

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL**

**Efecto de la suplementación con bifidobacterias sobre la formación de lesiones preneoplásicas en un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata.**

**PRESENTA**

**Gerardo Herrera Analco**

**Matrícula: 2182032802**

**Asesores**

**Dra. María Angélica Gutiérrez Nava**

**Dr. Julio Isael Pérez Carreón**

**Julio 2024**

## Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO .....	4
EL HÍGADO .....	4
ENFERMEDADES HEPÁTICAS.....	7
CÁNCER DE HÍGADO PRIMARIO.....	8
- <i>Carcinoma hepatocelular (HCC)</i> .....	8
- <i>Colangiocarcinoma intrahepático (cáncer de conducto biliar)</i> .....	9
- <i>Angiosarcoma y hemangiosarcoma</i> .....	9
HEPATOCARCINOMA Y LAS LESIONES PRENEOPLÁSICAS.....	9
MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES CRÓNICAS DEL HÍGADO.....	12
MODELO DE SCHIFFER .....	12
COMPUESTOS NITROSOS Y DIETILNITROSAMINA.....	14
PROBIÓTICOS Y SU PAPEL EN EL HEPATOCARCINOMA.....	15
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	16
OBJETIVOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	18
PROTOCOLO EXPERIMENTAL CON RATAS.....	19
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	20
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GGT .....	21
ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
RESULTADOS.....	23
AUMENTO DE PESO CORPORAL.....	23
ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE HÍGADOS.....	24
TINCIÓN HISTOQUÍMICA PARA GGT.....	27
TINCIÓN CON HEMATOXILINA & EOSINA .....	30
CONCLUSIONES .....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

## **Introducción**

El Carcinoma hepatocelular (HCC), es un problema de salud en todo el mundo que representa la cuarta causa de muerte asociada a cáncer y es la sexta neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia. Es el tipo más común de cáncer en el hígado, existen diferentes causas asociadas al desarrollo de HCC, sin embargo, en la actualidad se relaciona principalmente a la cirrosis, siendo los factores de riesgo las infecciones por hepatitis virales (Hepatitis B y C), enfermedad hepática por alcohol, enfermedad por hígado graso no alcohólico y la exposición a las aflatoxinas.

En México existe una tendencia creciente, la tasa de mortalidad relacionada al hepatocarcinoma ha incrementado el 14% en 6 años siendo este la tercera causa de muerte en México, según un estudio de 2008 a 2014. El estudio demostró que la raíz causante más frecuente es la cirrosis por consumo de alcohol, seguido de la infección por virus de la hepatitis C y la enfermedad por hígado graso no alcohólico. En el estudio se detectó que sólo el 39.9% de los pacientes estaba bajo un programa de vigilancia y más del 70% de los casos registrados se encontraban en una etapa no curativa.

Se ha demostrado que la microbiota intestinal tiene un gran impacto en los mecanismos de respuesta inflamatoria lo cual, hace que desempeñe un papel muy importante en las enfermedades hepáticas. Los probióticos tienen la capacidad de modular la microbiota intestinal, la permeabilidad intestinal y la respuesta inmunológica lo cual, se asocia a un mejor pronóstico de dichas enfermedades. Actualmente, se considera como un tema de estudio en donde se propone el uso de los probióticos para prevenir o coadyuvar en alguna enfermedad.

Debido a los recientes estudios que han demostrado una mejoría en diferentes padecimientos hepáticos, el objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de la suplementación con bifidobacterias durante 6 semanas, sobre la formación de lesiones preneoplásicas en un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata.

## Marco teórico

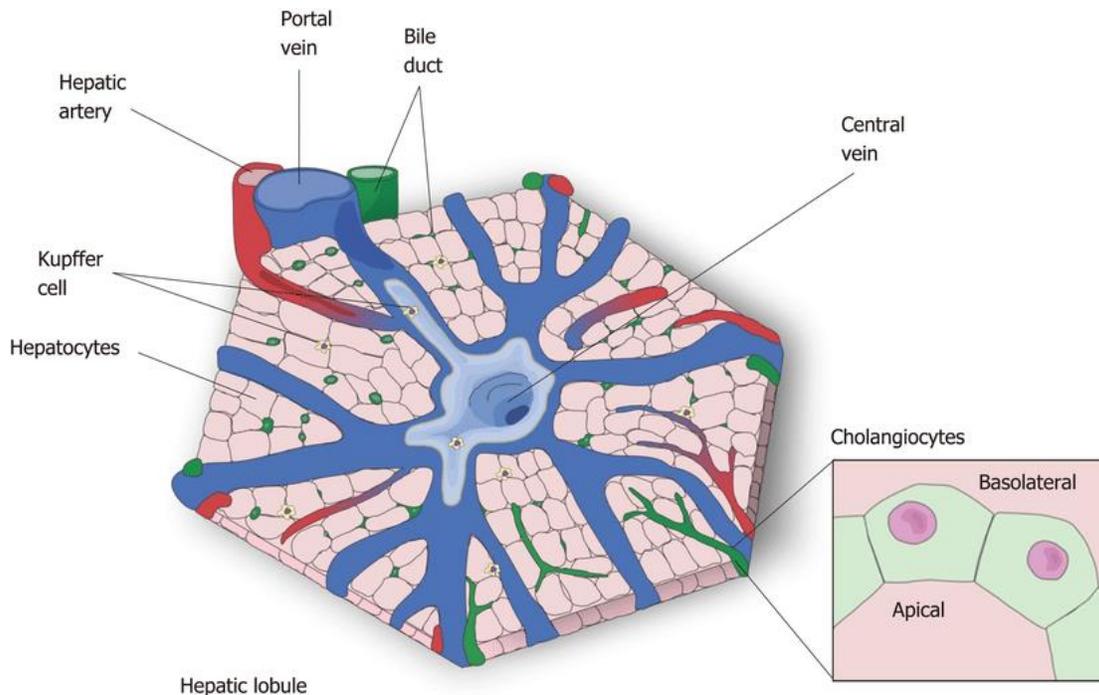
### El hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, cumple un papel muy importante en el metabolismo de nutrientes, detoxificación, regulación de los niveles químicos de la sangre. Dentro de sus funciones se encuentran, la producción de bilis que permite el metabolismo de las grasas, producción de proteínas a nivel plasmático, la producción de colesterol y proteínas especiales para ayudar a transportar las grasas por todo el cuerpo. Asimismo, se encarga de la regulación de los niveles de glucosa almacenando y liberándola en caso de que sea necesario y es el principal órgano encargado de la depuración de fármacos o sustancias nocivas presentes en la sangre (Monterola *et al.*, 2017).

El hígado recibe la sangre de dos fuentes, el 80% es proveniente desde la vena porta, la cual tiene su punto de origen en el bazo y el intestino, y el 20% restante se trata de sangre oxigenada proveniente de la arteria hepática. La vena porta está formada por la unión de las venas esplénicas y mesentéricas superior (Durand, 2019).

El suministro de la arteria hepática termina en los pequeños espacios porta en forma de arteriolas hepáticas terminales, que crean plexos alrededor de la vena porta; la vena porta termina en forma de vénulas portales terminales. La sangre arterial y venosa de los espacios porta fluye a través de los sinusoides hepáticos, llevando nutrientes y la oxigenación requerida al parénquima hepático, drenando en la vena hepática central. Los sinusoides hepáticos son canales revestidos por células endoteliales que forman una lámina permitiendo un fácil intercambio entre la sangre y los hepatocitos (Krishna, 2014).

La unidad funcional y anatómica principal del hígado es el lobulillo hepático, los lobulillos están organizados en hexágonos delimitados por tejido conectivo y compuesto por triadas portales que constan de una arteria hepática, de una vena hepática porta, un ducto biliar y vasos linfáticos; Las triadas portales se encuentra distribuidas en las esquinas formando un hexágono, siendo el centro una vena central (Fig 1).

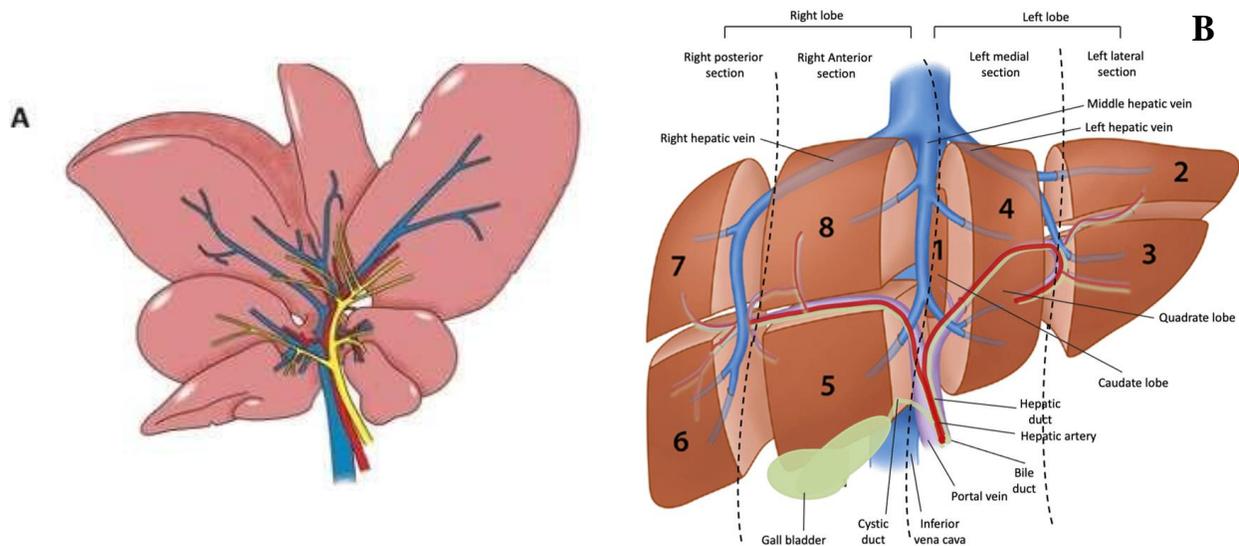


**Figura 1. Anatomía de un lobulillo hepático, con sus distintos componentes, como la triada portal, los hepatocitos, las células de Kupffer, los sinusoides hepáticos y venas (Imagen tomada de Lemos *et al.*, 2019).**

El parénquima del hígado está formado por diversas células, como es el caso de los hepatocitos que son células poliédricas que se organizan en placas y cordones, cumplen funciones endocrinas y exógenas, como el almacenamiento de glucógeno, síntesis de hormonas, ayudan en el proceso de desintoxicación, síntesis de proteínas, síntesis de lípidos, entre otras. Los hepatocitos se encuentran rodeados por sinusoides hepáticos, pero existe un espacio entre estos al cual se le denomina espacio de Dissé, sobre el cual podemos encontrar la presencia de las células de Kupffer, los cuales son macrófagos específicos del hígado, encargados de la eliminación de elementos sanguíneos dañados; En este mismo espacio de Dissé se encuentran las células estrelladas o de Ito, encargadas de almacenar la vitamina A al igual que la síntesis de citoquinas proinflamatorias y proteínas de la matriz extracelular (Rojas *et al.*, 2024).

