TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

"POSIBLE EFECTO MODULADOR DEL PROBIÓTICO *LACTOCOCCUS LACTIS* RECOMBINANTE Y SILVESTRE SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCL_4 EN UN MODELO DE RATA WISTAR"

PRESENTA

Catalina Soledad Delgado Venegas

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS CON ÁREA EN TOXICOLOGÍA

TUTOR (ES)

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

ASESOR

Dra. María de Jesús Loera Arias

Aguascalientes, Ags. 8 de noviembre del 2018

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante CATALINA SOLEDAD DELGADO VENEGAS con ID 129849 quien realizó la tesis titulada: **POSIBLE EFECTO MODULADOR DEL PROBIOTICO *LACTOCOCCUS LACTIS* RECOMBINANTE Y SILVESTRE SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR CCL4 EN UN MODELO DE RATA WISTAR**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 31 de Octubre, 2018.

Martin Humberto Muñoz O.

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Tutor de tesis

Dr. Javier Ventura Juárez
Cotutor de tesis

Dra. María de Jesús Loera Arias
Asesora de tesis

c.c.p.- A.Q.B. Catalina Soledad Delgado Venegas
c.c.p.- Dr. en C. Rogelio Salinas Gutiérrez - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Dr. José Francisco Morales Domínguez - Secretario Técnico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

CATALINA SOLEDAD DELGADO VENEGAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS, ÁREA TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"POSIBLE EFECTO MODULADOR DEL PROBIOTICO *LACTOCOCCUS LACTIS* RECOMBINANTE Y SILVESTRE SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR CCL4 EN UN MODELO DE RATA WISTAR",** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., a 06 de noviembre de 2018
"Se lumen proferre"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DATOS GENERALES

Título del proyecto

"Posible efecto modulador del probiótico *Lactococcus lactis* recombinante y silvestre sobre el daño hepático inducido por CCl_4 en un modelo de rata Wistar"

Datos del alumno

L.A.Q.B. Catalina Soledad Delgado Venegas

ID 129849

Correo: GA-cch@hotmail.com

Comité tutoral

Tutor: Dr. Javier Ventura Juárez

Cotutor: Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

Asesor: Dra. María de Jesús Loera Arias

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DESCRIPCIÓN BREVE

En este trabajo se muestra el efecto de la cepa bacteriana *Lactococcus lactis* recombinante secretora de IL-22 y silvestre sobre la reversión del daño hepático inducido con tetracloruro de carbono en rata macho Wistar.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar este posgrado.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Histología.

Agradezco a mis tutores, el Dr. Javier Ventura, el Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega y la Dra. María de Jesus Loera Arias. Gracias por su tiempo, por su disposición, por sus enseñanzas, por sus críticas, por su generosidad. De corazón gracias.

A mi esposo, Adrian Leonel Zermeño Ramírez.

A mi madre, Ma. Del Carmen Venegas Ruvalcaba.

A todas las personas que me apoyaron durante este camino, muchas gracias Dra. Sandra Luz Martínez Hernández, I.B.Q. Bruno Jesús Váquez López, L.A.Q.B. María Alejandra Díaz de León, M. en C. David Ibarra Martínez, Dra. Esperanza Sánchez Alemán, Dr. Manuel Ávila Blanco, Dr. Daniel Cervantes García, María Guadalupe Mata Martínez, Viridiana Magdalena Becerra González, Jessica Anahí Esparza Maldonado.

A todos gracias.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DEDICATORIAS

A mi pequeño Adrian, hijo te amo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE

CAPÍTULO I 11

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES 11

1. Introducción 12

1.1 El hígado. 12

1.1.1 Microarquitectura. 14

1.1.2 Poblaciones célulares hepáticas. 17

1.2 Patología Hepática. 20

1.2.1 Patrones morfológicos y funcionales generales de la lesión hepática. 20

1.2.2 Lesión hepática. 21

1.2.3 Cirrosis. 27

1.2.4 Activación de células estrelladas hepáticas. 30

1.2.5 Tetracloruro de carbono. 31

1.3 Blancos terapéuticos. 34

1.4 Probióticos 35

1.5 *Lactococcus lactis*. 36

1.6 Interleucina-22. 39

1.7 Interleucina 10 42

CAPITULO II 44

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 44

2. Planteamiento del problema 45

2.1 Pregunta de investigación 45

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.2 Objetivo general 46
2.2.1 Objetivos específicos 46
2.3 Justificación 47
2.4 Hipótesis 49
2.5 Metas 49
CAPÍTULO III 50
METODOLOGÍA 50
3. Metodología 51
3.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. 51
3.2 Animales. 51
3.3 Administración de *L. lactis* recombinante. 52
3.4 Inducción de fibrosis. 52
3.5 Análisis histopatológico. 52
3.6 Función Hepática. 53
3.7 Evaluación de marcadores inflamatorios y fibrogénicos en hígado por qPCR 53
3.8 Evaluación de marcadores inflamatorios en intestino delgado por qPCR 54
3.9 Inmunohistoquímica para detección de células intestinales positivas para IL-22 54
3.10 Análisis Estadístico. 55
CAPÍTULO IV 56
RESULTADOS 56
4. Resultados 57
4.1 Análisis histopatológico del hígado 57
4.2 Función Hepática. 60
4.3 Análisis histopatológico de Placas de Peyer 62

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.4 Análisis histopatológico de Ciego 64
4.5 Evaluación de marcadores inflamatorios y fibrogénicos en hígado por qPCR 66
4.6 Evaluación de marcadores inflamatorios en intestino delgado por qPCR 67
4.3 Inmunohistoquímica para detección de células intestinales positivas para IL-22 70
CAPÍTULO V 73
DISCUSIÓN 73
5. Discusión 74
CAPÍTULO VI 84
CONCLUSIONES 84
6. Conclusiones 85
CAPÍTULO VII 86
BIBLIOGRAFÍA 86
7. Bibliografía 87
CAPÍTULO VIII 101
ANEXOS 101

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Secuencias de cebador utilizadas para la PCR cuantitativa en tiempo real para tejido hepático. **53**

Tabla 2. Secuencias de cebador utilizadas para la PCR cuantitativa en tiempo real para tejido intestinal (íleon). **54**

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados. **55**

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vascularización del hígado.	**13**
Figura 2. Representación esquemática de la arquitectura microscópica del hígado.	**15**
Figura 3. Trabéculas hepatocitarias.	**16**
Figura 4. Representación esquemática de los componentes celulares hepáticos más importantes implicados en la fibrosis hepática.	**19**
Figura 5. Células balonizantes, vacuolación citoplasmática de hepatocitos con cambio graso macrovesicular en un ratón B6C3F1 macho de un estudio crónico.	**21**
Figura 6. Degeneración espumosa hepatocitaria con cambio graso microvesicular en un ratón macho P53 de un estudio crónico.	**21**
Figura 7. Necrosis centrolobulillar en un ratón B6C3F1 macho de un estudio subcrónico.	**22**
Figura 8. Células inflamatorias implicadas en lesiones hepáticas.	**24**
Figura 9. Mecanismo inmune-innato en la fibrosis hepática.	**26**
Figura 10. Micrografía de hígado cirrótico (Tinción Tricrómica).	**27**
Figura 11. Principales consecuencias clínicas de la hipertensión portal de la cirrosis.	**29**
Figura 12. Activación de células estrelladas y fibrosis hepática.	**30**
Figura 13. Esquema metabólico del tetracloruro de carbono.	**33**
Figura 14. Interacción IL-22 con su receptor transmembrana.	**39**
Figura 15. Interacción IL-10 con su receptor transmembrana.	**43**
Figura 16. Análisis macroscópico y microscópico de la lesión hepática.	**58**
Figura 17. Tinción rojo sirio para fibras de colágeno tipo I y III.	**59**
Figura 18. Porcentaje de fibrosis hepática.	**59**
Figura 19. Cuantificación de diferentes marcadores del perfil hepático.	**61**
Figura 20. Placas de Peyer.	**63**
Figura 21. Morfometría de Placas de Peyer.	**64**
Figura 22. Evaluación histológica del ciego.	**65**
Figura 23. Evaluación de marcadores inflamatorios en hígado.	**66**

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 24. Evaluación de marcadores fibrogénicos en hígado. **67**

Figura 25. Evaluación de marcadores inflamatorios en intestino delgado. **69**

Figura 26. Inmunohitoquímica para detección de células de la mucosa intestinal postivas para IL-22 **71**

Figura 27. Conteo de células positivas para IL-22 por mm^2 en tejido intestinal. **72**

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ACRÓNIMOS

Ácido retinoico	**AR**
Alanino aminotransferasa	ALT
Aspartato aminotransferasa	AST
Bacteria de ácido láctico	LAB
Célula endotelial sinusoidal	CE
Células asesinas naturales	NK
Células asesinas naturales T	NKT
Células de Kupffer	KCs
Células dendríticas	CDs
Células estrelladas hepáticas	CEH
Citocromo P450	CYP450
Citocromo P450 2E1	CYP4502E1
Citocromo P450 familia 3 subfamilia A	CYP3A
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Endotelina-1	ET-1
Error estándar de la media	SEM
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF
Factor de crecimiento transformante	TGF- β
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF-α
Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B	NF-Kb
Food and Drug Administration	FDA
Fosgeno	$COCl_2$
Generally Recognized as Safe	GRAS
Interferón gamma	INF-γ
Interleucina 1	IL-1
Interleucina 6	IL-6

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Interleucina-10	IL-10
Interleucina-22	IL-22
Janus Kinase-1	JAK1
Lipopolisacárido	LPS
Matriz extracelualr	MEC
Metaloproteínasas de matriz	MMP
Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato	NADPH
Peroxi triclorometilo	$\bullet OOCCl_3$
Proteína 1 quimiotáctica de los monocitos	MCP-1
Receptor de IL-22	IL-22R
Receptor tipo Toll	TLR
Sistema de expresión génica controlada con nisina	NICE
Src Homology-2	SH2
STAT-Binding Elements	SBE
Tejido linfoide asociado a la mucosa	MALT
Tetracloruro de carbono	CCl_4
Transductor de señal y activador de la transcripción 3	STAT3
Triclorometilo	$CCl_3\bullet$
Tyrosine Kinase-2	TYK2

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

RESUMEN (ESPAÑOL)

Los medicamentos utilizados para tratar enfermedades del hígado, como higado graso, fibrosis y cirrosis, tienen efectos secundarios graves; es importante buscar nuevas alternativas, como el empleo de cepas bacterianas con propiedades probióticas con funciones hepatoprotectoras y pocos efectos secundarios. Debido a sus propiedades inmunomoduladoras y a su capacidad para sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal y no ser un organismo colonizante, *Lactoccocus lactis* se ha utilizado como vehículo para administrar terapéuticos tales como citocinas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia del probiótico *Lactococcus lactis* recombinante secretor de IL-22 (pSec: hIL22) y silvestre (NZ9000) para prevenir la fibrosis experimental inducida por CCl_4. Los probioticos se administraron via enteral durante 6 semanas. Pasadas dos semanas de la administración de la cepa se administró CCl_4 vía peritoneal por 4 semanas (tiempo en el cual se siguió la ingesta de los probióticos). Los probióticos disminuyeron el daño hepático, el parénquima no se recuperó por completo pero hubo una mejoría considerable con una notable diminución de los depósitos de colágeno, restaurando la capacidad metabólica del hígado. La lesión subcrónica por CCl_4 indujo una sobreexpresión significativa de la citocina proinflamatoria IL-1β en hígado, mientras que los probióticos disminuyeron esta expresión. Nuestra investigación sugiere que la administración oral de *L. lactis* en su forma silvestre podría desarrollarse como un probiótico potencial para prevenir/proteger contra la lesión hepática inducido por CCl_4.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

RESUMEN (INGLÉS)

Medications used to treat liver diseases have serious side effects; It is important to look for new alternatives, such as the use of bacterial strains with probiotic properties with hepatoprotective functions and few side effects. Due to its immunomodulatory properties and its ability to survive the passage through the gastrointestinal tract and not be a colonizing organism, *Lactoccocus lactis* has been used as a vehicle to administer therapeutic reports as cytokines. *Lactococcus lactis* recombinant secretory secretor of IL-22 (pSec: hIL22) and wild-type (NZ9000) to prevent experimental fibrosis induced by CCl_4. The probiotics were administered enterally for 6 weeks. Two weeks after the administration of the strain, CCl_4 was administered peritoneally for 4 weeks (time in which the intake of probiotics was seen). The likelihood of liver damage diminishing, paralysis alone did not fully recover, but there was considerable improvement with a marked decrease in collagen deposits, restoring the metabolic capacity of the liver. The subchronic lesion by CCl_4 induces a significant overexpression of the proinflammatory cytokine IL-1β in the liver, whereas probiotics decreased this expression. Our research suggests that oral administration of *L. lactis* in its wild form could develop as a potential probiotic to prevent / protect the liver injury induced by CCl_4.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. Introducción

1.1 El hígado.

El hígado adulto normal pesa entre 1400-1600 gramos y representa el 2.5% del peso corporal (Robbins, 2000). Es una glándula asociada al tracto intestinal y a la circulación venosa sistémica, lo que facilita el desarrollo de su función primordial en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis. Debido a esta localización anatómica, el hígado recibe un abastecimiento doble de sangre: está vascularizado por la arteria hepática y recibe sangre de la vena porta proveniente del estómago, de los intestinos, bazo y páncreas, la cual posteriormente ingresa a la circulación sistémica (Fig. 1) (Jaramillo J. *et al.*, 2006). La sangre que pasa a través de la vena porta constituye el 60 a 70% del flujo sanguíneo hepático, y de la arteria hepática es el 30 a 40%, ambas penetran por el hilio hepático o porta hepatis. El conducto biliar hepático común sale por esta misma zona. Las primeras ramas de la arteria, la vena y el conducto biliar se encuentran situadas inmediatamente por fuera del hígado, pero las ramificaciones restantes de las tres estructuras adoptan trayectos aproximadamente paralelos ya dentro del órgano, donde forman espacios porta. El extenso parénquima hepático esta irrigado por pequeñas ramificaciones terminales y fenestradas de los sistemas de la vena porta y de la arteria hepática, que penetran en el parénquima a intervalos frecuentes. La arteria hepática se divide en dos ramas terminales, la arteria gastroduodenal y la hepática propia (Latarjet M. & Ruíz L, 2005). La arteria hepática termina bifurcándose en dos ramas la arteria hepática derecha y la arteria hepática izquierda (Latarjet M. & Ruíz L, 2005. Bouchet A & Cuilleret J. 1982. Netter F. 2007). La sangre ya procesada en el parénquima hepático pasa a las ramas de las venas supra hepáticas, situadas en la "puerta trasera" del hígado y desembocan en la vena cava inferior, a la que se encuentran íntimamente asociadas (Robbins, 2000).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

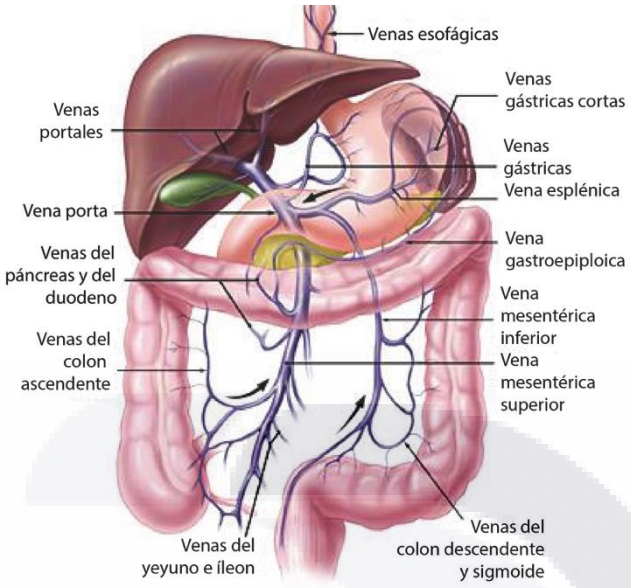

Figura 1. Vascularización del hígado. Imagen tomada de http://higado-med-uaa.blogspot.mx/2009/04/fisiologia-hepatica.html

Al ser el primer órgano que recibe los nutrimentos y xenobióticos provenientes del sistema digestivo, su capacidad metabólica y biotransformadora de estos elementos es de vital importancia. Se considera que el hígado realiza más de 500 reacciones metabólicas, incluyendo funciones esenciales para el mantenimiento de la vida, de la homeostasis y para el estado de salud general. Además, el hígado es el responsable de la incorporación y posterior almacenamiento de aminoácidos, lípidos, vitaminas, carbohidratos, de su conversión metabólica y de la liberación a la sangre y a la bilis. Por lo tanto, la alta tasa de biotransformación hepática convierte las sustancias hidrofóbicas en derivados hidrosolubles que pueden ser excretados en la bilis y orina (Jaramillo J. *et al.*, 2006).

La vulnerabilidad frecuente del hígado a los agentes tóxicos se explica por su estratégica localización anatómica y su gran capacidad para la biotransformación de xenobióticos. El acceso directo de los tóxicos a las células hepáticas provenientes de la absorción gastrointestinal, aunado a la alta concentración de enzimas metabolizantes en el hepatocito, genera una alta tasa de conversión a metabolitos inactivos (detoxicación); aunque también produce elementos tóxicos (bioactivación), a menudo intermediarios altamente reactivos, los cuales inician una serie de eventos que pueden llevar a la muerte celular. Además, las interacciones entre los diversos tipos de células del hígado pueden conducir al aumento del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

efecto tóxico a través de los mecanismos de respuesta inmune mediada por citocinas (Jaramillo J. *et al.,* 2006).

Aun cuando la respuesta del hígado ante los tóxicos es influenciada por diversos factores genéticos y ambientales, el daño a este órgano finalmente aparece cuando los agentes tóxicos están presentes durante un periodo determinado en concentraciones suficientemente altas que rebasen las capacidades defensivas y de regeneración del órgano (Jaramillo J. *et al.,* 2006).

1.1.1 Microarquitectura.

Clásicamente, el hígado se divide en lobulillos hexagonales, de 1 a 2 mm de diámetro, orientados alrededor de las ramas terminales de las venas supra hepáticas (vénulas hepáticas terminales o venas "centrolobulillares"). Sin embargo, como los hepatocitos más próximos a las venas centrolobulillares son los que se encuentran más alejados del aporte sanguíneo, se admite hoy que constituyen la periferia de los "lobulillos metabólicos", denominados ahora acinos. Concebidos como aproximadamente triangulares, los acinos poseen en sus bases ramas terminales de la arteria hepática y de la vena porta procedentes de los espacios porta, mientras que las ramificaciones de las venas centrolobulillares se sitúan en sus vértices (Fig. 2). El parénquima de los acinos hepáticos se divide en tres zonas: la zona 1 es la más cercana al aporte vascular; la zona 3 rodea las venas centrolobulillares terminales y la zona 2 es la zona intermedia. Esta división tiene consecuencias metabólicas considerables, ya que la actividad de muchas enzimas hepáticas muestra un gradiente lobulillar (Jungermann K & Kietzmann T., 1996). Además, muchas formas de lesión hepática siguen también una distribución zonal (Robbins, 2000).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

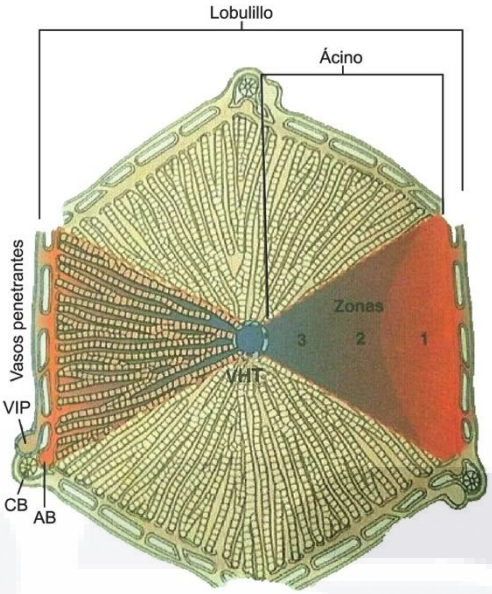

Figura 2. Representación esquemática de la arquitectura microscópica del hígado. El clásico lobulillo hexagonal se dispone alrededor de una vena centrolobulillar (vénula hepática terminal), con espacios porta en tres de sus vértices. El acino triangular tiene como base los vasos penetrantes, que nacen de las venas portas y las arterias hepáticas hacia el parénquima. El vértice está formado por la vena centrolobulillar. Las zonas 1, 2 y 3 representan las regiones metabólicas cada vez más distantes de la irrigación sanguínea (Robbins, 2000).

