



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

**Análisis de la expresión de la interleucina 1b (IL-1 β) como
marcador de inflamación en hígados de ratas alimentadas con dieta
alta en grasa y fructosa y probióticos, por PCR en tiempo real.**

ALUMNA:

KAREN ROJO ZARCO

MATRÍCULA:

2182027712

ASESORES:

DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA

DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

Julio 2024

AGRADECIMIENTOS

Al concluir esta etapa de mi vida, quiero agradecer:

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y en especial al Dr. Julio Isael Pérez Carreón por permitirme desarrollar mis habilidades como investigadora en el laboratorio de enfermedades hepáticas.

A la Dra. Ema Elvira Herrera López por sus enseñanzas en las técnicas, su amabilidad y paciencia.

A la Dra. Julia Esperanza Torres Mena por el tiempo y conocimientos compartidos, por su ayuda incondicional y sugerencias, que me han permitido cumplir con el desarrollo de este trabajo; sobre todo por ser un estímulo constante sobre mi persona.

Finalmente agradezco a mi asesora la Dra. María Angélica Gutiérrez Nava por darme la oportunidad de realizar mi servicio social, por su paciencia, tiempo y enseñanzas, que constituyen la base de mi vida profesional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO	6
ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.....	6
DE LA PROGRESIÓN AL CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	7
INTERLEUCINA 1-BETA EN EHGNA	9
EPIDEMIOLOGÍA DE LA EHGNA	10
DIETA, MICROBIOTA INTESTINAL Y EHGNA	12
PROBIÓTICOS Y SU IMPORTANCIA EN LA DIETA.....	14
EJE INTESTINO-HÍGADO	15
PROBIÓTICOS E INFLAMACIÓN.....	16
PREBIÓTICOS.....	17
OBJETIVOS.....	18
METODOLOGÍA.....	19
MICROORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO	19
- MEDIO MRS (MRS-C) PARA CULTIVO DE <i>BIFIDOBACTERIUM SP.</i>	19
- ACTIVACIÓN Y CULTIVO DE <i>BIFIDOBACTERIUM SP.</i>	19
- PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES DE <i>BIFIDOBACTERIUM SP.</i> , PARA ADMINISTRACIÓN	20
- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	20
PREPARACIÓN DE LA DIETA ALTA EN GRASA Y FRUCTOSA.....	20
MODELO EXPERIMENTAL	21
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	23
PURIFICACIÓN DE ARN	23
EXPRESIÓN DEL GEN IL-1B POR RT- PCR EN TIEMPO REAL.....	24
CONVERSIÓN DEL ARN A ADNC	24
PCR EN TIEMPO REAL	25
ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL HÍGADO	27
TEJIDO CONGELADO	27
TEJIDO EMBEBIDO EN PARAFINA	27
ANÁLISIS DE DATOS	28
RESULTADOS	29
PESO CORPORAL Y PESO DEL HÍGADO	29
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL HÍGADO.....	31

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL HÍGADO	32
ANÁLISIS DE BIOQUÍMICAS SANGUÍNEAS	34
CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DEL ARN	37
INTEGRIDAD DEL ARN	38
CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN IL-1B	38
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS	41
REFERENCIAS	42

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la enfermedad hepática crónica más común en todo el mundo, y es frecuentemente observada en pacientes obesos y/o con síndrome metabólico. La EHGNA es considerada una enfermedad emergente, se estima que al menos una cuarta parte de la población del mundo la padece, y estos individuos se encuentran en riesgo de desarrollar cáncer hepático algunos años después (Moctezuma-Velázquez, 2018). La prevalencia de la EHGNA a nivel mundial oscila del 10 al 24%, mientras que, en México es del 26%, dada la prevalencia de la obesidad (Vidal-Cevallos *et al.*, 2022). Actualmente, la EHGNA ha tomado importancia para los servicios de salud porque se ha convertido en la primera causa de trasplante hepático en México (Greene *et al.*, 2020).

La historia natural de la EHGNA no está completamente comprendida, pero se sabe que varía desde una esteatosis hepática leve, (la cual es potencialmente reversible) hasta una esteatosis grave acompañada de inflamación hepática, en cuyo caso se utiliza el término esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cual puede progresar aún más hacia fibrosis, cirrosis e incluso carcinoma hepatocelular (McPherson, 2015; Bedossa, 2017).

Durante la última década, se ha evidenciado que la inflamación es un factor importante en la patogénesis de la EHGNA. En particular, durante la etapa de esteatohepatitis se observan células inflamatorias y mediadores de inflamación que promueven una condición de daño hepático severo condicionando al órgano a progresar. Se sabe que la inducción de inflamación y la producción de citocinas inflamatorias como el TNF- α y los miembros de la familia de citocinas IL-1 desempeñan un papel crucial en el proceso de la enfermedad (Kakino, 2017). Cuando se activan, estas citocinas proinflamatorias pueden alterar las vías de señalización de la insulina y los lípidos, influyendo así en la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los lípidos (Alfadul *et al.*, 2022).

La IL-1 β tiene un papel importante en la EHGNA estando implicada en todas las etapas de la enfermedad, promueve la esteatosis, la inflamación y la fibrosis del hígado mediante la señalización a través del receptor de IL-1 ampliamente expresado en las diferentes subpoblaciones de células hepáticas (Kamari *et al.*, 2011; Tan,

2016). La IL-1 β promueve la esteatosis hepática al estimular la acumulación de triglicéridos y colesterol en los hepatocitos primarios del hígado (Negrin, 2014).

Una dieta alta en grasas podría acelerar el proceso de inflamación en el hígado graso y el desarrollo de complicaciones, por lo que una alternativa es añadir probióticos a la dieta diaria, debido a su capacidad para modular la microbiota intestinal, la permeabilidad intestinal y la respuesta inmunológica, pueden ser eficaces en el tratamiento de las enfermedades hepáticas y en la prevención de las complicaciones de la cirrosis (Soriano *et al.* 2013).

En este trabajo, se analizó la expresión del gen que codifica para la interleucina IL-1b en hígados de rata Wistar tras la administración del probiótico *Bifidobacterium* sp., y el prebiótico inulina durante 6 semanas, en un modelo de hígado graso no alcohólico, en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa.

MARCO TEÓRICO

ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) se halla entre las causas más comunes de enfermedad hepática crónica y de trasplante de hígado en los países del hemisferio occidental (Pais *et al.*, 2016), su prevalencia ha incrementado de acuerdo con la incidencia de condiciones clínicas tales como la obesidad y la resistencia a la insulina. Según la Secretaría de Salud (2018), se estima que entre un 20 y 30% de la población mundial presenta esta enfermedad.

La EHGNA es una enfermedad silenciosa con pocos o ningún síntoma, se caracteriza por la acumulación de grasa (esteatosis) en más del 5% de los hepatocitos en individuos sin consumo significativo de alcohol (Bernal-Reyes *et al.*, 2019).

La patogénesis de la EHGNA está asociada con múltiples factores que pueden ocurrir simultáneamente y proceder de forma sinérgica. Los factores pueden ser: 1) GENÉTICOS, como las mutaciones observadas en los genes PNPLA3: codifica para una lipasa de triacilglicerol; TM6SF2: involucrado en la regulación del proceso metabólico de lípidos y GCKR: codifica para una enzima relacionada con el metabolismo de glucosa, (Danford *et al.*, 2018) 2) CAMBIOS MOLECULARES como: la acumulación de triglicéridos, la alteración de la función mitocondrial, el estrés oxidativo, la alteración de los mecanismos de apoptosis y autofagia, fenómenos de lipotoxicidad e inflamación hepática y 3) AMBIENTALES relacionados con los hábitos alimentarios y la vida sedentaria de los que destacan la resistencia a la insulina, la obesidad, la dislipidemia y la hipertrigliceridemia.

Conforme a lo anterior, la EHGNA es una enfermedad fisiopatológica compleja que resulta de la interacción de muchos factores como, factores genéticos, epigenéticos, ambientales y culturales. Todo esto en conjunto conduce a la acumulación de grasa en el hígado, resistencia a la insulina, cambios hormonales y cambios en la microbiota intestinal, lo que provoca daño en los hepatocitos (Prieto-Ortiz *et al.*, 2022).

DE LA PROGRESIÓN AL CARCINOMA HEPATOCELULAR

Dada la acumulación excesiva de grasa, principalmente triglicéridos, en más del 5% de los hepatocitos del hígado en la EHGNA, la enfermedad se asocia con diferentes proporciones de pacientes relacionados con la obesidad (51%), dislipidemia (69%), Diabetes Mellitus tipo 2 (22%); hipertensión arterial (39%) y Síndrome Metabólico (43%), y estos factores no solo están relacionados con complicaciones hepáticas sino también cardiovasculares, siendo la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica (Desjonqueres & Gigante, 2022).

El proceso patológico inicia cuando los hepatocitos son expuestos a uno o varios de los factores de riesgo y el comienzo de mecanismos moleculares lo que induce a la acumulación de grasa en su interior, estableciendo la enfermedad de hígado graso no alcohólico; el riesgo de que esta etapa progrese a esteatohepatitis (acumulación de grasa en los hepatocitos junto con inflamación) es del 15 al 20%. Los hepatocitos que en el proceso de esteatosis ya estaban hinchados, tienden a hincharse aún más, comenzando a morir y causar inflamación (Figura 1). Es posible que tanto en la enfermedad de hígado graso como en la esteatohepatitis no haya síntomas perceptibles por lo que dichos procesos patológicos se consideren reversibles y pueden ser solucionados mediante cambios en el estilo de vida (Calleja y Turnes 2022).

En la figura 1 se observa que un hígado sano contiene hepatocitos con un núcleo en el centro y pequeñas gotas de grasa distribuidas uniformemente, en el hígado graso los hepatocitos acumulan exceso de grasa. En la etapa de la esteatohepatitis la grasa acumulada comienza a causar daño en el hepatocito, dando lugar a la infiltración de citocinas proinflamatorias (como la IL-1 β) que son secretadas por células inmunitarias como las células T, macrófagos y otras células que promueven la inflamación. La cicatrización (fibrosis) sucede cuando las fibras de colágeno reemplazan a las células muertas, dando lugar a la cirrosis donde se acumula el tejido cicatricial provocando el endurecimiento del hígado y deteriorando su función, hasta desarrollar cáncer hepatocelular.

La progresión de esteatohepatitis a fibrosis tiene una media menor al 0.1% con una prevalencia del 5 al 15%. En esta etapa la inflamación continúa, disminuye el flujo sanguíneo a través del hígado y comienza la formación de tejido cicatricial, lo que genera un daño mayor de las células hepáticas. La fibrosis puede progresar para establecer la cirrosis en una proporción menor al 5 %, y se caracteriza por regiones de hepatocitos rodeadas de cicatrices que endurecen el hígado, lo que afecta su función y estructura. La esteatohepatitis, la fibrosis y la cirrosis son los factores asociados al desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) en el 2% de la población. Aunque la historia natural de la progresión para desarrollar CHC tiene como inicio la cirrosis, los reportes quirúrgicos han mostrado que del 25 al 45% de los casos de CHC se desarrollaron en pacientes con esteatohepatitis en ausencia de fibrosis y cirrosis (Moctezuma-Velázquez, 2018; Grgurević *et al.*, 2021; Narayana Health Care, 2023).

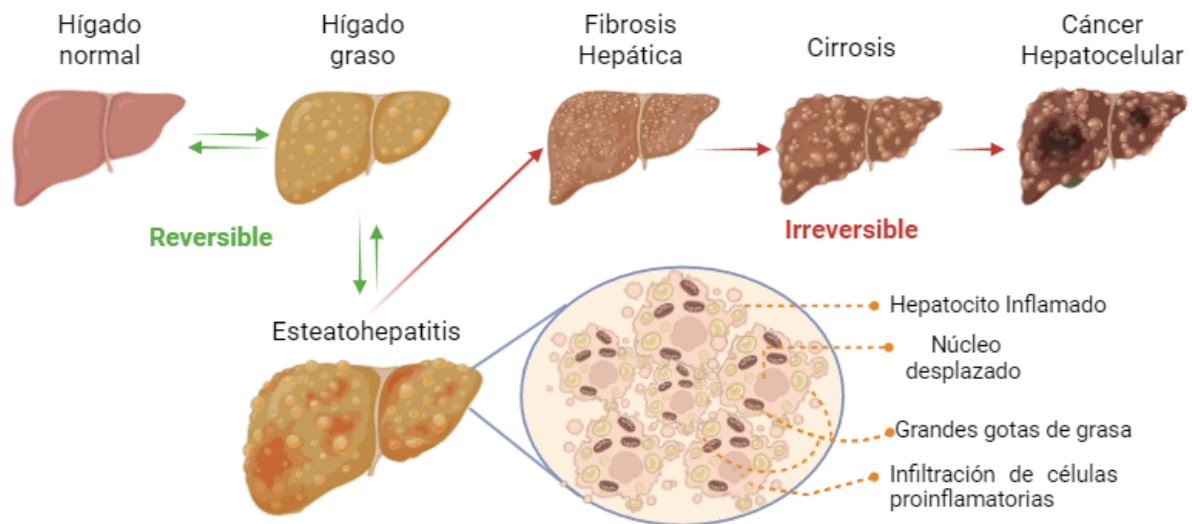


Figura 1: Evolución de la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Fuente: Elaboración propia, tomada de Calleja y Turnes (2022).

