en cuenta el color marrón rojizo y la textura lisa del tejido.

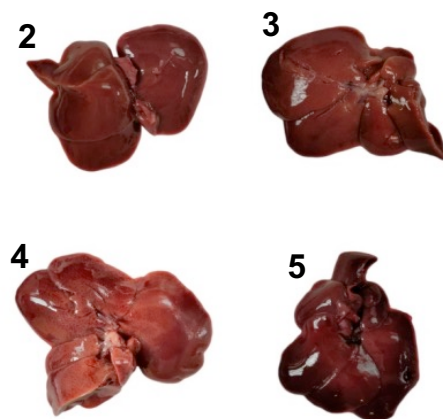


Figura 14. Hígados de ratas macho Wistar del grupo experimental DN. El peso del hígado de la rata 2 represento un 3.73 % del peso total de la rata; el de la rata 3 un 3.78 %; el de la rata 4 represento un 4.21 %; y el peso del hígado de la rata 5 represento un 4.06 % del peso total de la rata.



Figura 15. Hígados de ratas macho Wistar del grupo experimental HFD. El peso del hígado de la rata 1 represento un 3.78 % del peso total de la rata; el de la rata 2 un 4.028 %; y el peso del hígado de la rata 3 represento un 3.731 % del peso total de la rata.



Figura 16. Hígados de ratas macho Wistar del grupo experimental HFD-BB. El peso del hígado de la rata 1 represento un 4.295 % del peso total de la rata; el de la rata 2 un 4.098 %; el peso del hígado de la rata 3 represento un 3.790 % del peso total de la rata; el de la rata 4 fue de 3.697 % del peso total de la rata; y el de la rata 5 fue de 3.508 % del peso total de la rata.

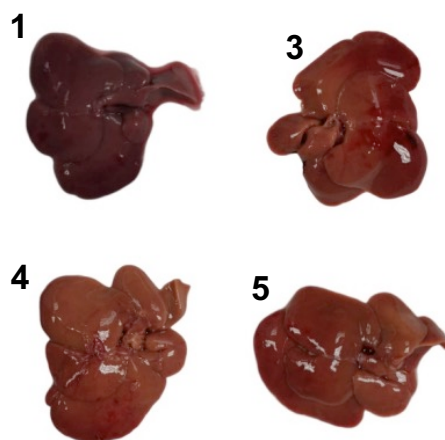


Figura 17. Hígados de ratas macho Wistar del grupo experimental HFD-INU. El peso del hígado de la rata 1 represento un 3.653 % del peso total de la rata; el de la rata 3 un 3.404 %; el de la rata 4 represento un 3.694 %; y el peso del hígado de la rata 5 represento un 2.943 % del peso total de la rata.

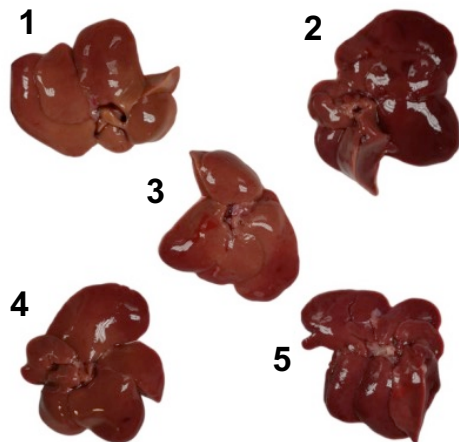


Figura 18. Hígados de ratas macho Wistar del grupo experimental HFD-BB-INU. El peso del hígado de la rata 1 represento un 3.505 % del peso total de la rata; el de la rata 2 un 3.244 %; el de la rata 3 represento un 3.387 %; la rata 4 tuvo un porcentaje de 2.949; y el peso del hígado de la rata 5 represento un 3.128 % del peso total de la rata.