El parénquima hepático está organizado en láminas o "placas" cribiformes y anastomosadas entre sí que, cuando se observan al microscopio, aparecen como cordones celulares. Los hepatocitos situados en la proximidad inmediata de los espacios porta reciben el nombre de placa limitante y forman un borde discontinuo en torno al mesénquima del espacio porta. Alrededor de las venas centrolobulillares, las trabéculas de hepatocitos adoptan una disposición radial. El tamaño global de los hepatocitos es bastante uniforme pero sus núcleos varían de tamaño, número y ploidia, sobre todo en las personas de edad avanzada. Tienden a predominar las células uninucleares y diploides, pero existe una fracción significativa de células binucleadas y el cariotipo puede alcanzar incluso la octaploidia (Robbins, 2000).

Entre los cordones o trabéculas hepatocitarias existen sinusoides vasculares. La sangre arterial y venosa portal circula por los sinusoides y pasa a las venas centrolobulillares a través de los innumerables orificios presentes en sus paredes. Por lo tanto, dos lados de los hepatocitos se encuentran bañados por una mezcla de sangre arterial y venosa portal, que representa el 25% del gasto cardiaco, y forman parte de las poblaciones celulares del organismo que reciben una irrigación más rica. Los sinusoides se encuentran revestidos por células endoteliales fenestradas y discontinuas que limitan un espacio extrasinusoidal denominado espacio de Disse, hacia el que se proyectan abundantes microvellosidades

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hepatocitarias. Las células de Kupffer (KCs) son células del sistema mononuclear-fagocítico que se unen salpicadamente a la superficie luminal de las células endoteliales. En el espacio de Disse existen aún otras células que contienen grasa, las células estrelladas hepáticas (CEH) (también llamadas células de Ito), de origen mesenquimal (Fig. 3). Estas últimas intervienen en el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A; como se verá más adelante, se transforman en miofibroblastos productores de colágeno en caso de inflamación o fibrosis del hígado (Robbins, 2000).

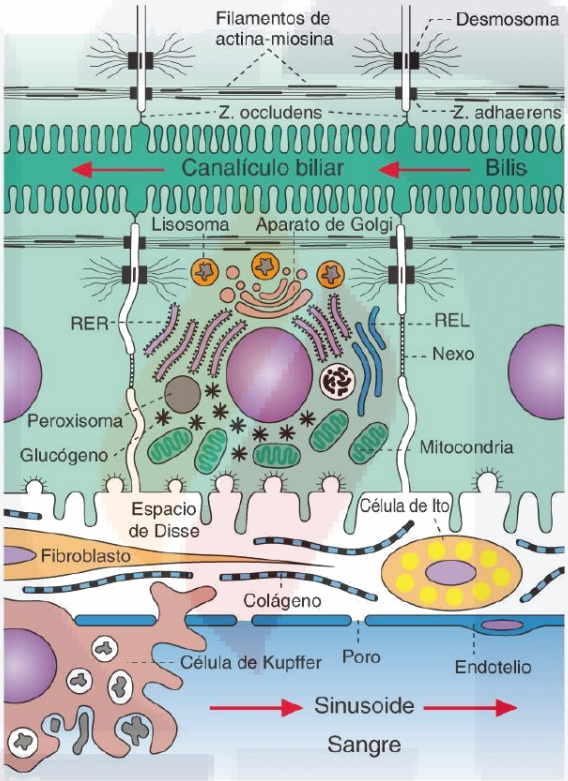

Figura 3. Trabéculas hepatocitarias. Las trabéculas hepatocitarias se disponen de manera radial cuyo centro es la vena interlobulillar. El espacio de Disse se dispone entre las células hepáticas y el sinusoide, en el se encuentran células que almacenan grasa (células de Ito) que al recibir ciertos estimulos cambian su fenotipo a fibroblasto. Figura tomada de https://www.mindomo.com/es/mindmap/unidades-estructural-higado-ccd4c1da11b5392c2c2456bf45a90eff

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Entre hepatocitos contiguos se forman canalículos biliares, de 1 a 2 μm de diámetro, constituídos por depresiones de las membranas plasmáticas de las células vecinas separados del espacio vascular por uniones íntimas. Hacia estos espacios intercelulares, considerados las raíces más externas del árbol biliar, se proyectan numerosas microvellosidades. Los microfilamentos intracelulares de actina y miosina localizados en torno a los canalículos ayudan a impulsar el líquido biliar hacia los espacio porta (Fig. 3) (Tsulada N. *et al.,* 1995). Los canales comienzan en las regiones centrolobulillares y se van uniendo progresivamente hasta drenar en los conductos de Hering, las ramas tributarias parenquimatosas terminales del sistema de conductos biliares. El flujo biliar pasa por sus luces en dirección a los conductos biliares interlobulillares, situados en los espacio porta, los cuales poseen un revestimiento epitelial cubico más resistente (Robbins, 2000).

1.1.2 Poblaciones células hepáticas.

El hígado consta de diferentes tipos de células. En términos generales, pueden clasificarse como células parenquimatosas (hepatocitos) y células no parenquimatosas. Los hepatocitos forman la base estructural del hígado y constituyen la mayoría de la masa del hígado. Las células no parenquimatosas, incluyen otros tipos de células diferentes incluyendo KCs, células endoteliales sinusoidales, células estrelladas, fibroblastos periportales y células dendríticas (CDs) hepáticas (Monga S. 2011).

1.1.2.1 Hepatocitos.

Los hepatocitos, la unidad funcional del hígado, desempeñan muchas funciones importantes, incluyendo la destoxicación, la síntesis y el metabolismo. La disponibilidad de una fuente homogénea de hepatocitos se considera la herramienta más valiosa para la detección de la toxicidad (Monga S. 2011).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.1.2.2 Células estrelladas hepáticas.

Las células estrelladas fueron identificadas por von Kupffer en 1876 (Zhao Y. *et al.,* 2015). Constituyen aproximadamente el 1.5% del volumen hepático total y el 5-8% del número de células hepáticas (Blouin A. *et al.,* 1977, Klinger W. *et al.,* 1988). Se localizan en el espacio de Disse adyacente a los hepatocitos, bajo la capa endotelial sinusoidal fenestrada (Fig. 4). Casi 50-80% de los retinoides del cuerpo (retinol más ésteres de retinilo) se almacenan en el hígado; las CEH acumulan del 80-90%, y lo almacenan en numerosas gotas de grasa perinuclear (Lomhoff R. *et al.,* 1990). Fisiológicamente, las CEH son quiescentes, de vida larga, y contienen retículo endoplasmático rugoso moderadamente desarrollado y un pequeño número de mitocondrias. La acumulación de células que contienen menos gotas de lípidos, de menor tamaño y abundante retículo endoplasmático (típico de los fibroblastos) en las áreas de lesión fibrótica llevó a la hipótesis de que estas células se originan a partir de células estrelladas (Kent G. *et al.,* 1976, McGee JO. & Patrick R. 1972). Trabajos subsiguientes confirmaron que las CEH pierden retinoides y adquieren un fenotipo altamente proliferativo miofibroblastico que contiene mayores cantidades de retículo endoplasmático rugoso durante la lesión hepática. La activación de las CEH se asocia con la expresión de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Pinzani M. *et al.,* 1989, Wong L. *et al.,* 1994), los receptores de ferritina (Ramm GA. *et al.,* 1994), y la disminución de la expresión del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisoma (PPARγ) (Yang L. *et al.,* 2006).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

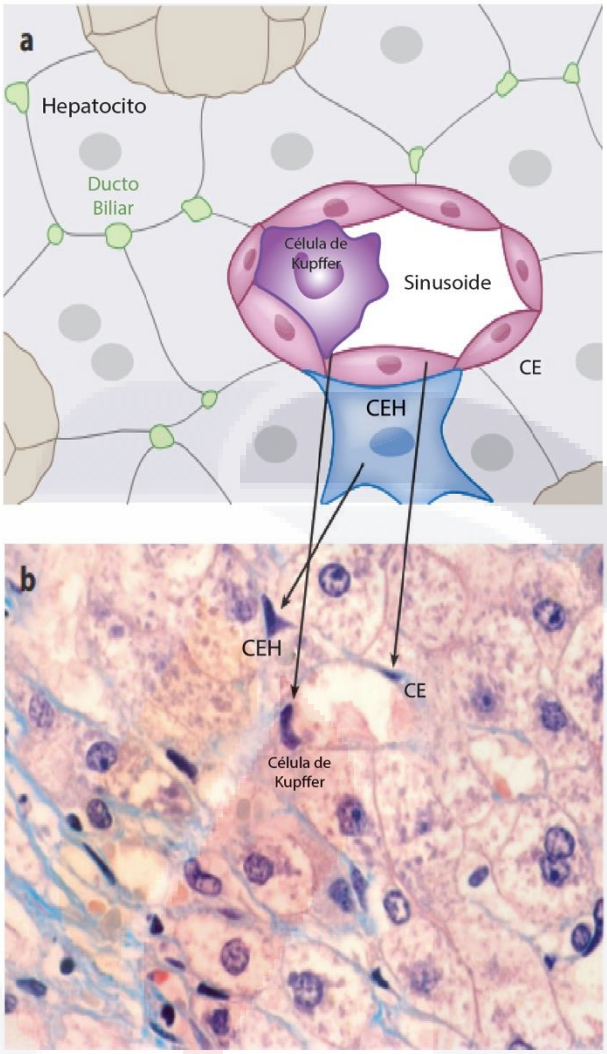

Figura 4. (a) Representación esquemática de los componentes celulares hepáticos más importantes implicados en la fibrosis hepática. (Abreviaturas: CEH, célula estrellada hepática en el espacio de Disse; CE, célula endotelial sinusoidal.) **(b) correlación histológica con el panel a.** Sección de parafina del hígado humano levemente fibrótico teñido con azul de anilina. Observe las fibras fibróticas (azul) en la esquina inferior izquierda. Aumento original 400. Figura parcialmente adaptada de Sevier Medical Art con permiso (Wick G. *et al.*, 2013).

1.1.2.3 Células de Kupffer.

Las células de Kupffer, son los macrófagos residentes hepáticos, forman una parte importante del sistema fagocito reticuloendotelial o mononuclear (Szymaāska R. *et al.*, 1979). Representan aproximadamente 30-35% en volumen y aproximadamente 20% en número de células no parenquimatosas (Blouin A, *et al.*, 1977, Freudenberg N. *et al.*, 1989). Las KCs son de forma irregular y se localizan en el lumen de los capilares en el hígado, adheridos a las células endoteliales (Fig. 4). Sus prolongaciones citoplásmicas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(pseudópodos), indican la función fagocítica, sobresalen en la luz sinusoidal y también pueden penetrar en el espacio de Disse a través de fenestraciones endoteliales más grandes (Monga S. 2011).

1.1.2.4 Células endoteliales sinusoidales.

En todos los órganos del cuerpo, la vasculatura está revestida por un epitelio escamoso simple, denominado endotelio. Independientemente del órgano en cuestión, los endotelios en tejidos normales mantienen un conducto no trombogénicamente alineado a través del cual una variedad de células sanguíneas y vehículo (plasma) ayudan a suministrar oxígeno, nutrientes y factores de mantenimiento para eliminar los desechos, desperdicios y productos de descomposición del tejido subyacente. El endotelio sinusoidal hepático desempeña innegablemente estas funciones (Monga S. 2011).

1.2 **Patología Hepática.**

1.2.1 Patrones morfológicos y funcionales generales de la lesión hepática.

Son muchas las agresiones de tipo metabólico, tóxico, microbiano, circulatorio y neoplásico capaces de producir lesiones hepáticas. En algunos casos, la enfermedad es primaria del hígado, como sucede con la hepatitis viral o el carcinoma hepatocelular. No obstante, con mayor frecuencia, la afectación hepática es secundaria, a menudo asociada a alguna de las enfermedades más comunes del hombre, como son las descompensaciones cardíacas, el cáncer diseminado, el alcoholismo o las infecciones extra hepáticas. La enorme reserva funcional de este órgano compensa, hasta cierto punto, el impacto clínico de las lesiones hepáticas iniciales. Sin embargo, cuando la enfermedad difusa progresa o se produce una interrupción estratégica del flujo biliar, las consecuencias de la alteración funcional hepática pueden poner en peligro, incluso, la vida del paciente (Robbins, 2000).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.2.2 Lesión hepática.

Desde el punto de vista morfológico, el hígado es un órgano único, con un repertorio limitado de respuestas a la agresión. Sea cual sea la causa, pueden observarse cinco tipos de respuestas (Robbins, 2000).

Degeneración y acumulación intracelular. Las alteraciones secundarias a las agresiones de tipo tóxico o inmunitario pueden hacer que los hepatocitos adopten un aspecto tumefacto y edematoso (degeneración balonizante), con grumos irregulares en el citoplasma y grandes espacios vacíos (Fig. 5). Otra posibilidad es que el material biliar retenido confiera un aspecto tumefacto y esponjoso difuso al hepatocito (degeneración espumosa) (Fig. 6). En los hepatocitos viables pueden acumularse distintos tipos de sustancias, entre ellas hierro y cobre. La acumulación de gotitas de grasa recibe el nombre de esteatosis. Cuando se trata de múltiples gotitas diminutas que no desplazan al núcleo, se habla de esteatosis microvesicular, propia de cuadros tales como hepatopatía alcohólica aguda y la esteatosis hepática aguda del embarazo. Por el contrario, el hígado de los alcohólicos crónicos o en las personas obesas o diabéticas, suele encontrarse una única vacuola grande que desplaza al núcleo; esta lesión constituye la esteatosis macrovesicular (Robbins, 2000).

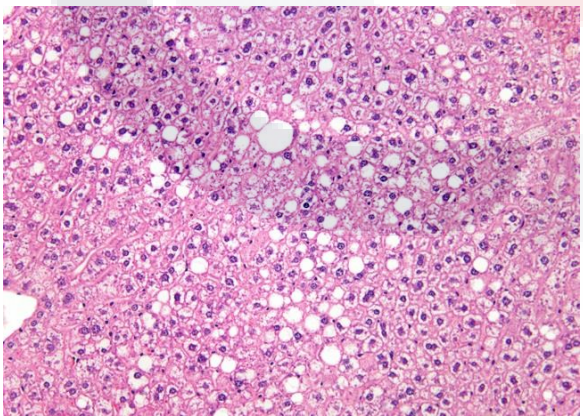

Figura 5. Células balonizantes, vacuolación citoplasmática de hepatocitos con cambio graso macrovesicular en un ratón B6C3F1 macho de un estudio crónico. Figura tomada de https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/fatty_change/index.htm

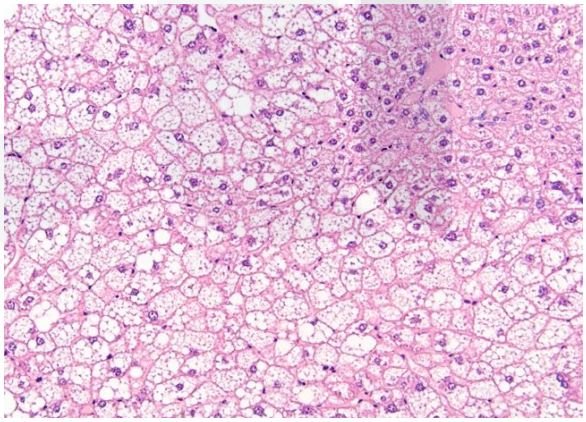

Figura 6. Degeneración espumosa hepatocitaria con cambio graso microvesicular en un ratón macho P53 de un estudio crónico. Figura tomada de https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/fatty_change/index.htm

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Necrosis. Cualquier agresión importante del hígado puede dar lugar a necrosis hepatocitaria. En la necrosis coagulativa isquémica, las células hepáticas aparecen teñidas y "momificadas", con núcleos a menudo lisados. Cuando la muerte celular se debe a mecanismos tóxicos o inmunológicos, proporciones variables de hepatocitos aislados adoptan una forma redondeada, se retraen, entran en picnosis y adquieren un aspecto intensamente eosinófilo, formando los llamados cuerpos de Councilman, que contienen fragmentos de núcleos. Esta forma de muerte celular es consecuencia de la apoptosis. Otros hepatocitos pueden hincharse osmóticamente y romperse, en la llamada necrosis lítica (Robbins, 2000).

Es frecuente que la necrosis siga una distribución zonal, siendo la más evidente la que afecta a los hepatocitos situados en torno a las venas centrolobulillares (necrosis centrolobulillar) (Fig. 7), lesión característica de la isquemia y de varias reacciones a fármacos y a tóxicos. Las necrosis mediazonal o periportal puras son raras: la segunda de ellas es característica de la eclampsia. La mayor parte de las otras causas de lesión hepática producen una mezcla variable de muerte hepatocelular e inflamación. La necrosis hepatocitaria puede limitarse a algunas células dispersas en el interior de los lobulillos hepáticos (necrosis focal) o en la interfaz entre el parénquima periportal y los espacios porta inflamados (hepatitis de interfaz). En las lesiones inflamatorias más graves, la necrosis de hepatocitos contiguos puede abarcar lobulillos adyacentes, siguiendo un patrón porto-portal, porto-central o centro-central (necrosis en puentes). La necrosis de lobulillos enteros (necrosis submasiva) o de la mayor parte del hígado (necrosis masiva) suele provocar la insuficiencia hepática aguda (Robbins, 2000).

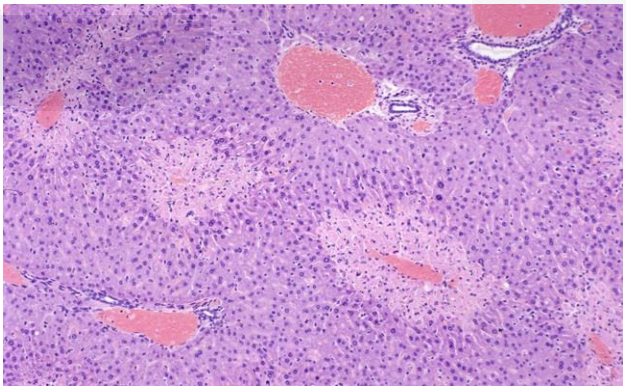

Figura 7. Necrosis centrolobulillar en un ratón B6C3F1 macho de un estudio subcrónico. Figura tomada de https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/necrosis/index.htm

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Inflamación. Cuando los agentes estresantes como patógenos o insultos ambientales desafían al hígado durante largos períodos de tiempo y su eliminación no es posible, la inflamación es el siguiente paso. El inicio de la inflamación es seguido de fibrosis, cirrosis e insuficiencia hepática. En las formas agudas de lesión hepática causada por virus, fármacos o resección hepática, las respuestas inflamatorias desempeñan un papel importante que conduce a lesiones citotóxicas. Citocinas producidas por las células del sistema inmune innato y adaptativo en el hígado son mediadores clave de la respuesta inflamatoria y están impulsando la enfermedad inflamatoria (Monga S. 2011).