INTERLEUCINA 1-BETA EN EHGNA

Las citocinas desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio que es definido por el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Entre las citocinas proinflamatorias destacan las quimiocinas, grupo de péptidos de bajo peso molecular entre los que se encuentra la IL-1 β que tienen un efecto sinérgico sobre la inflamación.

En el caso de las interleucinas ante el daño celular o en caso de infecciones, diferentes células inmunes, entre ellas especialmente los monocitos y los macrófagos, liberan la interleucina 1 beta. Esta citocina, que actúa sobre distintas células y órganos, es un mediador importante de la respuesta inmunitaria e inflamatoria (Figura 2) (Dinarello, *et al.*, 2016).

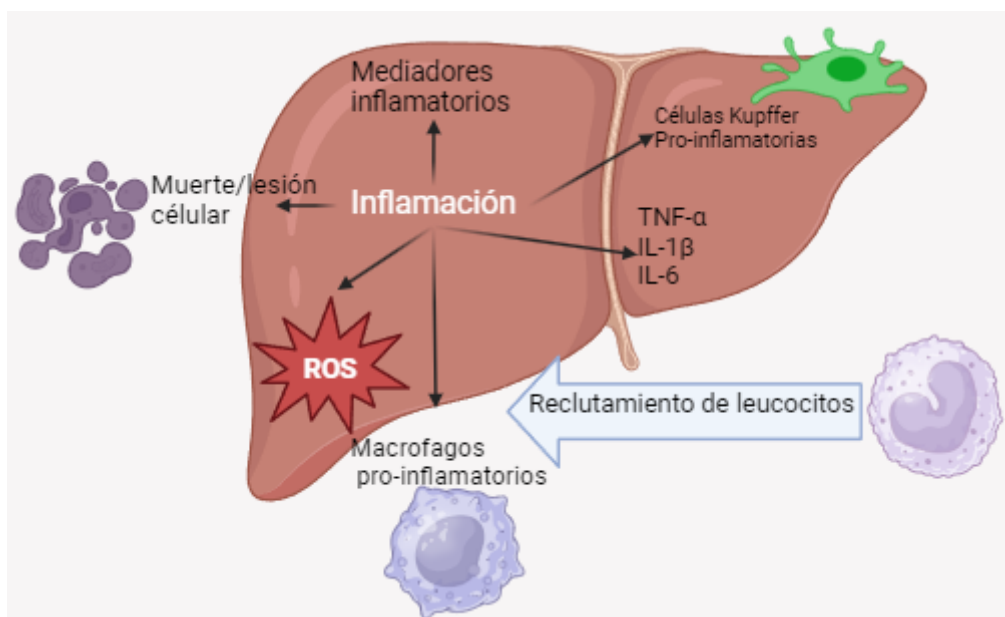


Figura 2: Inflamación relacionada con EHGNA. Fuente: Elaboración propia, tomado de Song *et al.*, 2023.

Se sabe que la interleucina-1 β regula la expresión de numerosas citocinas y quimiocinas, induce la producción de la interleucina 6 y contribuye con ello a la síntesis de las proteínas de fase aguda en el hígado (Ehses *et al.*, 2009).

Por tanto, el hígado también es un regulador central de las respuestas inflamatorias y la fuente más importante de producción de proteínas de fase aguda (APP), las cuales son proteínas biomarcadores presentes en el suero sanguíneo que pueden ser utilizadas como indicadores de enfermedad; producidas debido a infecciones, inflamaciones o traumas.

La interleucina-1b (IL-1b) pertenece a la familia IL-1, que consta de tres polipéptidos estructuralmente relacionados: IL-1a, IL-1b y antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra).

Como lo mencionan Ehling y colaboradores, La IL-1b se sintetiza principalmente después de la activación de fagocitos mononucleares, células del músculo liso y las células endoteliales por microorganismos o productos endógenos (es decir, ácido úrico o cristales de colesterol). Conduciendo con la formación de un complejo de proteínas citosólicas (receptores de pirina con repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos (NLRP)) conocido como "inflamósoma", que activa la caspasa-1 en respuesta a señales de peligro. Esta caspasa-1 convierte pro-IL-1b en la forma activa IL-1b. Se sabe que la producción excesiva de IL-1b y un desequilibrio en IL-1b e IL-1ra están relacionados con la inflamación (Ehling C. *et al.*, 2021).

EPIDEMIOLOGÍA DE LA EHGNA

La prevalencia mundial de la enfermedad de hígado graso no alcohólico es del 25% y se estima que aumente al 30% en la población adulta para el año 2030 a causa de la obesidad, los patrones dietéticos poco saludables y el estilo de vida sedentario. Su incidencia ha aumentado a la par de enfermedades no transmisibles tales como diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Abajobir *et al.*, 2017). La prevalencia varía del 20 al 40% en los países occidentales y entre el 5 y el 40% de la población general de Asia y el Pacífico (El-Kader & Ashmawy, 2015).

En Europa y América del Norte poseen una prevalencia de 23%, aunque la prevalencia en adolescentes obesos oscila entre el 40 y el 45%. La EHGNA es muy

prevalente en Corea del sur, se estima que el 43% de la población tiene hígado graso y el 5% de ellos tiene fibrosis significativa, siendo los hombres los más afectados. De hecho la prevalencia de la fibrosis avanzada aumentó en una década 2.6% (2005) a 6.8% (2016) (Huh *et al.*, 2022).

Datos de México muestran una prevalencia del 82% de EHGNA en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica. En mujeres obesas, esta tasa alcanza el 36%, y en pacientes con diabetes mellitus, la tasa de EHNA comprobada por biopsia es del 18.5% (Bernal-Reyes *et al.*, 2019).

La tasa de mortalidad general a 10 años fue mayor en los pacientes diagnosticados con NAFLD (19,2%). El riesgo relativo de muerte asociado con NAFLD fue 2,16%. La NAFLD es un factor de riesgo independiente de otras comorbilidades metabólicas y eventos cardiovasculares (Bernal-Reyes *et al.*, 2019).

Debido a los estilos de vida occidentales se espera que aumente la incidencia de la obesidad y la diabetes tipo 2 (Huh *et al.*, 2022). Un factor importante para aumentar el riesgo de adquirir la enfermedad del hígado graso no alcohólico, es a través de los patrones dietéticos poco saludables, como el estilo de vida sedentario (falta de ejercicio) y el consumo de una dieta alta en grasas, azúcares y carbohidratos procesados industrialmente, que causan obesidad, resistencia a la insulina, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico (Abajobir *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2021).

Estos cambios en los patrones dietéticos ocurrieron después de la Revolución Industrial, donde el consumo excesivo de grasas y carbohidratos iban en contra de nuestra fisiología antigua, siendo los principales factores de riesgo en la EHGNA (Romualdo *et al.*, 2022).

DIETA, MICROBIOTA INTESTINAL y EHGNA

La dieta se define como el conjunto de hábitos alimenticios y tipos de alimentos (ya sea sólidos y/o líquidos) que consume un organismo o una población. Existe la preocupación de que el consumo de azúcares libres (principalmente de bebidas azucaradas), aumente la ingesta calórica total y disminuya el consumo de alimentos ricos en calorías más adecuadas desde el punto de vista nutricional, puesto que puede provocar aumento de peso y un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, por lo que se recomienda que el consumo de grasa no supere el 30% de la ingesta calórica diaria (World Health Organization: WHO, 2020).

Una dieta occidental se caracteriza por un consumo elevado de alimentos ricos en ácidos grasos saturados, colesterol y carbohidratos simples como glucosa, sacarosa y uno de los endulzantes más utilizados en la dieta occidental (fructosa) (Romualdo *et al.*, 2022, Carvallo *et al.*, 2017).

La fructosa se encuentra principalmente en bebidas azucaradas y se metaboliza directamente en el hígado convirtiéndose en glucosa, luego se almacena como glucógeno y se convierte en una fuente de energía para las células del hígado (hepatocitos), por lo que la ingesta excesiva de fructosa se transformará en lípidos, y como consecuencia tendrá un efecto tóxico sobre el hígado (Carvallo *et al.*, 2017).

La dieta alta en grasas es aquella que mantiene relativamente alta la energía proveniente de las proteínas, pero sustituye una enorme parte de la energía que aportan los carbohidratos por energía en forma de grasas. Se puede asociar con el aumento de peso corporal e inflamación crónica, que es producto de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo (Guzmán *et al.*, 2020).

En condiciones normales la composición de la microbiota intestinal es muy variable, siendo alterada por la dieta, el estilo de vida, la edad y las enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico. En particular, la dieta es de los factores que modulan su diversidad, lo que puede alterar el apetito, aumentar o disminuir la extracción de algunos metabolitos provenientes de los alimentos; además de alterar diversas estructuras químicas de los componentes de la dieta (Spruss & Bergheim, 2009).

Algunos procesos de salud y enfermedad están relacionados a la interacción entre el ser humano y los microorganismos (*Bacteroidetes* y *Firmicutes*). Una diversidad de bacterias, virus, arqueas y eucariotas unicelulares habitan diferentes regiones del cuerpo humano. La microbiota intestinal es el reservorio más grande de microorganismos compuesta principalmente de bacterias (10^{14}); tiene diez veces más microorganismos intestinales que células eucariotas humanas (Qin *et al.*, 2010).

Recientemente, la microbiota intestinal, ha sido clasificada como un órgano vital por su conexión multidireccional y comunicacional con otros órganos a través de vías neuronales, endocrinas, inmunológicas y metabólicas. Aunque los mecanismos de la interacción entre el intestino y los órganos aún no se comprenden del todo, el cambio en la comunidad microbiana influye en diferentes enfermedades (Ahlawat *et al.*, 2020).

La comunicación entre la microbiota y el hígado es bidireccional a través de la vena porta, el tracto biliar y la circulación sistémica. Por lo tanto los elementos que provienen del hígado tales como las sales biliares, influyen en la composición y función de la microbiota intestinal (Brandl *et al.*, 2017), mientras que los productos microbianos y los derivados de los alimentos regulan la síntesis de los ácidos biliares y el metabolismo de glucosa y lípidos en el hígado (Kolodziejczyk *et al.*, 2018).

Con base en lo anterior, la microbiota intestinal modula la inmunidad, el aumento o la pérdida de peso, la homeostasis energética y algunos trastornos relacionados con la obesidad. Además, algunos metabolitos de la microbiota intestinal están asociados con enfermedad renal crónica, enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad de hígado graso no alcohólico, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Spruss & Bergheim, 2009, Jansen *et al.*, 2021).

Dicho de otra manera, la microbiota intestinal es susceptible a alteraciones ambientales y fisiopatológicas, por lo cual desempeña un papel fundamental en la fisiopatología del hígado graso (Prieto-Ortiz *et al.*, 2022).

Un mejor conocimiento de la importancia de la microbiota intestinal en los mecanismos de salud y enfermedad ha despertado el interés de intentar regular dicha

microbiota a través de la dieta y del uso de microorganismos vivos (probióticos) (Eslamparast, *et al.*, 2013).

PROBIÓTICOS Y SU IMPORTANCIA EN LA DIETA

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a un probiótico como, microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada (Sánchez *et al.*, 2015).

Los géneros que regularmente son utilizadas como probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, de acuerdo con las siguientes características: 1) tienen la capacidad de sobrevivir en el tracto digestivo, requiriendo de tolerancia al ácido y la bilis, 2) deben encontrarse en el tracto intestinal normal, 3) ser seguro para el huésped, 4) conseguir unirse al intestino y colonizarlo. 5) debe generar compuestos antimicrobianos, como bacterias para combatir patógenos y 6) no puede ser un microorganismo patógeno para el huésped (Figura 3) (Pramanik *et al.*, 2023).

