



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

INFORME DE ACTIVIDADES DE SERVICIO SOCIAL

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIFIDOBACTERIAS
SOBRE LA INFLAMACIÓN HEPÁTICA EN RATAS, INDUCIDA POR LA
ADMINISTRACIÓN DE UN CARCINÓGENO QUÍMICO

PRESENTA:
HERNÁNDEZ PÉREZ JAIRO

MATRÍCULA
2183068084

ASESORES
DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA
DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

FEBRERO 2025

Contenido

Introducción.....	4
Marco teórico.....	5
Hígado.....	5
Enfermedades del hígado.....	8
Cáncer hepático y carcinoma hepatocelular	10
Desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC).....	10
Esteatosis.....	11
Inflamación.....	11
Fibrosis	13
Cirrosis	13
Etapas de la carcinogénesis.....	14
Modelos animales de hepatocarcinogénesis	16
Dietilnitrosamina	17
Eje Intestino-Hígado	18
Microbiota.....	19
Bifidobacterias	19
Objetivo general	21
Objetivos específicos.....	21
Materiales y métodos.....	22
Microorganismo y condiciones de cultivo	22
Activación de de <i>Bifidobacterium</i> sp.....	22
Determinación de bacterias viables	22
Modelo experimental	24

Obtención de muestras biológicas	26
Análisis histológico.....	26
Análisis de la expresión de genes IL-1 β y TNF α	27
Extracción de RNA	27
Obtención de cDNA	28
Expresión de genes TNF- α e IL-1 β mediante qPCR	29
Resultados.....	30
Efectos en peso corporal	30
Características macroscópicas del hígado.....	32
Análisis del efecto en la fibrogénesis	35
Evaluación de la expresión de genes inflamatorios	37
Expresión del gen TNF- α	37
Referencias	41

Introducción

El carcinoma hepatocelular (CHC) representa un problema significativo para la salud a nivel global debido a su alta incidencia y mortalidad, siendo reconocida como una de las principales causas de muerte por cáncer en muchas regiones del mundo y posicionándose como el tipo de cáncer hepático más común asociada con enfermedades crónicas del hígado, dentro de las que se encuentran la hepatitis B y C, cirrosis, enfermedad de hígado graso no alcohólica, exposición a aflatoxinas, incluso enfermedades genéticas que afectan al hígado, como la hemocromatosis.

El CHC se ha destacado como una preocupación creciente la salud de la población mexicana, representando el 9° tipo de cáncer más común y la 3° causa de muerte por cáncer, con más de 10,000 nuevos casos diagnosticados anualmente de los cuales, más del 70% son diagnosticados en etapas no curativas. Esta situación denota la urgente necesidad de explorar enfoques innovadores que podrían mejorar los prospectos clínicos y la calidad de vida de los pacientes.

Durante las últimas décadas el reconocimiento y la importancia de la microbiota intestinal en relación con la salud hepática y en la progresión del CHC demostrando que, alteraciones en la composición y la función de la microbiota intestinal (disbiosis) se han asociado a una mayor susceptibilidad y progresión del CHC, sugiriendo alternativas para su intervención terapéutica como la investigación del papel de los probióticos, los cuales confieren beneficios para la salud del huésped, sugiriendo que sugerido que podrían modificar favorablemente la microbiota intestinal, promoviendo un entorno intestinal más saludable y reduciendo la inflamación sistémica y la carcinogénesis hepática.

El objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de la suplementación con bifidobacterias en un modelo de carcinogénesis química inducida en ratas, utilizando dietilnitrosamina como agente carcinogénico, durante 6 semanas.

Marco teórico

Hígado

El hígado es el órgano más voluminoso dentro del abdomen. Se ubica en la parte alta de la cavidad abdominal, ocupando la mayor parte de la región hipocondrial derecha y el epigastrio e invade un poco el hipocondrio izquierdo (Figura 1).^{1,2} En condiciones sanas, tiene una coloración pardo-rojiza, de consistencia firme con capacidad expansible debido a su riqueza en vasos sanguíneos que pueden almacenar gran cantidad de sangre. El peso de este órgano oscila entre los 1.2 y 1.5 kg, pero puede llegar a pesar más de 2 kg.²



Figura 1. Ubicación anatómica del hígado en el cuerpo humano. (Modificada de García-Porro y Hurlé González, 2019)

El hígado es un órgano dinámicamente complejo y fundamental del cuerpo humano, considerado como un centro crítico, responsable de una serie de procesos fisiológicos en todo el cuerpo, entre los que se encuentran el mantenimiento de la homeostasis del organismo, la regulación de los sistemas de metabolismo de los macronutrientes (glucosa y lípidos),³⁻⁵ apoyo al sistema inmune, desintoxicación y almacenamiento de vitaminas, entre otros.^{6,7}

El hígado tiene un doble aporte de sangre por la arteria hepática y por la vena porta. La arteria hepática lleva al hígado el 30% de flujo sanguíneo; sangre oxigenada. En el hilio hepático se dividen en hepática derecha, que vasculariza la porción derecha del hígado, y la hepática

izquierda, que irriga al resto del órgano. La vena porta transporta el 70% del flujo de sangre hepática, ² (Figura 2); se ramifica en vénulas más pequeñas por las que la sangre entra en el parénquima a través de las tríadas portales ^{8,9} (agrupación de un conducto biliar, vena portal y arteria hepática, en los vértices de los lobulillos). La sangre de la vena porta y la arteria hepática confluyen en los sinusoides hepáticos y de allí es conducida a la vena central de los lobulillos ^{2,9}.

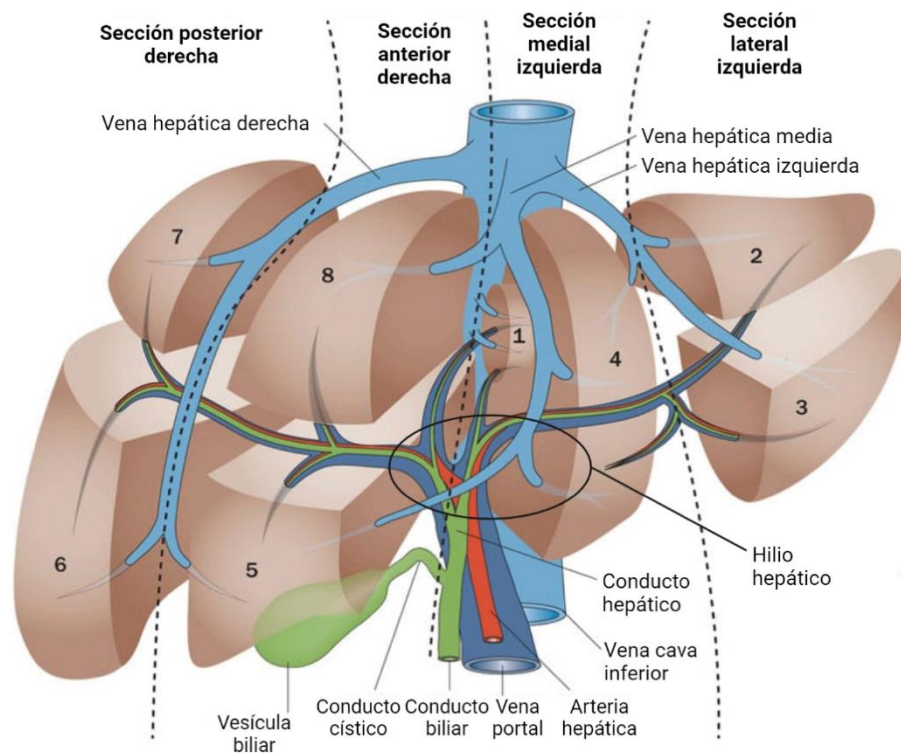


Figura 2. Irrigación y segmentación funcional del hígado. (Modificada de Tomi-Tricot, 2018)

Los lobulillos hepáticos, son las unidades funcionales del hígado (Figura 3). El número de lobulillos oscila entre 50,000 a 100,000; son estructuras aproximadamente hexagonales de 1-2 mm de diámetro. Cada lobulillo consta de elementos vasculares, células hepáticas y células del sistema reticuloendotelial. Tienen una vena central (intralobulillar) que transporta la sangre venosa hacia las venas hepáticas. La vena central se irradia los sinusoides hepáticos,

espacios capilares que reciben sangre de la vena porta y de la arteria hepática (espacios interlobulillares). Se encuentran también conductos biliares interlobulillares.²

El flujo de sangre desde la tríada porta a la vena central contribuye a una zonificación basada en la disminución de la tensión de oxígeno. Esto afecta tanto a las células no parenquimatosas como a las parenquimatosas.⁵

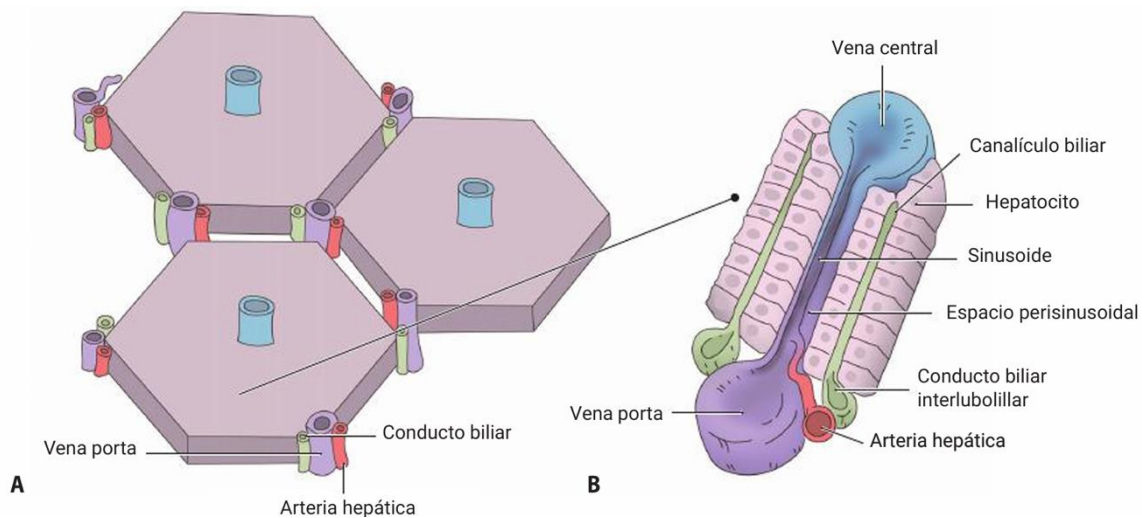


Figura 3. Estructura de los lobulillos hepáticos. A) Disposición de tres lobulillos hepáticos separados por espacios interlobulillares. B) Placa hepática. (Modificada de García-Porro y Hurlé González, 2019)

El hígado está compuesto por varios tipos celulares de distinto origen biológico, entre los que se encuentran principalmente hepatocitos, células epiteliales biliares, colanginocitos, células estrelladas, células Kupffer y células endoteliales del hígado.⁷

Las células parenquimatosas (hepatocitos) comprenden el 60% de la población celular y son responsables de la actividad metabólica del hígado (incluidas las isoformas del citocromo P450 (CYP450), la producción y liberación de proteínas de fase aguda, la producción de proteínas plasmáticas (como la albúmina y factores de coagulación), y la integración de diversos componentes de la glucosa, los lípidos, el nitrógeno y el metabolismo oxidativo.^{5,10}

Las células no parenquimatosas componen el 40% restante de la población celular hepática y desempeñan un papel fundamental en la arquitectura del tejido y en la mediación de las respuestas del tejido a estímulos metabólicos y tóxicos, además de apoyar la función de los hepatocitos. Estos tipos de células incluyen células endoteliales sinusoidales hepáticas, células de Kupffer, células estrelladas hepáticas y células pit (células asesinas naturales, NK).⁵

Las células de Kupffer juegan un papel importante en la respuesta del hígado ante lesiones al producir citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno. Las células estrelladas, por otro lado, responden a la lesión adoptando un fenotipo de miofibroblastos que ayudan a remodelar la matriz extracelular hepática y aumentan la actividad CYP450 en los hepatocitos. También se ha sugerido que la proliferación de células endoteliales sinusoidales, en respuesta a una lesión favorece la potente capacidad regenerativa del hígado. Así, las células no parenquimatosas complementan las funciones sintéticas y metabólicas de los hepatocitos contribuyendo con estímulos proregenerativos, proinflamatorios y profibróticos,⁵ de modo que, al igual que todos los tejidos del cuerpo, el tejido hepático puede sufrir daños. Estos daños pueden derivar en enfermedades que ocasionen una pérdida parcial o total de la función hepática.