Por último los colangiocitos son aquellas células que delimitan el sistema biliar intra y extrahepático, ubicados en la superficie interna de los conductos biliares, ayudando a canalizar el flujo biliar hacia el intestino, tiene participación en la producción de bilis al igual que en procesos regenerativos hepáticos (López *et al.*, 2024).

En resumen, para formar el parénquima del hígado, las células se ordenan de la siguiente manera, los hepatocitos forman placas o cordones rodeados por sinusoides que drenan en las venas centrales. Al espacio existente entre las paredes de los hepatocitos y las paredes del sinusoides se le denomina espacio de Dissé, donde se encuentran las células de Kupffer y las de Ito.



**Figura 2. Anatomía del hígado de rata (A) donde se describe 6 lobulillos alimentadas por la arteria hepática y la vena porta. (Imagen tomada de Beal *et al.*, 2017). Esquema de la anatomía del hígado humano (B) dividido en 8 lobulillos, alimentados por la vena hepática central, la arteria hepática y la vena cava inferior (Imagen tomada de Survarachakan *et al.*, 2022)**

## **Enfermedades hepáticas**

El hígado está relacionado con muchos procesos en el cuerpo, principalmente en la regulación de la sangre eliminando productos de desecho de la misma, regulando los niveles de glucosa y la producción de diversos compuestos esenciales para el cuerpo humano. Una lesión hepática puede ser aguda o crónica, según la duración o persistencia de la agresión. Las agresiones agudas en su mayoría se pueden superar con una resolución rápida tras la eliminación del agente dañino y la restitución completa de la arquitectura y función hepática normales sin evidencia duradera de la agresión.

Las consecuencias de una lesión hepática aguda continua son las que impulsan la fibrogénesis hepática lo que eventualmente puede resultar en cirrosis, insuficiencia hepática o carcinoma hepatocelular. La lesión hepática crónica refleja, en parte, una lesión hepática aguda continúa prolongada en el tiempo.

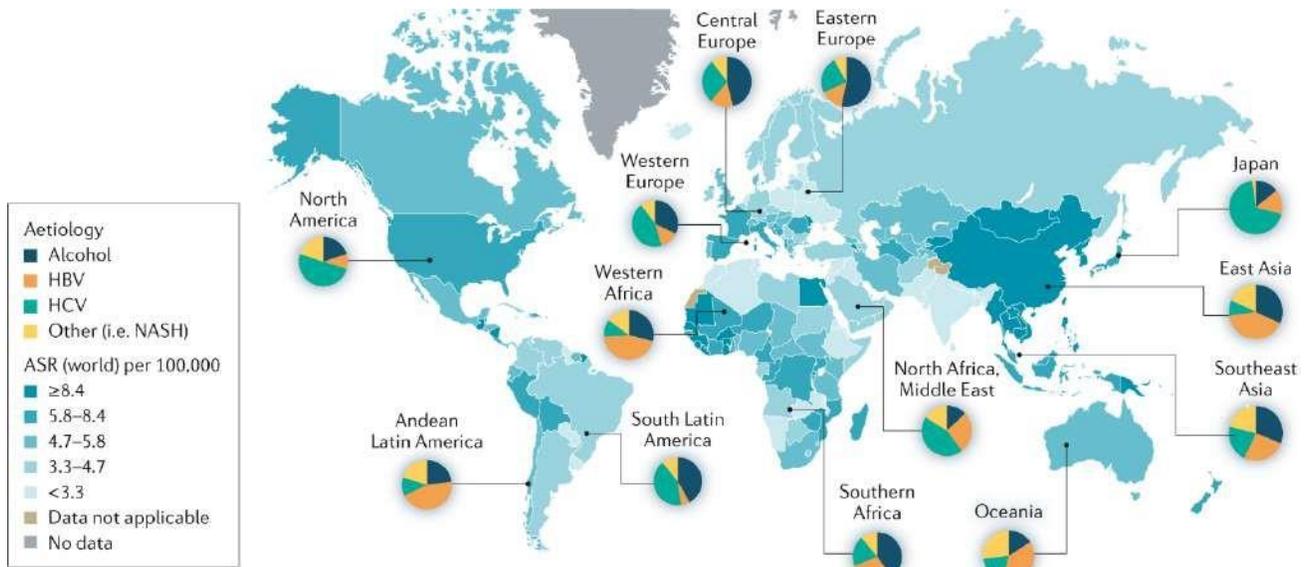
La enfermedad hepática crónica es un deterioro progresivo de las funciones hepáticas, es un proceso continuo de inflamación, destrucción y regeneración del parénquima hepático que conduce a fibrosis y cirrosis. La cirrosis es una etapa final de la enfermedad hepática crónica que resulta en la alteración de la arquitectura del hígado, la formación de nódulos generalizados, la reorganización vascular, la neoangiogénesis y el depósito de una matriz extracelular. El mecanismo subyacente de la fibrosis y la cirrosis a nivel celular es el reclutamiento de células estrelladas y fibroblastos que causan fibrosis, mientras que la regeneración parenquimatosa depende de las células madre hepáticas.

La mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas incluyen la enfermedad hepática alcohólica, la hepatitis viral crónica (incluidas las hepatitis B y C), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la hemocromatosis pueden derivar en cirrosis y carcinoma hepatocelular.

Las enfermedades hepáticas ocupan 2 millones de muertes anuales de manera mundial. Las muertes asociadas a estas enfermedades en general se atribuyen a complicaciones de cirrosis y de Carcinoma hepatocelular y en menor medida a la hepatitis. Se asocian principalmente a la hepatitis viral, el alcohol y las enfermedades de hígado graso no alcohólico.

A nivel global el HCC ocupa el sexto lugar en incidencia anual de cáncer, el cuarto lugar en mortalidad. México ocupa el noveno lugar en incidencia en neoplasias malignas, siendo el tercer tipo de cáncer más mortal tanto en hombres como en mujeres, destacando por tener diversos factores de riesgo

asociados, como el consumo de tabaco, la exposición a aflatoxinas (AFB1), el consumo de alcohol, la obesidad visceral, la diabetes mellitus tipo 2 (Cisneros-Garza *et al.*, 2022).



**Figura 3. Incidencia de HCC a nivel mundial y los factores asociados a su desarrollo en cada país. (Imagen recuperada de Llovet *et al.*, 2021)**

### Cáncer de hígado primario

Un cáncer que se origina en el hígado se llama cáncer de hígado primario. Existe más de una clase de cáncer de hígado primario.

- **Carcinoma hepatocelular (HCC)**

El carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés) es la forma más común del cáncer de hígado en adultos.

Los cánceres hepatocelulares pueden tener distintos patrones de crecimiento:

- Algunos comienzan como un tumor único que va creciendo. Sólo cuando la enfermedad es avanzada se propaga a otras partes del hígado.

- Otros parecen comenzar con múltiples nódulos pequeños a lo largo y ancho del hígado, y no como un tumor solo. Estos se ven con mayor frecuencia en las personas que tienen cirrosis del hígado y es el patrón más común visto en los Estados Unidos.
- **Colangiocarcinoma intrahepático (cáncer de conducto biliar)**

Alrededor del 10% al 20% de los cánceres originados en el hígado son colangiocarcinomas intrahepáticos. Estos cánceres comienzan en las células que revisten los conductos biliares pequeños (conductos que llevan bilis a la vesícula biliar) dentro del hígado. Sin embargo, la mayoría de los colangiocarcinomas en realidad se originan en los conductos biliares que están fuera del hígado.

- **Angiosarcoma y hemangiosarcoma**

El angiosarcoma y el hemangiosarcoma son tipos de cáncer poco comunes que se originan en las células que revisten los vasos sanguíneos del hígado. En alrededor de la mitad de todos los casos, no ha podido ser identificada una causa probable. Estos tumores crecen rápidamente y por lo general, para el momento en que se detectan, se han propagado demasiado como para extirparlos quirúrgicamente. La quimioterapia y la radioterapia pueden ayudar a desacelerar la enfermedad, pero estos cánceres son por lo general muy difíciles de tratar.

- **Hepatoblastoma**

El hepatoblastoma es un tipo de cáncer de hígado poco común que se origina en niños, generalmente los menores de 4 años. Las células del hepatoblastoma son similares a las células fetales del hígado. Alrededor de dos de cada tres niños con estos tumores son tratados exitosamente con cirugía y quimioterapia, aunque los tumores son más difíciles de tratar si se han propagado fuera del hígado.