La función del hígado como un "órgano inmunológico" se atribuye al hecho de que una gran cantidad de células inmunitarias residen en él, para realizar una amplia gama de respuestas inmunes. El hígado tiene el potencial único de detectar y atacar patógenos invasores, advertir al huésped de patógenos, a través de la producción de factores inflamatorios, y regular la inducción de respuestas inmunes adaptativas específicas de patógenos. Además de los patógenos, las señales endógenas de peligro de las células dañadas o moribundas también son reconocidas por las vías inmunitarias innatas en el hígado e inducen una inflamación "estéril". Todas estas y muchas otras funciones son ejecutadas por los diferentes tipos de células en el hígado incluyendo las células parenquimatosas o hepatocitos, pero lo más importante es que las células inmunitarias innatas no parenquimatosas, tales como los macrófagos o células Kupffer (KCs), diferentes tipos de células dendríticas (CDs), células asesinas naturales (NK) y células asesinas naturales T (NKT), permiten respuestas inmunitarias apropiadas frente a patógenos. Además, las células infiltrantes como los neutrófilos, las células T, las células T reguladoras y las células madre derivadas de la médula ósea juegan un papel importante durante las enfermedades inflamatorias hepáticas agudas y crónicas. La inflamación hepática se clasifica bajo hepatitis aguda identificada por inflamación aguda y daño a hepatocitos o lesión hepática crónica reconocida por esteatohepatitis o fibrosis hepática. Diferentes tipos de células del hígado (Fig. 8) contribuyen a la lesión hepática basada en la hepatotoxina, la duración del insulto y la exposición directa o indirecta a la hepatotoxina (Monga S. 2011).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

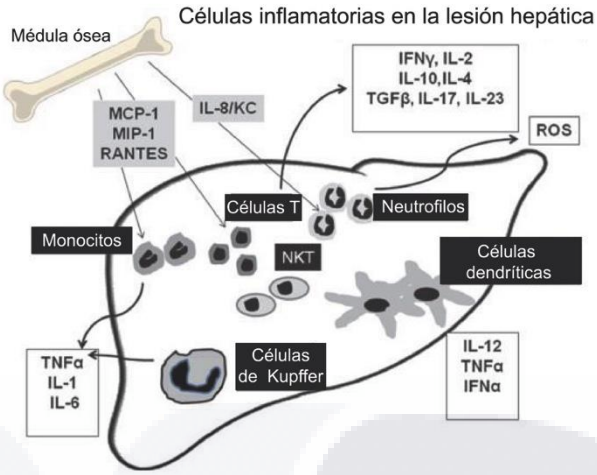

Figura 8. Células inflamatorias implicadas en lesiones hepáticas. Se representan tipos de células inmunes tales como monocito/macrófagos, células T y células NKT, células dendríticas, neutrófilos y mediadores de citocinas/quimiocinas producidas resultando en inflamación hepática (Monga S. 2011).

Fibrosis. La fibrosis (del latin *fiber*= filamento, hilo) se define como una deposición excesiva de componentes de la matriz extracelular (ECM) colágeno y no colágeno en órganos y tejidos como consecuencia de la proliferación y activación de fibroblastos y miofibroblastos. Los últimos todavía no están definidos de forma inequívoca por los marcadores característicos y pueden desarrollarse tanto a partir de fibroblastos como de células no fibroblásticas mediante transdiferenciación desencadenada por citocinas proinflamatorias y profibróticas producidas por células del sistema inmune innato y adaptativo (Wick G. *et al.,* 2013). Es decir en todas las formas de fibrosis, las reacciones inflamatorias-inmunológicas tienen lugar en las primeras etapas, promoviendo procesos profibróticos posteriores y elementos tanto del sistema inmune innato como adaptativo están involucrados en esta secuencia de eventos (Wick G *et al.,* 2010).

Al principio de la patogenia de la fibrosis, los neutrófilos, los eosinófilos, los monocitos/macrófagos, los mastocitos y las células linfoides, incluidas las células asesinas naturales/asesinas naturales T (NK / NKT) se encuentran en las áreas afectadas (Wick G. *et al.*, 2013).

En la inflamación aguda los primeros efectores son los gránulos de neutrófilos, estos contienen numerosas enzimas. Enzimas como metaloproteinasas de matriz (MMP), elastasa y catepsinas. Cuando estas se liberan pueden escindir específicamente en los componentes del tejido conectivo colagenoso y no colagenoso, considerados como instrumentos en la remodelación tisular

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en el curso de la fibrosis; por otro lado, los neutrófilos juegan un papel indirecto al activar más componentes celulares del sistema inmune innato que promueven la fibrogénesis (Lefkowitz DL. & Lefkowitz SS. 2001).

Los macrófagos activados producen factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) e interleucina 1 (IL-1) que a su vez activan a los fibroblastos e inducen la sobreproducción de proteínas de la matriz extracelular (MEC). La transducción de señal desencadenada por TNF-α que conduce a la expresión de citocinas fibrogénicas es principalmente eficaz a través de la ruta de NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Por el contrario, los efectos antifibróticos son ejercidos por interferón gamma (IFN-γ) producido por células NK activadas (Wick G. *et al.*, 2013).

Desde un punto de vista cuantitativo, es decir, contemplando la composición de infiltrados de células mononucleares inflamatorias crónicas en las primeras fases de formación de tejido fibrótico, los monocitos que luego se transforman en macrófagos sésiles parecen ser los principales actores en la fibrogénesis. Los mecanismos de defensa exactos ejercidos por ellos todavía no están claros, pueden depender del evento inicial que desencadena la inflamación, por ejemplo, infección, estrés mecánico, material extraño inorgánico (por ejemplo, implantes de silicona) o especies reactivas de oxigeno (Wick G. *et al.*, 2013).

Las células estrelladas hepáticas, los fibroblastos y los miofibroblastos se activan, proliferan y producen grandes cantidades de componentes de MEC (Fig. 9). Este proceso comienza en los campos periportales y desde allí se extiende al lobulillo de la célula hepática entre las trabéculas hepáticas (Wick G. *et al.*, 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

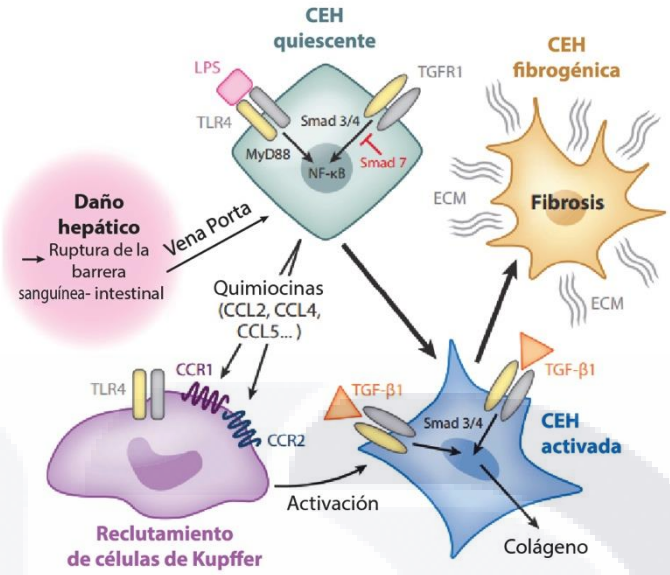

Figura 9. Mecanismo inmune-innato en la fibrosis hepática. El daño hepático crónico conduce a la descomposición de la barrera hemática del intestino con la liberación de toxinas bacterianas, por ejemplo, LPS, desde el microbioma intestinal a la circulación a través de la vena porta. Los LPS estimulan la vía MyD88-Irak a través de TLR4 en CEH quiescentes. Las CEH estimuladas producen quimiocinas (CCL2, CCL5, etc.) que reclutan células de Kupffer al unirse a los receptores de quimiocinas. Las CEH activadas se vuelven cada vez más sensibles a la citocina profibrótica TGF-β1, proporcionada por las células de Kupffer. ECM excesivo, principalmente colágeno, produce fibrosis hepática. (Abreviaturas: ECM, matriz extracelular, CEH, célula estrellada hepática, LPS, lipopolisacárido, TGF, factor de crecimiento transformante, TLR, receptor tipo Toll). (Wick G. *et al.*, 2013).

Las CEH cambian su perfil en reposo a productor de colágeno de tipo IV> III> I al colágeno III> IV> I todavía reversible, a un colágeno I> III> IV final, es decir, etapa irreversible (Kershenobich S. & Weissbrod AB. 2003) dominada por colágeno tipo I (Wick G. *et al.*, 2013). Las CEH activadas producen cantidades abundantes de MEC, lo que resulta en fibrosis hepática, como se ha mencionó anteriormente. Mediante la activación de receptores tipo Toll (TLR), las CEH pueden producir citocinas y quimiocinas proinflamatorias (TNF-α, CXCL1, CCL4, CCL3, CCL2), manteniendo activa la inflamación y, por lo tanto, el proceso profibrótico (Bertola A *et al.*, 2010) (Fig. 9). CXCL10 también se ha revelado como un factor profibrótico potente que participa en el diálogo cruzado entre los hepatocitos, las CEH y las células del sistema inmune (Hintermann E *et al.*, 2010). Así mismo las CEH activadas inducen la regulación positiva de MMP-2 que causa la degradación de las membranas basales locales, seguida del reemplazo de las células hepáticas destruidas por tejido cicatrizal intersticial depositado primero en el espacio subendotelial de Disse (Wick G. *et al.*, 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.2.3 Cirrosis.

La cirrosis hepática es un problema de salud pública mundial, en México se encuentra dentro de las 10 principales causas de muerte, 5.3% y 2.2% de la población económicamente activa de hombres y mujeres son afectados, respectivamente (INEGI, 2015; SIDSS, 2015). La cirrosis puede ser originada por un gran número de agentes químicos, biológicos y por enfermedades metabólicas: ingesta continua de alcohol; exposición a metildopa, tetracloruro de carbono; altas concentraciones de vitamina A; generación de anticuerpos contra las células del ducto biliar; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; deficiencia de α-1 antitripsina, entre otras decenas de agentes y condiciones. El hecho de que varias afecciones hepáticas desencadenen la cirrosis sugiere que comparten un mecanismo común de patogénesis (Jaramillo J. *et al.*, 2006). Este estadio terminal de las hepatopatías crónicas tiene tres características específicas (Fig.10):

i. *Tabiques fibrosos*, en forma de bandas delicadas que unen las distintas estructuras portales o centrolobulillares, o en forma de amplias cicatrices que sustituyen a varios lobulillos adyacentes.
ii. *Nódulos parenquimatosos,* causados por la regeneración de los hepatocitos que quedaron aislados, de tamaño variable, desde pequeños (<3 mm de diámetro o micronódulos).
iii. *Alteración de la arquitectura de todo el hígado* (Robbins, 2000).

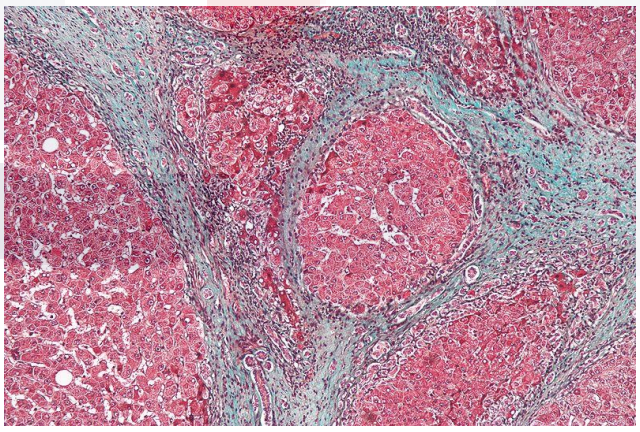

Figura 10. Micrografía de hígado cirrótico (Tinción Tricrómica). Figura tomada de http://www.pharmaceutical-technology.com/news/newslupin-introduces-hepatic-encephalopathy-treatment-zaxine-canada-4558527/

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Debe insistirse en varios aspectos:

a) *La lesión parenquimatosa y la fibrosis consiguiente son difusas* y se extienden por todo el hígado; las lesiones focales con cicatrización no constituyen cirrosis.

b) *Para poder establecer el diagnóstico, son imprescindibles los nódulos de regeneración,* reflejo del equilibrio entre la actividad regeneradora y la cicatrización constrictiva.

c) *La fibrosis, una vez establecida, suele ser irreversible,* aunque en casos raros de esquistosomiasis y hemocromatosis se ha observado regresión.

d) *Existe una reorganización de la arquitectura vascular,* secundaria a la lesión parenquimatosa y a la cicatrización con formación de comunicaciones anormales entre los vasos que llevan la sangre al órgano y los canales venosos de salida (Robbins, 2000).

Patogenia. En la cirrosis, el proceso patogénico central es la fibrosis progresiva. En el hígado normal, el colágeno intersticial (tipo I y III) se concentran en los espacio porta y alrededor de las venas centrolobulillares, con algunas bandas en los espacio de Disse. El colágeno (reticulina) que sigue el trayecto de los hepatocitos está formado por delicadas fibras de colágeno tipo IV situadas en el espacio de Disse. *En la cirrosis, se deposita colágeno de los tipos I y III en el lobulillo, creando tabiques fibrosos finos o anchos*. En estos tabiques, se forman canales vasculares nuevos que comunican la región portal (arterias hepáticas y venas porta) con las venas centrolobulillares, estableciendo cortocircuitos por los que la sangre evita el parénquima. El depósito continuo de colágeno en el espacio de Disse del parénquima conservado se asocia a la pérdida de las fenestraciones de las células endoteliales de los sinusoides. En el proceso, el espacio sinusoidal termina por parecer más un capilar que un canal para el intercambio de solutos entre los hepatocitos y plasma. Todo ello provoca graves alteraciones de la secreción hepatocelular de proteínas (p. ej., albúmina, factores de la coagulación, lipoproteínas, etc.) (Robbins, 2000).

La cirrosis se define por el desarrollo de complicaciones clínicamente evidentes de la enfermedad hepática (por ejemplo, varices esofágicas, ascitis, ictericia, peritonitis bacteriana

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

espontánea, encefalopatía hepática, hipertensión portal, carcinoma hepatocelular) (Fig. 11). Los pacientes con cirrosis compensada no tienen síntomas relacionados con su cirrosis y, a menudo, no se reconocen hasta que se manifiestan estas complicaciones. En ese momento, la supervivencia media de la cirrosis descompensada se reduce drásticamente (<2 años vs >12 años para la cirrosis compensada) (Walker M. *et al*., 2016. Muir AJ. 2015).

La presentación clínica de los pacientes con cirrosis, incluso aquellos con enfermedad grave, suele ser asintomática, con un panel hepático completamente normal o sólo ligeramente anormal. Además, los pacientes pueden tener cirrosis y sentirse bien, temprano en el curso de la enfermedad, aunque su calidad de vida puede verse afectada (Steven L. 2017).

Cuando los pacientes llegan a ser sintomáticos, a menudo es demasiado tarde para revertir el curso clínico. Signos y síntomas sutiles incluyen hinchazón abdominal, elevación de la alanino aminotransfereasa (ALT) y/o aspartato aminotransferasa (AST), recuento de plaquetas <150.000/L, fosfatasa alcalina elevada, bilirrubina >1.1 mg/dl, albúmina sérica <2.5 g/dL y el tiempo de protrombina <100%. La fosfatasa alcalina y/o la gammaglutamiltransferasa pueden estar levemente elevadas, pero la bilirrubina normalmente permanece normal a menos que haya una enfermedad avanzada. Es importante tener en cuenta que las pruebas de función hepática normales no descartan la cirrosis (Steven L. 2017).

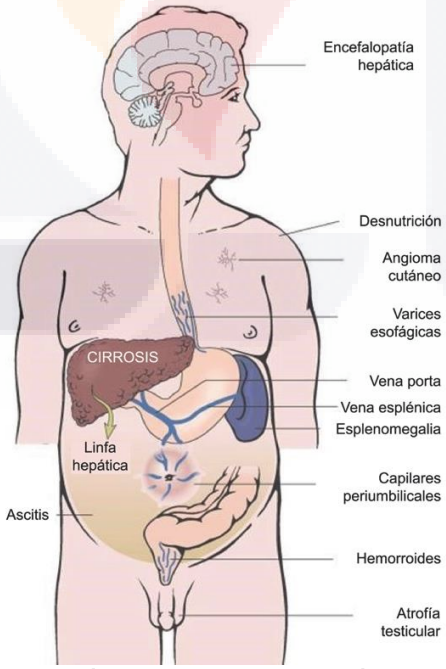

Figura 11. Principales consecuencias clínicas de la hipertensión portal de la cirrosis. Imagen tomada de http://images.slideplayer.es/13/4056185/slides/slide_19.jpg

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.2.4 *Activación de células estrelladas hepáticas.*

Parece que la mayor parte del exceso de colágeno presente en la cirrosis procede de las *células hepáticas estrelladas* (células de Ito) perisinusoidales, presentes en el espacio de Disse. Aunque en condiciones normales su función primordial es el almacenamiento de vitamina A, durante el desarrollo de la cirrosis se activan, pierden sus depósitos de esteres de retinol y se transforman en células de tipo miofibroblástico. Como se muestra en la figura 12, los estímulos para la síntesis y el depósito de colágeno pueden proceder de fuentes diversas:

1. Inflamación crónica, con producción de citocinas inflamatorias del tipo del factor de necrosis tumoral (TNF)-α, factor de transformación del crecimiento (TGF)-β e interleucina 1.
2. Producción de citocinas por las células endoteliales estimuladas (células de Kupffer, células endoteliales, hepatocitos y células epiteliales de los conductos biliares).
3. Alteración de la matriz extracelular.
4. Estimulación directa de las células estrelladas por toxinas (Robbins, 2000).

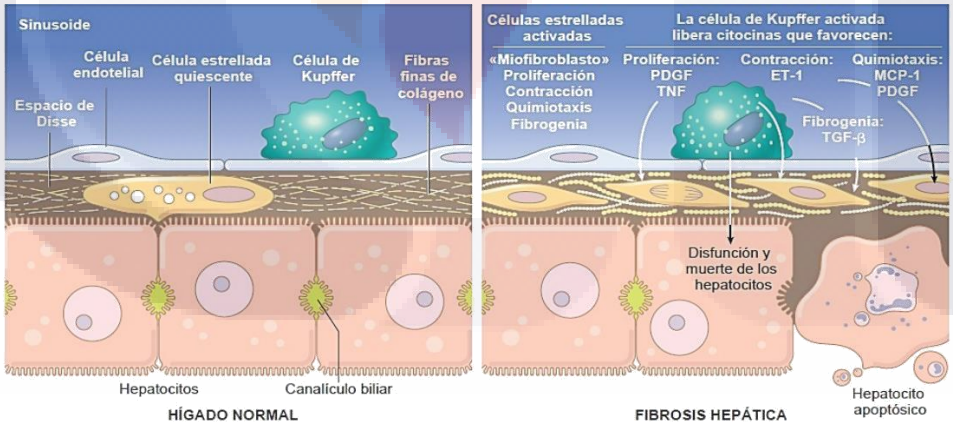

Figura 12. Activación de células estrelladas y fibrosis hepática. La activación de las células de Kupffer provoca la secreción de múltiples citocinas. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) activan las células estrelladas y la contracción de las células estrelladas activadas se estimula mediante la endotelina-1 (ET-1). La fibrogenia se estimula gracias al factor de crecimiento transformante β (TGF-β). La quimotaxis de las células estrelladas activadas hacia las zonas de lesión se favorece por el Factor estimulante de plaquetas (PDGF) y la proteína 1 quimiotáctica de los monocitos (MCP-1). Imagen tomada de http://documents.tips/documents/higado-patologia-de-robbins-y-cotran.htm

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La aparición de miofibrillas en las células estrelladas perisinusoidales y su transformación en miofibroblastos aumentan también la resistencia vascular en el interior del parénquima hepático, ya que la contracción tónica de estos "miofibroblastos" reduce la luz de los canales vasculares sinusoidales (Robbins, 2000).

Durante todo el proceso de lesión y fibrosis hepática, los hepatocitos restantes reciben estímulos continuos de regeneración, por lo que proliferan y forman nódulos esféricos dentro de los límites de los tabiques fibrosos. El resultado final neto es un hígado fibroso y nodular, con una grave limitación de la sangre que llega a los hepatocitos y la consiguiente disminución de su capacidad de secretar sustancias al plasma. La alteración de la interfaz entre el parénquima y los espacios porta oblitera asimismo los conductillos biliares. Por tanto, el paciente cirrótico puede desarrollar ictericia e incluso insuficiencia hepática, aunque la masa hepática total sea normal (Robbins, 2000).