Tinción de tejidos frescos con Hematoxilina & Eosina (H&E)

Se realizó esta técnica de tinción para poder observar las inclusiones lipídicas presentes en el hígado de las ratas causadas por la dieta alta en grasa y el efecto de cada uno de los tratamientos después de 6 semanas. En la figura 19 A se puede observar cómo DN no presenta inclusiones lipídicas, los hepatocitos aparecen organizados y una separación por los sinusoides. En contraste con HFD, donde se observan los hepatocitos desorganizados y existe un balonamiento de estos; esta diferencia se debe a la ingesta que mantuvieron las ratas durante 6 semanas de esta dieta, se observa pequeñas gotas de lípidos en los tejidos característicos de principios de esteatosis (Figura 19 B, círculos). En el caso de la población alimentada con dieta alta en grasa (HFD) y las ratas tratadas con *Bifidobacterium sp.* (Figura 19 C), se observó inicios de esteatosis con gotas micro y macrovesiculares que ocupan el citosol de los hepatocitos y desplazan el núcleo (Puntas de flechas), pero sin señales de inflamación. En el grupo de HFD+INU no se presentaron cambios en la morfología del hígado correspondiente con esteatosis (Figura 19 D); por último, en la población alimentada con dieta alta en grasa, *Bifidobacterium sp.* e inulina (HFD-BB-INU), se observan cuerpos de Mallory ya que existe una inclusión citoplasmática de contorno irregular (círculos amarillos) y células balonizadas (Figura 19 E). Todas las características que se observaron en las tinciones de H&E, en los grupos HFD, HFD-BB Y HBD-BB-INU fueron evidencias de esteatosis por las vacuolas de grasa que alteraban la estructura del tejido.

Pérez *et al.*, en 2022 analizaron el efecto de la administración de inulina en ratones macho C57/BL-6N expuestos a una dieta estándar para roedores o una dieta enriquecida con grasas durante 8 semanas. La histología hepática se evaluó con tinción de rojo aceite O y H&E, la cual, mostró una disminución en la acumulación de lípidos en el hígado de los grupos alimentados con dieta alta en grasa (Pérez, C. *et al.*, 2022).