Enfermedades del hígado

Las enfermedades hepáticas representan un desafío significativo para la salud pública, dado el papel central del hígado en la homeostasis metabólica y la detoxificación. Estas afecciones pueden surgir a partir de una variedad de mecanismos patológicos que alteran la estructura y función hepática. Las lesiones en el hígado pueden ser provocadas por diversos factores, que incluyen agentes infecciosos, toxinas, trastornos metabólicos y respuestas inmunitarias anormales.

Las enfermedades hepáticas crónicas involucran el deterioro progresivo de las funciones hepáticas durante más de seis meses que conllevan un proceso continuo de inflamación destrucción y regeneración del parénquima hepático, conduciendo a la fibrosis y cirrosis.¹¹

En México, la cirrosis es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de CHC en la población. Las principales etiologías de la cirrosis en este contexto incluyen el consumo de alcohol, la hepatitis B, la colangitis biliar primaria y la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA).^{12,13} También se ha identificado al síndrome metabólico, causado por el consumo de medicamentos, obesidad y o diabetes, como factores de importancia en el desarrollo de enfermedades hepáticas.

A nivel global, el CHC representa el 80-85% de las neoplasias malignas primarias de hígado, ocupando el 6° lugar en incidencia de cáncer, con una tasa anual de 9.3/100,000 habitantes; y el 4° lugar en mortalidad por cáncer, con una tasa de 8.5/100,000 habitantes, con una relación de mortalidad-incidencia de 0.93, posicionándose como el cáncer maligno más letal.^{12,14} En México, el CHC es el 9° tipo de cáncer más común y la 3° causa principal de muerte por cáncer.¹²

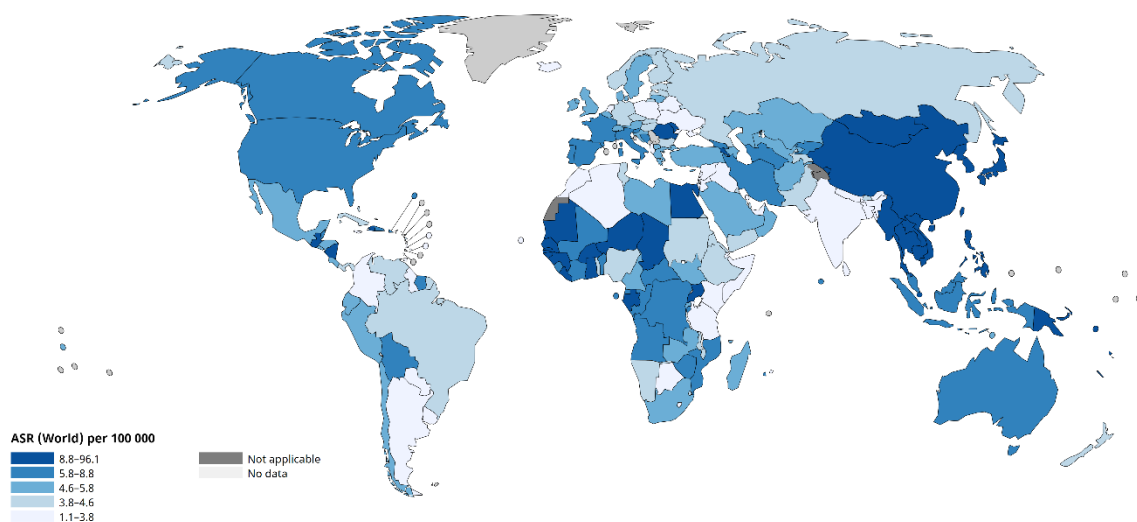


Figura 4. Tasa global de muertes por cáncer de hígado y vías biliares intrahepáticas, estimadas en 2022. Los tonos de azul indican la incidencia de muertes por cada 100 000 habitantes para ambos sexos. Obtenido de <http://gco.iarc.fr/today>, Organización Mundial de la Salud.

Cáncer hepático y carcinoma hepatocelular

El cáncer es un término que describe un grupo de enfermedades caracterizadas por la división descontrolada de células anormales, que pueden invadir tejidos cercanos y formar nuevos tumores (metástasis). Estas células cancerosas también tienen la capacidad de propagarse a otras partes del cuerpo a través de los sistemas sanguíneo y linfático.¹⁵

El cáncer primario de hígado se refiere a tumores malignos que se originan en los tejidos del hígado. Es importante distinguirlo de los cánceres metastásicos que se diseminan al hígado, los cuales no se consideran cánceres hepáticos primarios.

Hay varios tipos de cánceres primarios entre los que se encuentran:

- El sarcoma es un cáncer que se origina en tejidos conectivos y de sostén, incluyendo huesos, cartílago, grasa, músculo y vasos sanguíneos.¹⁶
- El linfoma y el mieloma son cánceres que comienzan en las células del sistema inmune, que pueden acumularse en los ganglios y vasos linfáticos.^{15,16}
- El carcinoma es un cáncer que comienza en las células epiteliales que recubren las paredes internas y externas del cuerpo de los órganos dentro del cuerpo.¹⁵

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el principal tipo de neoplasia hepática maligna primaria del hígado y se origina específicamente en los en los hepatocitos.

Desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC)

En la progresión de CHC hay diferentes etapas, comenzando con una etapa reversible de esteatosis, seguida de una etapa reversible de fibrosis asociada a inflamación, llegando a las etapas irreversibles de cirrosis y CHC (Figura 5).¹⁷

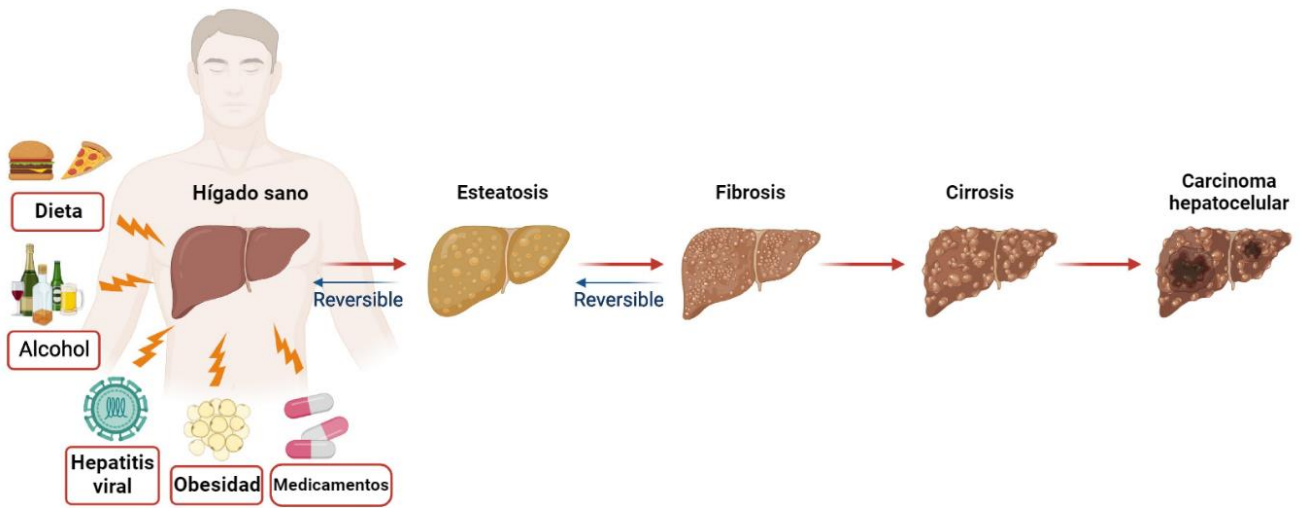


Figura 5. Desarrollo y progresión de CHC, y factores que pueden alterar el hígado. (Modificada de Gutiérrez et al., 2023)

Es muy poco común que el CHC se presente en un hígado completamente sano, es por eso por lo que se considera la presencia de enfermedades crónicas.¹⁸

Esteatosis

La esteatosis hepática es caracterizada por una acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos, es considerada un hallazgo patológico cuando afecta a más del 5% de los hepatocitos. Cuando la esteatosis es consecuencia de una ingesta de alcohol obesidad o síndrome metabólico puede estar asociado con inflamación, que luego puede definirse como esteatohepatitis, aunque también puede actuar como cofactor de la fibrogénesis en enfermedades hepáticas crónicas.^{19,20}

Inflamación

La estimulación celular de una lesión desencadena procesos inflamatorios como un mecanismo de defensa vital para la salud. La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico a estímulos dañinos, como patógenos, células dañadas o compuestos tóxicos,

y actúa eliminando estos estímulos dañinos e iniciando el proceso de sanación mediante la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β ; estas citocinas tienen efectos autocrinos y paracrinos que conducen a la activación local de macrófagos y neutrófilos, pero cuando estas citocinas se liberan en grandes cantidades, pueden ejercer efectos endocrinos, como la inducción de proteínas de fase aguda en el hígado, activación plaquetaria, fiebre y fatiga.²¹ Sin embargo, la inflamación aguda no controlada puede volverse crónica.

En la inflamación crónica, el daño hepático progresivo y crónico induce la regeneración y proliferación de los hepatocitos. A medida que pasa el tiempo, cuanto más se regeneran los hepatocitos, más inestable se vuelve el genoma y mayor es la probabilidad de que adquieran una mutación genética que promueva el cáncer.