Regeneración. El hígado dispone de una enorme reserva y ello permite que, salvo en las enfermedades más fulminantes, sus lesiones vayan seguidas de regeneración. La proliferación celular se pone de manifiesto a través de la mitosis, engrosamiento de las trabéculas hepatocitarias y cierta desorganización de la estructura del parénquima. La proliferación del epitelio de los conductos biliares hace que en los espacios porta muestre un número excesivo de ellos. Cuando se produce una necrosis hepatocelular que deja intacta la trama de tejido conjuntivo, la reconstrucción de la arquitectura hepática puede ser casi perfecta (Robbins, 2000).

1.2.5 Tetracloruro de carbono.

El tetracloruro de carbono (CCI_4) es una fuerte hepatotoxina que causa necrosis centrilobular en animales de experimentación, utilizada para inducir un modelo de lesión hepática química en estudios experimentales (Weber LW *et al.*, 2003, Ahn M *et al.*, 2014). La hepatotoxicidad y las propiedades carcinógenas de CCI_4 han sido bien definidas en humanos (Clawson G. 1989). Los modelos animales de CCI_4 demuestran una similitud significativa con los síntomas de toxicidad en humanos, incluyendo las manifestaciones morfológicas, bioquímicas y patológicas (Ahn M *et al.*, 2014, Pérez, 2007, Lee CH *et al.*, 2007, Yang YS *et al.*, 2008).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En el presente estudio, se utilizó CCl_4 en un modelo de rata macho Wistar para inducir daño hepático por inyección intraperitoneal. Se ha documentado que el metabolismo de CCl_4 en sus radicales libres, el triclorometilo (CCl_3•) y peroxi triclorometilo (•$OOCCl_3$), producen efectos hepatotóxicos, como fibrosis, esteatosis, necrosis y hepatocarcinoma (Fang H.L. & Lin W.C., 2008).

El CCl_4 se metaboliza en el cuerpo, principalmente por el hígado, pero también en los riñones, pulmones y otros tejidos que contienen citocromo P450 (CYP450). El metabolismo del tetracloruro de carbono ha sido ampliamente estudiado en sistemas de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. En la figura 13 se muestra un esquema metabólico para el tetracloruro de carbono. El paso inicial en la biotransformación del tetracloruro de carbono es la deshalogenación reductora: la escisión reductora de un enlace carbono-cloro para producir el ion cloruro y el radical triclorometilo (Tomasi *et al.,* 1987, Slater, 1982, Poyer *et al.,* 1980, 1978, Lai *et al.,* 1979).La etapa inicial de reacción es catalizada por un CYP450 dependiente de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) que es inducible por fenobarbital o etanol (Castillo *et al.,* 1992, Noguchi *et al.,* 1982, Sipes *et al.,* 1977). En humanos y animales, el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) es la principal enzima implicada en la bioactivación del tetracloruro de carbono, mientras que el citocromo P450, familia 3, subfamilia A, también conocido como CYP3A puede estar implicada en condiciones de alta exposición (Zangar *et al*., 2000; Raucy *et al.,* 1993). Como se demostró en estudios con ratones *knock-out* con CYP2E1, esta enzima es necesaria para el desarrollo de hepatotoxicidad (medida por elevadas enzimas hepáticas e histopatología hepática) en ratones expuestos al tetracloruro de carbono (Wong *et al.,* 1998).

Aeróbicamente, el radical triclorometilo puede atrapar oxígeno para formar el radical peroxi triclorometilo, que puede unirse a proteínas tisulares formando aductos (Galelli y Castro, 1998, Packer *et al.,* 1978) o descomponerse para formar fosgeno ($COCl_2$) (Pohl *et al.,* 1984) y una forma electrofílica de cloro (Pohl *et al.,* 1984). El radical peroxi triclorometilo es el iniciador primario de la peroxidación lipídica que se produce a partir de la exposición al tetracloruro de carbono (Boll *et al.,* 2001).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

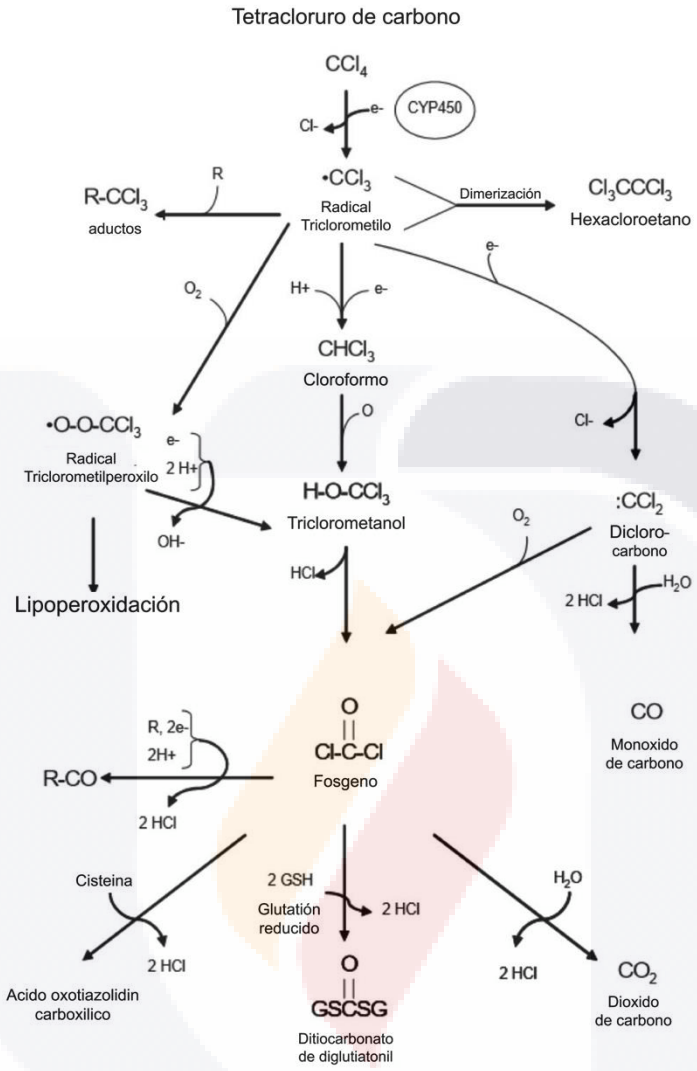

Figura 13. Esquema metabólico del tetracloruro de carbono. El metabolismo del CCl_4 se debe a la enzima CYP450, generando a los radicales libres triclorometilo y peroxitriclorometilo, los cuales general lipoperoxidacion y aductos.

La cantidad de tetracloruro de carbono metabolizado en un tejido dado está relacionada con el contenido de CYP450 del tejido (Bergman 1983. Villarruel *et al.*, 1977). En el hígado, la mayor acumulación de metabolitos de tetracloruro de carbono ocurre en la región centrilobular, que tiene altos niveles de CYP450 (Bergman 1983).

Zangar y cols. (2000) midieron las constantes de velocidad metabólica del tetracloruro de carbono para preparaciones de microsomas hepáticos humanos y animales *in vitro*. Los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

resultados sugieren que la tasa metabólica en humanos es más similar a la tasa en ratas que en otras especies de roedores.

1.3 ***Blancos terapéuticos.***

Existe una gran cantidad de información respecto a los mecanismos fisiopatológicos que participan durante el desarrollo de una lesión hepática. Tal parece que esta patología se desencadena de manera multifactorial debido a la gran variedad de mecanismos moleculares y celulares que participan. Se han desarrollado un sinnúmero de estrategias terapéuticas para tratar de detener el avance, disminuir o revertir el proceso de daño hepático causado por una lesión de tipo aguda que si se vuelve crónica puede desencadenar en cuadro cirrótico, pero aun la ciencia no ha dado en el blanco para curar por completo esta enfermedad.

Actualmente el único tratamiento totalmente efectivo para la cura de esta patología es el trasplante hepático, sin embargo, sabemos que posee limitaciones debido a su difícil acceso, la compatibilidad paciente-donante y el riesgo de complicaciones, entre otras cosas, no lo hace una opción accesible.

La base farmacológica de algunos de los tratamientos para enfermedades hepáticas, como la fibrosis, se apoya en un creciente cuerpo de evidencia sobre las interacciones entre el microbioma intestinal y su huésped humano. El microbioma humano es el genoma colectivo (es decir, el material genético) de los más de mil tipos de microorganismos que viven en asociación con el cuerpo humano, la gran mayoría de los cuales residen en el intestino distal (US National Institutes of Health. 2016. Gordon JI. *et al.,* 2015). Este sistema ecológico interactúa con los órganos internos y externos, factores que ayudan a mantener la salud general del individuo (Moraes-Filho JP. & Quigley EM. 2015).

Las terapias futuras deberán tener como blanco la interacción del microbioma con otros órganos, para evitar tratamientos invasivos que conlleven un riesgo para la vida del paciente. Tomando en cuenta el papel primordial de citocinas y sustancias vasoactivas en este tipo de patologías, y no enfocarse específicamente en sus efectos a nivel hepático, debido a los diversos efectos hemodinámicos de estos agentes sobre la circulación sistémica, portal y colateral.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.4 ***Probióticos.***

La demostración de que la microflora intestinal es de gran importancia en el desarrollo del sistema inmunológico y en el mantenimiento de los procesos inmunológicos normales locales y sistémicos ha fomentado la investigación sobre microorganismos con posibles efectos inmunológicos benéficos.

Los probióticos son microorganismos vivos que, ingeridos en cantidad adecuada, ejercen efectos benéficos para la salud más allá de sus propiedades puramente nutricionales (Guarner F. & Schaafsma G. 1998). Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino (Pardio *et al*., 1994). El efecto protector de estos microorganismos se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica. Este antagonismo está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. Mediante la inmuno-modulación protegen al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos (Penna FJ. *et al.*, 1998).

En diferentes estudios, tanto en animales como en humanos, distintas cepas de microorganismos probióticos han demostrado su capacidad para modular las respuestas inmunológicas cuando son administrados por vía oral. Ciertos probióticos son capaces de producir una estimulación de la inmunidad innata y de la inmunidad adquirida o específica, confiriendo al huésped un aumento de su resistencia a microorganismos patógenos. En otras situaciones patológicas, los probióticos pueden inducir efectos opuestos, como la inhibición de reacciones de hipersensibilidad o de falta de tolerancia (alergia) o induciendo un efecto antiinflamatorio. Este espectro tan complejo de efectos sobre la inmunidad del huésped es lo que confiere a los probióticos su carácter de inmunomoduladores (Borruel N. 2003).

En el estudio realizado por Haller D. y colaboradores en el año 2000 se demostró que *Lactobacillus johnsonii* de origen intestinal no inducía la liberación de TNF-α o IL-1β, pero sí la del TGF-β, presentando un perfil global antiinflamatorio.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Diferentes estudios *in vitro* efectuados en humanos con células mononucleares de sangre periférica demostraron que la exposición a bacterias grampositivas de la propia flora o a diferentes especies de lactobacilos eran capaces de estimular la inmunidad innata mediante la inducción de la liberación de TNF-α, IL-10, IL-12, IL-18 o IFN-γ (Chen T. *et al.,* 1999, Hessle C. *et al.,* 1999, Miettinen M. *et al.,* 1998).

Además de los estudios *in vitro*, distintos modelos experimentales animales, fundamentalmente de colitis, han demostrado la utilidad de los probióticos en el control de la inflamación intestinal. En el modelo de colitis en rata inducido por ácido acético, la administración de *Lactobacillus reuteri* R2LC inmediatamente tras la inducción prevenía la instauración de la colitis (Fabia R *et al.,* 1993). De la misma forma, en el modelo de enterocolitis en ratas inducida con metrotexato intraperitoneal, la ingestión de *Lactobacillus plantarum*, disminuía la severidad de la colitis (Mao Y. *et al.,* 1996).

Bajaj JS y colaboradores (2013) demostraron que probióticos *Lactobacillus GG* disminuye la endotoxemia y la respuesta inflamatoria sistémica en pacientes cirróticos.

Se ha demostrado que la lactulosa, la rifaximina y los probióticos que contienen Lactobacillus revierten parcialmente la disbiosis entérica asociada a cirrosis, junto con la mejora de la encefalopatía (Mamatha B. *et al.,* 2016).

Los estudios en pacientes con enfermedad inflamatoria, aunque prometedores, aún son escasos y contradictorios, por ende es de suma importancia investigar acerca de sus efectos, mecanismos de acción celular y molecular, interacciones celulares, etc.

1.5 Lactococcus lactis.

L. lactis se divide en tres subespecies, *L. lactis, L. lactis cremoris* y *L. lactis hordniae* (Parapouli M. *et al.,* 2013). Fenotípicamente, se clasifica como bacterias grampositivas, esféricas, homolactas, no esporulantes y bacterias anaeróbicas facultativas con cientos de cepas y biovariantes publicados hasta la fecha (Duwat P. *et al.,* 2001. Garrigues C. *et al.,* 1997).

Lactococcus lactis se ha utilizado durante siglos en la fermentación de alimentos, especialmente queso, yogur, chucrut y similares. Aparte de impartir sabor, *L. lactis* es una bacteria ácido láctica (LAB) utilizada para la conserva de alimentos. Algunas cepas mejoran

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aún más esta propiedad de conservación con la producción de bacteriocinas, reforzando así su papel en la industria alimentaria (Garcia Fruitos E. 2012).

Las bacterias ácido lácticas utilizan varios azúcares como la glucosa y la lactosa para la producción de ácido acético mediante la fermentación. Algunas bacterias son conocidas como anaerobias facultativas y otras como anaeróbicas obligadas (Torres R. 1999), pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal; además por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero (Schiffin et al., 1997).

El empleo de *Lactococcus lactis* ha progresado mucho desde su descubrimiento y uso inicial en la fermentación de productos lácteos hasta sus actuales aplicaciones biotecnológicas y de ingeniería genética para la producción de proteínas y metabolitos recombinantes que trascienden la barrera de las especies heterólogas. Las principales características deseables de estas bacterias intestinales incluyen su estado generalmente reconocido como seguro (GRAS: *Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration)*, las propiedades probióticas, la ausencia de cuerpos de inclusión y endotoxinas, la visualización de superficie, la tecnología de secreción extracelular y una diversa selección de clonación y vectores de expresión inducibles. Esto ha hecho de *L. lactis* un huésped deseable y prometedor al igual que otros sistemas bacterianos o de levaduras bien establecidos tales como *Escherichia coli, Salmonella cerevisiae* y *Bacillus subtilis* (Song A. *et al.*, 2017).

Una de las razones por las que *L. lactis* ha surgido para convertirse en un sistema exitoso de producción de células microbianas estables, se debe a la riqueza de conocimientos genéticos disponibles que abarcan al menos cuatro cepas lactocócicas completamente secuenciadas (Linares DM. et al., 2010), genoma completamente secuenciado de tamaño pequeño (2.3 Mbp) (Garcia Fruitos E. 2012) y muchos sistemas de expresión existentes (Song A. *et al.*, 2017).

El sistema de expresión lactocócica más exitoso hasta la fecha es el sistema de expresión génica controlada con nisina (NICE) desarrollado por Kuipers y colaboradores en 1995. La nisina es un péptido antimicrobiano de 34 aminoácidos cuya biosíntesis está codificada por un grupo de 11 genes. De los 11 genes, nisR y nisK regulan la expresión de los genes nisina. NisK es una histidina-proteína quinasa que reside en la membrana citoplasmática y actúa como un receptor para la molécula de nisina. Tras la recepción de nisina, se activa la vía fosforilación

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nisR, que a su vez induce la transcripción de dos promotores en el grupo de genes de nisina: PnisA y PnisF (Kuipers OP. *et al.*, 1995).

La secreción de proteínas heterólogas se prefieren en su mayoría en comparación con las proteínas expresadas intracelularmente debido a ventajas tales como etapas de purificación más simples, mayores rendimientos y mejores interacciones con el objetivo (Loir Y. *et al.*, 2005). A la vista de esto, es también ventajoso emplear el sistema de secreción al desarrollar *L. lactis* como huésped para la producción de proteínas heterólogas (Morello E. *et al.*, 2008). Además, las bacterias gram-positivas tienen una pared celular monocapa que permite la secreción directa en el ambiente extracelular en comparación con *E. coli* donde las proteínas secretadas en su mayoría se pegan en el periplasma (Schneewind O. & Missiakas DM. 2012). Además, *L. lactis* sólo posee una sola proteasa de limpieza extracelular, HrtA, lo que reduce las posibilidades de que al secretar las proteínas heterólogas se degraden (Sriraman K. & Jayaraman G. 2008. Poquet I. *et al.*, 2000).

Debido a sus propiedades inmunomoduladoras y a su capacidad para sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal, no coloniza el intestino a diferencia de *Lactobacillus spp.*, *L. lactis* se ha utilizado como vehículo para administrar terapéuticos tales como citocinas en el cuerpo humano. La primera evidencia de tales aplicaciones fue publicada por Steidler y cols. en el año 2000, donde la secreción de interleucina-10 (IL-10) por *L. lactis* se utilizó para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal en la colitis inducida en ratones.

El uso de LAB como portadores de vacunas es atractivo, ya que son capaces de inducir tanto respuestas inmunológicas en mucosas como sistémicas, tienen propiedades adyuvantes y están libres de riesgos asociados con el uso de patógenos vivos atenuados convencionales tales como *Salmonella spp.* y *Mycobacterium spp.* (Pouwels PH. *et al.*, 1998).

Las bacterias lácticas grampositivas no patógenas se consideran candidatas prometedoras para el desarrollo de vacunas vivas orales. *Lactococcus lactis* es de particular interés para la administración oral de proteínas funcionales, ya que es una bacteria no comensal en modelos animales y humanos (Mizoguchi A. 2012). En el presente estudio se empleara la cepa *L. lactis* silvestre y recombinante secretora de interleucina 22, que a su vez induce la producción de interleucina 10 (Loera *et al.*, 2014), una citocina con propiedades anti-inflamatorias (British

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Society for Immunology), y se evaluará su efecto sobre el proceso de daño hepático inducido por CCl_4.

1.6 ***Interleucina-22.***

La interleucina-22 (IL-22) fue descubierta en el año 2000 y originalmente se denominó factor inducible inducido por células T relacionado con IL-10 (Wolk *et al.*, 2010). La IL-22 se identificó por primera vez como un gen inducido por IL-9 en células T de ratón (Mizoguchi A. 2012). Es un miembro de la superfamilia de IL-10, que es producida principalmente por células T activadas y células NK (Pestka S. *et al.*, 2004). Comparte una homología de 22 y 25% con IL-10 humana y murina, respectivamente (Wolk *et al.*, 2010).

Esta citocina posee un papel importante en la respuesta inflamatoria mediante la reacción defensiva inmediata a la infección o lesión causada por agentes químicos o físicos. El proceso se caracteriza por vasodilatación local, extravasación de plasma en espacios intercelulares y acumulación de glóbulos blancos y macrófagos (Consortium, Accessed 11 May 2017).

Se ha sabido mediar su efecto a través de los siguientes dos receptores: IL-10Rb, que se expresa de forma ubicua, y el receptor heterodimérico IL-22R1 (Fig. 14), que está restringido a células no linfoides, con un alto nivel de expresión en el páncreas, riñón e hígado, así como las superficies de barrera, como la piel, el intestino y los pulmones (Kotenko S. *et al.*, 2001. Tachiiri A. *et al.*, 2003. Wolk 2004).