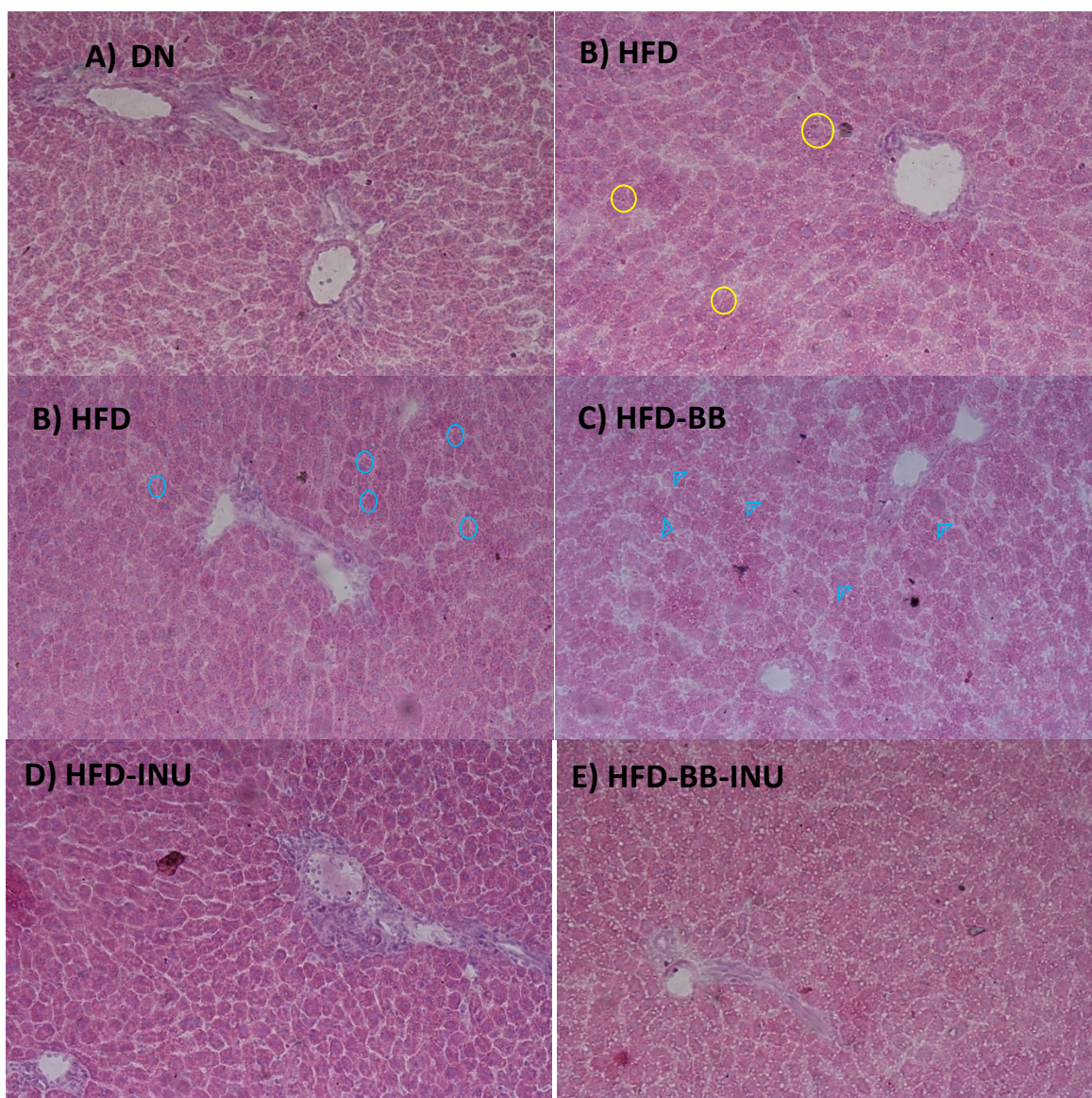


Figura 19. Fotografías de cortes histológicos de hígados teñidos con hematoxilina & eosina de los grupos de A: dieta normal (DN), B: dieta alta en grasa (HFD), C: dieta alta en grasa tratadas con *Bifidobacterium sp.* (HFD-BB), D: dieta alta en grasa tratadas con inulina (HFD-INU) y E: dieta alta en grasa tratadas con *Bifidobacterium sp.* e inulina (HFD-BB-INU).

Extracción de RNA de hígados de ratas

La concentración de RNA de las 15 extracciones fue adecuada, además de una absorbancia 260/280 dentro de los parámetros permitidos para indicar que el RNA no está contaminado en ninguna de las muestras.

Tabla 11. Cuantificación de concentración y pureza de RNA en Nanodrop.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	A 260/280	A 260/230
HFD 1	365.7	2.11	1.99
HFD 2	577.9	2.11	2.23
HFD 3	387.7	2.13	2.01
HFD-BB 2	876.3	2.11	1.15
HFD-BB 3	457.7	2.12	0.71
HFD-BB 5	292.8	2.14	0.95
HFD-INU 1	481.1	2.10	1.20
HFD-INU 3	540.6	2.08	1.77
HFD-INU 4	642.7	2.09	1.37
HFD-BB-INU 1	1135.7	2.12	2.05
HFD-BB-INU 3	242.9	2.13	0.43
HFD-BB-INU 5	191.0	2.09	1.93

Con el propósito de demostrar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. En el gel de integridad se observan las bandas correspondientes a la sub-

unidad grande ribosomal (28S) y sub-unidad pequeña ribosomal (18S), para las 16 muestras obtenidas; como se aprecia en las figuras 20 y 21 la integridad del RNA fue optima, ya que, las bandas fueron abundantes, indicando que todas las muestras de RNA tenían las condiciones adecuadas para llevar a cabo una PCR en tiempo real.

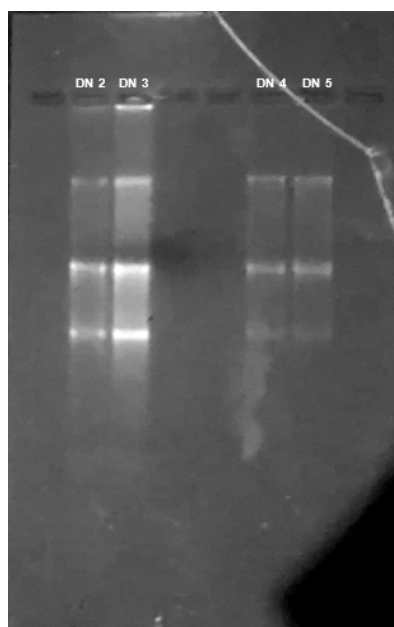


Figura 20. Electroforesis de extracción de RNA de hígados de ratas del grupo experimental DN.