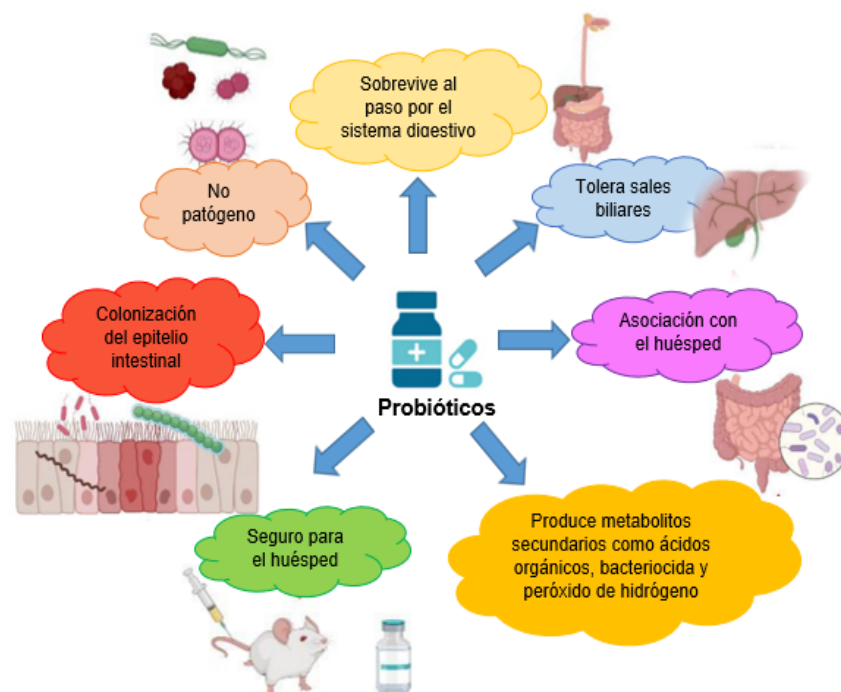


Figura 3: Características de los probióticos. Fuente: Elaboración propia, tomado de Pramanik *et al.*, 2023.

El género *Bifidobacterium* está conformado por 45 especies que pertenecen al filo *Actinobacteria* y están presentes en la microbiota gastrointestinal humana y animal. Las especies de *Bifidobacterium* son las más abundantes en el colon, se han encontrado el 25% en la materia fecal de adultos y el 80% en los niños, estas bacterias Gram positivas son importantes para la salud porque previenen infecciones intestinales, estimulan el sistema inmune y disminuyen el colesterol sérico (Rahila & Pradeep, 2019).

Los probióticos pueden promover la función de barrera de la mucosa intestinal y la recuperación de la mucosa durante una condición patológica. Debido a la estrecha relación anatómica y funcional entre el intestino y el hígado (Eslamparast *et al.*, 2013).

EJE INTESTINO-HÍGADO

El eje intestino-hígado es la comunicación bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el hígado mediante el tracto biliar, la vena porta y la circulación sistémica, es decir, las sustancias que se producen en el hígado pasan al intestino por medio de las vías biliares y con la ayuda de la circulación sistémica, por otra parte el hígado recibe dos tercios de la sangre del intestino a través de la vena porta (Han *et al.*, 2023).

Este eje desempeña un papel importante en el daño hepático y la progresión de la enfermedad, su interacción depende de dos cosas: un intestino intacto y un hígado capaz de manejar las respuestas inmunológicas, así como el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos. La mucosa intestinal actúa como una barrera protectora que ayuda a prevenir la entrada y propagación sistémica de bacterias y endotoxinas. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, esta barrera intestinal falla, lo que permite que bacterias y endotoxinas invadan a órganos y tejidos de todo el cuerpo; este proceso se llama translocación bacteriana (Eslamparast *et al.*, 2013).

La enfermedad hepática crónica y la cirrosis se asocian con una baja diversidad bacteriana y una mayor permeabilidad intestinal en comparación con pacientes sanos, a su vez, la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico se asocian con la disbiosis de la microbiota intestinal y una disminución en la diversidad de la microbiota. En la EHGNA, el aumento de la permeabilidad intestinal produce

endotoxemia, que se ha demostrado que desencadena respuestas inflamatorias de citocinas y resistencia a la insulina (Desjonqueres & Gigante, 2022).

Un estudio reciente en humanos sugiere que los pacientes cirróticos con EHGNA y hepatocarcinoma tienen una mayor inflamación intestinal y expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en comparación con pacientes sanos, Ponziani *et al* estudiaron el perfil de la microbiota intestinal de una serie consecutiva de pacientes con cirrosis relacionada con EHGNA y hepatocarcinoma (grupo 1, 21 pacientes), cirrosis relacionada con EHGNA sin hepatocarcinoma (grupo 2, 20 pacientes) y controles sanos (grupo 3, 20 pacientes)., permeabilidad intestinal, estado inflamatorio y células mononucleares circulantes (Ponziani *et al.*, 2018).

PROBIÓTICOS E INFLAMACIÓN

La inflamación puede desarrollarse como resultado de factores internos y externos. La principal causa de la inflamación se produce cuando los microorganismos aparecen en lugares a los que no pertenecen. La invasión de las bacterias patógenas debilitará la función de barrera de la mucosa, permitiendo la entrada de componentes bacterianos al cuerpo. Estos componentes acabarán en el hígado, creando una respuesta inflamatoria (Eslamparast *et al.*, 2013).

Los probióticos brindan beneficios para la salud del huésped a través de una variedad de mecanismos, como la reducción de la invasión de agentes proinflamatorios desde el intestino al cuerpo. Se ha demostrado que los lipopolisacáridos bacterianos (endotoxinas), así como una dieta alta en grasas, causan inflamación y resistencia a la insulina, que junto con el crecimiento de bacterias no benéficas en el intestino, provoca la translocación de endotoxinas bacterianas al torrente sanguíneo (endotoxemia), lo que activa los receptores tipo Toll-4 (TLR), estimulando distintas rutas metabólicas y favoreciendo la inflamación (Tumani *et al.*, 2021)

Los receptores TLR se expresan en muchos tipos diferentes de células hepáticas, incluidas las células de Kupffer, los hepatocitos y las células estrelladas hepáticas, son un vínculo importante entre la inflamación, lesión y la fibrosis hepática (Tumani *et al.*, 2021).

Entre los muchos TLR diferentes, el TLR4 desempeña un papel en la promoción de la inflamación y las lesiones en afecciones como la EHGNA. La activación de TLR4 se asocia con CD14 para iniciar la transducción de señales inducida por lipopolisacáridos, desencadenando una cascada inflamatoria que provoca la expresión de genes implicados en determinadas vías inflamatorias, produciendo TNF- α e IL-1 β (Eslamparast *et al.*, 2013).

PREBIÓTICOS

Los prebióticos están constituidos por carbohidratos complejos de origen vegetal con fibra soluble o insoluble. Se conoce que algunas bacterias intestinales son capaces de fermentar la fibra, produciendo metabolitos secundarios con actividad específica en las células eucariotas. En la actualidad existen prebióticos como los fructanos, los más comunes son los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina. Los fructanos como la inulina, se encuentran en los plátanos, el ajo, la cebolla, los puerros y otros vegetales. (Pérez-Monter *et al.*, 2022)

La inulina (INU) es una fibra dietética no digerible que se encuentra en la alcachofa de Jerusalén y se ha informado que tiene un efecto beneficioso sobre la modulación de la microbiota intestinal. Varios estudios han demostrado que la INU puede reducir la resistencia a la insulina al mejorar los lípidos en sangre, los niveles de azúcar en ayunas y restaurar la composición de la microbiota intestinal, reduciendo así las alteraciones metabólicas. (Bao *et al.*, 2020)

Dada las características benéficas de los prebióticos y probióticos, deberían formar parte de nuestra dieta diaria debido a que al mantener en equilibrio la microbiota intestinal se puede prevenir el desarrollo de enfermedades hepáticas.

Considerando que el consumo de prebióticos promueve la proliferación de bacterias benéficas y que los probióticos establecen un equilibrio de la microbiota intestinal y regulan el sistema inmune, en este trabajo se busca determinar si el consumo de *Bifidobacterium sp.* e Inulina inducen un cambio en la expresión genética de la citocina IL-1 β en un modelo de dieta alta en grasa en ratas Wistar, administrada durante 6 semanas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la expresión de la interleucina b1 (IL-1 β) como marcador de inflamación, en hígados de rata alimentadas con dieta alta en grasa, fructosa y probióticos.

Objetivos específicos

- Inducir daño hepático en ratas mediante el modelo experimental de dieta alta en grasa y fructosa.
- Observar el efecto de la administración de *Bifidobacterium* sp., en la formación de vesículas lipídicas en el hígado.
- Determinar por PCR en tiempo real, los niveles de expresión del gen IL-1 β en hígados de los diferentes grupos experimentales.
- Correlacionar la expresión del gen IL-1 β con la formación de vesículas lipídicas en los diferentes grupos experimentales.

METODOLOGÍA

MICROORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para la preparación de suspensiones de *Bifidobacterium* sp., para administrar a los animales de experimentación, se requiere de una serie de procedimientos experimentales:

- Preparación de medio MRS con cisteína (líquido y sólido).
- Activación y cultivo de *Bifidobacterium* sp.
- Preparación de suspensiones para su administración.
- Determinación de la viabilidad celular.

- MEDIO MRS (MRS-C) PARA CULTIVO DE *BIFIDOBACTERIUM* SP.

Se prepararon frascos con 40 ml y 80 ml de caldo MRS (Difco) los cuales fueron suplementados con cisteína al 0.05%, para generar las condiciones anaerobias se burbujeó CO₂ por 1 minuto en cada frasco, inmediatamente fueron sellados herméticamente con tapones de hule y anillos de metal, con la ayuda de pinzas para sellar viales. Posteriormente se esterilizaron a una presión de 15 lb/in² por 15 minutos. También se preparó agar MRS en cajas Petri para realizar cuenta viable, las condiciones de esterilización fueron las mismas que para el medio líquido.

- ACTIVACIÓN Y CULTIVO DE *BIFIDOBACTERIUM* SP.

Se descongeló un tubo de 1ml de *Bifidobacterium* sp., conservada en glicerol al 20%, las células fueron lavadas 2 veces en condiciones estériles. Las bacterias lavadas se transfirieron a un frasco con 40ml de medio MRS-C el cual se incubó durante 48 h a 37°C y agitación de 180 rpm. Pasado el tiempo, se transfirieron 8 ml de cultivo a un frasco de 80 ml con las mismas condiciones de incubación.

- PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES DE *BIFIDOBACTERIUM SP.*, PARA ADMINISTRACIÓN

Terminando el tiempo de incubación del cultivo de 80 ml, se agregó todo el cultivo en 2 tubos cónicos de centrífuga para realizar dos lavados por 15 minutos a 3,000 rpm cada uno, para eliminar el medio por completo. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 15 ml de agua del bioterio, para obtener la suspensión de bacterias a administrar a los correspondientes grupos experimentales.

- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad de las bifidobacterias se verificó por conteo en placa en agar MRS-C. El procedimiento a continuación se describe: Con una alícuota de 100 μ l de suspensión bacteriana se realizaron diluciones decimales seriadas hasta la dilución 10^{-9} . Las diluciones se plaquearon por triplicado y se incubaron por 48 horas a 37°C en condiciones anaerobias en una jarra GASPAK utilizando un sobre generador de anaerobiosis. Se contó el número de colonias en las diluciones donde se desarrollaron entre 30 y 300 UFC y se procedió a realizar los cálculos para conocer la concentración de bacterias en los cultivos, expresada en [UFC/mL].

Estos cultivos se preparaban cada semana y la cuenta viable se realizaban cada lunes para asegurar la administración de 1×10^9 bacterias/rata.

PREPARACIÓN DE LA DIETA ALTA EN GRASA Y FRUCTOSA

La dieta alta en grasa y fructosa fue preparada de la siguiente manera: Primero, la croqueta (RatDiet 5012 ®), fue triturada con la ayuda de un molino manual. Una vez triturada fue incorporada con los siguientes componentes: fructosa, caseína, vitaminas y minerales, se mezclaron todos los componentes secos (junto con la croqueta molida) todo esto previamente pesado, finalmente se le agregó la manteca de cerdo a la mezcla hasta obtener una completa homogeneización.

La dieta fue suministrada *ad libitum* por seis semanas consecutivas, con un consumo promedio de 30 gramos por cada una de las ratas.

La composición porcentual de los componentes de la dieta alta en grasa se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1: Composición de la dieta alta en grasa y fructosa.