TNF- α

El TNF- α es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por macrófagos que desempeña un papel fundamental en la patogénesis de enfermedades inflamatorias autoinmunes y malignas. El TNF- α ejerce sus funciones biológicas, como la proliferación celular, la producción de mediadores inflamatorios y la muerte celular, a través de interacciones con dos receptores de membrana relacionados, el TNFR1 y el TNFR2. La proteína TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión, facilitando la invasión y promoviendo el crecimiento de células tumorales metastásicas del cáncer hepático.^{22,23}

IL-1 β

La Interleucina-1 β (IL-1 β) es producida y secretada por diversos tipos celulares, como las células inmunitarias, los fibroblastos o las células cancerosas. Sin embargo, los mecanismos de producción de IL-1 β se han estudiado más ampliamente en las células inmunitarias, en particular en las células mieloides, como los macrófagos. Se ha demostrado que la IL-1 β está regulada positivamente en muchos tumores sólidos.²⁴

Fibrosis

La fibrosis hepática es un proceso patológico, como consecuencia de una respuesta inflamatoria crónica, caracterizado por la deposición de matriz extracelular (MEC), que resulta en la sustitución gradual de la estructura tisular arquitectura tisular funcional por un exceso de tejido conectivo fibroso, lo que conduce a una reducción de la función orgánica y, en última instancia, a la insuficiencia orgánica.²⁵

Durante el proceso fibrótico el reclutamiento de células inmunes induce la liberación de factores de crecimiento y citocinas, promoviendo la activación y proliferación de fibroblastos. Estos fibroblastos activados, además de las células estrelladas hepáticas, tienen la capacidad de transformarse en miofibroblastos, que contribuyen a la formación de tejido fibroso mediante la síntesis y secreción de moléculas de la MEC, como los colágenos fibrilares los cuales se distinguen por su conformación de triple hélice alargada e ininterrumpida.^{25,26}

En el hígado normal, los colágenos tipo IV y VI están presentes en el espacio de Disse, que está limitado por los hepatocitos y la pared sinusoidal formada por las células endoteliales sinusoidales. Sin embargo, durante la fibrogénesis, estos colágenos son reemplazados por colágenos tipo I y III. Mientras que el colágeno tipo III señala un proceso temprano de reparación y formación de tejido cicatricial en las etapas iniciales de la fibrosis, el colágeno tipo I contribuye a la rigidez y resistencia del tejido cicatricial. Este último actúa como un indicador de daño hepático significativo y cicatrización extensiva, característicos de la fibrosis severa y la cirrosis.²⁶⁻²⁸

Cirrosis

La cirrosis hepática es caracterizada por el desarrollo de nódulos regenerativos, y fibrosis vascularizada en respuesta a una agresión hepática crónica.²⁹ En la cirrosis, el espacio de Disse se llena de tejido cicatricial y se pierden las fenestraciones endoteliales (defenestración), resultando en la inhibición de la transferencia entre sangre y hepatocitos (Figura 6).^{30,31}

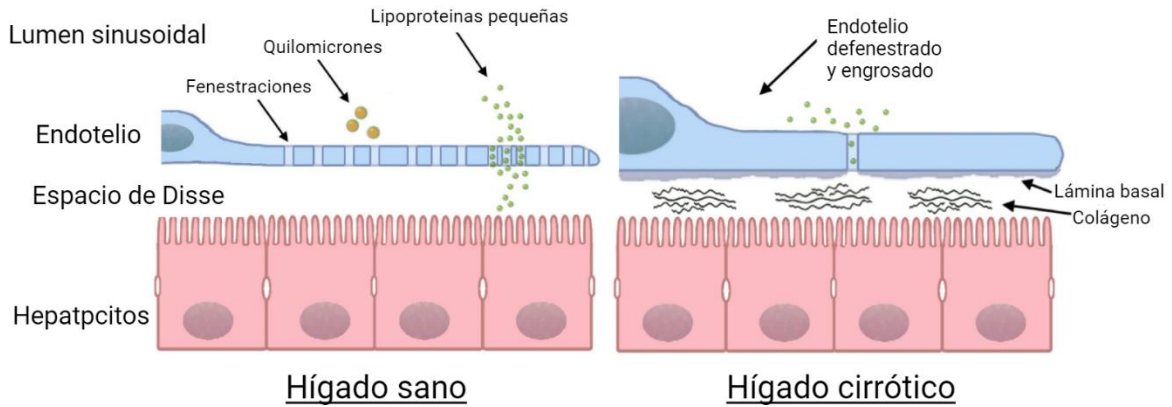


Figura 6. Defenestraciones en la arquitectura del hígado. (Modificada de Szafranska et al., 2021)

Las principales alteraciones clínicas en la cirrosis hepática incluyen hipertensión portal, conexiones arteriovenosas intrahepáticas, derivación portosistémica, capilarización sinusoidal e insuficiencia hepática.³² El hígado cirrótico está en un estado de inflamación crónica y estrés celular, lo que puede promover la acumulación de mutaciones en las células hepáticas y la desregulación de las vías de señalización celular. Este entorno microambiental puede facilitar la transformación maligna de los hepatocitos.

Etapas de la carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso multifactorial que representa la acumulación de defectos adquiridos y defectos genéticos por los cuales las células “normales” se transforman en células cancerosas, la figura 7 muestra las 4 etapas principales:

Iniciación: Esta etapa implica la alteración, cambio o mutación de genes, que pueden ocurrir espontáneamente o ser inducidos por la exposición a agentes físicos, químicos o biológicos conocidos como carcinógenos iniciadores. Las alteraciones genéticas resultantes pueden desregular las vías de señalización bioquímica involucradas en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Factores como la tasa y el tipo de metabolismo carcinogénico y la capacidad de reparación del ADN también influyen en este proceso inicial.³³

Promoción: Esta etapa es un proceso relativamente prolongado y reversible en el que se acumulan células preneoplásicas que están en proliferación activa. Esta fase intermedia puede durar años y es crítica para la acumulación de alteraciones adicionales antes de la transición a una etapa más avanzada.^{33,34}

Progresión: Es la fase final de la transformación neoplásica, caracterizada por cambios genéticos y fenotípicos adicionales, así como un incremento de la proliferación celular. Durante esta etapa, el tumor puede crecer rápidamente y las células pueden adquirir nuevas mutaciones que les confieren potencial invasivo y capacidad para metastatizar. La progresión lleva al desarrollo de un cáncer invasivo.³³

Metástasis: La metástasis es el proceso mediante el cual las células cancerosas se diseminan desde el tumor primario a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático. Esta diseminación permite que las células cancerosas formen tumores secundarios en órganos distantes, complicando el tratamiento y manejo del cáncer.³³

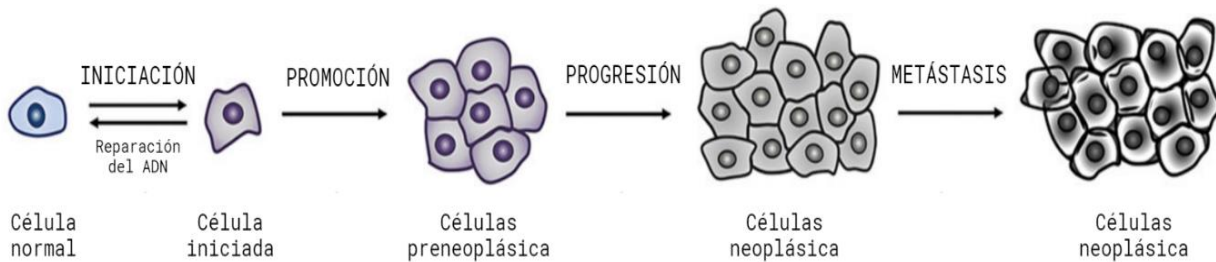


Figura 7. Fases de la carcinogénesis. (Modificada de Siddiqui et al., 2015)

Modelos animales de hepatocarcinogénesis

El estudio de la mayoría de los procesos biológicos tanto normales como patológicos se ha apoyado en el uso de modelos animales experimentales que reproduzcan fielmente la enfermedad humana, lo cual es fundamental para una comprensión exhaustiva de la patogénesis y para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas. Los roedores son considerados una herramienta crucial debido a las similitudes genéticas y fisiológicas con los seres humanos. Debido a su corto ciclo de vida, su capacidad reproductiva y facilidad de manipulación a distintas sustancias; la rata se ha posicionado como uno de los modelos más utilizados para replicar la historia natural, la fisiopatología y la bioquímica del CHC humano.³⁵

Los modelos animales se dividen en varias categorías: modelos genéticamente modificados, modelos singénicos, modelos de xenoinjerto y modelos inducidos químicamente. Estos últimos son especialmente valiosos porque ofrecen un microambiente tisular que refleja de manera fisiológica las condiciones del CHC, así como modificaciones inmunes asociadas con su desarrollo y progresión. Aunque la inducción del tumor puede ser un proceso prolongado, este tipo de modelos permite recrear las características ambientales crónicas del CHC humano, favoreciendo así un estudio más detallado de su desarrollo y evolución con el uso de carcinógenos químicos.³⁶

Existen diversos compuestos químicos que pueden inducir carcinogénesis después de una exposición aguda, a corto o largo plazo, dependiendo de la estructura química, la concentración, la susceptibilidad del animal, etc. Según su actividad y mecanismo patogénico específico, los compuestos químicos cancerígenos se clasifican como carcinógenos genotóxicos, como la dietilnitrosamina, o hepatocarcinógenos no genotóxicos.³⁶

Un modelo de carcinoma hepatocelular (CHC) inducido por DEN ampliamente utilizado es el diseño experimental propuesto por Schiffer et al., (2005).³⁷ Este modelo se basa en la administración repetida de DEN, lo que fomenta el desarrollo de fibrosis que progresa a cirrosis, seguida de CHC después de un período de 14 a 20 semanas con características similares a las observadas en el CHC humano.³⁶

Dietilnitrosamina

La dietilnitrosamina (DEN) es un carcinógeno genotóxico de acción indirecta, perteneciente a la familia de las *N*-nitrosaminas (Figura 8). Por lo general, requieren bioactivación en las células huésped para transformarlos en metabolitos cancerígenos o intermediarios reactivos que sean capaces de ejercer efectos genotóxicos.³⁸

La DEN se metaboliza principalmente en los hepatocitos centrolobulillares. Esto suele estar mediado por reacciones metabólicas de fase I y/o II. Las reacciones de fase I incluyen oxidación, reducción o hidrólisis, por las enzimas de CYP450, como el CYP2E1. Estas enzimas tienen la capacidad de activar carcinógenos de forma independiente o en conjugación con enzimas de fase II como las sulfotransferasas y la *N*-acetiltransferasa.³⁸

La transformación metabólica de las nitrosaminas genera un electrófilo, el ión metilcarbonio que puede unirse al DNA (Figura 9). Los aductos típicos formados en el DNA son *N*-7-metilguanina y *O*-6-metilguanina después de reaccionar. Si esta última no es reparada, puede introducir mutaciones puntuales con potencial carcinogénico.^{39,40}

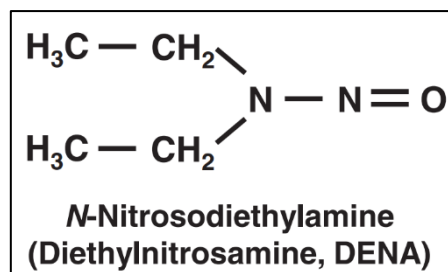


Figura 8. Estructura de la Dietilnitrosamina. (Obtenida de Tolba et al., 2015)