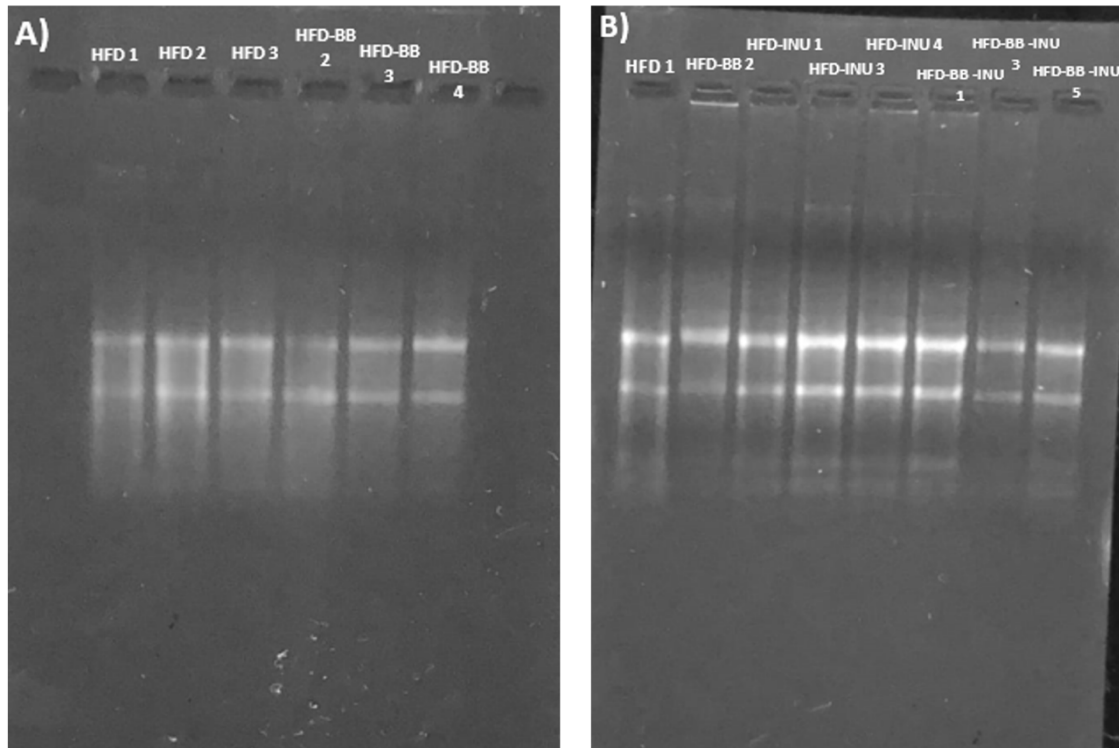


Figura 21. A) Electroforesis de extracción de RNA de hígados de ratas del grupo experimental HFD y el grupo HFD-BB. B) Electroforesis de extracción de RNA de los hígados del grupo experimental HFD- INU, el grupo HFD-BB-INU y dos muestras que se repite de la imagen A) (HFD 1 y HFD-BB 2) ya que se degradaron durante la primera electroforesis.

Cuantificación de la expresión del gen *TNF- α*

Los resultados obtenidos de la PCR en tiempo real muestran una sobreexpresión del gen *TNF- α* en los grupos HFD-INU y HFD-BB-INU (Figura 22). De acuerdo con la prueba de Tukey para la comparación entre grupos, mostro que el incremento de cada uno de los tratamientos no es significativo respecto a HFD, por lo cual, se recomienda que el número de individuos en cada grupo sea mayor debido a la variabilidad de los resultados obtenidos con este modelo experimental.