Componente	(g) / kg
Fructosa cristalina	160
Manteca de cerdo	160
Caseína ácida	220
Mezcla de vitaminas y minerales	1
Croqueta molida	459

Fuente: Pérez-Ramírez, 2017.

MODELO EXPERIMENTAL

Un lote de 19 ratas Wistar macho con un peso promedio de 200 g fueron otorgadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Bioterio) de la UAM-Xochimilco. Los animales de experimentación fueron mantenidos en ciclos de doce horas luz/ oscuridad y con una temperatura constante de 24 °C. Las ratas se dividieron en 4 grupos experimentales; un grupo de dieta alta en grasa (HFD, n=3), el grupo de dieta alta en grasa y probiótico (HFD + BB, n=5), el grupo de dieta alta en grasa e inulina (HFD + INU, n=5) y el grupo de dieta alta en grasa, probiótico e inulina (HFD + BB +INU, n=5). Todos los grupos tuvieron una semana de adaptación después de ser recibidos de la UPEAL- Bioterio.

NOTA: Se solicitaron 40 ratas, sin embargo, únicamente nos entregaron 19, por lo que se tomó la decisión de iniciar con los grupos con dieta alta en grasa.

Todos los grupos experimentales consumieron dieta alta en grasa *ad libitum*, durante seis semanas (para evitar desperdicio, se colocaron diariamente aproximadamente 30 g de alimento /rata). El grupo HFD representó el consumo de dieta alta en grasa, mientras que el grupo de HFD + BB además del consumo de dieta alta en grasa fue

administrado con *Bifidobacterium* sp., en tanto que, el grupo de HFD + INU adicional al consumo de dieta alta en grasa tuvo la administración de inulina. Con respecto al grupo HFD + BB + INU además del consumo de dieta alta en grasa se administró la combinación del probiótico *Bifidobacterium* sp. e inulina. En todos los casos, la cantidad bacterias administradas fue de 1×10^8 UFC/rata y la dosis de inulina fue de 150 mg/Kg La administración del probiótico y de la inulina se realizó tres veces por semana durante 6 semanas de experimentación (Figura 4).

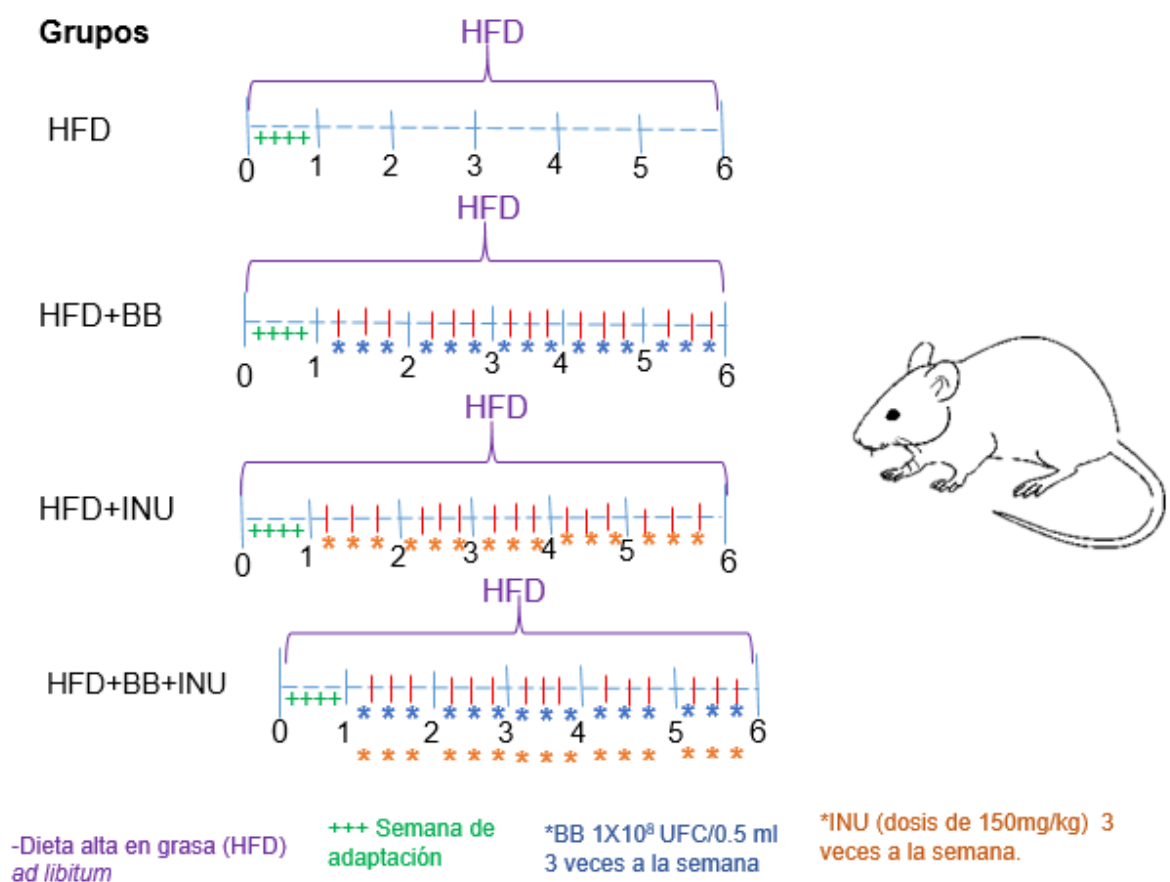


Figura 4: Inducción experimental de daño hepático.

Dieta alta en grasa (HFD) con sus respectivos tratamientos a las 6 semanas.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Al finalizar el protocolo experimental, se indujo la eutanasia de las ratas de todos los grupos. Cada una de las ratas fue anestesiada con isoflurano (Baxter). Una vez anestesiada, se registró su peso, y posteriormente fue colocada en la tabla de disección. Una vez que fue sujeta la rata, se realizó la limpieza y desinfección del abdomen utilizando una gasa estéril y benzal. Inmediato a la desinfección, y con la ayuda de una pinza y una tijera se cortó la piel y el músculo para mostrar los órganos vitales del abdomen. Al observar el corazón, se tomaron 5ml de sangre por punción cardiaca. Una vez obtenida la sangre se vació en un tubo vacutainer.

Después se cortó la vena cava, permitiendo el desangrado, inmediatamente se cortó el hígado y se colocó en solución salina para su lavado. Una vez lavado, se registró su peso y se capturo una fotografía.

Posteriormente, los lóbulos del hígado fueron seccionados en trozos pequeños con la ayuda de un bisturí. Varios trozos fueron adheridos a piezas de corcho utilizando el adhesivo tissue tek®, congelándolos en 2-metilbutano previamente enfriado en hielo seco. Los tejidos congelados fueron conservados en un ultracongelador a -70°C hasta su análisis. Un fragmento de tejido fue colocado en formalina al 10% por al menos 18 horas para posteriormente ser embebido en parafina y realizar análisis histológicos.

PURIFICACIÓN DE ARN

La purificación de ARN de hígado congelado se realizó utilizando el kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen). El procedimiento experimental a continuación se describe: un promedio de 30 mg de tejido fue obtenido mediante cortes de 5 µm de espesor, utilizando un criostato (Leica), en todo momento se evitó la descongelación del tejido. Inmediatamente después, se procedió a la lisis celular agregando 600 µL de buffer RLT suplementado con β-mercaptoetanol (1% v/v) y homogeneizando perfectamente. Una vez que el lisado fue homogeneizado se añadieron 600 µl de etanol (al 70% v/v) grado biología molecular. El alcohol es adicionado para proporcionar las condiciones de unión selectiva de ARN a la columna de sílice que se utiliza para su purificación. La mezcla fue aplicada a la columna de sílice y se dejó reposar por 5 minutos a

temperatura ambiente, esta acción permite que se impregne a la columna. Transcurrido el tiempo, la columna fue centrifugada a 10,000 rpm, y cuidando de no tocar la parte baja de la columna se desechó el contenido del tubo recolector.

Inmediatamente se incorporaron 650 µl del buffer RW1. Se dejó reposar por cinco minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a la misma velocidad y el mismo tiempo, también se desechó el fluido contenido en el tubo recolector. En seguida, se adicionaron 500 µl del buffer RPE y al igual que los procedimientos anteriores se dejó reposar el mismo tiempo a temperatura ambiente, igualmente el contenido del tubo recolector fue desechado, se adicionó una segunda vez el buffer RPE con el mismo procedimiento experimental. De inmediato, el tubo recolector fue reemplazado por un tubo nuevo para recolectar el ARN. Entonces, se adicionaron 35 µl de agua libre de RNasa a la columna con el objetivo de desprender el ARN purificado. Para ello, se centrifugó la columna a 10,000 rpm a temperatura ambiente. El ARN purificado se cuantificó utilizando un NanoDrop (Thermo scientific) y su integridad fue verificada mediante una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.2%. El ARN fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

EXPRESIÓN DEL GEN IL-1B POR RT- PCR EN TIEMPO REAL

CONVERSIÓN DEL ARN A ADNC

El ARN total obtenido del hígado de los diferentes grupos experimentales, fue convertido a ADNc mediante una reacción de transcripción inversa. Para el procedimiento experimental se utilizó el kit *High-Capacity RNA-to-cDNA*TM (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl mezclando 9 µl de ARN con una concentración de 750 ng en cada muestra, 10 µl de 2X RT buffer mix, 1 µl de 20X RT enzyme mix y agua libre de RNAsas cbp 20 µl (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes de reacción para obtención de cDNA.

Componentes	Volumen (μ l)
2X RT buffer mix	10 μ l
20X RT enzyme mix	1 μ l
RNA muestra	750 ng
Agua libre de RNasas cbp	20 μ l

Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 60 min y posteriormente a 95 °C durante 6 minutos. Al término de la reacción se colocaron 180 μ l de agua MiliQ en cada muestra y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

PCR EN TIEMPO REAL

Para el análisis de cada muestra se prepararon reacciones por duplicado las cuales se realizaron en un volumen final de 15 μ l y contenían: 1.0 μ l de 20X *TaqMan IL-1 β* , 7.5 μ l de *TaqMan Universal PCR Master Mix* y 6.5 μ l de cDNA (con aproximadamente 25 ng) (Tabla 3). Adicionalmente se preparó por duplicado una reacción con la sonda del gen 18S como control y un control negativo (NTC) (Tabla 4).

Tabla 3: Componentes de la reacción de PCR en tiempo real.

Componentes	Volumen (μ l)
Universal PCR Master Mix	7.5 μ l
Sonda TaqMan	1.0 μ l
cDNA	6.75 μ l
Volumen total	15 μ l

Tabla 4: Sondas TaqMan utilizadas en el análisis de expresión.

Símbolo del gen	Identificador
IL-1β	Rn00580432_m1
18S	Rn03928990_g1

Se utilizó un termociclador *Step One Plus* de Applied Biosystems con las siguientes condiciones de amplificación (Figura 5).

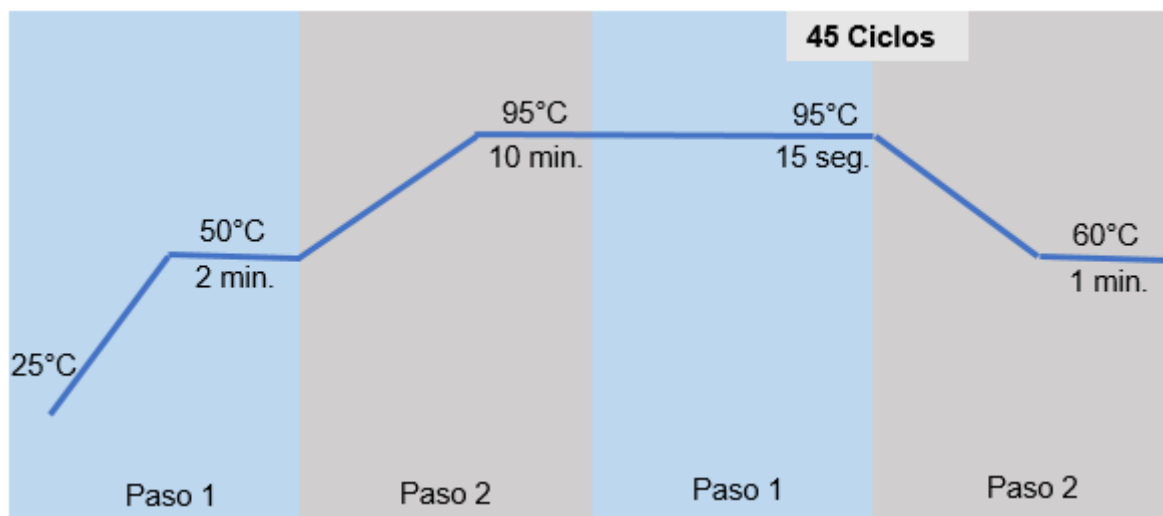


Figura 5: Condiciones del termociclador *Step One Plus* de Applied Biosystems.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL HÍGADO

TEJIDO CONGELADO

Se hicieron cortes de 10 μm del tejido hepático en un crióstato (Leica) los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E), para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

- Dejar secar la laminilla por 10 minutos.
- Colocar formalina al 10% hasta cubrirlos por completo 10 minutos.
- Dejar secar y se agregar isopropanol al 60% durante 10 segundos.
- Dejar secar perfectamente y se lavar con agua de la llave.
- Sumergir las laminillas en hematoxilina de Harris al 40% durante 2 minutos.
- Lavar con agua de llave hasta que deje de caer el colorante.
- Secar por completo la laminilla y agregar isopropanol al 60% por 10 segundos.
- Agregar eosina por 2 minutos.
- Retirar el excedente con agua destilada por goteo hasta que deje caer colorante, posteriormente lavar con agua de la llave y dejar secar.
- Agregar 1 gota de medio de montaje acuoso (Sigma), colocar un cubreobjetos sobre la laminilla ya con el medio de montaje y presionar hasta eliminar las burbujas de aire.