### **Hepatocarcinoma y las lesiones preneoplásicas**

El desarrollo de HCC se deriva de varios factores de riesgo asociados, siendo los más destacados las infecciones por el virus de la hepatitis B y la hepatitis C, junto al consumo de alcohol y de aflatoxinas como los de mayor prevalencia a nivel mundial. Se describe en la literatura que el crecimiento y desarrollo de HCC en hígados que presentan daño cirrótico existe la prevalencia de nódulos caracterizados por un cambio de nódulos hiperplásicos a nódulos displásicos. La evolución hacia nódulos displásicos se puede asociar a diferentes factores, como son los ambientales, el estilo de vida

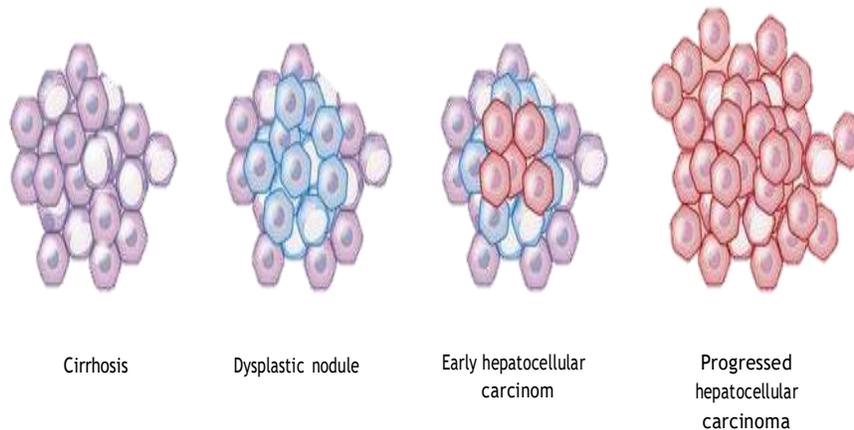
y hábitos no saludables, por ello es de vital importancia tener un control sobre estos mismos permitiendo un mejor pronóstico ante la enfermedad. Se describe el papel que tiene el estrés oxidativo desempeñando uno de los factores más críticos en el desarrollo de la carcinogénesis como en la recurrencia tumoral (Desjonquieres *et al.*, 2022).

El HCC en un estado temprano, se caracteriza macroscópicamente por la aparición de lesiones que vagamente pueden ser denominadas lesiones nodulares y la presencia de pequeños tumores encapsulados con un tamaño menor a 2 cm. Se pueden encontrar regiones tumorosas bien delimitadas, con una densidad celular aumentada, aunque puede ser difícil la distinción entre lesiones de bajo y alto grado (Schulien, I., & Hasselblatt, P. 2021).

### **Nódulos displásicos**

Las lesiones denominadas nódulos displásicos son un término acuñado a las lesiones benignas relacionadas a cualquier tipo de nódulo en un hígado cirrótico. Estas descritas como macroscópicamente diferentes en forma, color y tamaño de los nódulos cirróticos, que son detectables mediante estudios de imágenes. Existen dos tipos de clasificaciones, de alto y bajo grado, y se hacen con base en las características morfológicas presentadas. En la Figura 4, se representa un ejemplo de como se presentan estas lesiones en los hepatocitos.

Los nódulos displásicos de bajo grado consisten en hepatocitos que tienen una apariencia normal o con una atipia celular mínima, y en rara ocasión presentan un aumento en el radio cito-nuclear. La vascularización de estas lesiones es exclusivamente portal, y su riesgo como agentes malignos se considera como bajo. Debido a sus características histológicas, las lesiones de bajo grado son difíciles de diferenciar de macromoléculas de regeneración, por lo cual su utilidad a un nivel clínico se ha cuestionado.



**Figura 4. Desarrollo de nódulos displásicos hasta Carcinoma hepatocelular (Imagen recuperada de Villanueva A. 2019).**

Los nódulos displásicos de alto grado se caracterizan por la presencia de una atipia celular y/o estructural de los hepatocitos como se ve en la figura 4. Estas lesiones por lo general presentan un aumento en el radio cito-nuclear, una alta densidad celular, de igual manera las triadas portales presentan una disminución de la densidad denominada rarefacción. A diferencia de las lesiones de bajo grado estas presentan un riesgo de progresión alto a HCC, con un porcentaje alrededor del 30-40% de malignidad (Desjonqueres *et al.*, 2022).

Como se comentó anteriormente hay diversos factores de riesgo asociados al desarrollo de HCC, siendo la cirrosis el principal factor de riesgo, aunque a nivel global se ha documentado que la infección viral crónica ocasionada por el virus de la hepatitis B (VHB) y la enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGA) pueden ocasionar HCC aun en ausencia de cirrosis. En el estudio realizado por la Universidad de Texas se encontró una asociación positiva entre el consumo de nitrosaminas en la dieta y el desarrollo de HCC, por lo cual se da un mayor énfasis en el cuidado de la dieta en pacientes con un mayor riesgo de desarrollar HCC (Zheng, J *et al.*, 2022).

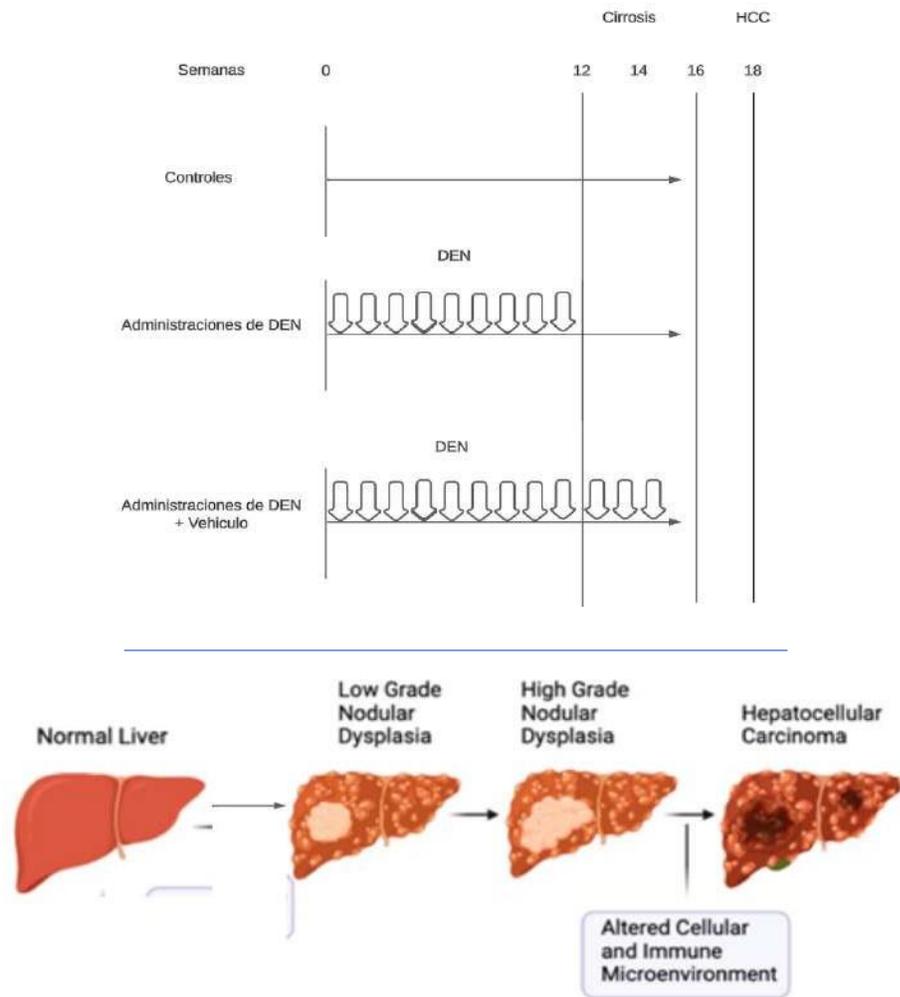
## **Modelos animales de enfermedades crónicas del hígado**

Las enfermedades crónicas del hígado hacen referencia a aquellas enfermedades que llevan una evolución constante y progresiva de alteraciones hepáticas, caracterizadas por un proceso de destrucción y reparación constante del parénquima hepático, acompañado de bandas fibróticas, nódulos displásicos y una distorsión vascular. Usualmente llevando al desarrollo de cirrosis, considerado como una condición premaligna que tiene un alto riesgo de evolucionar a HCC.

Es de vital importancia mejorar nuestro entendimiento en las patogénesis asociadas a las enfermedades crónicas del hígado que permitan desarrollar estrategias nuevas para el tratamiento de estas, así como de su diagnóstico, es por eso que el uso de modelos animales con la suficiente robustez y reproducibilidad es crítico. En la actualidad el uso de estos modelos animales trata de asemejar las condiciones existentes en humanos, desgraciadamente no existe uno que permita tener todas las características asociadas, por lo cual los modelos animales actuales se centran en replicar características específicas de dichas enfermedades, por ello es muy importante entender que modelo animal es el adecuado en cada caso para responder preguntas específicas.