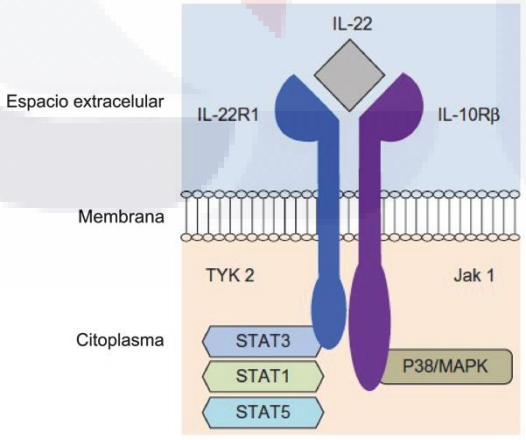

Figura 14. Interacción IL-22 con su receptor transmembrana. (Foxall B, 2016).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La expresión de la IL-22 puede proporcionar efectos protectores del tejido directo sobre varias células diana no hematopoyéticas durante la inflamación, en tejido tales como el hígado, el intestino, el corazón y los pulmones (Hammerich & Tacke. 2014. Troncone *et al.,* 2013. Kong *et al*., 2012. Scheiermann *et al* 2013. Ciccia *et al.,* 2012. Hoegl *et al.,* 2011). Se ha encontrado que la expresión de IL-22 contribuye a las fases proinflamatorias o de protección del tejido de la respuesta inmune dependiendo del contexto en el que se expresa (Sonnenberg *et al.,* 2010).

El papel biológico de IL-22 difiere dependiendo del tejido específico con el que interactúa. En general, participa en la defensa antimicrobiana, la regeneración y la protección contra los daños, por lo que desempeña un papel clave en la inmunidad innata que involucra tejidos e inflamación (Sonnenberg *et al.,* 2011). Estos efectos están mediados por la inducción de defensinas, proteínas de fase aguda y citocinas (Wolk *et al.,* 2010). Estas cualidades hacen que la IL-22 sea un objetivo prometedor para la terapia protectora de tejidos, en especial en enfermedades de fase aguda en tejidos epiteliales (Muhl *et al.,* 2013).

La IL-22 está relacionada bioquímica y funcionalmente con IL-10, además es activadora del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), y muestra la característica de actuar casi exclusivamente en células no leucocíticas tales como células epiteliales pulmonares, colónicas, queratinocitos y hepatocitos. Esta selectividad refleja la distribución celular específica de los receptores IL-22 funcionales y obviamente determina las funciones de la IL-22 en la salud y la enfermedad. Entre estas funciones, se considera que las actividades antibacterianas, antiapoptóticas, proproliferativas y de protección de tejidos son cruciales para estabilizar la homeostasis y eliminar la enfermedad aguda en los tejidos epiteliales (Wolk *et al.,* 2010. Sonnenberg & Fouser, 2011. Aujla & Kolls, 2011).

La fibrogénesis hepática es activada por una respuesta inflamatoria, dada selectivamente por macrófagos, células NK y NKT (Guillot *et al.,* 2013). Como se había mencionado antes, esta interleucina es un mediador anti-inflamatorio del sistema inmune, una de sus principales funciones es prevenir el daño causado por la respuesta inflamatoria; en este caso, la IL-22 puede potenciar la regeneración hepática (Brand et al., 2007). Se ha descubierto que IL-22 es una citocina que tiene un importante potencial terapéutico en el hígado (Loera *et al.,* 2014), ya que puede proporcionar protección a los hepatocitos durante la inflamación del hígado (Chun-xiao *et al.,* 2014).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La terapia de protección de tejidos IL-22 se ha demostrado en roedores (Muhl *et al.*, 2013). Simonian y colaboradores demostraron que a dosis mínimas (100 pg de IL-22) administrada intratraquealmente en un modelo murino recombinante proporciona una protección eficaz en un modelo de fibrosis pulmonar. Yam y colaboradores, en el año 2008 demostraron que *L. lactis* silvestre induce la secreción de IL-10 e IL-12 por lo que puede desempeñar un papel homestático induciendo respuestas humorales y celulares.

La IL-22 posee características anti-apoptóticas, pro-proliferativas y pro-regeneración, lo que podría aumentar la tasa de proliferación de hepatocitos en hígados lesionados (Scheiermann *et al* 2013. Muhl *et al.*, 2013. Zhao *et al.*, 2015).

Loera-Arias y colaboradores (2014), construyeron una cepa de *L. Lactis* (pSec: hIL22) capaz de expresar y secretar IL-22 humana biológicamente activa, demostrando que esta cepa recombinante puede ser útil en el futuro como terapia de vector *in vivo* para enfermedades que comprometen los tejidos epiteliales combinando los efectos de la IL-22 con la propiedad adyuvante de *L. lactis.* La bioactividad de la IL-22 recombinante se evaluó utilizando la línea celular Colo205. Se trata de una línea celular epitelial de colon que segrega IL-10 después de la estimulación con IL-22 a través de la fosforilación STAT3 (Nagalakshmi *et al.*, 2004). Esta interleucina, IL-10, disminuye y regula la respuesta inflamatoria producida por células dendríticas y macrófagos, asi como reduce las repuestas adaptativas de las células T CD4+, además inhibe la producción de IL-1 y TNF- α producido por macrófagos (British Society for immunology), citocinas proinflamatorias presentes en el proceso de lesión hepática.

Diferentes estudios respaldan estos hechos. Steidler y colaboradores (2000) emplearon una cepa recombinante de *L. lactis* productora de IL-10 como tratamiento para la enfermedad inflamatoria intestinal en la colitis inducida en ratones, logrando una reducción en la inflamación.

Cuando se trata de hipersensibilidad, las cepas de *L. lactis* que secretan IL-10 también se han investigado como tratamiento contra la alergia alimentaria, como la alergia a la leche de vaca (Frossard C. *et al.*, 2007), obteniendo una mejoría.

Estos hechos recalcan las cualidades en el papel anti-inflamatorio de estas citocinas, haciéndola de gran interés para nuevas terapias en diferentes patologías, en este caso particular en el estudio sobre la lesión hepática inducida por agentes tóxicos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1.7 ***Interleucina 10***

IL-10 (Interleucina-10) es una citocina pleiotrópica con funciones inmunorreguladoras importantes. Sus acciones influyen en las actividades de muchos de los tipos de células en el sistema inmune (ThermoFisher SCIENTIFIC). La IL-10 es producida principalmente por monocitos, células T (principalmente células Tr1), células B, células NK, macrófagos y DC. IL-10 se secreta como un homodímero que consta de 2 subunidades, cada una de 178 aminoácidos con un peso molecular de ~18 KDa. IL-10 afecta directamente las funciones de las células presentadora de antígeno al regular negativamente la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y moléculas coestimuladoras en la superficie de los macrófagos y monocitos. IL-10 inhibe la expresión de muchas citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y receptores de quimiocinas e interviene en la tolerancia a alérgenos en la inmunoterapia específica de alérgenos y después de la exposición a altas dosis de alérgeno. Además de estos efectos indirectos, IL-10 afecta directamente la activación de las células T suprimiendo CD28, CD2 y señalización del coestimulador de células T inducible a través de la tirosina fosfatasa SHP-1. En contraste con sus efectos inhibidores sobre las células T, la IL-10 promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de células B humanas y aumenta la producción de IgG4 (Akdis M. *et al.,* 2011).

Es una citocina que posee potentes propiedades antiinflamatorias. IL-10 reprime la expresión de citocinas inflamatorias como TNF-α, IL-6 (interleucina-6) e IL-1 (interleucina-1) por macrófagos activados (Williams LM *et al.,* 2004). Los complejos funcionales de IL-10R (Receptor de IL-10) son tetrámeros que consisten en dos subunidades de unión a ligando (IL-10R-Alpha o IL-10R1) y dos subunidades de señalización accesorias (IL-10R-Beta o IL-10R2) (Fig. 15). La unión de IL-10 al dominio extracelular de IL-10R1 activa la fosforilación de los receptores JAK1 (Janus Kinase-1) y TYK2 (Tyrosine Kinase-2) asociados constitutivamente con IL-10R1 e IL-10R2, respectivamente. Estas quinasas luego fosforilan residuos específicos de tirosina (Y446 e Y496) en el dominio intracelular de la cadena IL-10R1. Una vez fosforilados, estos residuos de tirosina (y sus secuencias peptídicas flanqueantes) sirven como sitios de acoplamiento temporal para el factor de transcripción latente, STAT3. STAT3 se une a estos sitios a través de su dominio SH2 (Src Homology-2) y, a su vez, es fosforilado por tirosina por los JAK asociados al receptor. Luego se homodimeriza y transloca al núcleo donde

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

se une con alta afinidad a SBE (STAT-Binding Elements) en los promotores de varios genes que responden a IL-10. Las formas constitutivamente activas de STAT3 aumentan la transcripción de genes antiapoptóticos y de progresión del ciclo celular como BCLXL, Cyclin-D1, Cyclin-D2, Cyclin-D3 y Cyclin-A, Pim1, c-Myc y p19 (INK4D) (Hu X et al., 2007. Cavalcante LB et al., 2012).

Además IL-10 tiene la capacidad de inducir la novosíntesis de SOCS3 en monocitos, correlacionando su capacidad para inhibir la expresión de muchos genes en estas células, que incluyen citoquinas inducibles por endotoxinas tales como TNF-α e IL-1 (ThermoFisher SCIENTIFIC, Accessed 29 december 2017).

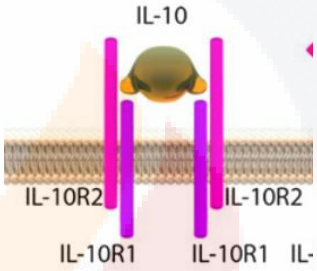

Figura 15. Interacción IL-10 con su receptor transmembrana. (Akdis M. *et al.*, 2011).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPITULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2. Planteamiento del problema

El hígado es un órgano de vital importancia para la salud integral del ser humano, al ser dañado el proceso patogénico central es la fibrosis hepática, que si no se detiene puede provocar cirrosis, insuficiencia hepática o hepatocarcinoma. En la actualidad, la cirrosis es considerada una de las principales causas de muertes a nivel mundial. Hasta el momento no existe un tratamiento no invasivo que revierta en su totalidad esta patología. El presente estudio tiene como objetivo evaluar los efectos de la cepa *Lactococcus lactis* administrada vía oral sobre el daño hepático inducido por el tetracloruro de carbono.

2.1 Pregunta de investigación

¿La ingesta de *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22) podrá tener efectos benéficos en la reversión del proceso fibrogénico hepático inducido por el tetracloruro de carbono en ratas macho Wistar?

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.2 Objetivo general

Evaluar los posibles efectos antifibróticos y antiinflamatorios de *Lactococcus lactis* recombinante secretor de IL-22 y silvestre en un modelo de fibrosis hepática en rata macho Wistar inducido por CCl_4.

2.2.1 ***Objetivos específicos***

1) Inducir animales fibróticos con tetracloruro de carbono durante 4 semanas.
2) Aplicación del tratamiento con *L. lactis* recombinante secretor de IL-22 y silvestre por sonda gástrica.
3) Valorar por histología el efecto preventivo de los probióticos para el daño generado por el CCl_4 en el parénquima hepático.
4) Evaluar marcadores fibrogénicos e inflamatorios expresados en los animales tratados con los probióticos.
5) Evaluar la expresión de diferentes marcadores en el intestino delgado de animales tratados en relación con grupos controles.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.3 Justificación

La fibrosis y, en el extremo, la cirrosis, dan como resultado una disfunción hepática global en niveles que van desde células individuales hasta el órgano entero. Más que el depósito de proteínas de la matriz extracelular (MEC) anormales por un conjunto de células fibrogénicas, la fibrosis representa una disrupción marcada en el medio soluble y mecánico del hígado y la función alterada de casi todos los tipos de células presentes, a menudo con la afluencia de poblaciones de células adicionales de la circulación (Monga S. 2011). Esta patología constituye un importante problema de salud alrededor del mundo, formando parte de las diez primeras causas de muerte (Méndez-Sánchez *et al.,* 2007). Se estiman 800.000 muertes anuales a nivel mundial. Es considerada como la quinta causa de mortalidad en México, es decir, cada año fallecen 30 mil personas por esta enfermedad (Hernández, Cirrosis hepática and Diabetes, 2007).

Esta patología es un problema de salud mundial importante pero sorprendentemente descuidado que no solo es de importancia médica sino también socioeconómicamente importante. De hecho, las estadísticas de salud actuales indican que casi el 45% de todas las muertes naturales en el mundo occidental se pueden atribuir a enfermedades fibroproliferativas crónicas (Wynn AT. 2004.). Desafortunadamente, el conocimiento básico de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen al desarrollo de la fibrosis aún no se ha traducido en medidas diagnósticas, preventivas y terapéuticas clínicamente aplicables (Wick G. *et al.*, 2013).

Por ende, la necesidad de tratamientos eficaces y no invasivos cada día es mayor, ya que es sabido que el único tratamiento que revierte en su totalidad esta patología es el trasplante hepático. Es por ello que surgen nuevas alternativas e ideas para tratar de revertir el proceso inflamatorio que conlleva a fibrosis y cirrosis.

La manipulación de la microbiota intestinal es una alternativa innovadora en el tratamiento del proceso inflamatorio y fibrogénico ocurrido en la cirrosis hepática. El empleo de cepas bacterianas en su estado silvestre o en un estado modificado genéticamente son propuestas innovadoras y necesarias ante la falta de tratamientos. En la presente investigación se evaluarán los posibles efectos inmunomodulares del *Lactococcus lactis* sobre el daño hepático inducido por CCl_4 en un modelo de rata Wistar. Mediante la administración oral de la cepa antes mencionada, tanto en su estado silvestre como recombinante secretor de IL-22.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La IL-22 es una citocina que tiene potencial terapéutico importante, participa en la modulación de la inmunidad innata y es una clase de potentes mediadores de respuestas inflamatorias celulares, es por ello que será empleada para potenciar la regeneración hepática mediante la disminución del proceso inflamatorio combinado con los efectos benéficos de la *L. lactis*. Con esto se pretende encontrar un tratamiento menos invasivo, más cercano y certero hacia la disminución del daño generado en la fibrosis hepática.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.4 **Hipótesis**

La administración de *L. lactis* recombinante secretor de IL-22 y silvestre reducirán el daño hepático tanto en el proceso inflamatorio como fibrogénico en un modelo de fibrosis por CCl_4 en rata macho Wistar.

2.5 **Metas**

- Aplicar un pretratamiento de *L. lactis* (pSec: hIL-22 y NZ9000) durante 4 semanas a los animales de experimentación, y un posterior tratamiento de 2 semanas.
- Inducir un proceso fibrogénico en ratas macho Wistar empleando CCl_4, demostrado a través del análisis bioquímico de muestras serológicas, así como un análisis histopatológico por medio de tinciones H&E y rojo sirio.
- Evaluar diferentes tipos de tejidos en los animales de experimentación (hígado, íleon y ciego) para determinar los mecanismos de acción que ejerce *L. lactis* (pSec: hIL-22 y NZ9000) sobre el daño hepático inducido por el CCl_4.
- Cuantificar el número de células positivas para IL-22 a través de inmunohistoquímica con el fin de dilucidar el mecanismo de acción de la cepa *L. lactis* (pSec: hIL-22 y NZ9000) sobre un daño hepático.
- Identificar la expresión de diferentes marcadores inflamatorios y fibrogénicos en tejido hepático e intestino delgado de los grupos experimentales para constatar el efecto inmunomodulador que posee *L. lactis.*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3. Metodología

3.1 ***Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.***

Para la reactivación de la cepa de *L. lactis* secretor de IL-22 humana, se tomaron 10 μL del stock de células que están contenidas en 1 mL de medio M17–Glucosa 10%-Cloranfenicol 10 μg/mL-Glicerol 30%. Se incubaron toda la noche en 50 mL de medio M17 suplementado con glucosa al 10%/ cloranfenicol 10 μg/mL a 30°C sin agitación. Para poder inducir la cepa, se tomó 1 mL del cultivo y se inoculó en 50 mL de medio M17 suplementado con glucosa al 10%/ cloranfenicol 10 μg/mL. Se midió la absorbancia o densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 600 nm y se incubo monitoreando la absorbancia, hasta que la OD se encontró en 0.6 a 0.8. En seguida, se realizó la inducción con 10 ng de nisina por cada mL de medio, y se incubó hasta una OD de 0.800 (aproximadamente 2 horas) a 30°C. Después de la inducción, se registró la absorbancia y el volumen final de cada cultivo y se centrifugó 15 minutos a temperatura ambiente a 5000 rpm para posteriormente realizar el cálculo de cuanto volumen de PBS se debe usar para resuspender las bacterias a una concentración de $1x10^9$ células/mL. Para la cepa *L. lactis* silvestre se procedió de la misma manera omitiendo el cloranfenicol y la inducción con nisina.

3.2 ***Animales.***

Los animales fueron manejados de acuerdo con las directrices del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, que se basa en la guía de NHI para la investigación animal (Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, 2011).

Veinte ratas Wistar macho (de 6 a 8 semanas de edad, 100 a 150 g) se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 12 h en una habitación controlada con temperatura (25ºC). La dieta consistía en Purina Chow y agua *ad libitum* durante todo el experimento. Todos los animales fueron previamente tratados con sulfato de neomicina y sulfadimetilpirimidina (durante 3 días) para eliminar parásitos y bacterias. Para los experimentos, las ratas se distribuyeron en cuatro grupos (cinco animales cada uno): 1) Grupo Intacto. 2) Grupo Silvestre-CCl_4 (al cual se le administro vía intratraqueal 1 ml de *L. lactis* silvestre denominado NZ9000, 5 días por semana durante 6 semanas, dos semanas de pretratamiento más 4 semanas de tratamiento). 3) Grupo Recombinante-CCl_4 (al cual se le administro vía intratraqueal 1 ml de *L. lactis* recombinante denominado pSec: hIL-22, 5

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

días por semana durante 6 semanas, dos semanas de pretratamiento más 4 semanas de tratamiento). 4) Grupo CCl_4. Se realizó una sesión de sacrificio a las 6 semanas. Se extrajo hígado, parte terminal de intestino delgado (Placa de Peyer), porción ascendente de intestino grueso y suero, esto fue almacenado a -20°C. Se tomaron fotografías de hígado de las ratas *in vivo*.

3.3 ***Administración de L. lactis recombinante.***

A los grupos Silvestre-CCl_4 y Recombinante-CCl_4 se les administró 5 veces por semana vía oral 1 ml de *L. lactis* silvestre *y* recombinante el cual contenía $1X10^9$ células/ml, respectivamente. La administración comenzó dos semanas antes de iniciar la inducción de daño con tetracloruro de carbono, con el fin de establecer un pre-tratamiento; y terminó hasta el día de la última inducción con CCl_4.

3.4 ***Inducción de fibrosis.***

Se indujo fibrosis a todos los grupos, excepto el grupo Intacto, utilizando CCl_4 durante 4 semanas. Se comenzó a administrar el CCl_4 tres veces por semana incrementando la concentración de forma progresiva comenzando con una dilución CCl_4: Petrolato de 1:6, 1:5, 1:4 y por último 1:3. La administración se realizó por vía intraperitoneal.

3.5 ***Análisis histopatológico.***

Los hígados, porciones terminales de íleon y colon ascendente se sometieron a una inclusión en parafina utilizando el Histoquinet MICROM STP 120 (Anexo A). Se elaboraron bloques de parafina empleando el Thermo Scientific Microm EC150-1 y EC150-2 para luego obtener los cortes de 5µm en el micrótomo LEICA RM2125RT (Anexo A). Los cortes de los tejidos obtenidos se tiñeron con hematoxilina & eosina (hígado e intestino) (Anexo B) y Rojo Sirio (hígado) (Anexo C). Finalmente se observaron las tinciones mediante los microscopios Óptico Axioskop 46 e Invertido de luz polarizada Axiovert 40 CFL, respectivamente. Las fotografías fueron tomadas por la cámara Cool Snap – Pro Color. Para el análisis morfométrico para porcentaje de colágeno de las tinciones hepáticas con rojo sirio se empleó el programa Image J Fiji-win64.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3.6 ***Función Hepática.***

Los marcadores hepáticos se midieron en suero obtenido por punción intracardiaca, se realizaron mediante el protocolo apegado a normas vigentes: se obtuvo la muestra sanguínea extrayendo 1.5-2.0 ml de sangre total, se centrifugaron a 3500 rpm. Los marcadores: albumina, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), bilirrubina, glucosa, proteínas totales y urea se procesaron en el analizador para química clínica espectrofotómetro automatizado por metodología general de química húmeda por colorimetría, turbidimetría y cinética enzimática de la marca Biosystems. Para las determinaciones se usaron reactivos de la marca comercial spinreact.