Las laminillas se observaron en el microscopio óptico (ZEISS AXIO) para su análisis.

TEJIDO EMBEBIDO EN PARAFINA

Se hicieron cortes de 3 μm del tejido hepático incluido en parafina en un micrótopo (Ecoshelsku), los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina, para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

ELIMINACIÓN DE PARAFINA

- Colocar las laminillas en una estufa a 65°C durante una hora, para quitar el excedente de parafina y proceder con los siguientes pasos:

Aclaración

- Colocar Xilol por 10 minutos. 2x

Rehidratación

- Agregar alcohol al 100% por 5 minutos. 2x
- Alcohol al 96% por 5 minutos. 2x
- Alcohol al 70% por 5 minutos. 2x
- Alcohol al 50% por 5 minutos. 2x
- Lavar con agua destilada por 2 minutos. En cada paso quitar el exceso y secar por completo.

TINCIÓN

- Sumergir las laminillas en hematoxilina de Harris al 40% por 5 minutos.
- Lavar con agua destilada por goteo durante 1 minuto
- Agregar alcohol al 70% por goteo durante 15 segundos.
- Colocar eosina por 2 minutos y retirar excedente.

DESHIDRATACIÓN

- Poner alcohol al 96% durante 1 minuto. 3x
- Agregar alcohol al 100% (Baker No. De catálogo 9014-02) por 1 minuto. 3x
- Finalmente colocar Xilol (Baker No. De catálogo 949003) por 15 segundos. 2x, secar por completo y montar la laminilla con medio de montaje acuoso (Sigma).

ANÁLISIS DE DATOS

Se analizó la expresión mediante $\Delta\Delta C_t$ y análisis unidireccional de varianza (ANOVA), con una significancia de $p < 0.05$ y posterior prueba de Tukey para comparación entre grupos con la ayuda (software GraphPad Prism 5).

RESULTADOS

De acuerdo con el proyecto y con el tratamiento que recibió cada una de las ratas, se presentarán solamente los resultados de los grupos de dieta alta en grasa, ya que los animales de los otros grupos con dieta normal (DN) tuvieron que ser sacrificados debido al paro de actividades en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Unidad Xochimilco, por lo que en algunos casos, se hará un análisis de nuestros resultados con otro estudio en donde se utilizó una dieta normal (DN) como control negativo.

PESO CORPORAL Y PESO DEL HÍGADO

En primer lugar se hizo el análisis del promedio de sus pesos corporales, los cuales fueron registrados cada semana, iniciando por la semana de adaptación como se muestra en la siguiente gráfica; en las ratas de los grupos experimentales HFD-INU y HFD-BB-INU el aumento de peso fue mayor al del grupo HFD-BB y similar al del grupo HFD, en cuanto al grupo HFD-BB su aumento de peso fue menor en comparación con HFD. Todos los grupos tuvieron un aumento de peso constante (Figura 6 A).

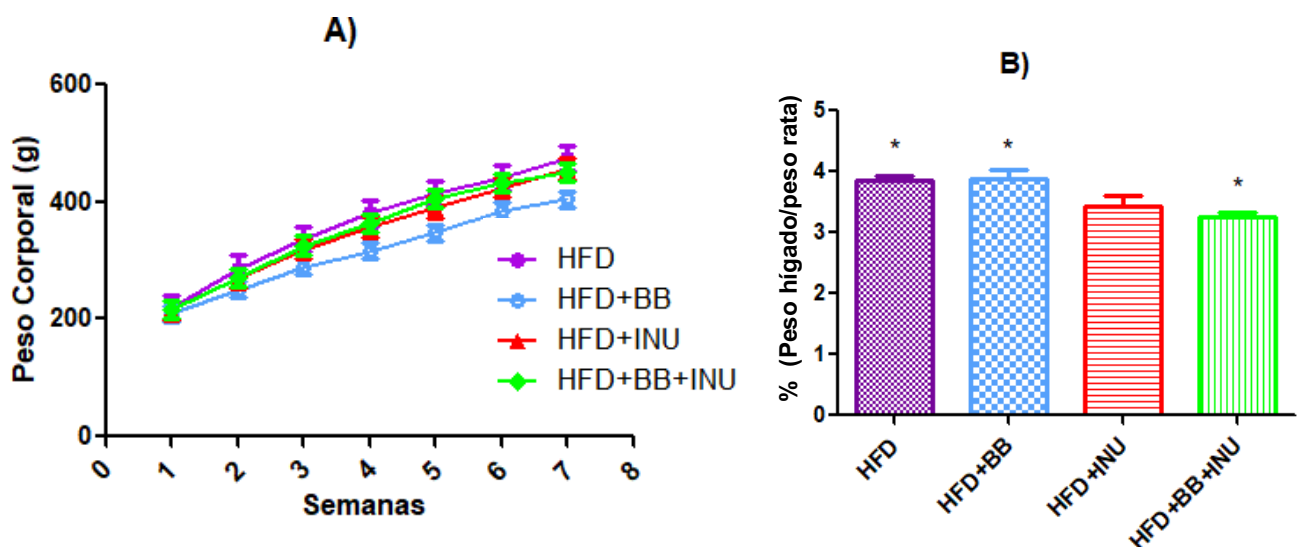


Figura 6: A) Aumento de peso corporal de los diferentes grupos experimentales. B) Porcentaje del peso del hígado obtenido durante 6 semanas.

Los 4 grupos experimentales, presentaron un aumento de peso constante, y aunque no hubo una diferencia estadísticamente significativa, el grupo que consumió únicamente dieta alta en grasa (HFD) presentó los mayores valores de peso, mientras que el grupo de dieta alta en grasa que se suplementó con *Bifidobacterium* sp., presentó una tendencia menor de los 4 grupos, lo que sugiere que el probiótico puede tener un efecto sobre el peso corporal (Figura 6-A).

En cuanto a los grupos donde se administró el prebiótico (HFD-INU y HFD-BB-INU) también se observó un aumento en su peso corporal pero fue menor en comparación con el grupo de dieta alta en grasa (HFD). Rodríguez *et al.* (2020) realizaron un estudio en ratones colonizados con heces de pacientes humanos obesos, los ratones fueron alimentados con dieta alta en grasa durante 3 meses, donde menciona que el consumo de Inulina puede fomentar el descenso del índice de masa corporal y regenerar la esteatosis hepática, debido a la composición de la microbiota intestinal, lo que se confirma en este estudio.

En cuanto al porcentaje de peso de los hígados en relación al peso corporal del animal, hay una disminución en el grupo HFD-INU en comparación con el grupo de HFD pero no es estadísticamente significativa, en cuanto a los grupos HFD vs HFD-BB-INU y HFD-BB vs HFD-BB-INU se observa una disminución donde sí existe una diferencia estadísticamente significativa. (Figura: 6 B). Gráficamente HFD y HFD+BB tuvieron un aumento similar pero sin diferencia estadísticamente significativa.

En el porcentaje de peso de hígado respecto con peso final de la rata, se observa que el aumento en HFD-BB es mayor al de HFD, pero sin diferencia estadísticamente significativa entre estos grupos.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL HÍGADO.

Tras la extracción del hígado, éste se fotografió en condiciones idénticas de luz, para poder realizar una valoración de sus características macroscópicas (Tabla 5).

Tabla 5: Características macroscópicas de los hígados con dieta alta en grasa (HFD).

Grupo	Rata	Peso de rata (g)	Peso de hígado (g)	% (Peso de hígado/peso rata).	Observaciones
HFD	1	527	19.94	3.784	Color café uniforme con textura lisa y poco brillante.
	2	400	16.11	4.028	Color café brillante con textura lisa.
	3	495	18.47	3.731	Color café brillante con textura lisa.
HFD+BB	1	349	14.99	4.295	En la punta de un lóbulo tiene un color vino más oscuro, su textura es poco porosa y con poco brillo.
	2	399	16.35	4.098	Presenta un color marrón con brillo y poca porosidad.
	3	386	14.63	3.790	Tiene color café uniforme con brillo y sin textura porosa.
	4	396	14.64	3.697	En las puntas de los lóbulos presenta un color vino más encendido con brillo y sin textura porosa.
	5	494	17.33	3.508	Color café uniforme con brillo y sin porosidad.
HFD+INU	1	404	14.76	3.653	El hígado tiene un color vino uniforme muy oscuro con textura lisa y sin brillo (muy opaco).
	3	512	17.43	3.404	Las puntas de los lóbulos presentan un color vino oscuro con brillo y sin porosidad.
	4	494	18.25	3.694	Presenta un color café con brillo y sin porosidad.
	5	418	12.3	2.943	Color café uniforme con brillo y textura muy lisa.
HFD+BB+INU	1	438	15.35	3.505	Color café brillante con textura lisa.
	2	509	16.51	3.244	Su textura se aprecia lisa, con color vino muy oscuro y brillante.
	3	408	13.82	3.387	En las puntas de los lóbulos el color vino permanece más encendido, tiene una textura lisa con brillo pero presenta algunos puntos blancos en algunas partes de los diferentes lóbulos, el color no es uniforme.
	4	475	14.01	2.949	Color café brillante con textura lisa.
	5	423	13.23	3.128	Los lóbulos de la parte de abajo parecen presentar porosidad, el resto tiene textura lisa con brillo y un color oscuro uniforme.

Se clasificaron los hígados atendiendo a las características macroscópicas: color, rugosidad de la superficie y tamaño. Dentro de esas características, en general se observó un pequeño cambio de color en algunas zonas de los hígados en todos los grupos experimentales, no hubo un cambio evidente y representativo de cada grupo, algunos hígados presentaron una textura un poco porosa a diferencia de otros que su textura era lisa y con color brillante. Las características macroscópicas de los hígados por lo general muestran un aumento en el peso del hígado, en especial en el grupo de HFD y evidente cambio de color a causa de las vesículas de grasa, Simoes *et al.* (2020) reportó las mismas observaciones sugiriendo esteatosis, en su modelo de ratones machos C57BL/6J de cuatro semanas de edad (20-30 g) donde fueron alimentados durante 16 semanas, comenzando en la semana 7 de edad con una dieta alta en grasas que contenía el 51% de su energía de la grasa, el 26% de los carbohidratos y el 23% de las proteínas y está compuesta por un 30% de grasa (14% de AGS, 12% de ácidos grasos monoinsaturados y 1% de ácidos grasos poliinsaturados), un 16% de sacarosa y 284 mg/kg de colesterol.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL HÍGADO

Para los cortes de tejido se optimizó el método de la tinción hematoxilina/eosina, donde las imágenes más representativas de cada grupo se muestran en la figura 7.