### **Modelo de Schiffer**

Se han descrito diferentes modelos de carcinogénesis hepática inducida por dietil-nitrosamina, sin embargo, a diferencia de los modelos anteriores, el modelo de Schiffer reproduce la secuencia de la cirrosis y del carcinoma hepatocelular (como suele suceder en la enfermedad hepática humana) y por lo tanto, proporciona una herramienta única para probar tratamientos preventivos del carcinoma hepatocelular (Schiffer *et al.*, 2005),



**Figura 5. Modelo experimental de Schiffer y las diferentes etapas en el desarrollo del HCC.**  
 (Imagen adaptada de Schiffer *et al.*, 2005 y Coffin *et al.*, 2023)

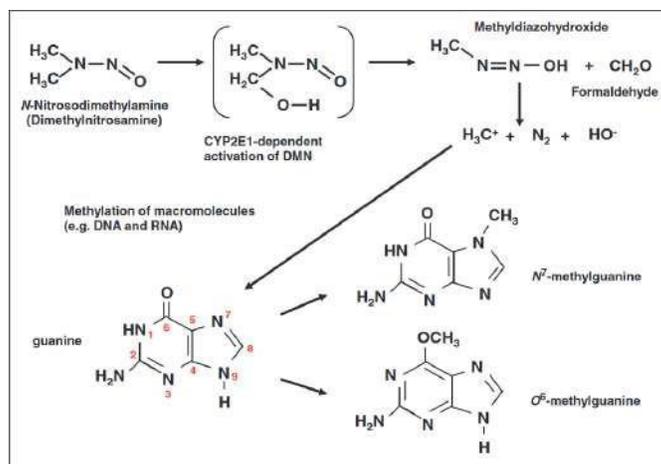
## Compuestos nitrosos y dietilnitrosamina

Los compuestos nitrosos fueron descritos por primera vez en 1937 como posibles agentes causantes de daño hepático en humanos. En 1954 Barnes y Magee pusieron a prueba el factor cancerígeno del dietilnitrosamina (DEN usando dosis de 20 a 40 mg/kg de peso corporal en ratas, ratones y conejos de laboratorio, determinando su capacidad de causar necrosis en el hígado. El efecto hepatotoxicidad y sus efectos carcinogénicos de diferentes compuestos nitrosos incluidos la dietilnitrosamina, fueron descritos en años posteriores. (Tolba *et al.*, 2015)

Se ha demostrado que la dietilnitrosamina (DEN) en su biotransformación a intermediarios reactivos mediante hidroxilación por acción de enzimas dependientes de citocromo P450, como el caso de CYP2E1, permitiendo la producción de metabolitos quelantes, que originan la formación de macromoléculas metiladas, como el caso de N7-metilguanina y O6-Metilguanina en el ADN. Estos errores provocados en el ADN pueden llevar a un mal apareamiento de las bases nitrogenadas o dar paso a que se formen sitios AP (Sitios que no contienen una base de purina o pirimidina) que pueden llevar a diferentes alteraciones como transformaciones guanina-timina. La actividad generada por CYP2E1 causa especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo peróxido de hidrógeno y aniones superóxidos, propiciando el estrés oxidativo y subsecuentemente el daño producido a nivel del ADN (Schulien, Hasselblatt, 2021).



**Figura 6. Estructura de los compuestos nitrosaminas.**  
(Imagen tomada de Tolba *et al.*, 2015)



**Figura 7. Modelo simplificado de la biotransformación de DMN, siendo el mismo mecanismo en el caso de DEN (Imagen tomada de Tolba *et al.*, 2015).**

## Probióticos y su papel en el hepatocarcinoma

El eje hígado-intestino se refiere a la relación bidireccional resultante de la integración de señales generadas por factores dietéticos, genéticos y ambientales entre hígado e intestino y su microbiota. Esta interacción la establece la vena porta, que permite el transporte de productos derivados del intestino directamente al hígado, y la ruta de retroalimentación hepática de la secreción de bilis y anticuerpos al intestino. La barrera vascular y la mucosa intestinal son las estructuras que permiten las interacciones entre el intestino y el hígado, el control de las comunidades microbianas es fundamental para mantener la homeostasis. Investigaciones recientes han demostrado que los probióticos pueden prevenir los efectos negativos de enfermedades hepáticas importantes como la cirrosis, la encefalopatía hepática y la esteatosis alcohólica y no alcohólica.

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando son administrados en las dosis adecuadas proveen un beneficio en la salud del paciente, en la actualidad se ha planteado el uso de estos probióticos como una manera de restablecer la composición de la microbiota tratando de disminuir el impacto asociado a una enfermedad hepática. Los mecanismos que se han descrito por el uso de probióticos, como la modulación de la composición bacteriana intestinal, mejoría en la barrera intestinal y modulación inmunológica de manera local y sistémica. En enfermedades hepáticas se han descrito sus mecanismos en los cuales los probióticos ayudan a disminuir la excreción de compuestos que tienen un efecto perjudicial en el AND como el caso de B1-DNA, al igual que la disminución en

la expresión de protooncogenes como son C-myc, Bcl-2 y Rasp-21, el restaurar la homeostasis intestinal que causa una disminución en la inflamación intestinal y hepática inhibiendo así el desarrollo de HCC (Wan & El-Nezami, 2018).

Se ha relacionado a los probióticos con la habilidad de causar modificaciones epigenéticas en su huésped, siendo un efecto beneficioso en la reducción del desarrollo de HCC. La comunicación entre huésped y la microbiota entérica, es un factor que altera la expresión génica en diferentes niveles entre ellos la metilación de ADN y la modificación de histonas. Lo anterior, muestra el impacto que tienen las bacterias en la expresión génica del huésped. Se plantea que la suplementación con probióticos puede minimizar la incidencia de HCC salvaguardando el genoma del hepatocito, lo cual es de vital importancia en la fisiopatología del HCC. (Russo *et al.*, 2021). Aunque se han descrito diferentes mecanismos de acción que involucran a los probióticos y la disminución del avance del HCC, uno de ellos involucra la producción de PAMPs los cuales pueden ayudar en la progresión de HCC mediante respuesta inflamatorias mediadas por TLR, la suplementación con bifidobacterias ha demostrado tener un impacto en la reducción de estas respuestas inflamatorias deteniendo el avance de HCC mediante la inmunorregulación de estas señales.

El consumo de probióticos ha demostrado que son capaces de biotransformar factores dietéticos en metabolitos que impiden el avance del HCC, en el caso de comida contaminada con aflatoxinas, se ha visto una reducción de sus niveles en el cuerpo siendo que su absorción intestinal se ve interrumpida por efecto de las bifidobacterias (Thilakarathna *et al.*, 2021).

### **Antecedentes directos**

En el laboratorio de Ecología Microbiana de la UAM Xochimilco, se ha utilizado el modelo experimental de Schiffer con una duración de 18 semanas, lo que implica la administración intraperitoneal semanal del carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) a una dosis de 50 mg/kg junto con la suplementación de bifidobacterias, sin embargo, durante este tiempo, los hígados de los animales de experimentación ya presentan tumores y los resultados en cuanto al efecto de la suplementación de probióticos ha sido muy heterogénea y difícil de observar. Por lo anterior, en el presente proyecto de investigación, se propone utilizar el mismo modelo de Schiffer, y analizar en una etapa temprana (6 semanas), el efecto de las bifidobacterias sobre el desarrollo de las lesiones, que en esa etapa apenas comienzan a desarrollarse.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la suplementación de *Bifidobacterium* sp., sobre la formación de lesiones preneoplásicas en una etapa temprana de un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata.

### **Objetivos específicos**

1. Inducir daño hepático durante 6 semanas con el carcinógeno dietilnitrosamina, en ratas Wistar con el modelo experimental de Schiffer.
2. Evaluar las lesiones GGT positivas en hígados de rata de los diferentes tratamientos experimentales.
3. Realizar análisis histológicos de los hígados de rata de los diferentes tratamientos experimentales por medio de la tinción Hematoxilina-Eosina.

## **Materiales y métodos**

### **Microorganismos y condiciones de cultivo**

*Bifidobacterium* sp., se cultivó en medio MRS suplementado con cisteína al 0.05%. El medio se preparó en condiciones anaeróbicas burbujeando CO<sub>2</sub> en frascos viales, los cuales fueron sellados herméticamente con tapones de hule y arillo de metal, posteriormente se esterilizaron a 15 lb/in<sup>2</sup> de presión por 15 min. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación orbital a 180 rpm.

### **Activación de *Bifidobacterium* sp.**

Alícuotas de *Bifidobacterium* sp., conservadas en 20% glicerol a -70 °C, se descongelaron y se centrifugaron para eliminar el glicerol, se lavaron 2 veces con solución salina fisiológica 0.85% (SSF). Una vez lavadas, las células se inocularon en 40 mL de caldo MRS-C y se incubaron durante 24 h a 37°C con agitación orbital a 180. Los cultivos se observaron en microscopio previa con tinción de Gram.