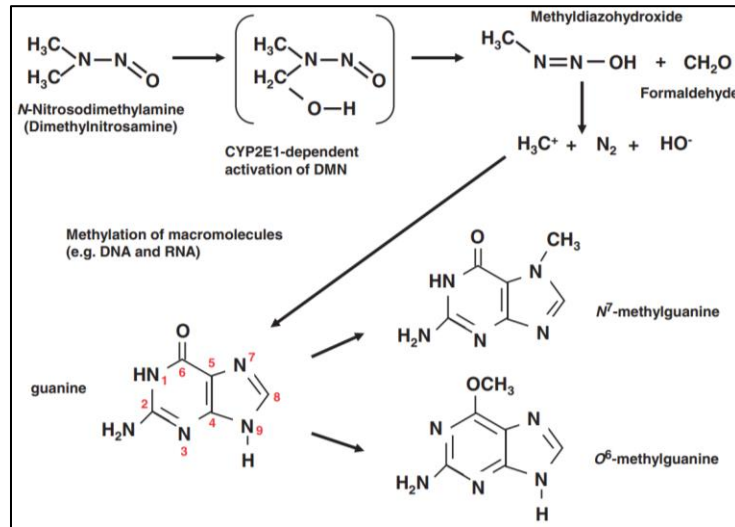


Figura 9. Modelo simplificado de la biotransformación de Dimetilnitrosamina (DMN), aplicable a Dietilnitrosamina (DEN). (Obtenida de Tolba et al., 2015)

El impacto de DEN en el hígado va más allá de las alteraciones genéticas directas. La carcinogénesis hepática está significativamente influenciada por factores que afectan el entorno hepático, entre los cuales destaca el eje intestino-hígado. La salud intestinal, que incluye la composición de la microbiota y la permeabilidad de la barrera intestinal, desempeña un papel crucial en la modulación de la respuesta hepática a carcinógenos como el DEN. Alteraciones en estos factores pueden exacerbar la inflamación y la disfunción hepática, influyendo en la progresión del CHC

Eje Intestino-Hígado

El eje intestino-hígado se refiere a la relación bidireccional entre el intestino, junto con su microbiota, y el hígado; surge como resultado de interacciones entre señales generadas por factores dietéticos, genéticos y ambientales. El hígado y el intestino se comunican ampliamente a través de la vena porta, que transporta los productos derivados del intestino al hígado y el tracto biliar mediante la retroalimentación de la bilis y los anticuerpos del hígado al intestino. La interfaz entre el hígado y el microbioma es la barrera de la mucosa intestinal, que comprende células epiteliales intestinales que mantienen la homeostasis

intestinal mediante la segregación de la microbiota intestinal y las células inmunitarias del huésped.⁴¹

La disfunción de la barrera intestinal, manifestada en forma de aumento de la permeabilidad intestinal, es el factor que facilita la entrada portal de PAMPs, lo que desencadena una cascada proinflamatoria que empeora la inflamación hepática. En este contexto de disfunción de la barrera intestinal, la carga intestinal de bacterias lumenales determina el nivel de PAMPs que se trasladan a la circulación portal y sistémica y, como consecuencia, la gravedad de la inflamación del hígado.⁴¹

Microbiota

La microbiota está compuesta por un número significativo de bacterias diferentes, aproximadamente 160 especies por persona y muestra fecal, y este ecosistema desempeña un papel importante en la salud humana. Se sabe que la colonización microbiana del intestino desempeña un papel clave en las vías inmunológicas y metabólicas que repercuten en la salud humana.⁴²

La protección contra la carcinogénesis mediada por el sistema inmunológico es importante para muchos cánceres humanos. La alteración de la microbiota intestinal sana desencadena una serie de respuestas inmunes innatas y adaptativas involucradas en el proceso de formación de tumores. La relación entre el CHC y la microbiota intestinal es compleja, ya que la microbiota del huésped puede tener un efecto desencadenante, inhibidor o nulo sobre la susceptibilidad al cáncer.⁴³

Bifidobacterias

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ FAO/OMS ha definido a los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped", esto es debido al cambio deseado en el equilibrio microbiano intestinal, por lo que puede aplicarse como tratamiento biológico.

Los probióticos más utilizados en la industria incluyen *Bifidobacterium*.^{44,45} Estos microorganismos pueden tener participación directa o indirecta en diversos beneficios para el organismo, incluida la protección contra microbios patógenos, hipertensión, inflamación, diabetes y estrés oxidativo. Además, participan en la modulación del microbioma, la modulación inmune y la actividad anticolesterolémica.⁴⁵

Las bifidobacterias, al igual que otras bacterias colonizadoras del intestino, son microorganismos anaerobios obligados que pueden sintetizar y producir vitaminas como riboflavina, tiamina, vitamina B6 y vitamina K y moléculas bioactivas relacionadas como ácido fólico, niacina y piridoxina.^{44,45}

Se ha descubierto que este probiótico tiene efectos anticancerígenos, ya que las bifidobacterias previenen la mutagénesis y la genotoxicidad de los compuestos químicos en el colon y reducen la proliferación de células cancerosas. La producción de compuestos anticancerígenos, la promoción del sistema inmunológico, la mejora de la barrera intestinal, la inducción de la apoptosis en células cancerosas, la inhibición del cáncer y su proliferación celular son diferentes tipos de acciones de los probióticos.⁴⁴

Objetivo general

Analizar el efecto de la suplementación con bifidobacterias sobre la expresión de genes de inflamación, en un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata Wistar.

Objetivos específicos

- Inducir hepatocarcinogénesis mediante el uso de dietilnitrosamina durante 6 semanas, de acuerdo con el modelo de Schiffer.
- Analizar la expresión de genes TNF- α e IL-1 β en hígados de rata de los diferentes tratamientos experimentales.
- Realizar análisis histológicos de los hígados de rata de los diferentes tratamientos experimentales por medio de la tinción tricrómica de Masson.

Materiales y métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *Bifidobacterium* sp., que fue cultivada en frascos viales con medio MRS suplementado con HCl-Cisteína al 0.05% (MRS-C) preparado en condiciones anaerobias con burbujeo de CO₂. Estos viales fueron sellados herméticamente y fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/in² por 15 minutos. Una vez inoculados, los cultivos se incubaron a 37 °C en agitación orbital a 180 rpm.

Activación de de *Bifidobacterium* sp.

A partir del cultivo con las bacterias activadas, se inocularon 80 mL de medio MRS-C con el 10% de su volumen total y se incubaron durante 48 horas bajo las condiciones previamente descritas. Tras la incubación, se tomaron 20 mL del cultivo, y las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos. Las células se lavaron dos veces con 20 mL de solución salina fisiológica (SSF) y luego se resuspendieron en 6 mL de agua purificada.

Determinación de bacterias viables

La concentración de bacterias viables en la suspensión se determinó por cuenta viable para garantizar la correcta administración de las bacterias a una concentración de 1×10^9 UFC. Para ello se tomaron 100 µL de la suspensión de *Bifidobacterium* sp., y se llevó a 900 µL de SSF, a partir de aquí se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-8} .

A partir de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , se tomaron alícuotas de 3 µL y fueron inoculadas por triplicado en placas Petri con agar MRS-C (Figura 10).

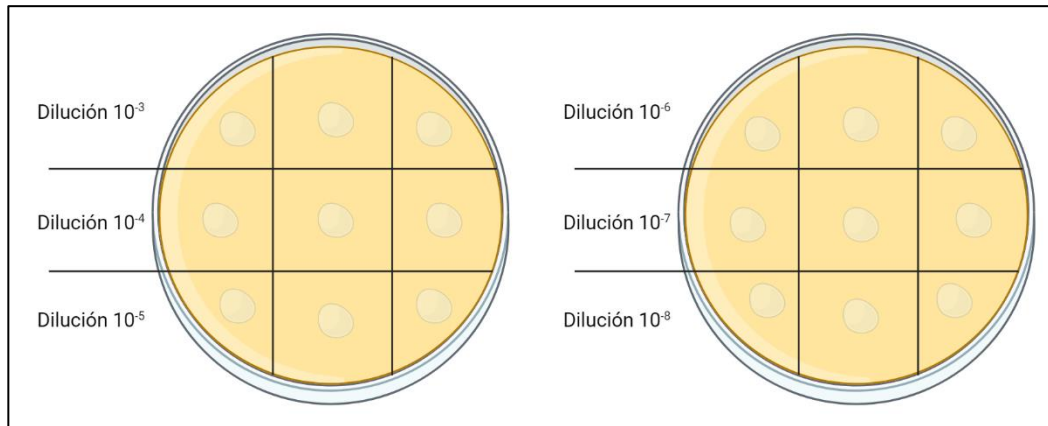


Figura 10. Inoculación por triplicado de bifidobacterias a distintas diluciones en placas con agar MRS-C.

Las placas se incubaron en cámara de anaerobiosis (Thermo Fisher Forma Anaerobic System Modelo 1025) a 37 °C durante 48 h. Se contó el número de colonias en las diluciones donde se desarrollaron y se procedió a realizar los cálculos para conocer la concentración de bacterias en los cultivos, expresada en [UFC/mL].

Modelo experimental

Se utilizaron 20 ratas Wistar macho procedentes del UPEAL-Bioterio de la UAM-Xochimilco con un peso inicial entre 180 a 200 g las cuales se mantuvieron a una temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ bajo ciclos de luz y oscuridad de 12/12 h, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos los cuales se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos experimentales y tratamientos.

Grupo	Abreviatura	No. de ratas	Tratamiento
Control negativo	CTRL-	5	No se administró ningún tratamiento.
Control positivo	CTRL +	5	Administración de dietilnitrosamina. 50 mg/kg; 1 vez/semana por vía intraperitoneal.
Bifidobacterias	BB	5	Administración de <i>Bifidobacterium</i> sp., 1×10^9 bacterias/rata, cada tercer día.
DEN + bifidobacterias	BB-DEN	5	Administración de dietilnitrosamina. 50mg/kg; 1 vez/semana por vía intraperitoneal. Administración de <i>Bifidobacterium</i> sp., 1×10^9 bacterias/rata, cada tercer día.

El tratamiento correspondió al modelo original de Schiffer con administración intraperitoneal de dietilnitrosamina (marca Sigma) en una dosis de 50 mg/kg por semana, ajustado a 6 semanas. Posterior a las semanas de administración, se incluyó un periodo de depuración de 2 semanas; completando un total de 8 semanas. La suplementación de 1×10^9 bifidobacterias se realizó tres veces por semana durante las 8 semanas (Figura 11) y se realizó el seguimiento semanal del peso de las ratas.