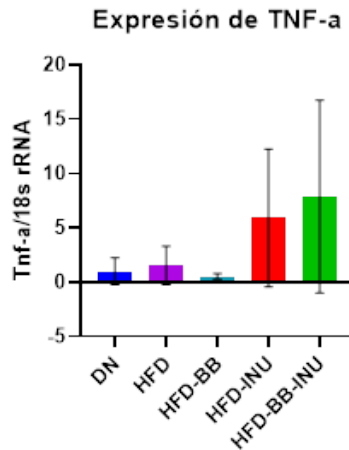


Figura 22. Grafica de la expresión del gen *TNF-α* en los diferentes grupos experimentales.

Como sabemos en la patogenia de EHGA la hipótesis de más fuerza es la teoría de los 2 golpes (Two hits models). El primer golpe lleva al desarrollo del hígado graso, en donde la resistencia a la insulina tiene un papel fundamental sensibilizando al hígado, producido por el incremento de ácidos grasos libres en los hepatocitos, trayendo como consecuencia la β -oxidación. Los mecanismos responsables de la aparición de la resistencia a la insulina en la obesidad podrían tener su origen en la liberación de ciertas sustancias por los adipocitos, tanto de *TNF-α* y resistina, así como factores que la disminuyen, como la adiponectina. Se piensa que la adiponectina puede tener un papel patogénico relevante, ya que sus niveles plasmáticos se encuentran inversamente relacionados con la aparición del HGNA. Así niveles bajos de adiponectina en el hígado se asocian a procesos necroinflamatorios graves que pudieran contribuir al desarrollo de la esteatohepatitis.

Durante la necroinflamación aumenta la gravedad de la esteatosis y aparece lipotoxicidad, el hígado se vuelve más resistente a la insulina, debido principalmente al aumento de la concentración intracelular de ácidos grasos poliinsaturados y sus metabolitos. En estas circunstancias, cuando los ácidos grasos entran en la célula, se dirigen a las mitocondrias y se oxidan por enzimas genéticamente reguladas. Por otra parte, un aumento de los niveles de *TNF-α* en hígado aumenta la generación de especies oxigenadas, que tienen capacidad reactiva durante la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y alteran el flujo de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial, es decir, la regulación al alza de enzimas implicadas en la oxidación microsomal y peroxisomal de ácidos grasos

contribuyen a incrementar el estrés oxidativo, lo cual actúa como un segundo golpe (Del Alcázar, M., 2013).

Todo esto muestra la importancia de *TNF- α* durante el desarrollo de EHGA, como lo demostraron Li et al., los cuales observaron en ratones obesos que la combinación de probióticos VSL#3 reduce la resistencia a la insulina y la expresión de vías de señalización reguladas por *TNF- α* que participan en el desarrollo de la resistencia a la insulina. También demostraron que VSL#3 disminuye el daño histológico hepático, la concentración hepática de ácidos grasos y los niveles séricos de transaminasas (Bao, T., **et al.**, 2020).

CONCLUSIÓN

La administración de dieta alta en grasa en este modelo experimental de 6 semanas demostró cambios en la histología hepática debido a que se observaron pequeñas gotas de lípidos en los tejidos, pero, el periodo de ingesta no fue suficiente para observar diferencias significativas en la presencia de grasa o glucosa en sangre, así como la sobre expresión de enzimas de daño hepático. La administración de *Bifidobacterium* sp. e inulina en este modelo experimental de hígado graso no alcohólico, no fue concluyente.