### **Obtención de suspensiones bacterianas para administrar**

El cultivo activado se utilizó para inocular 80 mL de nuevo medio el cual se incubó durante 48 h a las mismas condiciones. De este cultivo, se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm Se llevó a cabo la cuenta viable 3 veces por semana, esto para poder garantizar la administración de una concentración de bifidobacterias viables de aproximadamente 1X10<sup>9</sup> UFC/rata

### **Cuenta viable por goteo**

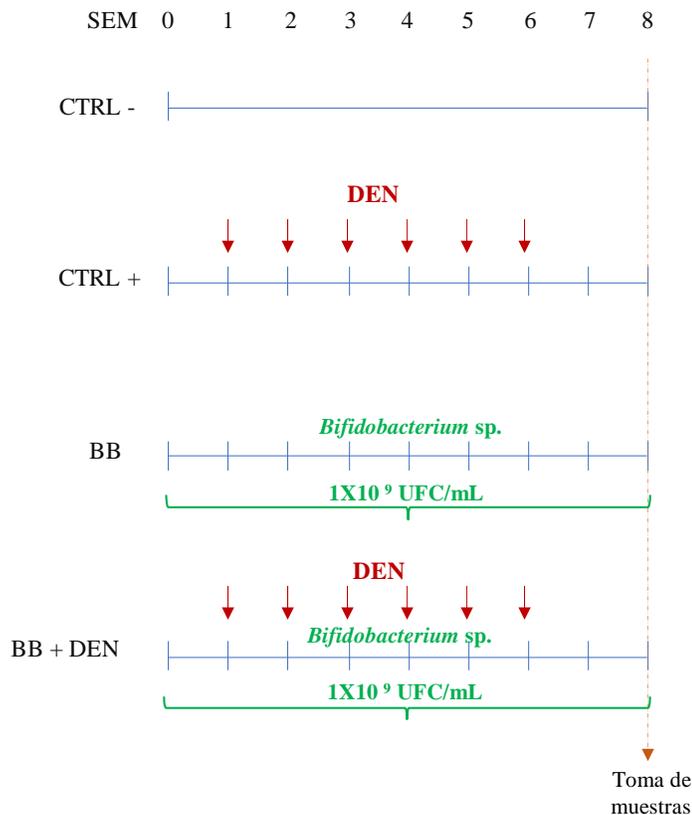
Se tomaron 100 µL de la suspensión bacteriana para realizar diluciones decimales seriadas en microtubos estériles de 1.5 mL los cuales contenían 900 µL SSF. Las diluciones fueron: [10<sup>-1</sup>], [10<sup>-2</sup>], [10<sup>-3</sup>], [10<sup>-4</sup>], [10<sup>-5</sup>], [10<sup>-6</sup>], [10<sup>-7</sup>], [10<sup>-8</sup>] y [10<sup>-9</sup>], agitando vigorosamente en vortex entre cada dilución.

Se colocaron por triplicado 3 µL de las diluciones en una caja de petri con agar MRS-C. Se rotularon con fecha y nombre y se incubaron en cámara de anaerobiosis

Se contó el número de colonias en las diluciones donde se desarrollaron entre 30 y 300 UFC, se procedió a realizar los cálculos para conocer la concentración de bacterias a administrar, expresada en [UFC/mL].

### **Protocolo experimental con ratas**

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial entre 180 a 200 g procedentes de la UPEAL-Bioterio de la UAM-Xochimilco, las cuales se mantuvieron a  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  y bajo ciclos de luz y oscuridad de 12/12 h, con alimento y agua *ad libitum*. Se utilizó el modelo experimental de Schiffer en un plazo de 6 semanas que permitió evaluar el desarrollo de lesiones preneoplásicas para lo cual las ratas se dividieron en cuatro grupos que fueron clasificados como grupo control negativo (Ctrl-); grupo control positivo (Ctrl+) al cual se le administró intraperitoneal el carcinógeno DEN a 50 mg/kg de peso una vez por semana; un grupo donde solo se administró las bifidobacterias con sonda intragástrica cada 3er día en una dosis de  $1 \times 10^9$  ufc/rata durante 6 semanas (BB) y un grupo donde se administró el carcinógeno semanalmente y las bifidobacterias (BB+DEN) bajo las mismas condiciones descritas. Se llevó un seguimiento semanal de peso corporal.



**Figura 8. Diseño experimental donde se muestran los 4 grupos. Flechas rojas representan las administraciones semanales del carcinógeno DEN a 50 mg/kg hasta la semana 6. La llave horizontal verde indica administración de *Bifidobacterium sp.*, a  $1 \times 10^9$  UFC/rata cada 3er día hasta la semana 8.**

### Obtención de muestras

Las ratas se anestesiaron con ayuda de un trozo de algodón empapado en isoflurano, el cual se colocó en un tubo cónico de 50 mL, donde se introdujo la cabeza de la rata para poder ser anestesiada. Una vez que se comprobó que el animal se encontraba completamente anestesiado, se realizó un corte en forma de V en la piel y músculo dejando expuesto el área abdominal, así como la caja torácica del animal, tomando una muestra sanguínea directamente del corazón para su análisis y posteriormente se hizo un corte de la vena cava inferior, causando que el animal muera por exanguinación, y de manera inmediata se extirpó el hígado el cual fue lavado con SSF para poder ser fotografiado y pesado. Se

registraron **sus** características macroscópicas. Una parte del hígado se cortó en trozos pequeños, uno de ellos se colocó en formalina para posteriormente ser embebido en parafina. Los demás trozos de hígado se congelaron sumergiéndose en 2-metil butano enfriado en hielo seco y se guardaron en ultracongelador a -70 °C hasta su análisis.

### **Actividad enzimática de GGT**

A partir de una muestra de hígado congelado, se obtuvieron cortes de 20 µm utilizando un criostato (Leica CM1860) fijando los tejidos en laminillas a una temperatura entre -16 a -19°C. Posterior a este tiempo, se retiró el exceso de acetona.

A las laminillas con los tejidos congelados, se les colocó acetona a -20°C durante 5 minutos, esto se hizo con la intención de fijar los tejidos. Se realizó la preparación de la mezcla reacción, la cual consiste en 1.1 mg de Glicil-Glicina y un 1.1 mg de Fast-Blue suspendidos en un 1 mL de agua destilada, y 15 µL del reactivo Ácido L-glutámico  $\gamma$ -(4-metoxi- $\beta$ -naftilamida) (GMNA). Esta mezcla reacción se colocó sobre las laminillas previamente fijadas con acetona. La reacción se dejó sobre las laminillas un aproximado de 10 a 15 minutos, se monitoreó con ayuda de un microscopio estereoscópico. Una vez que se llevó a cabo la reacción, se limpió el exceso de la muestra reacción, y se utilizó Sulfato de cobre (CuSo<sub>4</sub>, como fijador del color de la reacción. Con ayuda de esta evaluación se pudo hacer una determinación rápida de la presencia de lesiones positivas GGT en los diferentes grupos experimentales.

### **Análisis histológicos**

#### **Inclusión de los tejidos en parafina y tinción con Hematoxilina & Eosina**

Los tejidos previamente fijados en formalina se deshidrataron con diferentes concentraciones crecientes de etanol (70 – 100%), durante 15 minutos en cada uno para evitar el deterioro del tejido. Posteriormente, el tejido se sumergió en una mezcla de xileno: cloroformo (1:1) durante al menos 1 hora. El tejido se infiltró secuencialmente con parafina fundida a 60 °C durante 1 hora en cada una.

Para poder realizar la tinción de hematoxilina & Eosina, las laminillas se colocaron en una estufa durante 1 hora a 65°C para poder eliminar la capa de parafina. Una vez eliminada la parafina se

colocaron las laminillas en baños de xilol durante 10 minutos dos veces, posteriormente se realizaron baños con alcohol al 100%, 96%, 70 y 50% durante 5 minutos, dos veces cada uno. Posteriormente se colocó la hematoxilina durante 5 minutos, lavando el excedente con agua destilada, posteriormente se colocó la eosina por 2 minutos, quitando el excedente de este y utilizando alcohol al 70% por goteo para asegurarnos de eliminar cualquier excedente, posterior a esto, utilizamos alcohol al 96% durante 3 minutos y alcohol al 100% de igual forma durante 3 minutos, como último paso utilizamos Xilol durante 15 segundos.

Las laminillas se observaron con ayuda de un microscopio de epifluorescencia Axio Scope A1 (Carl Zeiss) equipado con una cámara Cannon modelo DS126191, las fotografías fueron realizadas con los objetivos 20x y 40x.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron por medio de un ANOVA de una vía. Para la identificación de diferencias entre grupos, se aplicará la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

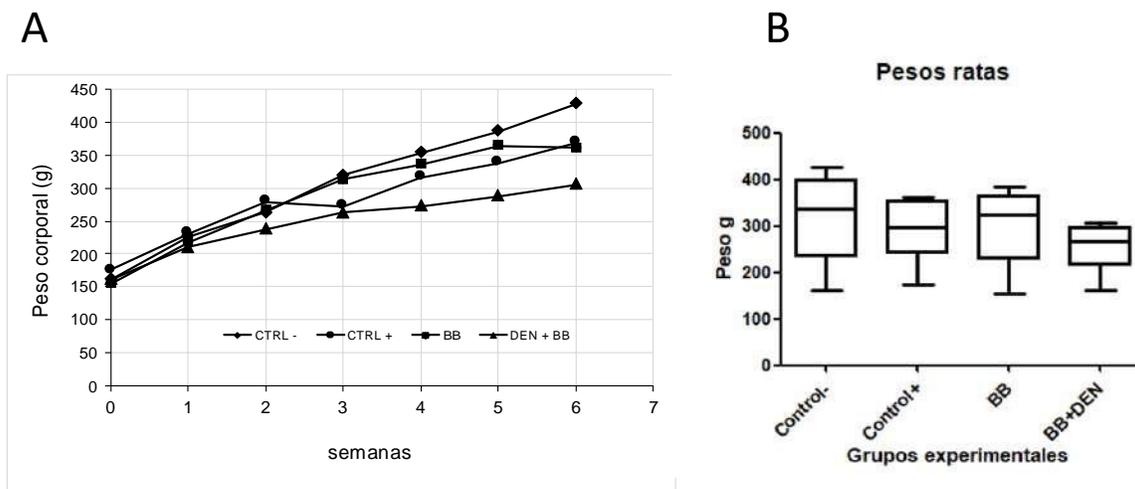
## Resultados

### Aumento de peso corporal

Durante el periodo establecido de 6 semanas en el tratamiento de bifidobacterias y las administraciones intraperitoneales del carcinógeno DEN, se registró el peso corporal de las ratas de los diferentes grupos experimentales (Ctrl -, Ctrl +, BB y BB-DEN). La Figura 8A muestra el peso promedio de cada grupo experimental a lo largo de las 6 semanas que duro el proyecto, se observa que a partir de la semana 3 empieza a existir una diferencia entre los pesos entre los diferentes grupos experimentales siendo los grupos que recibieron las administraciones de DEN quienes presentaron un menor peso en comparación. Esta tendencia continuo hasta la semana 6 donde el Ctrl+ y el grupo experimental BB presentaron el mismo peso.