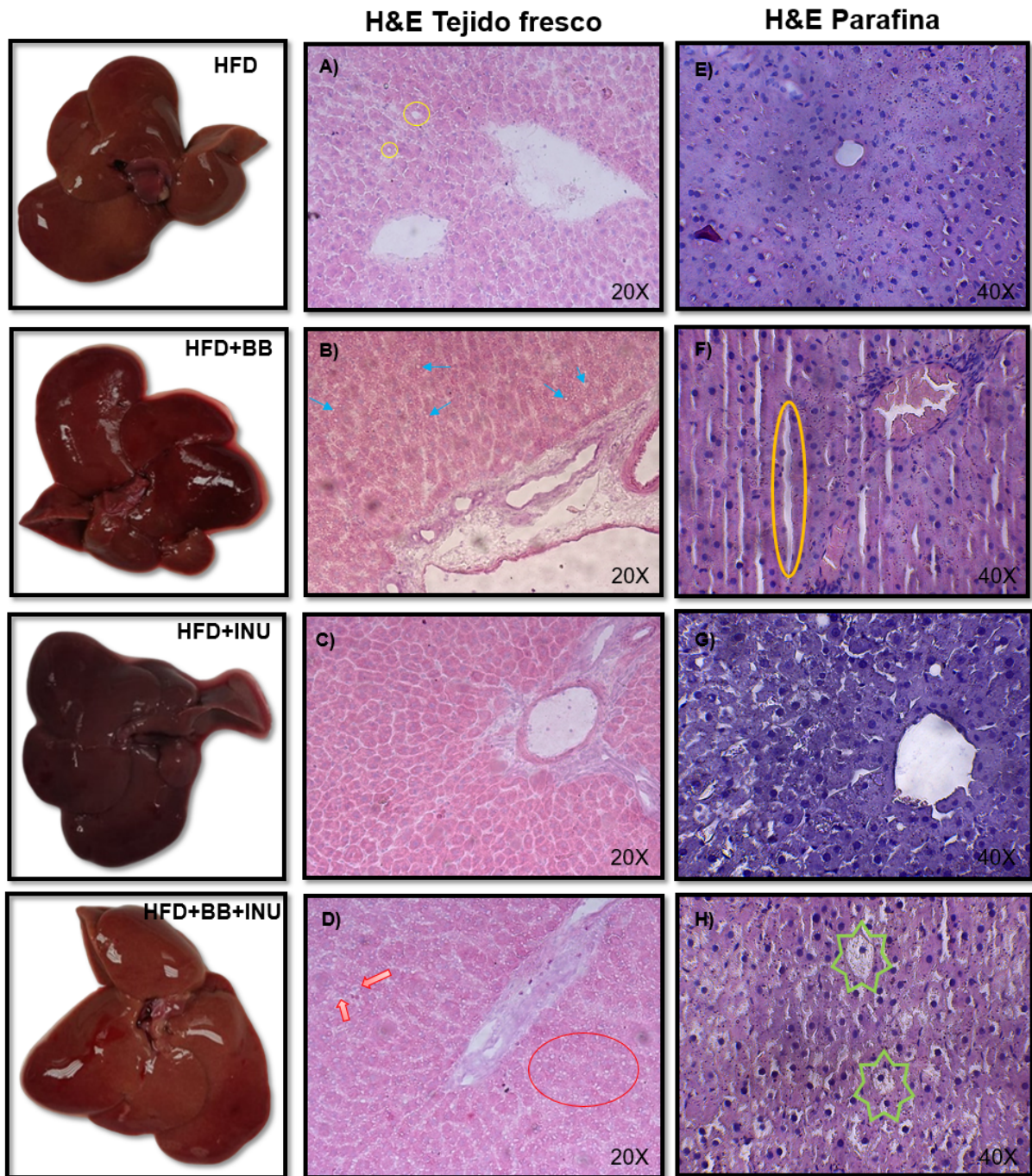


Figura 7: Imágenes representativas de hígados y tinción con Hematoxilina/Eosina de tejido hepático fresco y tejido embebido en parafina (lado derecho) de los grupos HFD (**A, E**), HFD+BB (**B, F**), HFD+INU (**C, G**) y HFD+BB+INU (**D, H**). Aumento objetivo 20x y 40x. Las flechas azules indican esteatosis micro y macrovesicular, en los círculos amarillos se muestran gotas de lípidos. El círculo rojo muestra células balonizadas y en las flechas rojas se observan estructuras que podrían ser cuerpos de Mallory. En cuanto al ovalo naranja (Figura 7 **F**) se observan espacios que pueden deberse a una inadecuada fijación del tejido. Las estrellas verdes indican células balonizadas (Figura 7 **H**).

El grupo de dieta alta en grasa (HFD) presenta inicios de esteatosis en algunos puntos caracterizadas por pequeñas gotas de lípidos en los tejidos Figura 7 **A** (círculos amarillos). También se observaron inicios de esteatosis con gotas micro y macrovesiculares que ocupan el citosol de los hepatocitos y desplazan el núcleo, pero sin señales de inflamación en el grupo HFD+BB Figura 7 **B** (flechas azules). En el grupo de HFD+INU no se presentaron cambios en la morfología del hígado correspondiente con esteatosis Figura 7 (**C**) y en el grupo HFD+BB+INU, en algunos casos se visualizan estructuras que podrían ser cuerpos de Mallory (formas de media luna representando una condensación de filamentos) y células balonizadas (flechas y círculo rojos) Figura 7 **D**.

Todas esas características correspondían con lo observado en las tinciones de H&E, en los grupos de HFD, HFD-BB y HFD-BB-INU hubo características evidentes de esteatosis con vacuolas de grasa que alteraban la estructura del tejido (Figura 7).

Bao *et al.*, (2020) analizaron el efecto de la administración de inulina a ratones C57BL6 con dietas altas en grasa durante 14 semanas. En su estudio, administraron dietas con 60% de grasa y 5 g/kg de peso de inulina para estudiar el efecto que tenía esta sobre la enfermedad del hígado graso no alcohólico, en el cual se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina y se observó una mejoría en la progresión de EHGNA, demostrando que la inulina disminuye la acumulación de lípidos en hígado en los grupos con dieta alta en grasa.

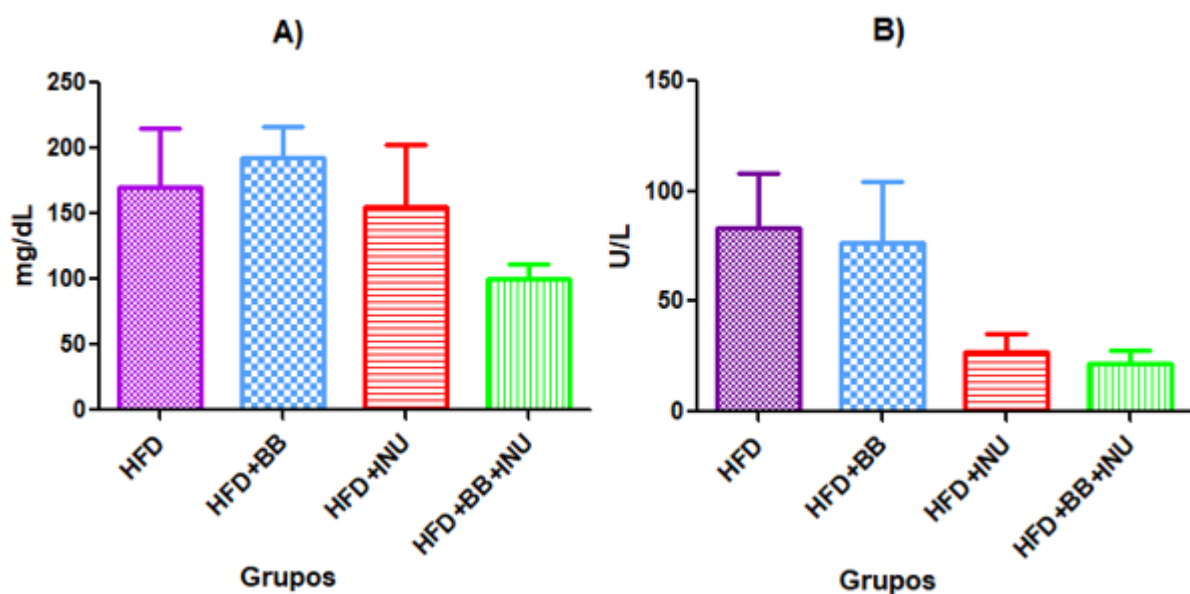
ANÁLISIS DE BIOQUÍMICAS SANGUÍNEAS

De la sangre obtenida por punción cardiaca de cada grupo experimental, se obtuvo el suero para determinar los siguientes parámetros bioquímicos: triglicéridos (TG), alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina, de los cuales, aunque no es estadísticamente significativo, existe un aumento de triglicéridos para los grupos HFD y HFD-BB principalmente, mientras que la presencia de triglicéridos en suero para los grupos HFD-INU y HFD-BB-INU tuvieron mayor disminución en comparación con HFD sin ser estadísticamente significativo (Figura 8 A). Los parámetros bioquímicos relacionados con el funcionamiento hepático como ALT, mostro una disminución similar en comparación

con HFD para los grupos HFD-INU y HFD-BB-INU, aunque no fue significativa, en el grupo de HFD-BB los niveles fueron similares a HFD (Figura 8 B).

En el parámetro AST se observó una disminución, en todos los grupos comparándolos con HFD, en los grupos HFD-INU y HFD-BB-INU al hacer la prueba de Tukey para comparación entre grupos, si existe una diferencia estadísticamente significativa entre HFD vs HFD-INU y HFD vs HFD-BB-INU (Figura 8 C). La reducción para fosfatasa alcalina en el grupo HFD-BB-INU fue mayor a los otros grupos, y con respecto a la dieta alta en grasa (HFD) al realizar el análisis de varianza se puede decir que existe una diferencia estadísticamente significativa (Figura 8 D).

En cuanto al parámetro de glucosa (Figura 8 E) todos los grupos tuvieron un incremento mayor al del grupo HFD, el grupo HFD-INU presenta un aumento pero no es mayor respecto al grupo HFD-BB-INU, y el aumento del grupo HFD-BB es superior al del grupo HFD, sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre cada uno de los grupos. Para los niveles de colesterol (Figura 8 F) los grupos HFD-BB, HFD-INU y HFD-BB-INU tuvieron un aumento similar pero son menores en comparación con el grupo de dieta alta en grasa (HFD) que tiene niveles un poco más elevados, pero sin una diferencia estadísticamente significativa.



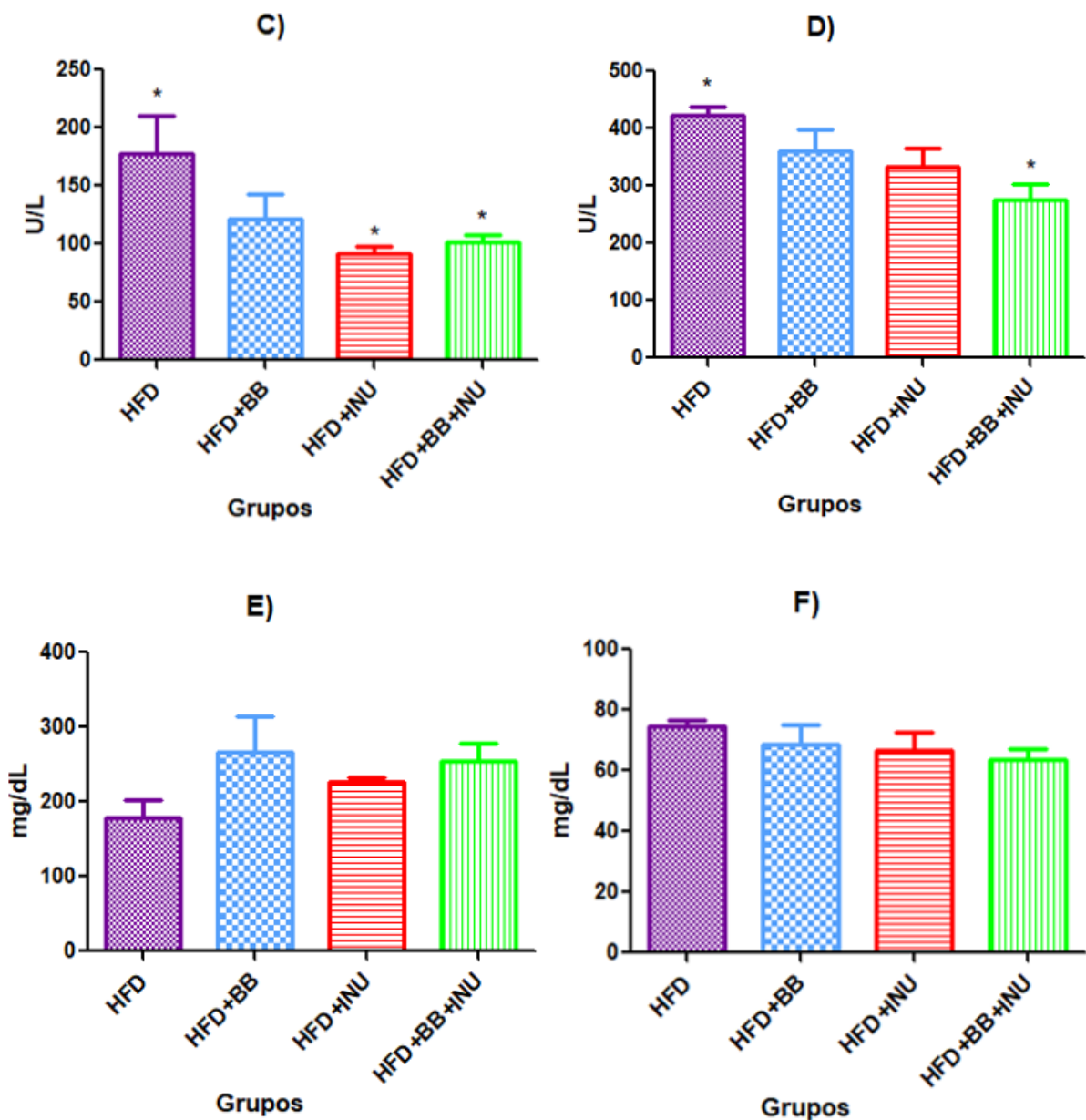


Figura 8: Determinación de parámetros bioquímicos en la sangre de los diferentes grupos experimentales. Triglicéridos (TG) A), alanino aminotransferasa (ALT) B), aspartato aminotransferasa (AST) C), Fosfatasa alcalina D), Glucosa E) y Colesterol F). *P<0.05 diferencia estadísticamente significativa.