Se observó un aumento en la expresión del gen *TNF- α* en los grupos HFD-BB y HFD-INU, sin embargo, el aumento no fue estadísticamente significativo en el experimento de 6 semanas. No se concluye una correlación entre la formación de vesículas lipídicas en el hígado y la expresión del gen *TNF- α* en los diferentes grupos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A. (2018). Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silenciosa. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 56(6): 544-9. Recuperado julio 05, 2024.
- Alarcón, P., González, M., & Castro, E. (2016). Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Revista Med. Chile;* 144: 910-916. Recuperado en junio 23, 2023.
- Almarza, J. (2010). Hígado graso no alcohólico: ¿un componente inflamatorio del síndrome metabólico?, *Perspectivas en nutrición humana*, 12 (2), 163-175. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. Recuperado en mayo 20, 2022. Sitio web: <http://www.scielo.org.co/pdf/penh/v12n2/v12n2a5.pdf>
- Araneda, G., Jiménez, A., Poniachik, R., & Poniachik, J. (2016). Microbiota e hígado graso: potencial terapéutico. *Gastroenterol. latinoam.*, 27 (1), 47-50. Recuperado en junio 01, 2022.
- Bao, T., He, F., Zhang, X., Zhu, L., Wang, Z., Lu, H., Wang, T., Li, Y., Yang, S., & Wang, H. (2020). Inulin Exerts Beneficial Effects on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease via Modulating gut Microbiome and Suppressing the Lipopolysaccharide-Toll-Like Receptor 4-M ψ -Nuclear Factor- κ B-Nod-Like Receptor Protein 3 Pathway via gut-Liver Axis in Mice. *Front Pharmacol*; 11:558525. Recuperado en noviembre 05, 2023. Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7774311/>
- Beltrán, A., Galindo, A., Mendoza, Y., Hernández, G., Varón A., Garzón, M., Edison, J., Pardo, R., Otero, W., & Sabbagh, L. (2015). Guía de práctica clínica para la enfermedad hepática grasa no alcohólica. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*. Recuperado en mayo 20, 2023. Sitio web: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v30s1/v30s1a10.pdf>
- Bernal, R. et al. (2019). Consenso mexicano EHGNA. *Revista de Gastroenterología de México;* Vol. 84, Issue 1: 69-99. Recuperado en mayo 20, 2023. Sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0375090618301794>
- Cardoso, I. (2019). Efecto farmacológico del esteviósido en un modelo experimental novedoso de hígado graso no alcohólico y caracterización de un nuevo modelo de esteatohepatitis no alcohólica. *Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Zacatenco*. Recuperado en enero 16, 2024.

- Carvallo, P., Carvallo, E., Barbosa, S., Mandarim, C., & Del Sol, M. (2017). NAFLD e Ingesta de Fructosa en Altas concentraciones. Una Revisión de la Literatura. *International Journal of Morphology*, 35(2), 676-683. Recuperado en enero 16, 2024. Sitio web: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000200047
- Castro, L., & Silva, G. (2015). Hígado graso no alcohólico. *Revista Médica Clínica Los Condes*; Vol. 26 (5): 600-612. Sitio web: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-hgado-graso-no-alcoholico-S071686401500125X>
- Cisneros, R., Gallegos, B., Ramírez, J., Gutiérrez, S., Jordán, B., Garnelo, S., García, J., Preciado, M., Lazo de la Vega, M., Ruiz, Y., & Ibarra, L. (2017). Diferencias en el perfil de citocinas de acuerdo al grado de inflamación y esteatosis en pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico. *Revista jóvenes en la ciencia*, Vol. 3 no. 2, Verano de la Investigación Científica. Recuperado en septiembre 03, 2023.
- Chen, J., Wang, R., Li, XF., & Wang, RL. (2011). *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr.*;107(10):1429-34. Recuperado en octubre 24, 2023. Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21914236/>
- Dan Zhao, Fei Gao, Hui Zhu, Zhixiang Qian, Wenwei Mao, Yu Yin, & Daijie Chen. (2020). Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 relieves metabolic alterations and liver injuries associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Journal of Functional Foods*; volume 72. Recuperado en octubre 24, 2023. Sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620302759>
- De Olivera, C., Pinchemel, H., & Arrese, M. (2019). Factores de riesgo de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en poblaciones de Latinoamérica: situación actual y perspectivas. *Clinical liver disease*, 13(Suppl 1), S5–S8. Recuperado en agosto 21, 2023. Sitio web: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6541043/>
- Del Alcázar, M. (2013). Hígado graso no alcohólico en pediatría. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 29(4), 351-368, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252013000400009&lng=es&tlng=es.