La figura 8B muestra la gráfica del peso promedio final de cada grupo donde se observa que hubo un cambio en los pesos de los grupos experimentales siendo el mayor peso el grupo control, seguido del grupo experimental BB y el grupo experimental Ctrl+, y el grupo BB+DEN siendo el grupo que registro el menor peso entre todos.

Según los datos obtenidos de los pesos de los diferentes grupos experimentales los pesos en cada caso no variaron de manera significativa, esto se comprobó con ayuda del análisis de ANOVA el cual arrojo un valor de  $P > 0.05$ , que nos indica que no hay una diferencia significativa entre las medias de los pesos de los grupos experimentales.



**Figura 9. Registro del peso corporal de las ratas en los diferentes grupos experimentales. (A) Pesos registrados a lo largo del periodo experimental (6 semanas). (B) Peso promedio final de cada grupo experimental.**

## Análisis macroscópico de hígados

Pasadas las 6 semanas de administración del carcinógeno DEN y el probiótico *Bifidobacterium* sp., los animales de experimentación fueron anestesiados para extraer las muestras de sangre e hígado con lo cual murieron por exanguinación. Las características macroscópicas de los hígados y sus respectivos pesos fueron registradas (tabla 2), los hígados de los grupos Ctrl- y BB mostraron una apariencia normal, mientras que los hígados del grupo Ctrl+ en lo general tuvieron una apariencia porosa y en algunos casos resultaban rugosos al tacto, de igual manera los hígados del grupo BB+DEN presentaron una apariencia porosa aunque no presentaban una textura rugosa.

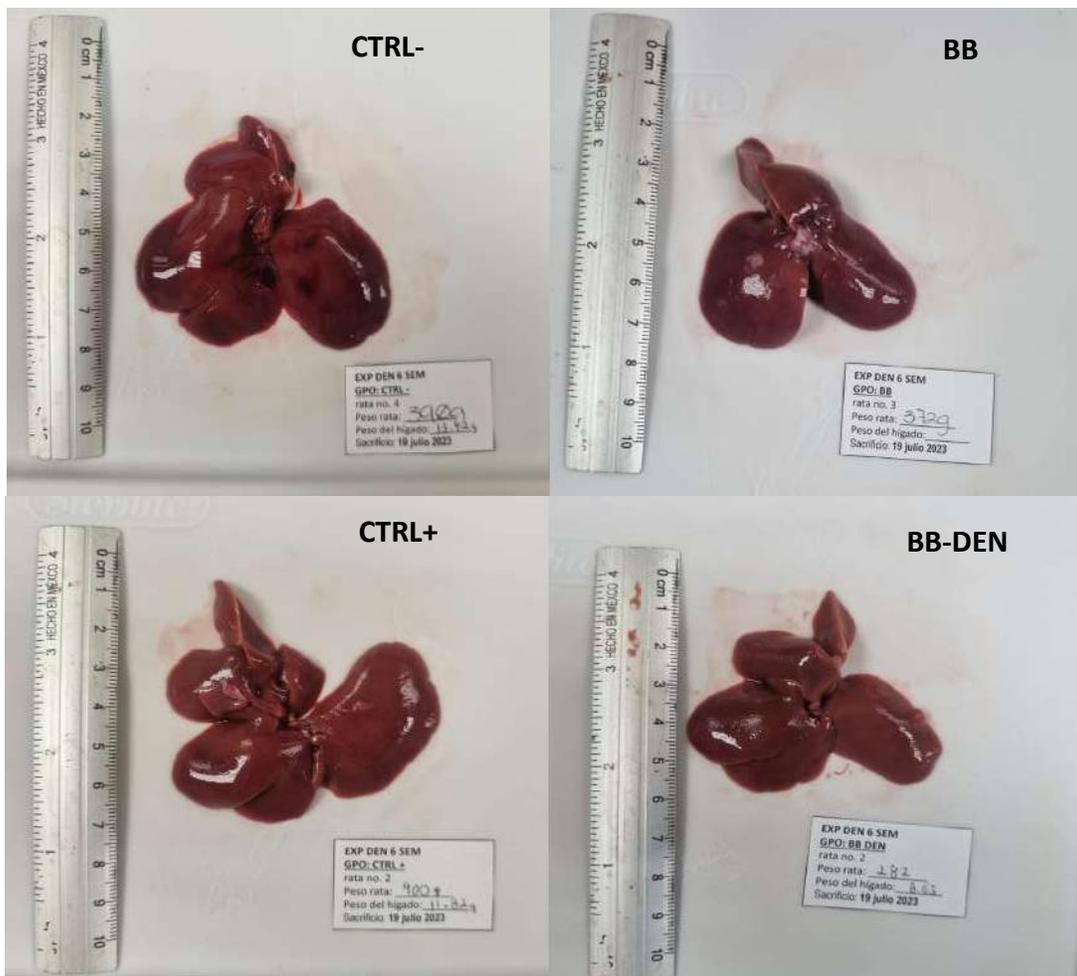
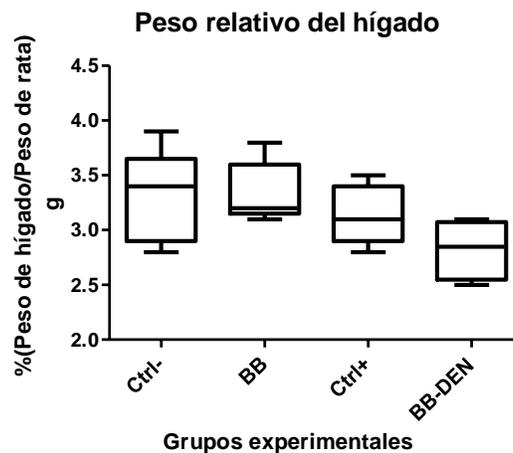


Figura 10. Imagen representativa de los hígados de los diferentes grupos experimentales

Tabla 2. Peso de las ratas al momento del sacrificio, así como el peso de los hígados para cada rata según el grupo experimental asignado y su relación en porcentaje del peso total. Observaciones macroscópicas de los hígados.

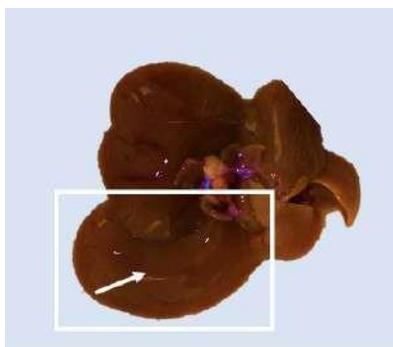
Grupo	Rata	Peso de rata (g)	Peso de hígado (g)	% (peso de hígado/peso rata)	Observaciones
Control -	1	448	17.26	3.9	Apariencia normal
	2	388	13.01	3.4	Apariencia normal
	3	410	12.38	3.0	Apariencia normal
	4	390	13.42	3.4	Apariencia normal
	5	374	10.39	2.8	Apariencia normal
BB	1	371	12.68	3.4	Apariencia normal
	2	372	11.91	3.2	Apariencia normal
	3	372	11.38	3.1	Apariencia normal
	4	388	14.61	3.8	Apariencia normal
	5	415	13.9	3.3	Apariencia normal
Control +	1	348	10.81	3.1	Hígado con apariencia porosa
	2	400	11.82	3.0	Hígado con ligera apariencia porosa
	3	388	12.63	3.3	Hígado con apariencia porosa y rugosidad al tacto
	4	318	8.78	2.8	Hígado con ligera apariencia porosa
	5	360	12.45	3.5	Hígado con apariencia normal pero rugoso al tacto
BB+ DEN	1	263	8.13	3.1	Apariencia ligeramente porosa
	2	287	8.63	3.0	Apariencia porosa
	3	331	8.9	2.7	Apariencia ligeramente porosa
	5	314	7.87	2.5	Apariencia ligeramente porosa

En la tabla 3 se muestran los pesos relativos de los hígados en comparación al peso total de las ratas de los diferentes grupos experimentales, siendo que el Ctrl- fue el grupo experimental que presentó un mayor peso en cuanto a los hígados, seguido del grupo experimental BB, posteriormente el Ctrl + y por el último el grupo BB-DEN que presentó el menor peso en comparación de todos los demás grupos. Los resultados arrojados en el peso relativo del hígado en comparación al peso corporal de las ratas, sometidos a una prueba ANOVA con un valor de  $P = 0.12$ , acompañado de una prueba de Tukey que nos permite comparar las medias individuales del análisis de varianza indican que no existe una diferencia significativa en cuanto a las medias de los diferentes grupos experimentales en el peso promedio del hígado respecto al peso corporal.



**Figura 11. Relación del peso de hígado en comparación al peso corporal de las ratas**

De cada uno de los animales de experimentación, se seleccionó el lóbulo más grande (conocido como lóbulo izquierdo) (Fig 12), el cual se cortó en diferentes secciones, una parte dedicada a ser congelada y conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$  y una parte destinada a ser conservada en formalina al 10% para posteriormente ser embebida en parafina.