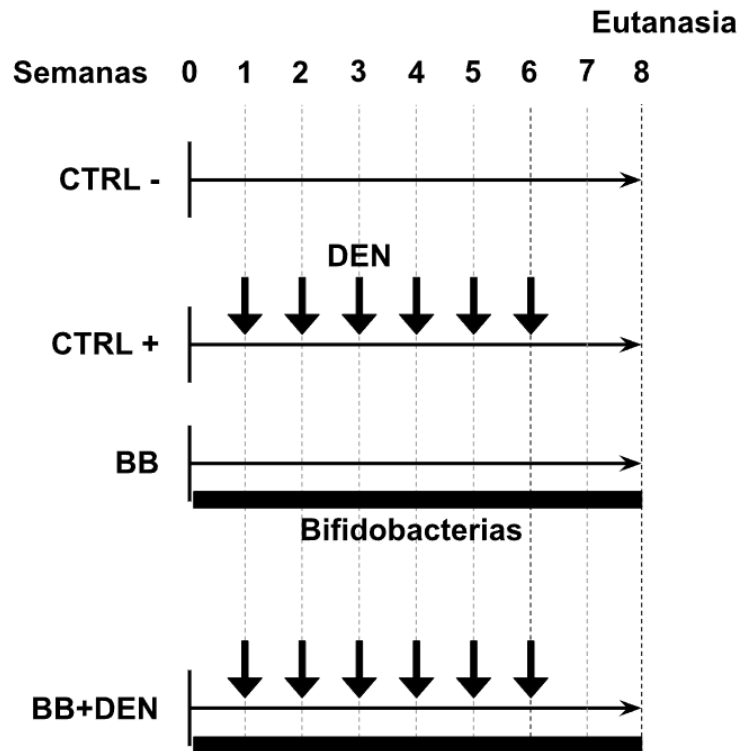


Figura 11. Modelo de Schiffers: La flecha horizontal hacia la derecha representa el tiempo del experimento. Las flechas hacia abajo representan las inyecciones intraperitoneales semanales de DEN a 50 mg/Kg durante 6 semanas. Las barras negras horizontales representan las administraciones de 1×10^9 bacterias/rata cada tercer día durante 8 semanas.

Las dosis de DEN se prepararon el día de la administración, utilizando guantes y cubrebocas en todo momento y envolviendo en aluminio el vial con DEN 50mg/Kg para su transporte desde el Laboratorio de Ecología microbiana de la UAM- X hasta el UPEAL-Bioterio de la UAM-X.

Obtención de muestras biológicas

Las ratas se mantuvieron en ayuno de 12 h previo al sacrificio.

Las ratas fueron anestesiadas por inhalación con Servofluorano de la marca BAXTER. Tras confirmar la efectividad de la anestesia mediante presión en la punta de la cola con una pinza, se colocó a la rata en una tabla de sacrificio, sujetando sus extremidades en la tabla de disección. A continuación, se limpió el área abdominal utilizando una gasa impregnada con benzal, realizando barridos uniformes hacia abajo. Se realizó un corte en forma de V desde el área pélvica hacia el área abdominal y extendiéndola hasta el área torácica procurando no dañar los órganos internos. Una vez expuesta la zona abdominal se realizó un corte en el diafragma para acceder al área torácica. Haciendo uso de una jeringa y ajuga nueva y estéril, se tomaron 5 mL de sangre directamente del corazón y se transfirió a tubos para su centrifugación y obtención de suero, el cual se refrigeró para su posterior análisis.

Una vez obtenida la muestra de sangre, se realizó un corte en la vena cava inferior para desangrar a la rata, inmediatamente después se retiró el hígado cortando los ligamentos y cuidando de no lastimarlo con las tijeras. El hígado se lavó con SSF y se registró su peso y características macroscópicas. Posteriormente se separó lóbulo de mayor tamaño y se cortó en pequeños trozos, algunos trozos fueron conservados en formalina al 4% y el resto fueron congelados utilizando 2-metilbutano en hielo seco y almacenados a -70 °C.

Análisis histológico

Los trozos de hígado fijados en formalina al 4% fueron sometidos a un proceso de deshidratación sumergiéndolos en distintos grados de etanol por 15 minutos por cada uno (Tabla 2). Se realizaron 2 lavados por en cada grado de alcohol; el primero funciona para “lavar” el tejido del alcohol anterior y el segundo funciona para preparar el tejido para el siguiente grado de etanol. Posteriormente, cada tejido sumergió en xilol (mezcla de xileno y cloroformo 1:1) durante 1 hora y se realizó el proceso de inclusión en parafina.

Se inició por sumergir los tejidos toda una noche en parafina (Parafina 1) a 68 °C. Al siguiente día se cambió la parafina (Parafina 2), transfiriendo los tejidos durante 1 hora a 68 °C,

seguido de otro cambio de parafina “Parafina 3) durante 1 hora. Finalmente se transfirieron los tejidos a un casete etiquetado y utilizando una parafina nueva (Parafina 4) calentada en baño María, se obtuvieron los cassetes con los tejidos incluidos. Estos bloques fueron llevados al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), donde realizaron cortes histológicos y se les realizó el tratamiento para obtener Tinciones Tricrómicas de Masson de cada tejido.

Análisis de la expresión de genes $Il-1\beta$ y $TNF \alpha$

Extracción de RNA

En una hielera con hielo seco, aproximadamente 0.09 g de hígado congelado se cortaron con un bisturí limpiado con RNase Zap®. El hígado se maceró en un mortero sobre hielo seco. Con un pincel limpiado con RNase Zap® y con las cerdas congeladas, se transfirió el hígado macerado a un microtubo de 1.5 mL, se agregó 1 mL de reactivo TRIzol® y se homogeneizó con el tejido usando la punta de la micropipeta. Se añadieron 200 μ L de cloroformo grado biología molecular y se incubó la muestra sobre hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una microcentrífuga Eppendorf® (“Centrífuga 5447R”). Se descartaron la fase orgánica y la interfase, y se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL al cual se añadieron 500 μ L de isopropanol grado biología molecular y se incubó a -20 °C durante 1 hora. Después, se centrifugó a 1174 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet formado se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% grado biología molecular. Se homogeneizó con un Vortex 2000® marca Mixer® durante 5 segundos y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar en el área estéril de un mechero de alcohol durante 5 a 7 minutos. El pellet seco se resuspendió en 20 μ L de agua libre de RNasas y se calentó en un termoblock a 55-60 °C durante 10 minutos. El RNA obtenido se cuantificó utilizando un Nanodrop® con 2 μ L de muestra.

La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, sumergido en TAE 1X. Se aplicó un voltaje inicial de 50 V durante 10 minutos, seguido por un aumento a 100 V durante 60 minutos. El gel se analizó sobre una lámpara de luz UV para evaluar la integridad de la muestra. El RNA obtenido se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Obtención de cDNA

A partir del RNA obtenido, se prepararon diluciones llevando 375ng de RNA a 4.5 μ L de agua libre de RNasas, las muestras se mantuvieron en una gradilla enfriadora durante el proceso.

Para preparar la “Mezcla de reacción para cDNA” se utilizó el kit High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) de Thermo Fisher Scientific® y se siguieron las instrucciones del fabricante, ajustando todos los volúmenes como se muestra en la Tabla 2 como se describe a continuación.

Tabla 2. Componentes de la reacción de RT utilizando el kit: High Capacity RNA-to-cDNA.

Componente para la reacción	Volúmenes reacción
2X RT Buffer Mix	5 μ L
20X RT Enzyme Mix	0.5 μ L
Muestra de RNA	4.5 μ L

Se preparó la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA en un microtubo para PCR, utilizando 5 μ L de 2X RT Buffer Mix y 0.5 μ L de 20X RT Enzyme Mix. A continuación, se añadieron 4.5 μ L de la muestra de ARN a la mezcla, y el microtubo fue sellado cuidadosamente para evitar contaminación.

La mezcla se incubó en un termoblock programando las siguientes condiciones de temperatura y tiempo: primero se incubó a 37 °C durante 60 minutos para permitir la actividad de la transcriptasa inversa y la síntesis de cDNA, seguido de un aumento de temperatura a 95 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Posteriormente, se mantuvo a 4 °C, hasta que se extrajo la muestra del termoblock, para conservar la estabilidad del cDNA obtenido.

Finalmente, al cDNA sintetizado se le añadieron 90 μL de agua libre de RNasas, y la muestra se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

Expresión de genes TNF- α e IL-1 β mediante qPCR

Este procedimiento se realizó utilizando una placa para PCR colocada sobre una gradilla de enfriamiento y cada reacción se colocó en un pozo diferente. Para cada reacción se colocaron 7.5 μL de Universal PCR Máster Mix TaqMan® y se agregaron 0.75 μL de sonda específica para el gen de interés. Para cada muestra seleccionada se incluyó 1 reacción con el gen 18s para normalizar la expresión de los genes de interés y 1 reacción por cada gen, TNF- α e IL-1 β , utilizando la Sonda TaqMan® Gene Expression Assay correspondiente: Para el gen 18s se utilizó la sonda Rn03928990_g1; para el gen TNF- α se utilizó la sonda Rn00562055_m1; para el gen IL-1 β se utilizó la sonda Rn00580432_m1.

Posteriormente se agregaron 6.75 μL de muestra de cDNA a cada pozo, obteniendo un volumen total de 15 μL en cada pozo. Para cada gen se colocó una reacción control sustituyendo la muestra de cDNA por 6.75 μL de agua libre de RNasas para verificar la inexistencia de contaminación en el agua utilizada.

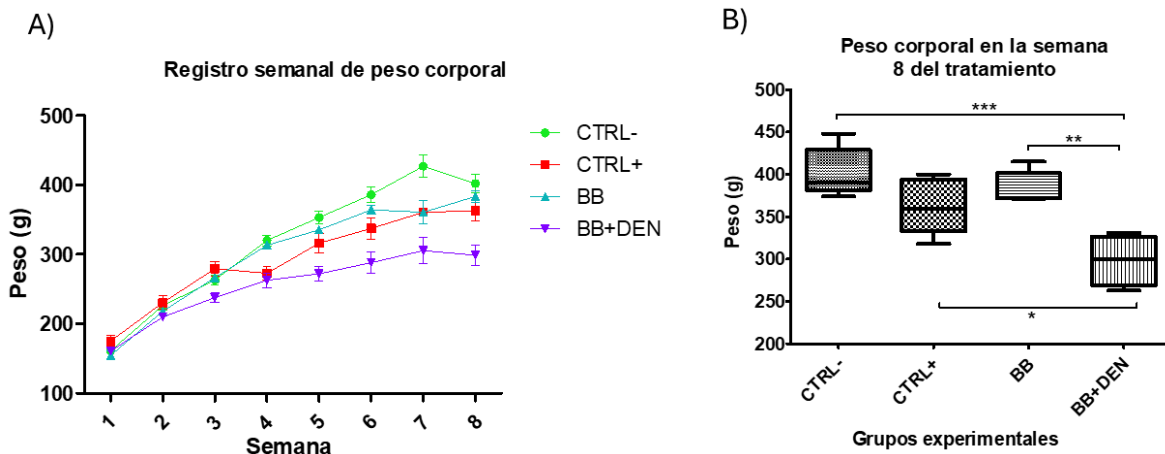
La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador StepOne PCR Tiempo Real utilizando sondas TaqMan bajo las siguientes condiciones: una etapa inicial a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos y luego a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos; seguida de una etapa de amplificación con 45 ciclos de desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos y alineación/extensión a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, con adquisición de fluorescencia específica al final de cada ciclo. Al finalizar, se realizó el análisis de expresión mediante $\Delta\Delta\text{C}_T$ y ANOVA de una vía con significancia $P<0.05$ para la comparación de inter-grupos, y una prueba de Tuckey para comparaciones múltiples.