Los niveles séricos de triglicéridos (TG), alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina y colesterol en los grupos HFD y HFD-BB mostraron un aumento en comparación con los otros grupos que recibieron tratamiento (HFD-INU y HFD-BB-INU). Luo *et al.*, (2021) en su estudio administró una dieta alta en grasa (45% de grasa) en ratas macho Sprague-Dawley durante 6 semanas y en cada rata se administró 312 mg/kg/d de probióticos, teniendo como

resultado en el grupo de dieta alta en grasa aumento en los niveles de triglicéridos ($0,53 \pm 0,13$), alanino aminotransferasa ($221,6 \pm 60,8$), aspartato aminotransferasa ($362,8 \pm 75,4$), colesterol ($2,27 \pm 0,47$) y lipoproteínas de baja densidad ($0,42 \pm 0,12$).

CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DEL ARN

Se purificó el RNA únicamente de 3 muestras de hígado de cada grupo experimental, los cuales fueron cuantificados (Tabla 6), se obtuvieron concentraciones del ARN que variaron entre $191\text{ng}/\mu\text{l}$ y $1,135.7\text{ ng}/\mu\text{l}$, debido a que se pesó diferente cantidad de tejido al realizar la extracción de RNA. Los rangos de pureza estuvieron alrededor de 2.1 por lo que se considera que fue óptima para todas las muestras con rangos de 2.0 a 2.3, pero con presencia de compuestos orgánicos en la mayoría de las muestras, debido a que se obtuvieron valores menores de 1.8 en A 260/230.

Tabla 6: Cuantificación de la concentración y pureza de RNA en Nanodrop.

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

INTEGRIDAD DEL ARN

Para poder determinar la integridad de los RNA extraídos, se observaron en gel de agarosa al 1.2%. La figura 9 muestra los RNA representativos de cada grupo experimental, donde no se observó degradación porque las bandas están bien definidas correspondientes al 18s y 28s del RNA ribosómico.

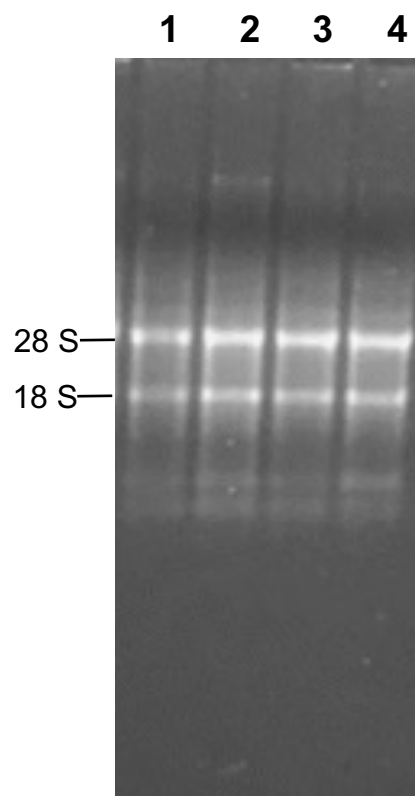


Figura 9: Imagen representativa del RNA purificado de hígados de rata alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa. Carriles: 1-HFD, 2-HFD+BB, 3- HFD+INU, 4-HFD
Determinación de integridad de RNA en gel de agarosa al 1.2%.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN IL-1B

En cuanto a los datos obtenidos de PCR, gráficamente se visualiza que el gen IL-1 β está sobreexpresado en los grupos HFD-BB y HFD-INU en comparación con el grupo de dieta alta en grasa (HFD), en el grupo HFD-BB-INU se observa una expresión similar a HFD (Figura 10).

De acuerdo con la prueba de Tukey para la comparación entre grupos, indica que el incremento de cada uno de los tratamientos no es estadísticamente significativo respecto a HFD, a pesar de que el aumento de la expresión del grupo HFD-BB es mayor en relación con los grupos HFD-INU y HFD-BB-INU, sin embargo, se recomienda que el número de individuos en cada grupo sea mayor por la alta variabilidad de los resultados obtenidos con este modelo experimental.

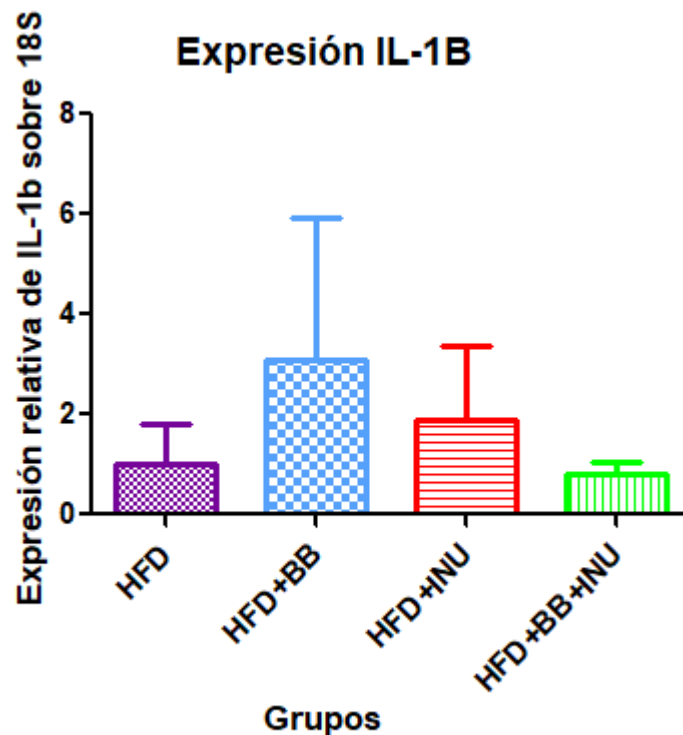


Figura 10: Cuantificación de la expresión de ARNm por RT-qPCR del gen que codifica para la citocina proinflamatoria IL-1 β . *P<0.05 diferencia estadísticamente significativa.

La familia de las citocinas IL-1 son importantes promotores de la inflamación en la EHGNA, en particular la IL-1 β fomenta la esteatosis hepática al provocar el almacenamiento de triglicéridos y colesterol en los hepatocitos primarios del hígado y la formación de gotas de lípidos (Mirea *et al.*, 2018).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) y muchas otras complicaciones, se asocian con la elevada ingesta calórica inducida por la dieta (Lasker *et al.*, 2019). La dieta es un factor importante y modificable en las enfermedades no transmisibles asociadas con la obesidad (Aboujassoum *et al.*, 2023). El aumento de la EHGNA se atribuye al estilo de vida occidental, especialmente por el consumo de una dieta rica en grasa. La grasa es un nutriente dietético que aporta 9 kcal/g siendo la de mayor densidad energética, a su vez los carbohidratos y proteínas solo aportan 4 kcal/g (Picchi *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, la dieta alta en grasas se puede relacionar al aumento de peso corporal e inflamación crónica (Guzmán *et al.*, 2020) en la EHGNA, por lo que se ha visto como una opción terapéutica el uso de probióticos, pues se ha demostrado que pueden reducir el daño y mejorar la función hepática en pacientes con esta enfermedad, a través de la regulación de la microbiota intestinal y mejorando la función de la barrera intestinal (Luo *et al.*, 2021).

Los probióticos más estudiados para el tratamiento de EHGNA son *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*, y se ha demostrado en experimentos clínicos y con animales que estos pueden mejorar el desequilibrio de la microbiota intestinal y la inflamación (Luo *et al.*, 2021).

La disbiosis de la microbiota intestinal también juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) (Luo *et al.*, 2021), por lo que en este estudio, se agregó prebióticos junto con probióticos en la dieta, para ayudar a aumentar la diversidad bacteriana benéfica, que contribuya a la mejora de la EHGNA, sin embargo, se sugiere realizar análisis de las poblaciones microbianas del contenido intestinal de los diferentes grupos experimentales y así conocer si la administración de probióticos y prebióticos tuvieron influencia en la composición de la microbiota en esta etapa del desarrollo de la EHGNA.

CONCLUSIONES

- La administración de dieta alta en grasa durante 6 semanas en el modelo experimental utilizado de hígado graso no alcohólico, no fue suficiente para ver un cambio en las características macroscópicas del hígado, ni en los parámetros analizados en sangre y a nivel histológico.
- La administración de probióticos y prebióticos durante 6 semanas en el modelo experimental utilizado de hígado graso no alcohólico, no fue concluyente.
- Se observó un aumento en la expresión del gen IL-1 β en los grupos HFD-BB y HFD-INU, sin embargo el aumento no fue estadísticamente significativo en el experimento de 6 semanas.
- No se observó una correlación entre la formación de vesículas lipídicas en el hígado y la expresión del gen IL-1 β en los diferentes grupos experimentales.

PERSPECTIVAS

- Realizar el experimento incluyendo los respectivos grupos sin dieta alta en grasa y control negativo.
- Aumentar el número de animales de experimentación en cada grupo experimental por la variabilidad de los datos obtenidos.
- Realizar análisis histológicos de cada uno de los lóbulos del hígado con el fin de conocer si la esteatosis se presenta de forma indistinta.

REFERENCIAS

- Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K., Abd-Allah, F., Abdulle, A., Abera, S. F., Aboyans, V., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Abyu, G. Y., Adedeji, I. A., Adetokunboh, O., Afarideh, M., Afshin, A., Agrawal, A., Agrawal, S., Ahmadieh, H., Ahmed, M. B., . . . Zodpey, S. (2017). Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1345-1422. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)32366-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32366-8)
- Aboujassoum, H., Mohamed-Ali, V., Abraham, D., Clapp, L. H., & Al-Naemi, H. (2023). Relative Recovery of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Diet-Induced Obese Rats. *Nutrients*, 16(1), 115. <https://doi.org/10.3390/nu16010115>
- Ahlawat, S., Asha, A., & Sharma, K. K. (2020). Gut–organ axis: a microbial outreach and networking. *Letters In Applied Microbiology*, 72(6), 636-668. <https://doi.org/10.1111/lam.13333>
- Alfadul H., Sabico S., Al-Daghri N. M. (2022). The role of interleukin-1 β in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*.
- Bao, T., He, F., Zhang, X., Zhu, L., Wang, Z., Lü, H., Wang, T., Li, Y., Yang, S., & Wang, H. (2020). Inulin Exerts Beneficial Effects on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease via Modulating gut Microbiome and Suppressing the Lipopolysaccharide-Toll-Like Receptor 4-M ψ -Nuclear Factor- κ B-Nod-Like Receptor Protein 3 Pathway via gut-Liver Axis in Mice. *Frontiers In Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.558525>
- Barbier, L., Ferhat, M., Salamé, E., Robin, A., Herbelin, A., Gombert, J. M., Silvain, C., & Barbarin, A. (2019). Interleukin-1 Family Cytokines: keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02014>
- Bedossa, P. (2017). Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 37, 85–89. Doi: 10.1111/liv.13301
- Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N. C., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, M., Bosques-Padilla, F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J., Cisneros-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., De La Tijera, M. H., Kershenobich-Stalnikowitz, D., . . . Velasco, J. V. (2019). Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(1), 69-99. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.11.007>
- Brandl, K., Kumar, V., & Eckmann, L. (2017). Gut-liver axis at the frontier of host-microbial interactions. *American Journal Of Physiology. Gastrointestinal And Liver Physiology/American Journal Of Physiology: Gastrointestinal And Liver Physiology*, 312(5), G413-G419. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00361.2016>
- Calleja J. y Turnes J. (2022). EHGNA. Enfermedad de hígado graso no alcohólico: un estudio integral. Fundación Gaspar Casal. <https://aeeh.es/wp-content/uploads/2022/02/EHGNA-pdf.pdf>
- Carvallo, P., Carvallo, E., Barbosa-da-Silva, S., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Del Sol, M. (2017a). NAFLD e Ingesta de Fructosa en Altas concentraciones: Una Revisión de la Literatura. *International Journal Of Morphology*, 35(2), 676-683. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022017000200047>
- Danford, C. J., Yao, Z., & Jiang, Z. G. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease: a narrative review of genetics. *Journal Of Nanjing Medical University*, 32(6), 389. <https://doi.org/10.7555/jbr.32.20180045>
- Desjonqueres, E., & Gigante, E. (2022). Hepatocellular carcinoma on the background of nonalcoholic fatty liver disease: Epidemiological update. *Hepatoma research*, 8, 16. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2021.136>