**Figura 12. Fotografía de hígado que indica el lóbulo seleccionado.**

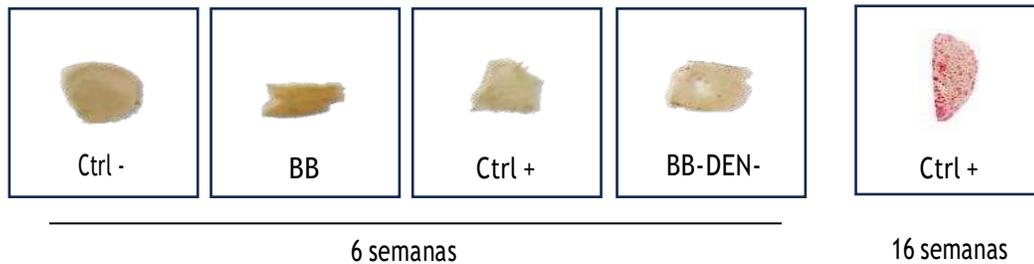
### Tinción histoquímica para GGT

De las muestras de hígado que fueron conservadas en congelación, se obtuvieron cortes histológicos de 20  $\mu\text{m}$  de los 4 grupos experimentales; con la tinción histoquímica de GGT los tejidos no presentaron alteraciones visibles a simple vista (Fig 13).



**Figura 13. Actividad GGT en cortes de hígado de los 4 grupos experimentales. La laminilla A corresponde al Ctrl-, la laminilla B al grupo experimental BB, la laminilla C corresponde al grupo experimental Ctrl+ y la laminilla D corresponde al grupo experimental BB+DEN**

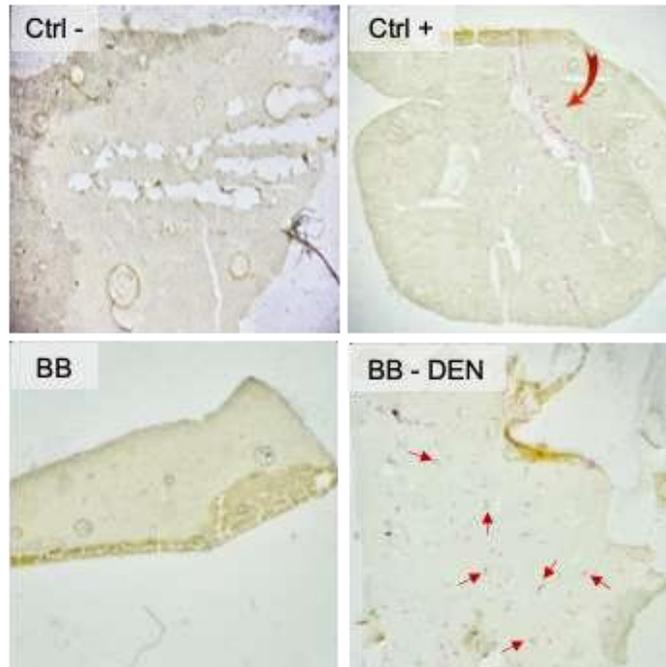
En la figura 14 se muestra un corte representativo de los mismos grupos experimentales comparados con un Ctrl + obtenido en otro experimento que siguió el protocolo de Schiffer hasta las 16 semanas de administración (Limeta, 2017).



**Figura 14. Comparación de la actividad GGT en los diferentes grupos experimentales a las 6 semanas de administración del carcinógeno DEN *versus* la actividad de GGT en un grupo control + a las 16 semanas de administración del carcinógeno.**

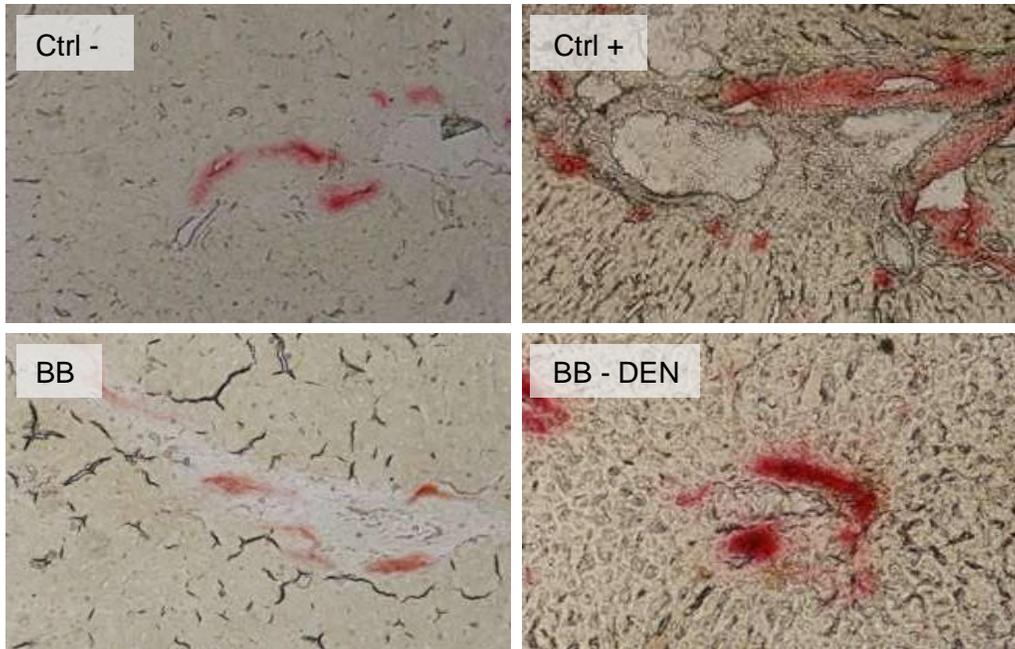
Los tejidos fueron analizados posteriormente con ayuda de un microscopio estereoscópico, donde se observó que los tejidos de los grupos Ctrl – y BB que no fueron expuestos al carcinógeno DEN, no presentaron lesiones GGT positivas, sin embargo, en los grupos Ctrl+ y BB-DEN si se observaron dichas lesiones (Fig. 14). En los tejidos del grupo control +, se observa presencia de daño de manera dispersa sobre todo el tejido, estas lesiones no se encuentran de manera localizada sobre un área específica, en el caso del grupo BB-DEN se presentó la misma situación, presencia de daño sobre el tejido en general, de una forma no específica, la única diferencia entre el grupo BB-DEN y el grupo Ctrl+ es un mayor número de lesiones en el Ctrl+ de manera cualitativa.

El análisis planteado con ImageJ fue descartado debido a que el tamaño de las lesiones presentadas era imposible de determinar por parte del programa, causando que el análisis realizado fuera poco preciso y confiable, motivo por el cual se decidió no realizar dicho análisis, y presentar la información obtenida de forma cualitativa



**Figura 15. Imágenes representativas de la actividad GGT en cada grupo experimental: Ctrl -, Ctrl +, BB y BB-DEN. Imágenes tomadas en un microscopio estereoscópico. Las flechas señalan lesiones GGT positivas.**

Las lesiones GGT + se observaron en un microscopio estereoscópico con un aumento 10x, detectando el color indicativo de lesiones en todos los grupos incluyendo los grupos Ctrl – y BB, sin embargo, se observa en mayor cantidad en los grupos donde se administró DEN, aunque no se pudo identificar las zonas donde se localizaban, se observó mayor cantidad de lesiones y con mayor intensidad de color.



**Figura 16. Imágenes representativas de la actividad GGT en cada grupo experimental: Ctrl -, Ctrl +, BB y BB-DEN. Imágenes tomadas en un microscopio óptico Axio Scope A1.**

### **Tinción con Hematoxilina & Eosina**

Las muestras de hígado en formalina se les dio el tratamiento para ser incluidos en parafina, para poder realizar un análisis histológico por medio de una tinción de Hematoxilina-Eosina. Se observaron con ayuda de un microscopio óptico Axio Scope A1 (Carl Zeiss).

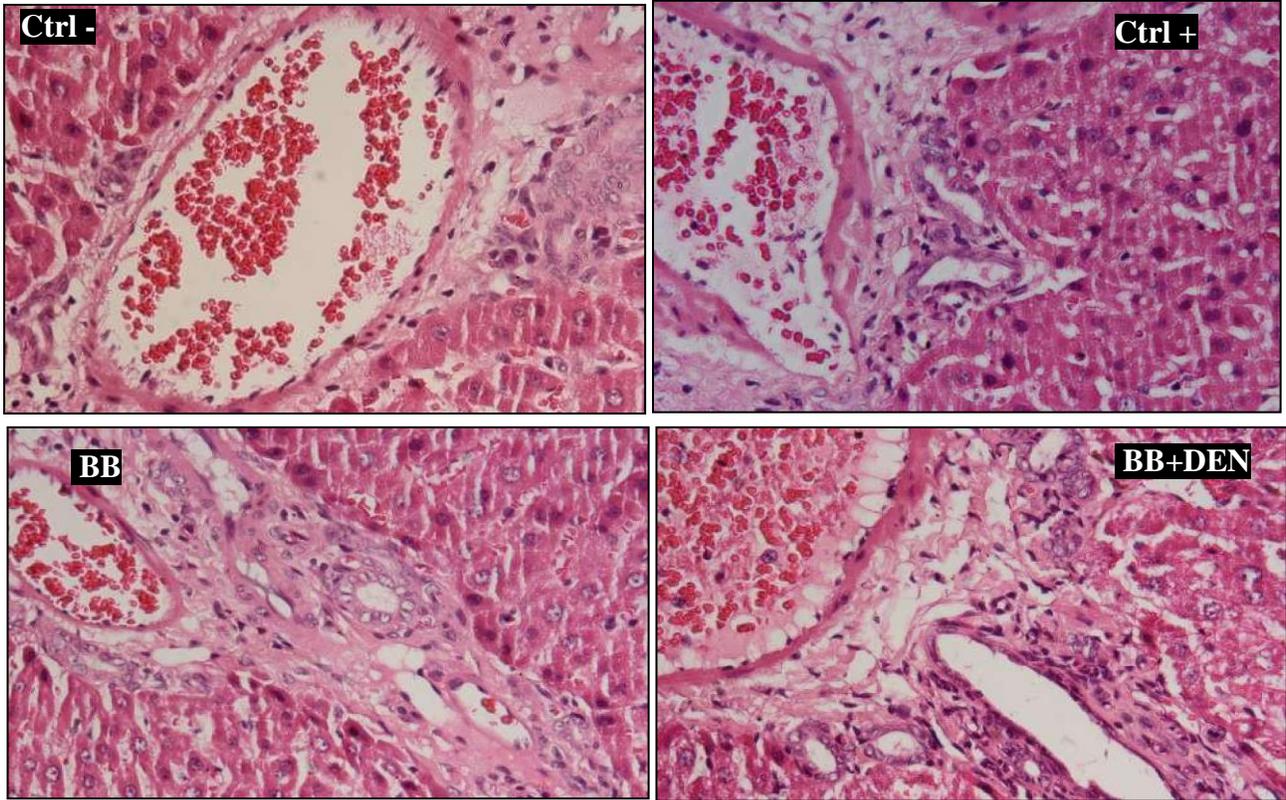


Figura 17. Tinciones con H&E del hígado de los diferentes grupos experimentales. Control negativo (Esquina superior izquierda), control positivo (Esquina superior derecha), BB (Esquina izquierda) y BB-DEN (Esquina derecha). Imágenes vistas a un aumento de 40x en microscopio óptico.