3.7 ***Evaluación de marcadores inflamatorios y fibrogénicos en hígado por qPCR***

Se obtuvo cDNA del tejido hepático de los diferentes grupos de experimentación para la cuantificación de la expresión del factor de transcripción FOXP3, para las citocinas IL-1β e IL-10 y para las proteínas TGF-β y colágeno. Se realizaron mezclas en placas de 96 pocillos para qPCR (Applied Biosystems® MicroAmp® -N8010560), qPCR GreenMaster with UNG (Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 71 | 07749 Jena, Germany | PCR-303S). Las placas se agitaron en microcentrífuga (MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner- Labnet International®) y colocadas en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System para su análisis (Anexos E y F).

Tabla 1. Secuencias de cebador utilizadas para la PCR cuantitativa en tiempo real para tejido hepático.

Transcripción	Primer Forward	Primer Reverse
FOXP3	CGGGAGAGTTTCTCAAGCAC	CACAGGTGGAGCTTTTGTCA
IL-1β	CTGTGACTCGTGGGATGATG	GGGATTTTGTCGTTGCTTGT
IL-10	TGGCTCAGCACTGCTATGTT	TTGTCCAGCTGGTCCTTCTT
TGF-β	GACTCTCCACCTGCAAGACCAT	CGGGTGACTTCTTTGGCGTA
Colágeno	AGGCATAAAGGGTCATCGTG	ACCGTTGAGTCCATCTTTGC
Beta-actina	GTCGTACCACTGGCATTGTG	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3.8 ***Evaluación de marcadores inflamatorios en intestino delgado por qPCR***

Se obtuvo cDNA del tejido intestinal de los diferentes grupos de experimentación para la cuantificación de la expresión de los factores de transcripción FOXP3 y ROR, así como para las citocinas IL-10 e IL-22R. Se procedió de la misma forma antes mencionada para los marcadores hepáticos (Anexos E y F).

Tabla 2. Secuencias de cebador utilizadas para la PCR cuantitativa en tiempo real para tejido intestinal (íleon).

Transcripción	Primer Forward	Primer Reverse
IL-10	TGGCTCAGCACTGCTATGTT	TTGTCCAGCTGGTCCTTCTT
IL-22R	CCTGTCTTTGGGAATCAGGA	CAGACCCCAAGGAAACAGAA
FOXP3	CGGGAGAGTTTCTCAAGCAC	CACAGGTGGAGCTTTTGTCA
RORγT	GCAGCAACGGGAACAAGTAG	GGGCTATACTCAAGGTGGCA
Beta-actina	GTCGTACCACTGGCATTGTG	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA

3.9 ***Inmunohistoquímica para detección de células intestinales positivas para IL-22***

Como primer anticuerpo se utilizó Anti-hIL-22, dilución 1:100, y se dejó incubar durante 24 horas en cámara húmeda a 4°C, posteriormente se utilizó Anti-goat IgG como anticuerpo secundario, dilución 1:500. Para el revelado se utilizó 3,3’ diaminobencidina (SIGMA Aldrich D-8001) (Anexo D). En la tabla 1 se muestran las características de los anticuerpos empleados.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Anticuerpo	Host	Catálogo	Lote	Marca	Dilución
Anti-hIL-22 Affinity Purified Goat IgG	Rata	AF782	FCM0417041	R&D SISTEMS	1:100
Anti-goat IgG HRP Conjugated	Cabra	HAF017	WVR0607081	R&D SISTEMS	1:500

3.10 Análisis Estadístico.

Los resultados se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron con la versión de software Prism 6.01 (GraphPad Software Inc.). Las diferencias se probaron entre los grupos utilizando la prueba *one way* t-student y la comparación de la media de Tukey. Los valores de P inferiores a 0.05 se consideran estadísticamente significativos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4. Resultados

4.1 ***Análisis histopatológico del hígado***

A nivel macroscópico los hígados del grupo Intacto muestran coloración café obscuro clásica del hígado sano. Por otra parte, los hígados del grupo CCl_4 muestran cambios en su superficie mostrándola áspera e irregular, con coloración café más claro respecto al control (Figura 16). Los hígados de los grupos tratados con *L. lactis* silvestre y recombinante presentan una coloración y textura de su superficie muy similar al del grupo Intacto. A nivel microscópico, se hicieron observaciones a diferentes aumentos (10X, 20X y 40X) de cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina (Figura 16). En el Grupo Intacto (Figs. 16a-d), se aprecia los lobulillos clásicos de un parénquima hepático normal, a diferencia del Grupo CCl_4 (Figs. 16e-h), en el cual se observan células esteatósicas y núcleos picnóticos en la zona 1 del acino hepático según Rapapport. El Grupo Silvestre-CCl_4 (Figs. 16i-l) a 10 y 20X muestran en la zona II hepatocitos con disminución del daño hepático ocasionado por el CCl_4 y pocas células esteatósicas del tipo microvesicular incipiente, adicionalmente, a 40X se visualizan células con citoplasma más acidófilo y de mayor tamaño, pudiendo especular que estas células se encuentran metabólicamente activas con mayor cantidad de retículo endoplasmático rugoso (asteriscos amarillos en Fig. 16i). En las imágenes del Grupo Recombinante-CCl_4 (Fig. 16m-p) se observa daño hepático principalmente del tipo esteatosis microvesicular, en la zona 2.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

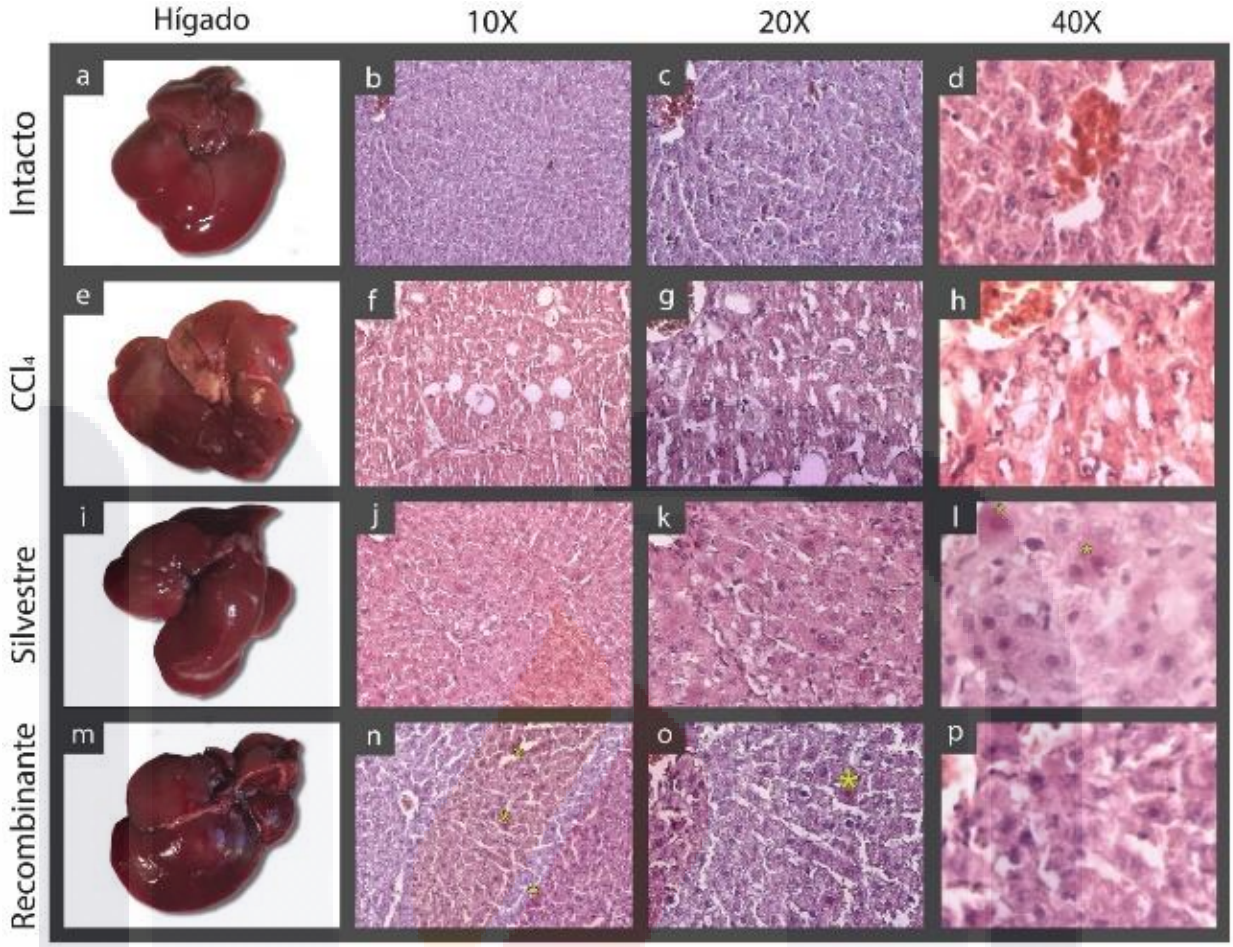

Figura 16. Análisis macroscópico y microscópico de la lesión hepática. Grupo Intacto (a-d). Grupo CCl_4 (e-h). Grupo Silvestre-CCl_4 (i-l). Grupo Recombinante-CCl_4 (m-p). Hematoxilina y eosina. 10X, 20X, 40X.

Los tejidos hepáticos teñidos con rojo sirio y observados bajo el microscopio de luz polarizada muestran en el grupo Intacto una arquitectura histológica normal con colágeno tipo III, por el contrario, en el grupo administrado con CCl_4 fue evidente el predominio de la birrefringencia rojiza (colágeno Tipo I) sobre una verdoso-amarillenta (colágeno Tipo III); indicativa de lesión fibrótica, con predominio de estos depósitos de colágeno alrededor de vasos sanguíneos. Por otra parte, en los grupos tratados con *L. lactis* silvestre y recombinante se observa disminución significativa de fibras de colágena (Figura 17).

Para corroborar el grado de fibrosis, se realizó el análisis morfométrico del parénquima hepático de todos los grupos (Figura 18), lo anterior evidenció el aumento de las fibras de colágena en el Grupo CCl_4, el cual fue diferente significativamente comparado con el grupo Intacto (***$p<0.001$),

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a su vez, en los grupos tratados con *L. lactis* silvestre y recombinante, disminuyo el porcentaje de colágeno.

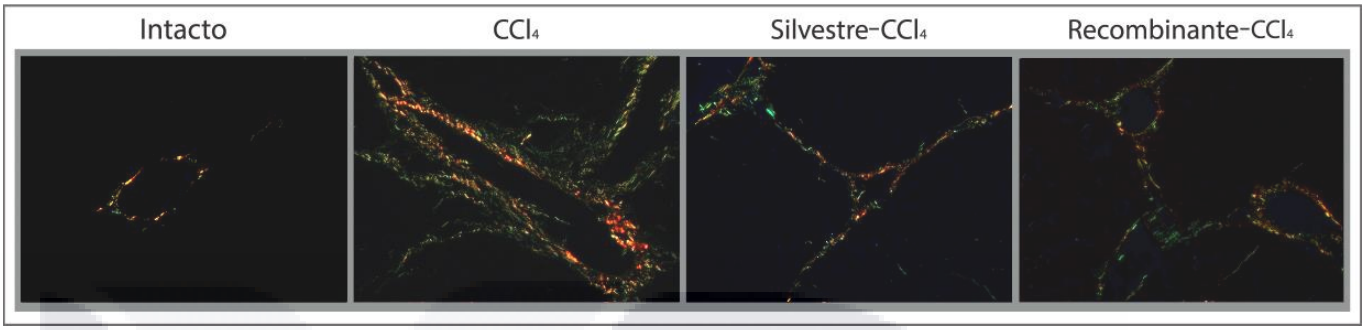

Figura 17. Tinción rojo sirio para fibras de colágeno tipo I y III. Grupo Intacto. Grupo CCl_4, Grupo Silvestre- CCl_4. Grupo Recombinante-CCl_4. Rojo sirio. 20X.

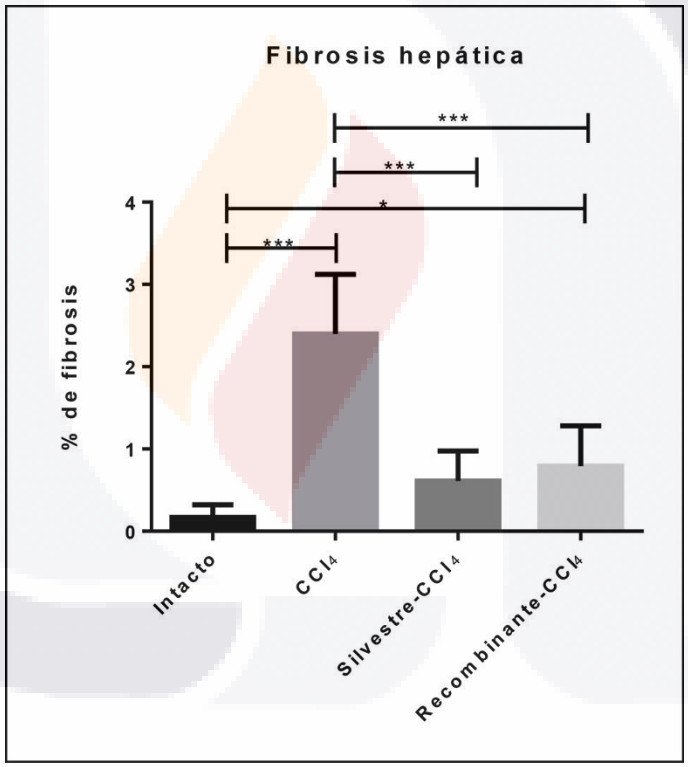

Figura 18. Porcentaje de fibrosis hepática. Grupo Intacto**.** Grupo CCl_4, Grupo Silvestre- CCl_4. Grupo Recombinante-CCl_4. Los valores se representan como la media ± SD. * $p < 0.05$.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.2 ***Función Hepática.***

La función hepática fue evaluada por medio de diferentes elementos bioquímicos (Figura 19). Las cantidades séricas de: albúmina, bilirrubina, glucosa y proteínas totales, no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se observó aumento plasmático de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) durante el tratamiento con CCl_4. En la cuantificación de la ALT los grupos tratados con *L. lactis* silvestre y recombinante se observó disminución de esta enzima indicadora de daño hepático, presentando una diferencia significativa con el grupo CCl_4 (***$p<0.001$), esto indica que estos tratamientos inducen mejoría de la función hepática. Con relación a la cuantificación de la AST, ésta presenta un comportamiento similar respecto a ALT. La urea se forma principalmente en el hígado como un producto final del metabolismo de las proteínas; en el grupo CCl_4 se observó disminución significativa respecto al control (*$p<0.05$); mientras que en los grupos Silvestre-CCl_4 y Recombinante CCl_4, tuvieron cantidades muy similares al control.

La recuperación cuantitativa de las enzimas de funcionamiento hepático valoradas correlaciona con la mejoría histológica que se describió anteriormente. (Figura 16).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

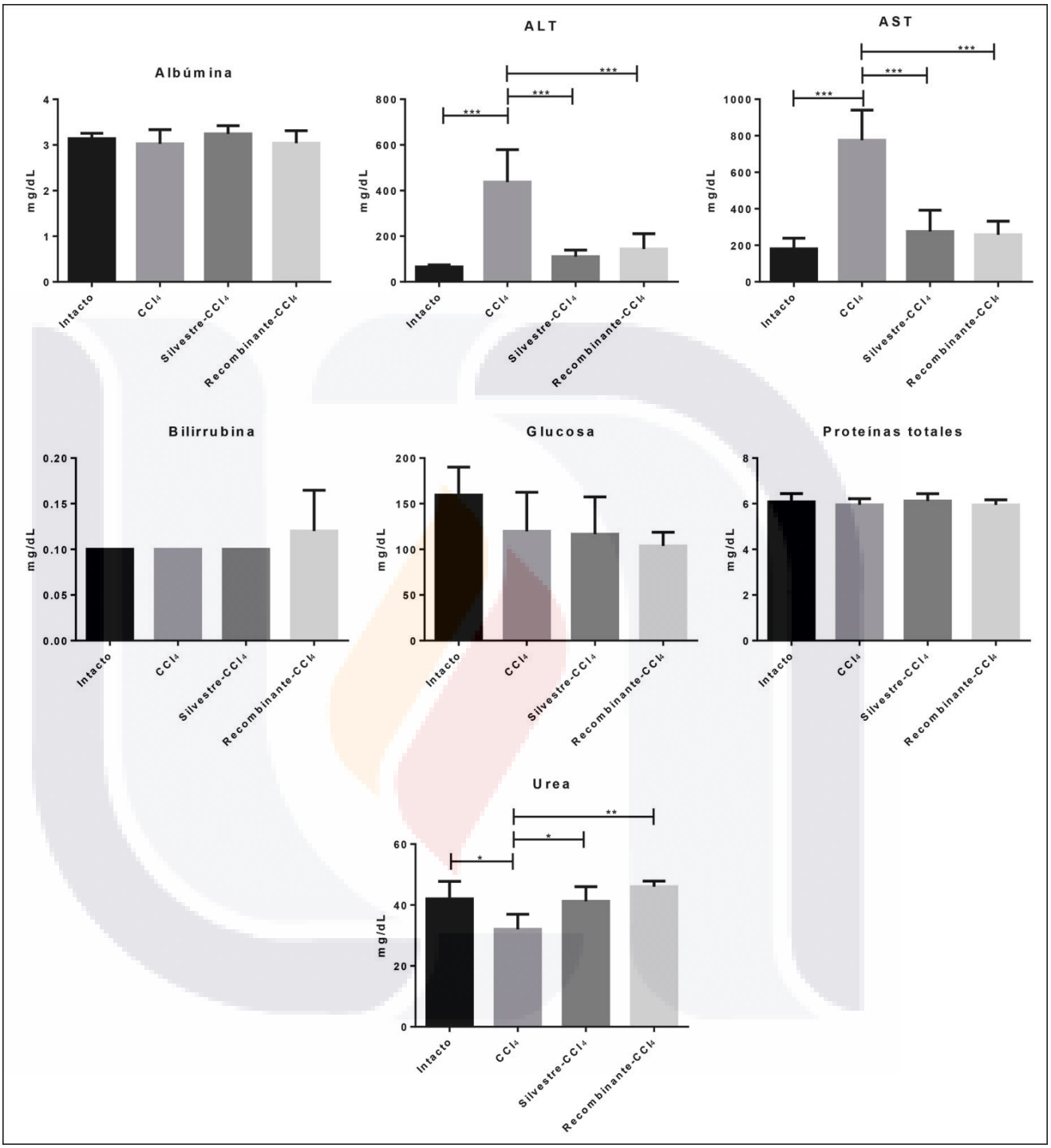

Figura 19. Cuantificación de diferentes marcadores del perfil hepático. Albúmina. ALT (Alanino aminotransferasa). AST (Aspartato aminotransferasa). Bilirrubina. Glucosa. Proteínas totales. Urea. Los valores se representan como la media ± SD. * p <0.05.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.3 Análisis histopatológico de Placas de Peyer

El reconocimiento específico de microorganismos comensales se produce en los ganglios linfáticos mesentéricos (Macpherson AJ & Uhr T. 2004). La mayoría de los antígenos o agentes infecciosos penetran en el cuerpo a través de las mucosas, que incluye el revestimiento de la superficie de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. En estas superficies mucosas, el moco representa la primera barrera contra la entrada de microorganismos, mientras que el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), como las placas de Peyer intestinales, son sitios críticos para ejercer una respuesta inmune protectora eficiente. Estas razones hacen atractivas para el estudio de esta porción de intestino delgado (íleon).