- Del Valle, S., Piñera, M., Sanchez, J., & Díaz, J. (2015). Enfermedad hepática por depósito de grasa. *MEDISAN*, 19 (7). Recuperado en mayo 21, 2022. Sitio web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192015000700009
- Delgado, H., García, F. & García, I. (2018). La enfermedad por hígado graso no alcohólico y el trabajo del internista. *Revista Hospital Juárez de México*, 85(2): 86-93. Recuperado en agosto 21, 2023.
- Díaz, D., Escartín, R., López, V., & Mancilla, J. (2018). Efectos de una dieta con alto contenido de grasas sobre patrones conductuales alimentarios. *Acta.colomb.psicol*, 21 (1), 95-105. Recuperado en mayo 23, 2022. Sitio web: http://www.scielo.org.co/pdf/acp/v21n1/es_0123-9155-acp-21-01-00095.pdf
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Med Integral*;39(2):63-71. Recuperado en febrero 01, 2024. Sitio web: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
- Fragoso, J., Vargas, G., Jiménez, S., Reyes, O., & Ramirez, J. (2014). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta médica de México*, 150:334-44. Recuperado en junio 23, 2023.
- Garfias, C. (2019). Caracterización de un producto granulado con protección entérica, a base de *Bifidobacterium sp.* y su efecto en la formación de inclusiones lipídicas en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco. Recuperado en octubre 5, 2023.
- Gauffin, P., Santacruz, A., Trejo, FM., & Sanz, Y. (2013). Bifidobacterium CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet fed mice. *Obesity (Silver Spring)*; 21(11):2310-21. Recuperado en octubre 24, 2023. Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23418126/>
- Gómez, E., Pérez, R., Martínez, J., Guerrero, N., Mondragón, P., Alcaráz, S., López, L., & Suárez, J. (2015). Permeabilidad intestinal y eje intestino–hígado. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. Volumen 20, Núm. 1, pp. 83-89. Recuperado en enero 17, 2024. Sitio web: <https://revistahepatologia.com/index.php/hepa/article/view/71/61>
- Gross, V., Monet, D., & Álvarez, J. (2023). Regulación de la respuesta inflamatoria dependiente de citocinas. *MEDISAN*, 27(5), e4317. Epub. Recuperado en febrero

01, 2024. Sitio web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192023000500016&lng=es&tlng=es.

- Hernández, A. (2014). Efecto de una dieta alta en grasa y colesterol sobre marcadores hepáticos de estrés oxidativo en ratas *Sprague-Dawley*. Universidad Autónoma de Querétaro. Recuperado en julio 08, 2024.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2022). COM. 636 Equipo de nutriólogos, gastroenterólogos y de medicina interna brindan atención en el IMSS contra el hígado graso. Recuperado en octubre 02, 2023. Sitio web: <https://www.gob.mx/imss/prensa/com-636-equipo-de-nutriologos-gastroenterologos-y-de-medicina-interna-brindan-atencion-en-el-imss-contra-el-higado-graso>
- [Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales](#). (2021). Enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Recuperado en agosto 13, 2023. Sitio web: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-higado/esteatohepatitis-no-alcoholica/definicion-informacion>
- Krishna M. (2014). Anatomía microscópica del hígado. *Clinical liver disease*, 2(Suppl 5), 109–112. Recuperado en enero 16, 2024. Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6448680/>
- Mamdouh, A. (2015). Expression of ezrin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in hepatocellular carcinoma and non-neoplastic liver lesions of HCV positive patients. Thesis MD Degree in Pathology. Faculty of Medicine, Assiut University. Egypt.
- Manterola, C., del Sol, M., Ottone, N., & Otzen, T. (2017). Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado. Fundamentos para las Resecciones Hepáticas. *Int. J. Morphol.*, 35(4):1525-1539. Recuperado en enero 16, 2024.
- Méndez, N., Gutiérrez, Y., Chávez, N., Kobashi, R., & Uribe, M. (2010). Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales. *Revista de Gastroenterología de México*, 75 (52): 143-148. Recuperado en mayo 20, 2023. Sitio web: <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-higado-graso-no-alcoholico-esteatohepatitis-articulo-X0375090610873768>
- Mescher, A. (2013). Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas (13th ed.), by Anthony L. Mescher.