Resultados

Efectos en peso corporal

Uno de los parámetros utilizados como referencia para evaluar el daño provocado por DEN es el registro y comparación del peso corporal. Por esa razón, 1 vez por semana durante las 8 semanas de administración de bifidobacterias se registró el peso corporal de cada rata y con esos datos se calculó la media de peso semanal por grupo experimental obteniendo la gráfica que se observa en la Gráfica 1A.

Para evaluar el efecto de las bifidobacterias y el carcinógeno a lo largo del tiempo. Finalmente, se realizó un análisis ANOVA de 1 vía, utilizando la media de los pesos por cada grupo como se observa en la Gráfica 1B.



Gráfica 1. A) Registro de los pesos promedio semanales por grupo experimental durante las 8 semanas de administración de bifidobacterias. Las primeras 6 semanas corresponden también al periodo de administración de DEN. **B)** Comparación de las medias del peso corporal por grupo experimental al finalizar la semana 8 de administración de bifidobacterias, correspondiente a la segunda semana de depuración posterior al periodo de administración de DEN. Los niveles de significancia estadística se indican como * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), y *** ($P < 0.001$).

En la Gráfica 1A se observa un incremento progresivo en el peso corporal para los cuatro grupos experimentales desde la semana 1 hasta la semana 7, aunque con diferencias significativas entre ellos. El grupo CTRL- muestra el mayor incremento a lo largo del modelo

experimental, alcanzando el peso promedio más alto durante la semana 7, finalizando, en la semana 8, con un peso promedio de 402 g.

En contraste, el grupo CTRL+ exhibe un aumento de peso constante durante las primeras tres semanas; sin embargo, esto cambia a partir de la semana 4, cuando se registra una disminución en el peso promedio. Posteriormente, el peso vuelve a incrementar, aunque de manera menos acelerada en comparación con las primeras semanas, finalizando con un peso de 362.8 g.

De manera similar al grupo CTRL-, el grupo BB presenta un incremento progresivo en el peso corporal hasta la semana 6. Aunque muestra una ligera estabilización hacia el final del periodo de administración, nuevamente muestra un aumento de peso en la semana 8 del periodo de administración de bifidobacterias con un peso final de 383.6 g

Por otro lado, el grupo BB+DEN muestra diferencias en el aumento del peso corporal, con un incremento menos acelerado en comparación con los otros grupos. Con excepción de la semana 1, este grupo mantiene los pesos promedio más bajos a lo largo del tiempo, finalizando con una media de pesos de 298.8 g.

La Gráfica 1B muestra un análisis comparativo de la media de los pesos finales en la semana 8. Se observa una diferencia altamente significativa (con un valor $P < 0.01$) entre los grupos CTRL+ y BB+DEN, lo que evidencia el efecto de la combinación de la administración del carcinógeno y las bifidobacterias, que resulta en una disminución de la ganancia de peso. Asimismo, la comparación entre los grupos BB y BB+DEN reveló diferencias significativas entre ambos tratamientos. De igual forma, se encontró una diferencia significativa entre los grupos CTRL- y BB+DEN. En contraste, las comparaciones entre los demás grupos experimentales no mostraron diferencias significativas en los pesos finales.

Gracias a estos datos se demuestra el efecto del carcinógeno sobre el sobre el peso corporal, comenzando por el hecho de que ambos grupos que no recibieron el carcinógeno (CTRL- y BB) registraron un mayor peso promedio con respecto a los grupos a los que sí fueron administrados con el carcinógeno (CTRL+ y BB+DEN). Esto puede ser explicado tanto por las alteraciones metabólicas que pueden surgir derivadas de la inflamación y el estrés

oxidativo como a la desregulación hormonal debida al daño hepático aunados al efecto de la toxicidad del carcinógeno que resultan en una pérdida del apetito.

También se puede ver un efecto de las bifidobacterias sobre la ganancia de peso que se hace más evidente con la diferencia significativa de la comparación del grupo BB y BB+DEN. Hamed Riveros *et al.*, (2024), reportan mediante una revisión sistemática el efecto de las bifidobacterias en la pérdida de masa corporal, específicamente de grasa corporal.⁴⁶ Este efecto en conjunto con las alteraciones metabólicas provocadas por DEN, explican la menor ganancia de peso en el grupo al que se le administraron ambos tratamientos.

Características macroscópicas del hígado

Inmediatamente después de la extracción de los hígados, se pesaron, fotografiaron y registraron sus características macroscópicas. Las observaciones se presentan en la Tabla 3 y las imágenes representativas de los hígados en cada grupo experimental se presentan en la Figura 12.

Tabla 3. Observaciones macroscópicas de los hígados extraídos de los diferentes grupos experimentales (CTRL-, CTRL+, BB y BB+DEN) a las 8 semanas de tratamiento con bifidobacterias de las cuales, las primeras 6 semanas también se administró DEN

Grupo		Observaciones
CTRL -	R1	Apariencia normal sin daños
	R2	Apariencia normal sin daños
	R3	Apariencia normal sin daños
	R4	Apariencia normal sin daños
	R5	Apariencia normal sin daños
CTRL+	R1	Se observa porosidad
	R2	Se observa ligeramente porosidad
	R3	Se observa ligeramente porosidad y rugosidad
	R4	Se observa ligeramente porosidad
	R5	Apariencia con rugosidad
BB	R1	Apariencia normal sin daños

	R2	Apariencia normal sin daños
	R3	Apariencia normal sin daños
	R4	Apariencia normal sin daños
	R5	Apariencia normal sin daños
BB+DEN	R1	Se observa ligeramente porosidad
	R2	Se observa porosidad
	R3	Se observa ligeramente porosidad
	R4	No se obtuvo muestra de hígado debido a que el sujeto murió por razones desconocidas en la semana 4
	R5	Se observa ligeramente porosidad

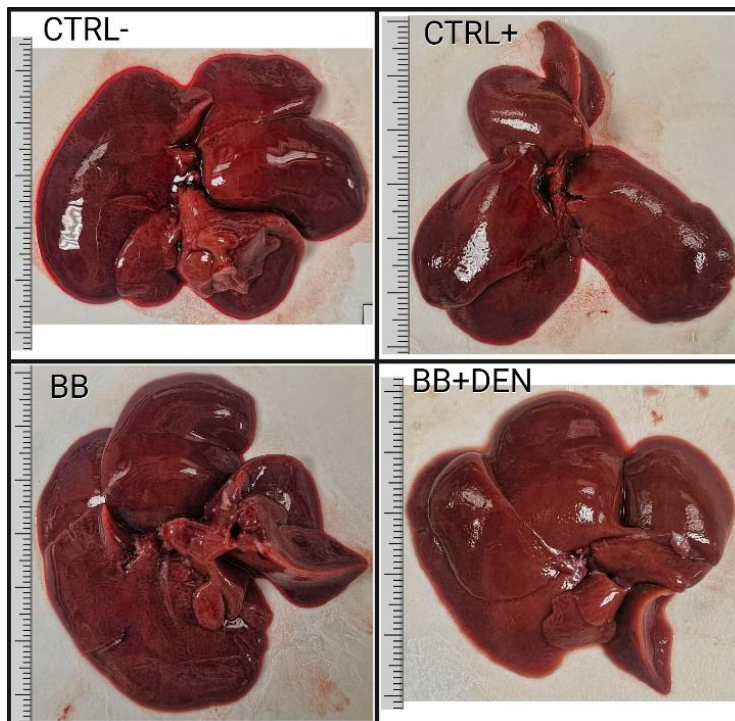
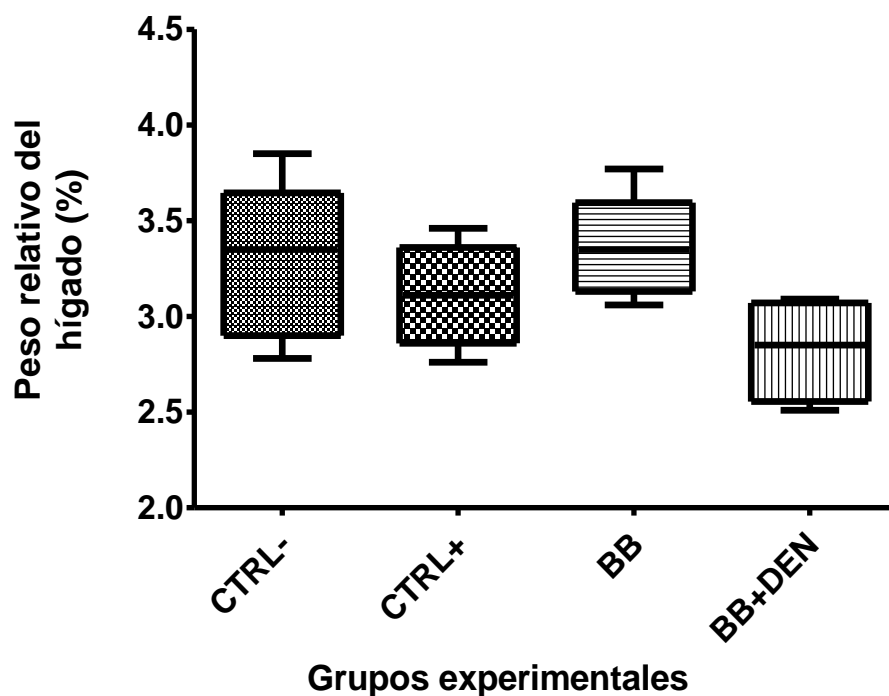


Figura 12. Imágenes representativas de hígados por cada grupo experimental.

El análisis visual de los hígados al momento de su extracción, en su gran mayoría deja observar hígados normales o con ligera porosidad y rugosidad. Estas alteraciones de la estructura hepática que podrían asociarse con el inicio del desarrollo de hepatitis o inclusive fibrosis provocada por los efectos de DEN. No obstante, existe una disminución en los efectos del carcinógeno sobre los hígados tratados con bifidobacterias. Esto evidencia,

aunque no en gran manera, el efecto protector de las bifidobacterias contra la inflamación y estrés oxidativo, que contribuye a la prevención de la mutagénesis, además de su protección contra agentes genotóxicos.

Inmediatamente después de la extracción de los hígados, se registró el peso individualmente y los datos se agruparon por grupo experimental, para obtener el peso relativo por grupo experimental y posteriormente realizar el análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía, este análisis está representado en la Gráfica 2.



Gráfica 2. Análisis estadístico del peso relativo de los hígados por grupo experimental reportado al final la semana 8 del periodo de administración con bifidobacterias.

El análisis del peso relativo en este modelo experimental es fundamental para evaluar el impacto del efecto del carcinógeno y la eficacia del tratamiento con bifidobacterias para poder detectar cambios en el tamaño del hígado que pueden no ser visibles, pero pueden reflejar procesos inflamatorios.

Una vez realizado el análisis se determinó que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales. Sin embargo, se observa una clara tendencia de los grupos administrados con DEN de presentar un peso relativo más bajo. Esto puede ser explicado por el efecto hepatotóxico del carcinógeno en la etapa inicial del desarrollo de CHC, resultando en una reducción del tamaño y peso del hígado, antes del desarrollo de una proliferación tumoral. Aunado a esto y como se observa en el registro histórico de los pesos promedios (Gráfica 1), el efecto citotóxico también llega a afectar al peso total de las ratas, lo cual también se refleja en la disminución del peso relativo.