Se realizaron cortes transversales de la porción terminal del íleon en donde se aprecian cúmulos de tejido linfático (nódulos linfáticos) que recubren la lámina propia. El Grupo Silvestre-CCl_4 mostró alrededor de 8 nódulos en una sola porción de tejido, sin embargo, en los Grupos Intacto (a), CCl_4 (b) y Recombinante-CCl_4 (d) (Fig. 20), mostraron un promedio de 3 nódulos, siendo estos de menor tamaño. Para corroborar esto, se realizó un análisis morfométrico en cual no se apreció diferencia significativa entre ningún grupo, sin embargo, el Grupo Silvestre-CCl_4 (c) morfológicamente fue el que tuvo mayor área de estos nódulos (Figura 21).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

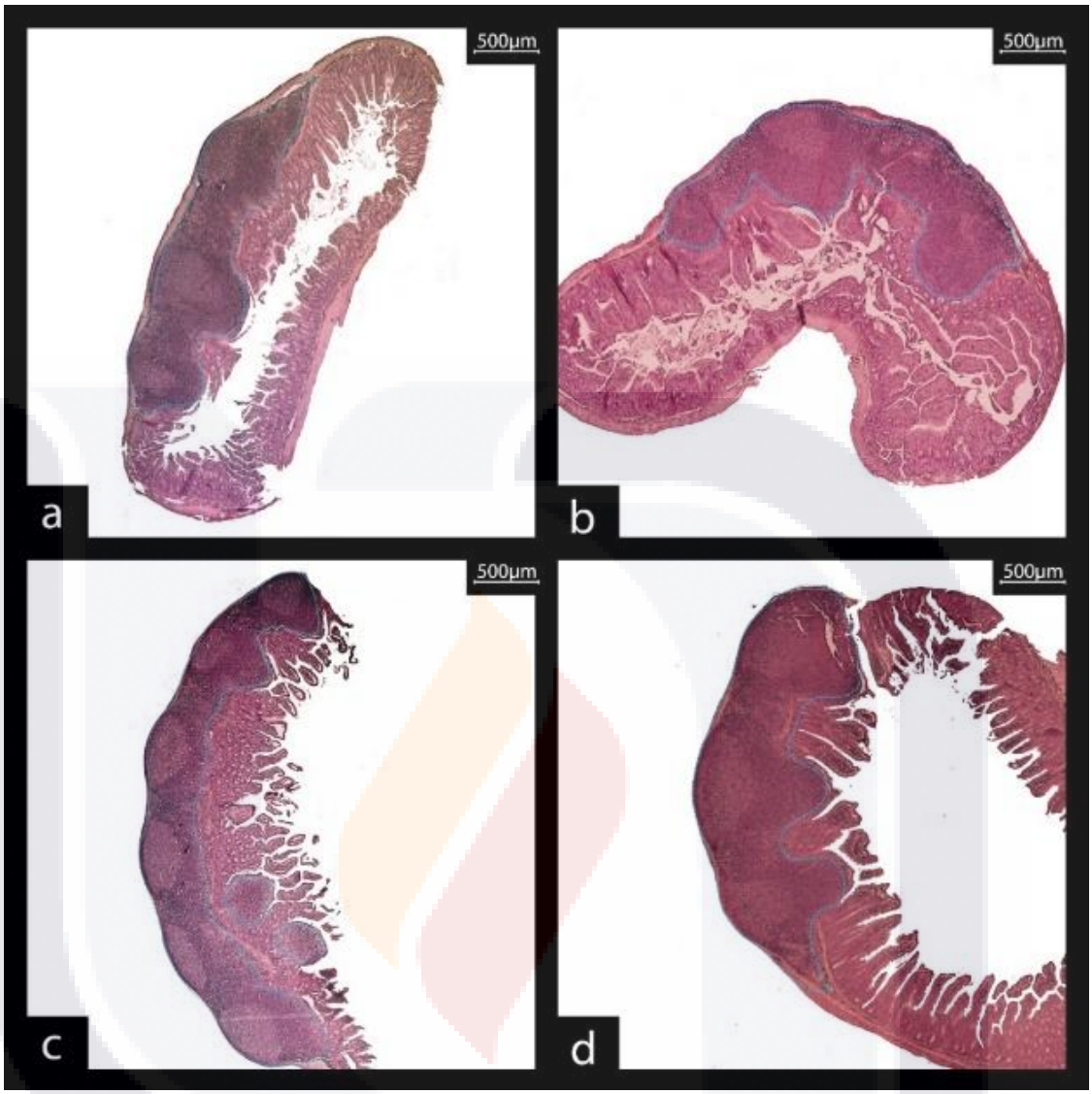

Figura 20. Placas de Peyer. a) Intacto. b) CCl_4. c) Silvestre-CCl_4. d) Recombinante-CCl_4. Hematoxilina y eosina. 2.5X.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

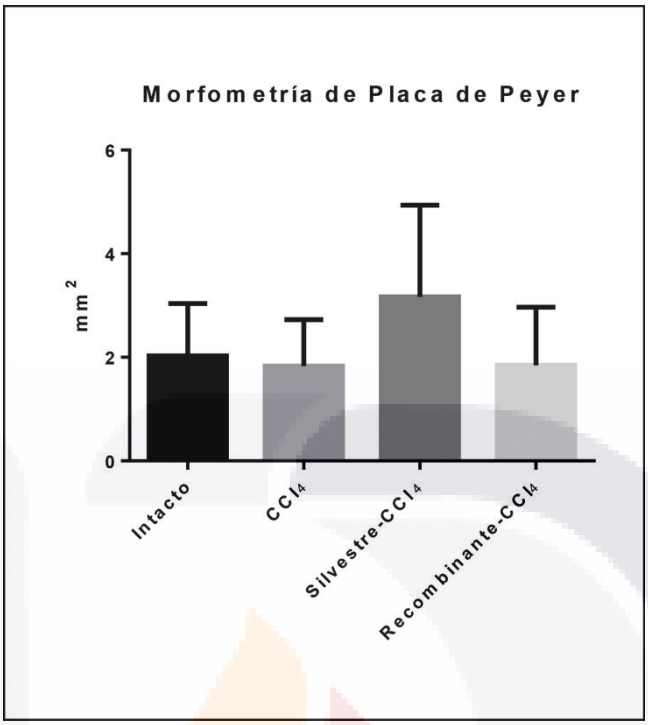

Figura 21. Morfometría de Placas de Peyer. Intacto. CCl_4. Silvestre-CCl_4. Recombinante-CCl_4. Los valores se representan como la media ± SD. * $p < 0.05$.

*4.4 **Análisis histopatológico de Ciego***

El microbioma humano se define como el genoma colectivo de los más de mil tipos de microorganismos que viven en asociación con el cuerpo humano, la gran mayoría de los cuales residen en el intestino distal (US National Institutes of Health. 2016. Gordon JI. *et al.*, 2015). Este sistema ecológico interactúa con los órganos internos y externos, factores que ayudan a mantener la salud general del individuo (Moraes-Filho JP. & Quigley EM. 2015). Se realizaron cortes transversales de la porción ascendente del colon, conocida como ciego (Figura 22). En la cuales se pudo apreciar una histología normal en el grupo control, sin embargo, el tejido del colon del Grupo CCl_4, presentó infiltrado celular (cabezas de flechas amarillas) en la región de la capa mucosa. Este infiltrado se vio disminuido en los grupos tratados con las cepas tanto silvestre como recombinante.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

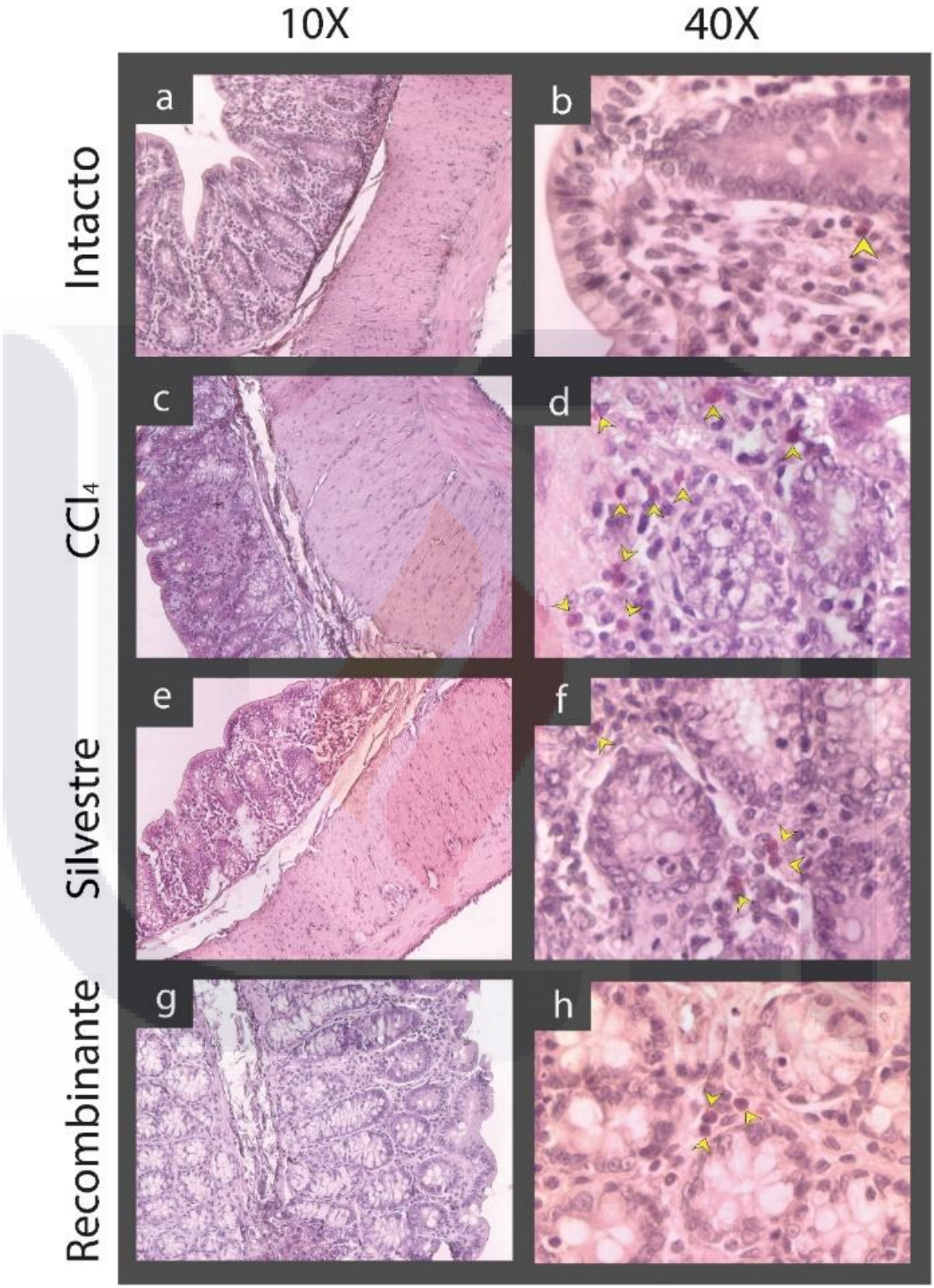

Figura 22. Evaluación histológica del ciego. a) Intacto. b) CCl_4. c) Silvestre-CCl_4. d) Recombinante-CCl_4. Hematoxilina y eosina. 10X y 40X. Puntas de flecha amarillas indican infiltrado celular.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.5 ***Evaluación de marcadores inflamatorios y fibrogénicos en hígado por qPCR***

Se procedió a evaluar un marcador proinflamatorio (IL-1β) y dos antiinflamatorios (IL-10 y FOXP3) en tejido hepático (Figura 23).

El factor de transcripción FOXP3 aumentó en los grupos a los que se les administro CCl_4. El grupo Silvestre-CCl_4 tuvo mayor nivel de expresión, teniendo diferencia estadística con todos los grupos. La expresión de IL-1β se elevó en el grupo CCl_4, respecto al control. Por otro lado, los grupos Silvestre-CCl_4 y Recombiante-CCl_4, disminuyeron la expresión de IL-1β (Fig. 23).

Para la evaluación de la expresión de IL-10 en tejido hepático no hubo diferencias significativas en ningún grupo experimental (Fig. 23).

De igual manera se evaluaron el marcador fibrogénico TGF-β y la cantidad de colágeno (Figura 24). TGF-β es un agente fibrogénico importante en la lesión hepática, debido a que estimula la quimiotaxis de las células estelares activadas a miofibroblasto, aumentando los depósitos de matriz extracelular y la expresión de colágeno. Su expresión se vio aumentada en el grupo CCl_4 comparada con el control. Por el contrario los grupos tratados con las cepas silvestre y recombinante la expresión es mínima.

Para el marcador colágeno, el grupo que tuvo la mayor expresión fue el CCl_4. Por otro lado los grupos Silvestre-CCl_4 y Recombinante-CCl_4, lograron disminuir la expresión de esta proteína (Fig. 24). Esto concuerda con lo visto en la evaluación histológica con la tinción rojo sirio (Fig. 17).

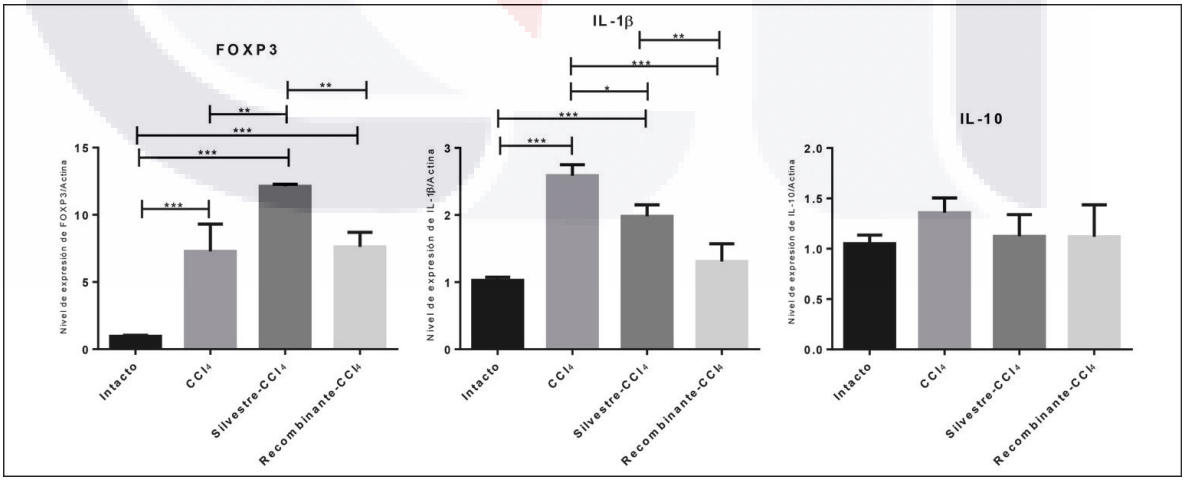

Figura 23. Evaluación de marcadores inflamatorios en hígado. FOXP3. IL-1β. IL-10.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

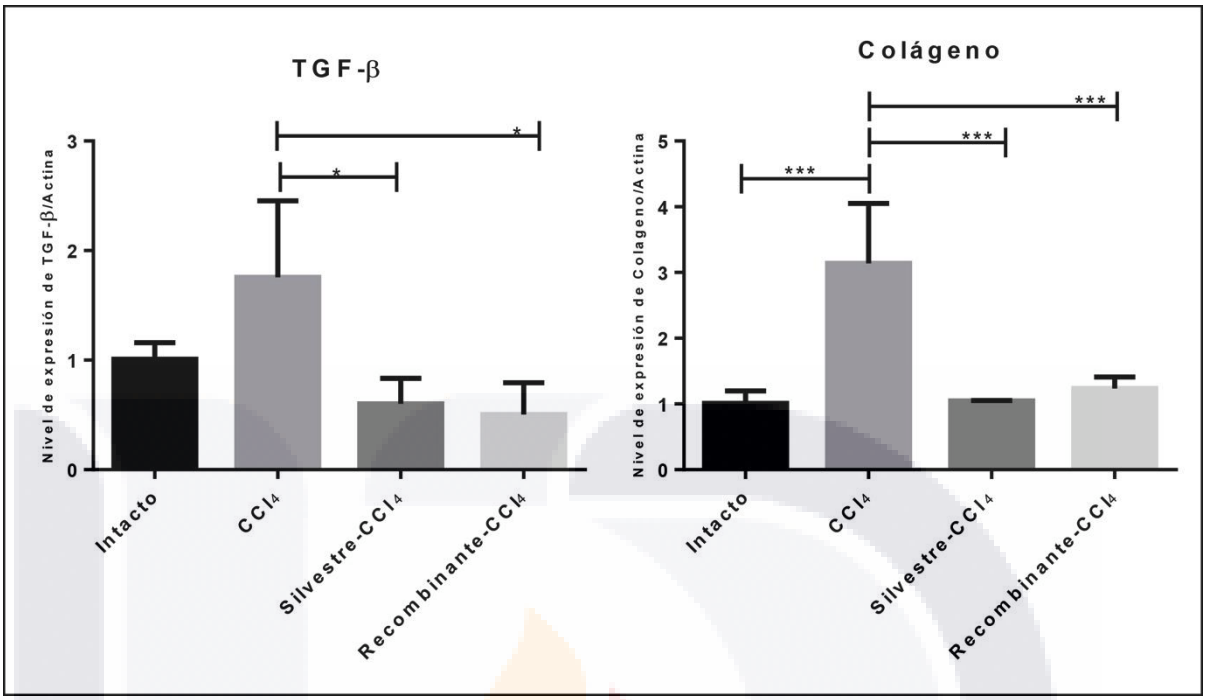

Figura 24. Evaluación de marcadores fibrogénicos en hígado. TGF-β. Colágeno.

4.6 ***Evaluación de marcadores inflamatorios en intestino delgado por qPCR***

Se procedió a evaluar la citocina IL-10, el receptor de IL-22 (IL-22R) y los factores de transcripción FOXP3 y ROR en tejido intestinal (íleon) (Fig. 25).

La IL-10 es una citocina que posee potentes propiedades antiinflamatorias, debido a que reprime la expresión de citocinas inflamatorias como TNF-α, IL-6 e IL-1 producidas por macrófagos activados durante la lesión hepática (Williams LM *et al.*, 2004). La expresión de IL-10 fue mínima en el grupo Intacto y CCl_4. Sin embargo, para los grupos tratados con la cepa *L. lactis* tanto silvestre como recombinante, esta citocina se vio expresada a nivel intestinal. Siendo el grupo Silvestre el que posee mayor expresión. Pudiendo especular que la cepa en su estado silvestre es capaz de estimular la producción de IL-10. Para el caso de la cepa recombinante secretora de IL-22, biológicamente activa, debido a que tiene la capacidad de estimular la producción de IL-10 (Loera *et al.*, 2014), se pudo comprobar en un modelo *in vivo*.

La expresión del receptor de IL-22 (IL-22R) tuvo un comportamiento similar al de IL-10 en intestino, siendo mínimo en los grupos Intacto y CCl_4, y aumentando en los grupos Silvestre-CCl_4 y Recombinante-CCl_4.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para el factor de transcripción FOXP3 su expresión fue mínima en los grupos Intacto, CCl_4 y Silvestre-CCl_4. Por el contrario el grupo Recombinante-CCl_4 elevó el nivel de expresión de este factor de transcripción teniendo diferencia estadística con los demás grupos de experimentación.