- Dinarello C.A., Simon A., van der Meer JW. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 11(8):633-52.
- Duan, Y., Pan, X., Luo, J., Xiao, X., Li, J., Bestman, P. L., & Luo, M. (2022). Association of inflammatory cytokines with Non-Alcoholic fatty liver Disease. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880298>
- Ehrling, C., Wolf, S. D., & Bode, J. G. (2021). Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. *Biological chemistry*, 402(9), 1129–1145. <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0209>
- Ehses, J. A., Lacraz, G., Giroix, M. H., Schmidlin, F., Coulaud, J., Kassis, N., Irminger, J. C., Kergoat, M., Portha, B., Homo-Delarche, F., & Donath, M. Y. (2009). IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33):13998–14003.
- El-Kader, S. M. A., & Ashmawy, E. M. (2015). Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World Journal Of Hepatology*, 7(6), 846. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i6.846>
- Eslamparast, T., Eghtesad, S., Hekmatdoost, A., & Poustchi, H. (2013). Probiotics and Nonalcoholic Fatty liver Disease. *Middle East journal of digestive diseases*, 5(3), 129–136.
- Greene, E. D., Weber, F. L. R., Rodríguez, G. C., & Chavarría, M. J. O. (2020). Prevalencia del hígado graso no alcohólico y su asociación con alteraciones bioquímicas en una población mexicana asintomática. *Acta médica grupo ángeles*, 18(2), 127-132. <https://doi.org/10.35366/93885>
- Grgurević, I., Božin, T., Mikuš, M., Kukla, M., & O'Beirne, J. (2021). Hepatocellular Carcinoma in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Epidemiology to Diagnostic Approach. *Cancers*, 13(22), 5844. <https://doi.org/10.3390/cancers13225844>
- Guzmán C., Forman K. y Sánchez R. (2020). Efectos de una Dieta con Alto Contenido de Grasas sobre Parámetros Alimentarios y Tejido Adiposo Blanco Visceral de Ratas Sprague Dawley. *Revista Internacional de Morfología*, 38 (3), 611-615. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022020000300611>
- Han, H., Jiang, Y., Wang, M., Melaku, M., Liu, L., Zhao, Y., Zhang, H. (2023). Disbiosis intestinal en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD): centrándose en el eje intestino-hígado. *Reseñas críticas en ciencia de los alimentos y nutrición*, 63 (12), 1689-1706. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1966738>
- Hernández-Pérez, E., García, L. E. A., Ne, L., Rivera-Cabrera, F., & E, D. Á. B. (2016). Liver steatosis and nonalcoholic steatohepatitis: From pathogenesis to therapy. *Medwave*, 16(08), e6535. <https://doi.org/10.5867/medwave.2016.08.6535>
- Huh, Y., Cho, Y. J., & Nam, G. E. (2022). Recent Epidemiology and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal Of Obesity & Metabolic Syndrome*, 31(1), 17-27. <https://doi.org/10.7570/jomes22021>
- Jansen, V. L. B., Gerdes, V. E. A., Middeldorp, S., & Van Mens, T. E. (2021). Gut microbiota and their metabolites in cardiovascular disease. *Baillière's Best Practice And Research In Clinical Endocrinology And Metabolism/Baillière's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 35(3), 101492. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101492>
- Kamari, Y., Shaish, A., Vax, E., Shemesh, S., Kandel-Kfir, M., Arbel, Y., Olteanu, S., Barshack, I., Dotan, S., Voronov, E., Dinarello, C. A., Apte, R. N., & Harats, D. (2011). Lack of interleukin-1 α or interleukin-1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *Journal Of Hepatology*, 55(5), 1086-1094. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.048>

- Kakino S, Ohki T, Nakayama H, Yuan X, Otabe S, Hashinaga T, et al. Pivotal Role of TNF-alpha in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. *Horm Metab Res.* 2017
- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., Shibolet, O., & Elinav, E. (2018). The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Molecular Medicine*, 11(2). <https://doi.org/10.15252/emmm.201809302>
- Lasker, S., Rahman, M., Parvez, F., Zamila, M., Miah, P., Nahar, K., Kabir, F., Sharmin, S. B., Subhan, N., Ahsan, G. U., & Alam, M. A. (2019). High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56538-0>
- López-Castejón, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1B secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Luo, M., Yan, J., Wu, L., Wu, J., Chen, Z., Jiang, J., Chen, Z., & He, B. (2021). Probiotics Alleviated Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High-Fat Diet-Fed Rats via Gut Microbiota/FXR/FGF15 Signaling Pathway. *Journal of immunology research*, 2021, 2264737. <https://doi.org/10.1155/2021/2264737>
- McPherson, S., T. Hardy, E. Henderson, A.D. Burt, C.P. Day, and Q.M. Anstee. 2015. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *Journal of Hepatology* 62 (5): 1148–1155
- Mirea, A. M., Tack, C. J., Chavakis, T., Joosten, L. A. B., & Toonen, E. J. M. (2018). IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends in molecular medicine*, 24(5), 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.03.005>
- Moctezuma-Velázquez, C. (2018). Tratamiento actual de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista de Gastroenterología de México*, 83(2), 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2017.10.003>
- Narayana Health Care. (2023, 26 diciembre). Fatty liver Stages - Types, symptoms, causes, treatment options. [https://www.narayanahealth.org/es/blog/h%C3%ADgado-graso-etapas-tipos-s%C3%ADntomas-causas-opciones-de-tratamiento/#:~:text=Las%20diferentes%20etapas%20indican%20la,cicatrices%20\(fibrosis\)%20y%20cirrosis](https://www.narayanahealth.org/es/blog/h%C3%ADgado-graso-etapas-tipos-s%C3%ADntomas-causas-opciones-de-tratamiento/#:~:text=Las%20diferentes%20etapas%20indican%20la,cicatrices%20(fibrosis)%20y%20cirrosis).
- Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS one*. 2014;9(9):e107265.
- Pais, R., Barritt, A. S., Calmus, Y., Scatton, O., Runge, T. M., Lebray, P., Poynard, T., Ratziu, V., & Conti, F. (2016). NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *Journal Of Hepatology*, 65(6), 1245-1257. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.033>
- Peiseler, M., & Tacke, F. (2021). Inflammatory Mechanisms Underlying Nonalcoholic Steatohepatitis and the Transition to Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 13(4), 730. <https://doi.org/10.3390/cancers13040730>
- Pérez-Monter, C., Álvarez-Arce, A., Nuño-Lámbarri, N., Escalona-Nández, I., Juárez-Hernández, E., Chávez-Tapia, N. C., Uribe, M., & Barbero-Becerra, V. J. (2022). Inulin Improves Diet-Induced Hepatic Steatosis and Increases Intestinal Akkermansia Genus Level. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(2), 991. <https://doi.org/10.3390/ijms23020991>
- Picchi, M. G., De Mattos, A. M., Barbosa, M. R., Duarte, C. P., De Azevedo Gandini, M., Portari, G. V., & Jordão, A. A. (2011). A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 26(suppl 2), 25-30. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502011000800006>

- Ponziani, F. R., Bhoori, S., Castelli, C., Putignani, L., Rivoltini, L., Del Chierico, F., Sanguinetti, M., Morelli, D., Paroni Sterbini, F., Petito, V., Reddel, S., Calvani, R., Camisaschi, C., Picca, A., Tuccitto, A., Gasbarrini, A., Pompili, M., & Mazzaferro, V. (2019). Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 69(1), 107–120. <https://doi.org/10.1002/hep.30036>
- Pramanik, S., Venkatraman, S., Karthik, P., & Vaidyanathan, V. K. (2023). A systematic review on selection characterization and implementation of probiotics in human health. *Food science and biotechnology*, 32(4), 423–440. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01210-z>
- Prieto-Ortiz, J. E., Sánchez-Luque, C. B., & Ortega-Quiroz, R. (2022). Hígado graso (parte 1): aspectos generales, epidemiología, fisiopatología e historia natural. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 37(4), 420-432. Publicación electrónica del 7 de julio de 2023. <https://doi.org/10.22516/25007440.952>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., . . . Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Rahila Yakoob and B.V. Pradeep, *Bifidobacterium* sp as Probiotic Agent – Roles and Applications, *J Pure Appl Microbiol.*, 2019; **13(3)**:1407-1417. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.11>
- Rodriguez, J., Hiel, S., Roy, T. L., Pötgens, S. A., Leyrolle, Q., Pachikian, B. D., Gianfrancesco, M., Cani, P. D., Paquot, N., Cnop, M., Lanthier, N., Thissen, J., & Bindels, L. B. (2020). Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients. *Gut*, 69(11), 1975-1987. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319726>
- Romualdo, G. R., Valente, L. C., Sproccati, A. C., Bacil, G. P., De Souza, I. P., Rodrigues, J., Rodrigues, M. A. M., Vinken, M., Cogliati, B., & Barbisan, L. F. (2022). Western diet-induced mouse model of non-alcoholic fatty liver disease associated with metabolic outcomes: Features of gut microbiome-liver-adipose tissue axis. *Nutrition*, 103-104, 111836. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111836>
- Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 56(1), 45-59. <https://dx.doi.org/10.4321/S2340-98942015000100007>
- Simoes, I. C. M., Karkucinska-Wieckowska, A., Janikiewicz, J., Szymanska, S., Pronicki, M., Dobrzyn, P., Dabrowski, M., Dobrzyn, A., Oliveira, P. J., Zischka, H., Potes, Y., & Wieckowski, M. R. (2020). Western Diet Causes Obesity-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Development by Differentially Compromising the Autophagic Response. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 995. <https://doi.org/10.3390/antiox9100995>
- Song, C., Long, X., He, J., & Huang, Y. (2023). Recent evaluation about inflammatory mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers In Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1081334>
- Spruss, A., & Bergheim, I. (2009). Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 20(9), 657-662. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.05.006>
- Soriano G., Sánchez E., Guarner C. (2013). Probióticos en las enfermedades hepáticas. *Nutrición Hospitalaria*. 28 (3):558-563.
- Tan Q, Hu J, Yu X, Guan W, Lu H, Yu Y, et al. The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration. *Biomed Res Int*. 2016;2016 6495793.

- Tilg, H., Wilmer, A., Vogel, W., Herold, M., Nölchen, B., Judmaier, G., & Huber, C. (1992). Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*, 103(1), 264–274. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91122-k](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91122-k)
- Tumani, M. F., Tapia, G., Aguirre, C., Obregón, A. M., & Pettinelli, P. (2021). Rol de la microbiota intestinal en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *scielo*, 149(4), 570-579. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872021000400570>
- Vidal-Cevallos, P., Torre, A., Mendez-Sanchez, N., Uribe, M., & Chavez-Tapia, N. C. (2022). Epidemiological and Genetic Aspects of NAFLD and NASH in Mexico. *Clinical liver disease*, 19(2), 68–72. <https://doi.org/10.1002/cld.1167>
- World Health Organization: WHO. (2020, 29 abril). Alimentación sana. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet#:~:text=Para%20evitar%20un%20aumento%20malsano,1%2C%20%2C%203\).](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet#:~:text=Para%20evitar%20un%20aumento%20malsano,1%2C%20%2C%203).)
- Zhang, J., Powell, C. A., Kay, M., Sonkar, R., Meruvu, S., & Choudhury, M. (2021). Effect of Chronic Western Diets on Non-Alcoholic Fatty Liver of Male Mice Modifying the PPAR- γ Pathway via miR-27b-5p Regulation. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(4), 1822. <https://doi.org/10.3390/ijms22041822>