Análisis del efecto en la fibrogénesis

Se evaluó histopatológicamente el desarrollo de fibrosis hepática inducida por DEN mediante la tinción tricrómica de Masson en los hígados de ratas (Figura 13). Este método permitió analizar la deposición de fibras de colágeno en el parénquima hepático como parte del estudio de la carcinogénesis.

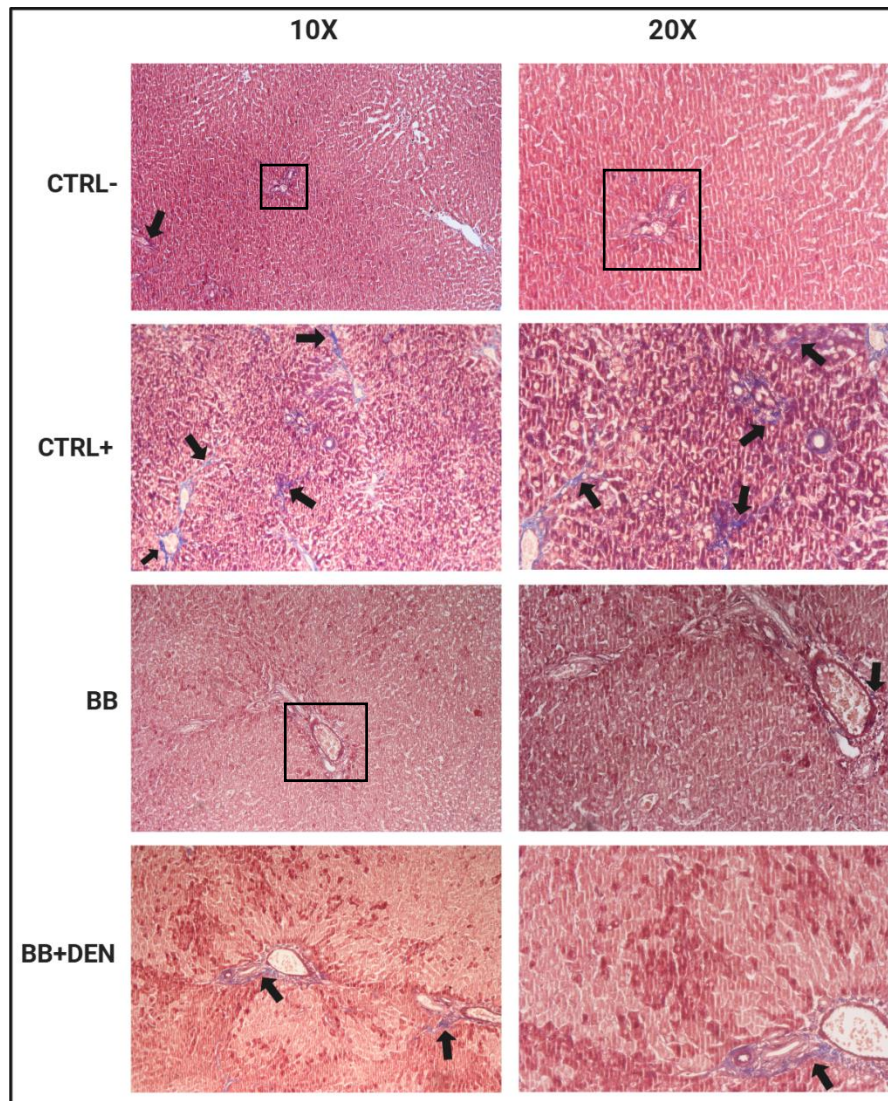


Figura 13. Deposición de fibras de colágeno en el parénquima hepático. Se realizó una tinción tricrómica de Masson para identificar las deposiciones de colágeno las cuales se tiñen de color azul. Imágenes representativas de cada grupo experimental.

En el grupo CTRL- se observa, de una intensidad muy tenue, una acumulación mínima de colágeno alrededor de la triada portal sin señales de una sobre acumulación ni una expansión de colágeno alejada de la zona portal, lo cual es característico de un depósito normal de colágeno.

Para el grupo CTRL+ se observan deposiciones de colágeno de color azul intenso que se extienden por fuera de las áreas portales y vena central en múltiples direcciones a través del parénquima hepático, demostrando un proceso de fibrosis posiblemente clasificada en etapa

1 debido a que no se muestra una gran expansión de las deposiciones colágeno, demostrando que el DEN sí pudo ser capaz de iniciar procesos fibróticos dentro del hígado.

La muestra del grupo BB también muestra pequeñas deposiciones alrededor de la zona portal, pero de color azul más tenue que en las del grupo CTRL-, aunque esto también puede deberse a cambios que se pudieron realizar a los parámetros de captura de la cámara evidenciando.

Finalmente, el grupo BB+DEN muestra deposiciones de colágeno alrededor de la zona portal, además en la parte inferior derecha se logra apreciar levemente una acumulación de colágeno que se extiende hacia el parénquima hepático, pero es, en extensión considerablemente más corta y menos intensa en comparación con lo observado en el grupo CTRL+. Esto indica una atenuación de la fibrosis hepática debida al efecto de la administración con bifidobacterias.

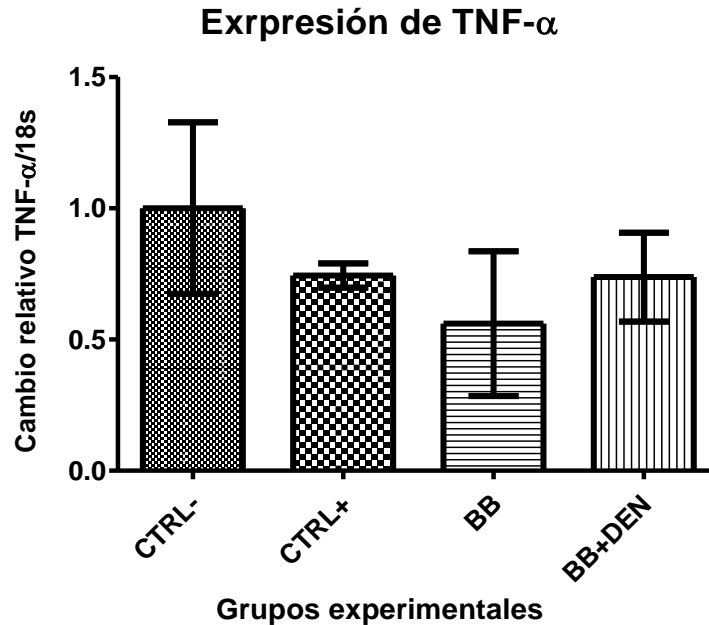
Evaluación de la expresión de genes inflamatorios

La expresión de los genes proinflamatorios TNF- α e IL-1 β se determinó mediante sondas TaqMan específicas para cada gen, utilizando el rRNA 18S como gen de referencia. Este gen es ampliamente reconocido por su alta estabilidad y su expresión constante a diversas condiciones experimentales. Además de haber demostrado su capacidad para proporcionar datos de normalización precisos y de alta fiabilidad, convirtiéndolo en una herramienta confiable para la cuantificación de genes involucrados en la inflamación TNF-a e IL-1b.

Para evaluar la expresión génica, se utilizaron únicamente muestras de 3 ratas por grupo experimental, seleccionando las muestras de RNA que demostraron la mejor integridad.

Expresión del gen TNF- α

Como se menciona anteriormente, la expresión del gen proinflamatorio TNF- α se determinó usando una sonda TaqMan específica para este gen y utilizando el 18srRNA para normalizar la expresión. Los resultados fueron graficados y analizados mediante una prueba ANOVA y una prueba post hoc de Tukey. Los resultados del análisis se representan en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Expresión del gen proinflamatorio TNF- α por grupos experimentales. La expresión génica fue normalizada contra el gen de referencia 18S y calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$. Los valores representan el cambio relativo en contraste con el gen de referencia 18S.

TNF- α es expresada como respuesta al estrés celular, daño celular o tisular, promoviendo la angiogénesis, además de estar involucrado en el microambiente tumoral cumpliendo un papel crucial en la regulación de la inflamación, la apoptosis y la inmunidad innata, promoviendo la inflamación crónica y contribuyendo a la progresión de la carcinogénesis.⁴⁷

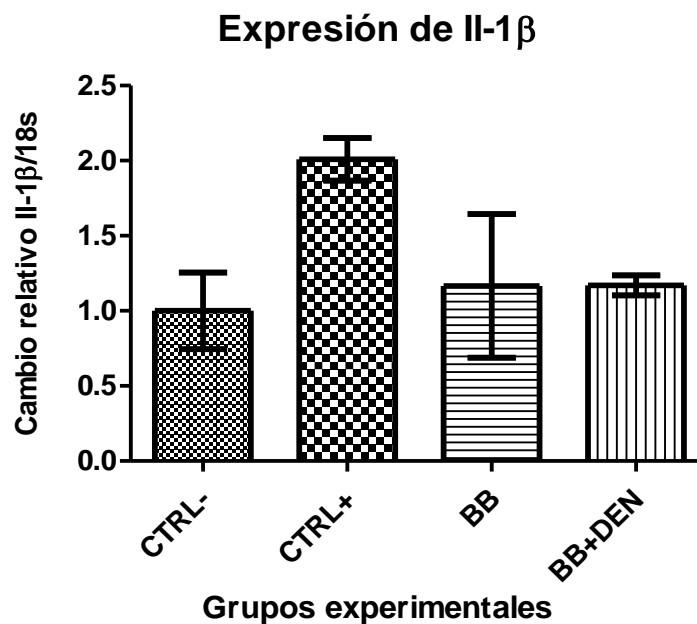
En el análisis estadístico de la expresión génica para TNF- α no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. A pesar de ello, se observa que el grupo CTRL- obtuvo el mayor nivel de expresión en comparación con los demás grupos experimentales; mientras que el grupo que mostró la expresión más baja del gen TNF- α fue el grupo BB. A su vez se aprecia que los dos grupos tratados con el carcinógeno (DEN y BB+DEN) expresan el gen a niveles similares. Complementando lo anterior, se puede observar barras de error bastante amplias para el grupo CTRL- y para el grupo BB, esto es debido a la alta variación de los datos de expresión y la baja cantidad de sujetos pertenecientes a estos grupos, a comparación con los valores del grupo BB+DEN y especialmente del grupo

CTRL+, el cual tuvo una menor variación de expresión de TNF- α entre los miembros del grupo.

Existe evidencia del efecto inmunosupresor de la administración de DEN debido a su papel en la modulación del microambiente tumoral y la afección en células del sistema inmune, y a la alteración de las vías de señalización inmunológicas, disminuyendo la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α .⁴⁸ Al inhibir la producción de la citocina TNF- α , responsable de la eliminación de células tumorales, estas células tumorales son capaces de evadir las respuestas inmunitarias y funciones de eliminación, promoviendo su supervivencia y proliferación.