- Mesquida, M., Bouzas, C., Mascaró, C., Tejeda, S., & Sureda, A. (2023). Probióticos como terapia potencial en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). *Fermentation*, 9 (4), 395. Recuperado en octubre 05, 2023. Sitio web: <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/4/395>
- Moctezuma, C. (2018). Tratamiento actual de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista de Gastroenterología de México*, 83 (2), 125-133. Recuperado en mayo 24, 2022. Sitio web: <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-tratamiento-actual-enfermedad-por-higado-articulo-S0375090618300405>
- Perez, C., Alvarez, A., Nuno, N., Escalona, I., Juarez, E., Chavez, C., Uribe, M., & Barbero, V. (2022). Inulin Improves Diet-Induced Hepatic Steatosis and Increases Intestinal Akkermansia Genus Level. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(2), 991. Sitio web: <https://doi.org/10.3390/ijms23020991>
- Pérez, I., González, M., Mora, O., Gallegos, M., & Reynoso, R. (2017). Effect of *Ocimum sanctum* and *Crataegus pubescens* aqueous extracts on obesity, inflammation, and glucose metabolism. *Journal of Functional Foods*. 35:24-31.
- Robledo, R. (2019). Probióticos como estrategia terapéutica frente a la esteatosis no alcohólica y esteatohepatitis. *Facultad de farmacia, Universidad Complutense*. Recuperado en mayo 24, 2022.
- Salama, H., Zekry, A., Ahmed, N., Bahnasy, A. & Shabrawy, M. (2008). Autologous adult haematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Hepatology - J HEPATOL*. 48. 10.1016/S0168-8278(08)60529-2.
- Sijia Lu, Yibing Wang & Junli Liu. (2022). Tumor necrosis factor- α signaling in nonalcoholic steatohepatitis and targeted therapies. de [*Revista de genética y genómica*](#), 49 (4), 269-278. Recuperado en septiembre 03, 2023. Sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1673852721003374>
- Soriano, G., Sánchez, E., & Guarner, C. (2013). Probióticos en las enfermedades hepáticas. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 558-563. Recuperado en mayo 24, 2022. Sitio web: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013000300002
- Tsutsui, Hiroko & Nishiguchi, Shuhei. (2014). Importance of Kupffer Cells in the Development of Acute Liver Injuries in Mice. *International journal of molecular sciences*. 15. 7711-30. 10.3390/ijms15057711.
- Tumani, M., Tapia, G., Aguirre, C., Obregón, A., & Pettinelli, P. (2021). Rol de la microbiota intestinal en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *Revista médica*

de Chile, 149(4), 570-579. Recuperado en octubre 05, 2023. Sitio web: <https://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872021000400570>

- Ubeda, M. (2010). Relevancia del hígado en la inducción de la inflamación sistémica en ratas con cirrosis compensada. *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD). Universidad de Alcalá*. Recuperado en mayo 24, 2022.
- Ursa, A. (2023). Estudio comparativo sobre la dieta occidental y las dietas emergentes en los aspectos económico, de salud y sostenibilidad ambiental ¿Cuál es la dieta más adecuada para la sostenibilidad del planeta? *Medicina naturista, ISSN 1576-3080, Vol. 17*, 8-14. Recuperado en enero 19, 2024. Sitio web: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9004199>
- Uscanga, L., Bielsa, M., Huerta, F., Lizardi, J., Muñoz, L., López, C., Rodríguez, H., Torre, A. & Tostado, C. (2008). Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de hepatopatía grasa no alcohólica. Generalidades. *Revista de Gastroenterología de México*, 73 (2), 126-128. Recuperado agosto 16, 2023. Sitio web: <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-guias-clinicas-diagnostico-tratamiento-hepatopatia-articulo-13132661>
- Valle, J. (2022). Generación de una línea celular productora de TNF- α humano. *Universidad ORT Uruguay*. Recuperado en septiembre 03, 2023.
- Villalobos, M. (2023). Alteración de la microbiota intestinal y su relación con enfermedades gastrointestinales y hepatobiliares. *Hepatología*; 4:75-89. Recuperado en enero 17, 2024.
- Zhandong, Y., Huihui, S., Yunjuan, L., Heqing, T., Yonghong, J., Ziyang, N., Liang, P., & Xueqing, C. (2023). Inulin intervention attenuates hepatic steatosis in rats via modulating gut microbiota and maintaining intestinal barrier function. *Food Research International*; volume 163, 112309. Recuperado en noviembre 05, 2023. Sitio web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996922013679#preview-section-abstract>