En las tinciones de hematoxilina y eosina, se buscó encontrar muestras del daño realizado por el DEN, esta se representa principalmente en los cordones de los hepatocitos, como una pérdida de la estructura de los hepatocitos. Los daños presentes en el grupo Ctrl + y el grupo BB-DEN se localizaban de manera principal alrededor de las triadas portales, siendo que los cordones de los hepatocitos pierden estructura causando que vean los núcleos de los hepatocitos pierdan su forma (Fig. 17).

## Conclusiones

En los datos de los pesos obtenidos de los diferentes grupos experimentales se comprobó que no existe una diferencia significativa entre los grupos experimentales principalmente en el grupo experimental BB+DEN, el cual en la gráfica presenta un peso menor en comparación al control positivo el cual también fue sometido al cancerígeno y de igual manera con el grupo experimental que recibió las bifidobacterias y el control negativo.

Las características morfológicas de los hígados no presentaron una diferencia notable de manera macroscópica, presentando solo en casos puntuales un aspecto descrito como poroso o áspero en los grupos que se les administro DEN de manera semanal e inclusive en estos casos los cambios no eran destacables. En cuanto a los pesos de los hígados en relación con el peso total de la rata el análisis estadístico de los mismos no muestra una diferencia significativa entre ellos.

El análisis histológico presentó muy pocas alteraciones lo cual impide poder realizar un análisis que permita determinar el impacto del uso de bifidobacterias en el modelo de hepatocarcinoma. Siendo que la mayoría de las lesiones se presentan como nódulos displásicos de bajo grado es difícil determinar si el daño presentado entre el grupo experimental BB+DEN en comparación al control positivo es representativo a nivel histológico.

Las histoquímicas realizadas para la detección de áreas GGT positivas en los tejidos, aunque si presentó la formación de lesiones indicadoras de daño, fueron de un tamaño muy reducido lo cual imposibilitó el uso del análisis de ImageJ siendo incapaz de hacer un análisis del tamaño de las lesiones y la cantidad de estas. Se realizó un análisis cualitativo de los diferentes grupos experimentales permitiendo tener una aproximado.

El análisis cualitativo entre los diferentes grupos experimentales indican que en caso del grupo experimental BB el cual solo recibió el tratamiento con bifidobacterias no existió la presencia de algún indicativo de daño hepático, en el caso de la comparativa entre el control positivo y el grupo experimental BB+DEN, la diferencia entre estos grupos no se puede establecer exactamente mediante un parámetro estadístico, en ambos casos se reportó la presencia de daño hepático sobre el tejido y de una manera generalizada.

## Referencias bibliográficas

- Beal, Eliza & Dumond, Curtis & Kim, Jung-Lye & Mumtaz, Khalid & Hayes, Don & Washburn, Ken & Whitson, Bryan & Black, Sylvester. (2017). Method of Direct Segmental Intra-hepatic Delivery Using a Rat Liver Hilar Clamp Model. *Journal of Visualized Experiments*. 2017. 10.3791/54729.
- Cisneros-Garza L.E., González-Huezo M.S., Moctezuma-Velázquez ., Ladrón de Guevara-Cetina L., Vilatobá M., García-Juárez I., Alvarado-Reyes R., Álvarez-Treviño G.A., Allende-Pérez S., Bornstein-Quevedo L., *et al.*, Consenso Mexicano de Carcinoma Hepatoceleular. Parte I: Epidemiología y diagnóstico. *Revista de Gastroenterología de México*, <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2021.10.002>.  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0375090622000064>)
- Coffin, Philip, and Aiwu He. 2023. "Hepatocellular Carcinoma: Past and Present Challenges and Progress in Molecular Classification and Precision Oncology" *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 17: 13274. <https://doi.org/10.3390/ijms241713274>
- Desjonqueres, E., Campani, C., Marra, F., Zucman-Rossi, J., & Nault, J. C. (2022). Preneoplastic lesions in the liver: Molecular insights and relevance for clinical practice. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 42(3), 492–506. <https://doi.org/10.1111/liv.15152>
- Durand-López, César Augusto. (2019). Anatomy of the Liver (A05.8.01.001). *Worldwide Review*, 2019. New Findings, Concepts and Definitions Support a Division of the Liver into Seven Portal Segments. *International Journal of Morphology*, 37(3), 1179-1186. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000301179>
- Krishna M. (2014). Anatomía microscópica del hígado. *Clinical liver disease*, 2(Suppl 5), 109–112. <https://doi.org/10.1002/cld.287>
- Lemos, Fernanda & Florentino, Rodrigo & Lima Filho, Antônio & Santos, Marcone & Leite, Maria. (2019). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the liver: Expression and function. *World Journal of Gastroenterology*. 25. 6483-6494. 10.3748/wjg.v25.i44.6483.
- Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 7, 6 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- López Panqueva, Rocío del Pilar. (2013). Hepatopatología para gastroenterólogos y hepatólogos. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 28(2), 161-168. Retrieved February 26, 2024, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572013000200011&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572013000200011&lng=en&tlng=es).
- López Panqueva, Rocío del Pilar. (2015). Neoplasias hepáticas malignas: Hepatocarcinoma: papel de la biopsia hepática, estudios de inmunohistoquímica y otros aspectos importantes. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 30(2), 232-242. Retrieved March 01, 2023, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572015000200014&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572015000200014&lng=en&tlng=es).
- Manterola, Carlos, del Sol, Mariano, Ottone, Nicolás, & Otzen, Tamara. (2017). Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado. Fundamentos para las Resecciones Hepáticas. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1525-1539. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000401525>

- Rojas Lemus, Marcela, Milán Chávez, Rebeca, Delgado Medina, Abigail, Bizarro Nevares, Patricia, Cano Gutiérrez, Gumaro, Cafaggi Padilla, Diego, Cervantes Yépez, Silvana, & Fortoul van der Goes, Teresa I. (2017). El hepatocito como un ejemplo de interacción entre la biología celular y las rutas metabólicas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(2), 52-58. Recuperado en 27 de febrero de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422017000200052&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422017000200052&lng=es&tlng=es).
- Russo, E., Fiorindi, C., Giudici, F., & Amedei, A. (2022). Immunomodulation by probiotics and prebiotics in hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, 14(2), 372–385. <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i2.372>
- Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Barbu, V., & Rosmorduc, O. (2005). Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(2), 307–314. <https://doi.org/10.1002/hep.20538>
- Schulien, I., & Hasselblatt, P. (2021). Diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice. *Methods in cell biology*, 163, 137–152. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.08.006>
- Survarachakan, Shanmugapriya & Prasad, Pravda & Naseem, Rabia & Pérez de Frutos, Javier & Kumar, Rahul & Langø, Thomas & Alaya Cheikh, Faouzi & Elle, Ole & Lindseth, Frank. (2022). Deep learning for image-based liver analysis — A comprehensive review focusing on malignant lesions. *Artificial Intelligence in Medicine*. 130. 102331. 10.1016/j.artmed.2022.102331.
- Thilakarathna, Wasitha P.D. Wass, H.P. Vasantha Rupasinghe, and Neale D. Ridgway. 2021. "Mechanisms by Which Probiotic Bacteria Attenuate the Risk of Hepatocellular Carcinoma" *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 5: 2606. <https://doi.org/10.3390/ijms22052606>
- Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M., & Weiskirchen, R. (2015). Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Laboratory animals*, 49(1 Suppl), 59–69. <https://doi.org/10.1177/0023677215570086>
- Villanueva A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *The New England journal of medicine*, 380(15), 1450–1462. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1713263>
- Wan, M., & El-Nezami, H. (2018). Targeting gut microbiota in hepatocellular carcinoma: probiotics as a novel therapy. *Hepatobiliary Surgery And Nutrition*, 7(1), 11-20. doi:10.21037/hbsn.2017.12.07
- Zheng, J., Daniel, C. R., Hatia, R. I., Stuff, J., Abdelhakeem, A. A., Rashid, A., Chun, Y. S., Jalal, P. K., Kaseb, A. O., Li, D., & Hassan, M. M. (2021). Dietary N-Nitroso Compounds and Risk of Hepatocellular Carcinoma: A USA-Based Study. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 74(6), 3161–3173. <https://doi.org/10.1002/hep.32046>

**Visto bueno de los asesores**

Asesor interno



Dra. María Angélica Gutiérrez Nava  
Número económico: 34568  
Labo. Ecología Microbiana  
UAM-X

Asesor externo



Dr. Julio Isael Pérez Carreón  
CVU 206199  
Lab. Enfermedades Hepaticas  
INMEGEN