Expresión del gen IL-1 β

La expresión del gen proinflamatorio IL-1 β , de igual manera, se determinó usando el gen 18s y los resultados fueron registrados en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Expresión del gen proinflamatorio IL-1 β por grupos experimentales. Expresión del gen proinflamatorio IL-1 β . De igual manera, la expresión génica se normalizó utilizando como gen de

referencia al 18S, y calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$. Los valores indican el cambio relativo en comparación con el gen de referencia.

En el análisis de expresión génica de Il-1 β demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos administrados a los grupos experimentales. A pesar de ello, se observa una gran diferencia en el nivel de expresión del grupo CTRL+ siendo el grupo que registró el mayor nivel de expresión, incluso siendo el doble del nivel de expresión en contraste con el grupo CTRL-. A su vez, ambos grupos a los que se les administraron bifidobacterias muestran un nivel de expresión bastante similar y ligeramente superior al nivel de expresión del grupo CTRL-. Sin embargo; el grupo BB+DEN muestra una baja dispersión entre los datos del grupo, a diferencia del grupo BB, del cual se observa una amplia dispersión entre sus datos.

La citocina codificada por el gen Il-1 β es producida por macrófagos activados. Esta citocina proinflamatoria es clave en la respuesta inmune, mediando la activación de linfocitos T y B y teniendo una función promotora para otras citocinas proinflamatorias como Il-6 y TNF- α .⁴⁹ La expresión de este gen aumenta como respuesta a inflamaciones y daño celular. En el hígado, se han observado niveles elevados de Il-1b en pacientes con hepatitis B y C crónicas y están asociadas con la inflamación hepática y fibrosis.⁵⁰

Conclusión

Al analizar los efectos entre los grupos experimentales del modelo de hepatocarcinogénesis, basado en el modelo de Schiffer *et al.*, a 6 semanas, se logró demostrar que la administración de bifidobacterias a una concentración de 1×10^9 UFC, 3 veces a la semana durante 8 semanas, contribuye a un menor aumento de masa corporal y el aumento de tamaño y masa del hígado como consecuencia de procesos inflamatorios característicos de la etapa inicial del CHC. Además, ayuda a reducir el daño hepático producido por DEN, incluyendo la atenuación del proceso de fibrogénesis. También, se demostró una disminución en la expresión del gen Il-1 β , expresado en enfermedades inflamatorias crónicas y etapas iniciales de CHC, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los casos.

Referencias

1. Mahadevan V. Anatomy of the liver. *Surgery (Oxford)*. 2020;38(8):427-431. doi:10.1016/j.mpsur.2014.10.004
2. García-Porrero JA, Hurlé González JM. Hígado. In: *Anatomía Humana*. 2nd ed. EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA, S. A.; 2019:349-359.
3. Watt MJ, Miotto PM, De Nardo W, Montgomery MK. The Liver as an Endocrine Organ— Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocr Rev*. 2019;40(5):1367-1393. doi:10.1210/er.2019-00034
4. Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, et al. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Vol 0. 6th Edition. Wiley-Blackwell; 2020.
5. Beckwitt CH, Clark AM, Wheeler S, et al. Liver ‘organ on a chip.’ *Exp Cell Res*. 2018;363(1):15-25. doi:10.1016/J.YEXCR.2017.12.023
6. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. Physiology, Liver. *StatPearls*. Published online May 1, 2023. Accessed July 1, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
7. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Current Biology*. 2017;27(21):R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
8. Berent AC, Tobias KM. Portosystemic Vascular Anomalies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2009;39(3):513-541. doi:10.1016/J.CVSM.2009.02.004
9. Tomi-Tricot R. Clinical applications of the kT-points method to homogenise spin excitation in 3T MRI. Published online September 26, 2018. <https://theses.hal.science/tel-01912792>
10. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017;152(4):745-761. doi:10.1053/j.gastro.2016.11.048
11. Sharma A, Nagalli S. Chronic Liver Disease. *Sex/Gender-Specific Medicine in the Gastrointestinal Diseases*. Published online July 3, 2023:209-227. doi:10.1007/978-981-19-0120-1_14
12. Cisneros-Garza LE, González-Huezo MS, Moctezuma-Velázquez C, et al. II Consenso Mexicano de Carcinoma Hepatocelular. Parte I: Epidemiología y diagnóstico. *Rev Gastroenterol Mex*. 2022;87(2):216-234. doi:10.1016/j.rgm.2021.10.002
13. Arellano N, Páez L, Arellano C. Hepatocelular carcinoma on non alcoholic fatty liver. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*. 2018;51(3):93-98. doi:10.18004/anales/2018.051(03)93-098
14. Gao Y, Yang T, Yin J, et al. Progress and prospects of biomarkers in primary liver cancer (Review). *Int J Oncol*. Published online April 1, 2020. doi:10.3892/ijo.2020.5035

15. National Cancer Institute. What Is Cancer? Accessed February 19, 2024. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
16. Cancer Research UK. Types of cancer. Accessed February 19, 2024. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>
17. Gutierrez AH, Mazariegos MS, Alemany S, Nevzorova YA, Cubero FJ, Sanz-García C. Tumor progression locus 2 (TPL2): A Cot-plicated progression from inflammation to chronic liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2023;1869(4):166660. doi:10.1016/j.bbadis.2023.166660
18. Vilana R, Forner A, Garca Á, Ayuso C, Bru C. Carcinoma hepatocelular: diagnóstico, estadificación y estrategia terapéutica. *Radiología*. 2010;52(5):385-398. doi:10.1016/J.RX.2010.05.003
19. Sasso M, Miette V, Sandrin L, Beaugrand M. The controlled attenuation parameter (CAP): A novel tool for the non-invasive evaluation of steatosis using Fibroscan®. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(1):13-20. doi:10.1016/J.CLINRE.2011.08.001
20. Sanyal AJ, Boyer TD, Lindor KD, Terrault NA. Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease. *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. Published online January 1, 2017:1-1052. doi:10.1016/C2013-0-19055-1
21. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, et al. A guiding map for inflammation. *Nature Immunology* 2017 18:8. 2017;18(8):826-831. doi:10.1038/ni.3790
22. Jing Y, Sun K, Liu W, et al. Tumor necrosis factor- α promotes hepatocellular carcinogenesis through the activation of hepatic progenitor cells. *Cancer Lett*. 2018;434:22-32. doi:10.1016/J.CANLET.2018.07.001
23. Tan W, Luo X, Li W, et al. TNF- α is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine*. 2019;40:446-456. doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.047
24. Rébé C, Ghiringhelli F. Interleukin-1 β and Cancer. *Cancers* 2020, Vol 12, Page 1791. 2020;12(7):1791. doi:10.3390/CANCERS12071791
25. Ye W, Lv X, Gao S, Li Y, Luan J, Wang S. Emerging role of m6A modification in fibrotic diseases and its potential therapeutic effect. *Biochem Pharmacol*. 2023;218:115873. doi:10.1016/J.BCP.2023.115873
26. Ding DY, Jiang SY, Zu YX, et al. Collagen in hepatocellular carcinoma: A novel biomarker and therapeutic target. *Hepatol Commun*. 2024;8(7). doi:10.1097/HC9.0000000000000489
27. Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta*. 2006;364(1-2):33-60. doi:10.1016/J.CCA.2005.06.014

28. Aydin MM, Akcali KC. Liver fibrosis. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2018;29(1):14. doi:10.5152/TJG.2018.17330
29. Moctezuma-Velázquez C, García-Juárez I, Soto-Solís R, Hernández-Cortés J, Torre A. Nutritional assessment and treatment of patients with liver cirrhosis. *Nutrition*. 2013;29(11-12):1279-1285. doi:10.1016/J.NUT.2013.03.017
30. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2008;371(9615):838-851. doi:10.1016/S0140-6736(08)60383-9
31. Szafranska K, Kruse LD, Holte CF, McCourt P, Zapotoczny B. The wHole Story About Fenestrations in LSEC. *Front Physiol*. 2021;12. doi:10.3389/fphys.2021.735573
32. Faccioli LAP, Dias ML, Paranhos BA, dos Santos Goldenberg RC. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents. *Life Sci*. 2022;301:120615. doi:10.1016/J.LFS.2022.120615
33. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1348(1):20-31. doi:10.1111/NYAS.12811
34. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1. 2021;7(1):1-28. doi:10.1038/s41572-020-00240-3
35. Fuentes S. *Carcaterización de Un Modelo de Hepatocarcinogénesis En El Ratón*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Univerdidad Nacional Autónoma de México; 2018.
36. Jilkova ZM, Kurma K, Decaens T. Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: The Role of Immune System and Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10). doi:10.3390/CANCERS11101487
37. Schiffer E, Housset C, Cacheux W, et al. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(2):307-314. doi:10.1002/HEP.20538
38. Barnes JL, Zubair M, John K, Poirier MC, Martin FL. Carcinogens and DNA damage. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(5):1213-1224. doi:10.1042/BST20180519
39. Valle-Mendolia A, Weiss-Steider B. ORIGEN MOLECULAR DEL CÁNCER. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. Published online 2003:3-8. Accessed February 20, 2024. <https://www.revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/33236/30419>
40. Tolba R, Kraus T, Liedtke C, Schwarz M, Weiskirchen R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab Anim*. 2015;49:59-69. doi:10.1177/0023677215570086/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0023677215570086-FIG4.JPEG

41. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol.* 2020;72(3):558-577. doi:10.1016/J.JHEP.2019.10.003
42. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26(0). doi:10.3402/MEHD.V26.26050
43. Aygün C, Tözün N. Hepatocellular Cancer and Gut Microbiome: Time to Untie Gordian's Knot. *J Gastrointest Cancer.* 2021;52(4):1309-1313. doi:10.1007/S12029-021-00736-5/TABLES/1
44. Heydari Z, Rahaie M, Alizadeh AM. Different anti-inflammatory effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in hepatocellular carcinoma cancer mouse through impact on microRNAs and their target genes. *J Nutr Intermed Metab.* 2019;16:100096. doi:10.1016/J.JNIM.2019.100096
45. Sharma M, Wasan A, Sharma RK. Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. *Food Biosci.* 2021;41:100993. doi:10.1016/J.FBIO.2021.100993
46. Hamed Riveros NF, García-Corredor, Lady, Martínez-Solare M, González-Clavijo A. Effect of *Bifidobacterium* Intake on Body Weight and Body Fat in Overweight and Obese Adult Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Nutrition Association.* Published online 2024. doi:10.1080/27697061.2024.2320192
47. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(5):361-371. doi:10.1038/nrc2628
48. Zidi I, Mestiri S, Bartegi A, Amor N Ben. TNF- α and its inhibitors in cancer. *Medical Oncology.* 2010;27(2):185-198. doi:10.1007/s12032-009-9190-3
49. da Cruz NS, Pasquarelli-do-Nascimento G, e Oliveira ACP, Magalhães KG. Inflammasome-Mediated Cytokines: A Key Connection between Obesity-Associated NASH and Liver Cancer Progression. *Biomedicines.* 2022;10(10):2344. doi:10.3390/biomedicines10102344
50. Şenol A, Alayunt NÖ, Solmaz ÖA. Role of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6 in liver inflammation in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. *Gulhane Medical Journal.* 2021;63(3):200-204. doi:10.4274/gulhane.galenos.2021.1338