El factor de transcripción ROR tiene como función promover la inmunidad protectora contra las bacterias y hongos extracelulares, principalmente en las superficies de las mucosas. También promueve enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Es generado en presencia de TGF-β e IL-6 y/o IL-21 y mantenido por IL-23 e IL-1. Las moléculas efectoras secretadas son IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, CCL20 (Dong C. & Martínez G. 2010). Para este factor de transcripción sus niveles de expresión fueron mínimos para los grupos Intacto, CCl_4 y Recombinante-CCl_4. Por el contario para el grupo Silvestre-CCl_4 los niveles se elevaron teniendo diferencia estadística con los demás grupos experimentales. Este factor tiene relación con IL-22, lo cual tiene relación con la expresión de IL-22R en el grupo Silvestre-CCl_4.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

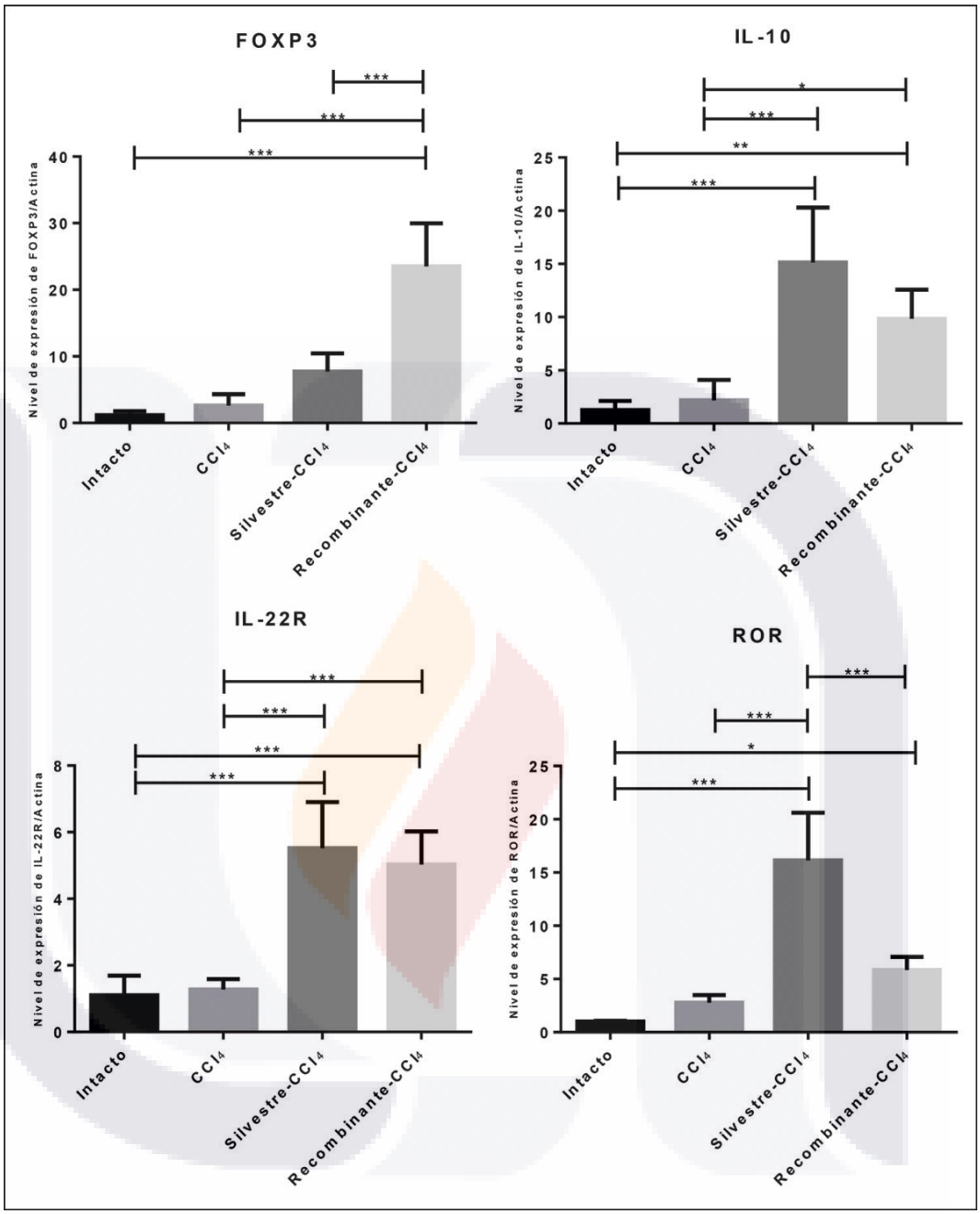

Figura 25. Evaluación de marcadores inflamatorios en intestino delgado. IL-10. IL-22R. FOXP3. ROR.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.3 Inmunohistoquímica para detección de células intestinales positivas para IL-22

La expresión de IL-22 proporciona efectos protectoras del tejido directo sobre varias células diana no hematopoyéticas durante los procesos inflamatorios (Hammerich & Tacke. 2014). Esta citocina participa en la defensa antimicrobiana, la regeneración y la protección contra daños, desempeñando un papel clave en la inmunidad innata (Sonnenberg *et al.,* 2011). Se evaluó la detección de células intestinales (íleon) positivas para IL-22 en los diferentes grupos experimentales, en donde todos los grupos tuvieron resultados positivos, presentando una mayor incidencia hacia la luz intestinal en la porción mucosa del intestino (Fig. 26). Este dato se constató por medio del conteo de células positivas para IL-22 por mm^2 (Fig. 27), en donde el grupo tratado con la cepa Recombinante (pSec: hIL-22) fue la que tuvo mayor cantidad de células positivas (aproximadamente 40 células/mm^2) teniendo diferencia significativa con todos los demás grupos experimentales (***$p<0.0001$). Por otro lado, el grupo intacto y el grupo Silvestre-CCl_4 poseen la misma cantidad de células positivas para esta citocina (aproximadamente 15 células/mm^2). Sin embargo, este valor se vio disminuido en el grupo CCl_4 (10 células/mm^2).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

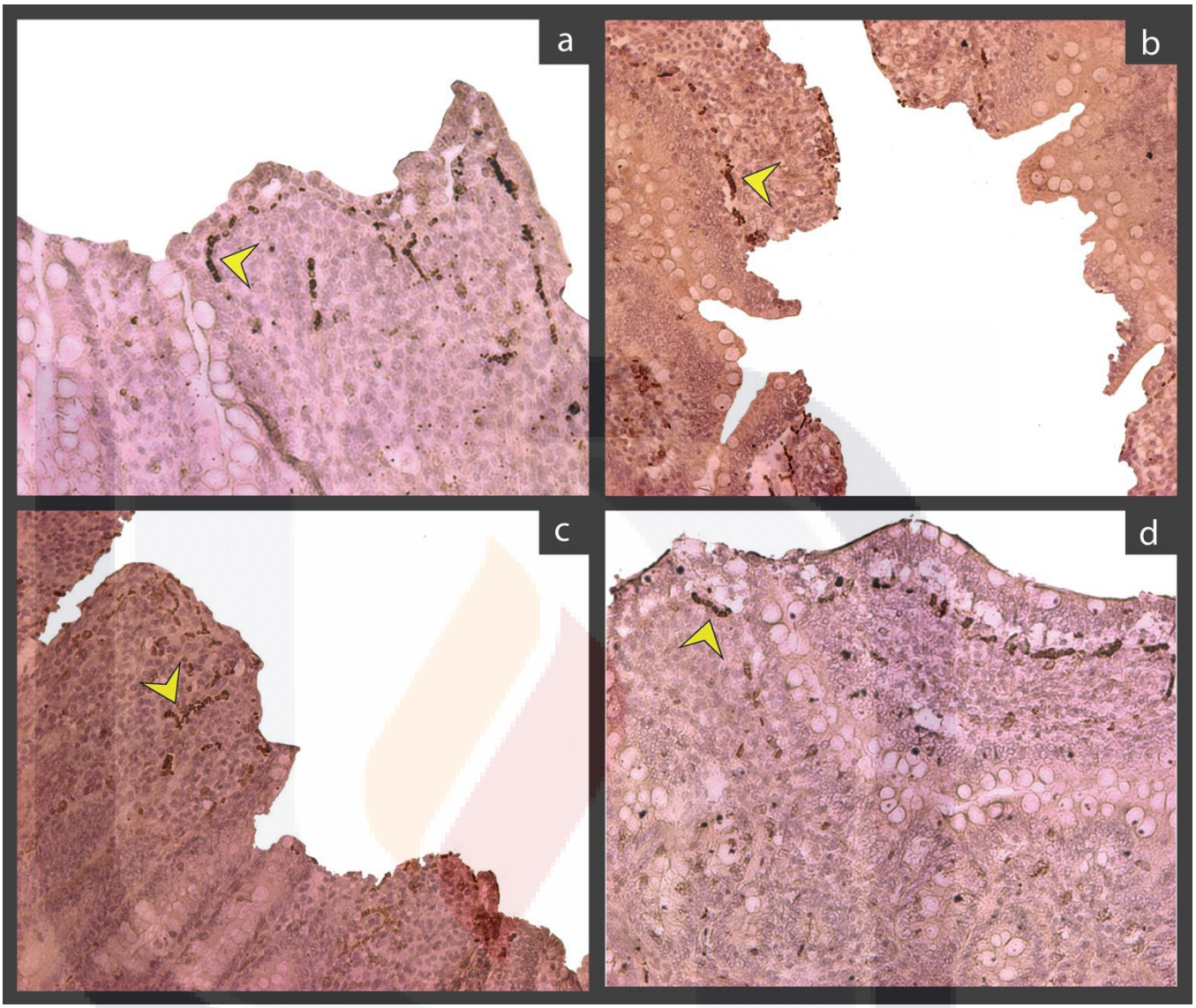

Figura 26. Inmunohitoquímica para detección de células de la mucosa intestinal postivas para IL-22. A) Intacto b) CCl_4 c) Silvestre-CCl_4 d) Recombinante-CCl_4. 10X.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

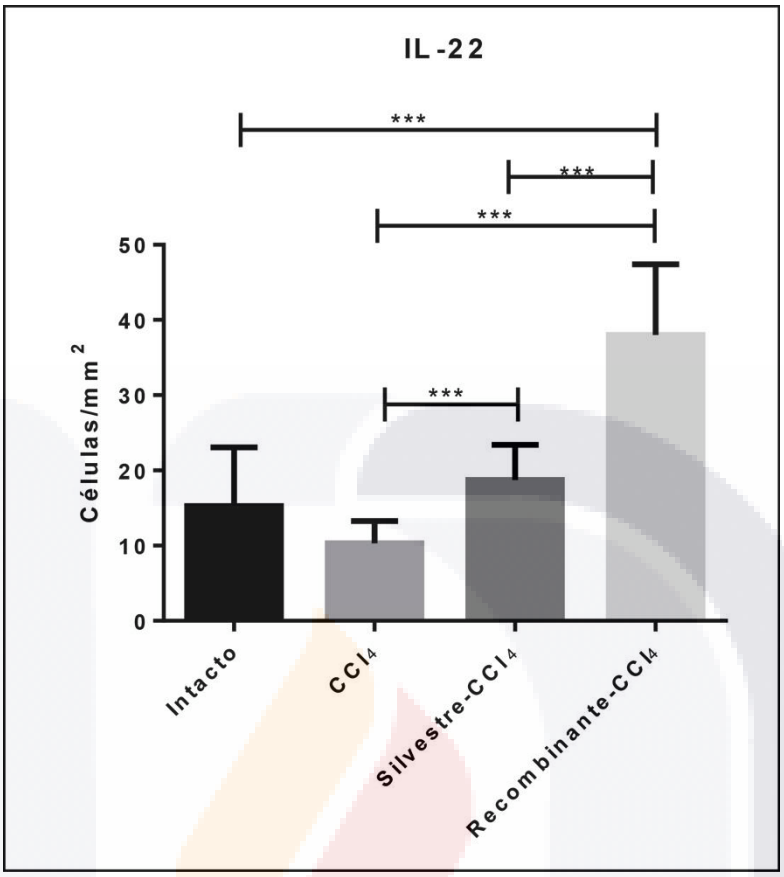

Figura 27. Conteo de células positivas para IL-22 por mm^2 en tejido intestinal.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

5. Discusión

En la actualidad el estudio de la manipulación positiva del microbioma intestinal mediante la introducción de microorganismos benéficos, conocidos como probióticos, es un área activa de investigación (Plaza J. *et al*., 2014). Al mismo tiempo, se han estudiado xenobióticos capaces de inducir hepatotoxicidad, afectando las funciones del órgano, su disposición estructural y sus propiedades bioquímicas. En el trabajo llevado a cabo analizamos los efectos preventivos y protectores de *L. lactis*, organismo LAB, sobre la lesión hepática provocada por CCl_4 en un modelo de rata macho Wistar.

Fue evidente el efecto inhibidor que presenta la cepa bacteriana *L. lactis*, tanto en un estado silvestre (NZ9000) como recombinante (pSec: hIL-22) sobre el proceso fibrogénico en el hígado ocasionado por el CCl_4, generando un proceso inmunomodulador en tejido intestinal y disminuyendo los depósitos de colágeno en el parénquima hepático. Este efecto es uno de los mecanismos que exploramos para establecer una metodología nueva sobre el tratamiento de una enfermedad que sabemos es de difícil tratamiento y aún no se tiene un esquema establecido para ello.

En primer lugar aprovechamos la interconexión fisiológica entre el tubo digestivo y la funcionalidad hepática a través del sistema portal hepático, como sabemos eso representa un amplio mecanismo de comunicación a través de la vía sanguínea entre el intestino y el hígado (Jaramillo J. *et al.,* 2006), varios trabajos han fundamentado que en el intestino grueso existe en mayor concentración la microbiota intestinal (US National Institutes of Health. 2016); y que la funcionalidad de ésta repercute en la salud sistémica del individuo (Gordon JI. *et al.* 2015), aprovechando esta relación fisiológica, exploramos esta comunicación para inducir una reducción del daño hepático, con el fin de minimizar o evitar por completo el proceso fibrogénico ocasionado por el CCl_4.

El CCl_4, al ser metabolizado se transforma en un radical triclorometilo que reacciona con oxígeno molecular para formar el radical triclorometil peroxilo altamente tóxico; este radical libre interrumpe los ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos de la membrana causando la ruptura de las estructuras de la membrana, lo que lleva a la interrupción de los procesos de energía celular y la síntesis de proteínas, lo que conduce a la peroxidación lipídica en las células hepáticas (Weber L. *et al.,* 2003).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En el estudio histopatológico llevado a cabo (Fig. 16 e-h), la sección del hígado de las ratas administradas con CCl_4 se caracterizó por necrosis, infiltración de leucocitos y esteatoatosis macrovesicular. Se ha documentado que el metabolismo de CCl_4 en sus radicales libres, el triclorometilo y peroxi triclorometilo, producen efectos hepatotóxicos, como fibrosis, esteatosis, necrosis y hepatocarcinoma (Fang H.L. & Lin W.C., 2008). La lesión hepática se redujo notablemente por los tratamientos NZ9000 (Figs. 16i-l) y pSec: hIL-22 (Figs. 16m-p). Este hallazgo implica que la ingesta de *L. lactis* tiene el desafío de proteger el tejido hepático de la lesión ocasionada por el CCl_4, sin embargo, los mecanismos de acción aun no están bien definidos. El tratamiento preventivo y protector de *L. lactis* puede reparar y proteger el tejido hepático estabilizando la membrana y evitando la filtración de enzimas intracelulares, esto se constata con las pruebas de funcionamiento hepático (Fig. 19). La lesión hepática generalmente se manifiesta por la elevación sérica de la ALT y AST. En una lesión de tipo crónica, el proceso inflamatorio está caracterizado por un aumento de citocinas proinflamatorias y profibrogénicas; si este proceso de daño no se detiene, se generan depósitos de proteína de la matriz extracelular anormales, ocasionando fibrosis, aunado a muerte hepatocitaria y disminución de las funciones metabólicas del órgano.

En cuanto al efecto benéfico de *L. lactis* administrada oralmente sobre la toxicidad de CCl_4, Hamed H. y colaboradores (2017) realizaron un estudio agudo de leche de camello fermentada por *L. lactis* subsp. *cremoris* sobre la cardiotoxicidad inducida por CCl_4 en ratones, en el cual se evidenció que un pretatramiento de 15 días de administración oral de esta leche revertía los daños histológicos ocasionados por esta hepatotoxina. Además, Hamed H. y colaboradores (2018) demostraron que los daños histológicos renales ocasionados por la lesión aguda de CCl_4 fueron revertidos en gran parte por el pretratamiento con leche fermentada de camello inoculada con *L. lactis* subsp. *cremoris*, el cual redujo notablemente la necrosis glomerular y tubulointersticial, la fragmentación de los glomérulos y la ampliación del espacio de Bowman. Comparando estos resultados con los nuestros, el CCl_4 también causo daño en tejido hepático, como se aprecia en la figura 16 e-h, este daño se vió disminuído por el tratamiento por *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22). Estas propiedades convierten a *L. lactis* en un producto adecuado para la prevención del daño hepático, cardíaco y renal.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante la lesión hepática recurrente la activación de las CEH conlleva a la producción de colágeno. Diferentes estímulos deben de ocurrir para que se lleve a cabo la síntesis y depósito de esta proteína, siendo la producción de citocinas inflamatorias de vital importancia, entre ellas la IL-1β, así mismo esta activación de las CEH se lleva a cabo gracias al reclutamiento de células de Kupffer y a la producción de TGB-β, citocina con propiedades fibrogénicas, debido a estas razones analizamos por histología, morfometría y qPCR, estos tres marcadores (colágeno, IL-1 y TGB- β), entre otros.

La tinción rojo sirio evidenció depósitos de colágeno en el parénquima hepático, con bandas anchas en el grupo CCl_4, por otro lado los animales tratados con *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22) disminuyeron este grosor, atenuando los depósitos de colágeno (Fig. 17). Gracias al estudio morfométrico se corroboró lo antes mencionado, en donde el grupo con mayor cantidad de colágeno fue el CCl_4 (***$p<0.001$), comparándolo con el control (Fig. 18). Este porcentaje se vió disminuído gracias a la administración de *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22). En estudios anteriores, D'Argenio y colaboradores (2013) examinaron los efectos de una formulación simbiótica en un modelo experimental de fibrosis hepática inducida por CCl_4 en ratas. El producto simbiótico fue una mezcla de una cepa probiótica (*L. paracasei* B21060) con L-glutamina, arabinogalactano y xilo-oligosacáridos como prebióticos. En tal estudio las actividades séricas ALT y AST, así como la histología hepática y el depósito de colágeno disminuyeron en ratones fibróticos con la mezcla simbiótica en comparación con los del grupo placebo; estos autores explican que el mecanismo por el cual generó una mejoría de los depósitos de colágeno fue mediante la normalización de los niveles séricos de la citocina proinflamaoria TNF-α y una mejoría significativa de los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Por otro lado, Simonian y cols. (2010) administraron oralmente IL-22 en un modelo murino, esta administración proporcionó una protección contra la fibrosis pulmonar. La senescencia de CEH activadas puede limitar la respuesta fibrogénica y es una forma de controlar la activación de CEH, sin embargo, los mecanismos por los que se regula la senescencia de CEH permanecen ampliamente desconocidos. Recientemente, Kong X. y cols. (2012) demostraron que la administración exógena de IL-22 mejora la fibrosis hepática en un modelo murino de fibrosis hepática inducida por CCl_4, en este estudio el tratamiento con IL-22 aumento el número de CEH positivas a la beta-galactosidasa asociadas con la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

senescencia. Añadiendo, estos autores demostraron que las CEH expresan altos niveles de IL-10R2 e IL-22R1, generalmente se piensa que este último se expresa exclusivamente en células epiteliales.

El CCl_4 condujo a cambios metabólicos severos en el hígado de los animales de experimentación (Fig. 19), como lo demuestra un aumento significativo de los niveles plasmáticos de ALT y AST en el grupo CCl_4 en comparación con el grupo Intacto (***$p<0.001$). ALT y AST se distribuyen principalmente en las células hepáticas y cuando las membranas de las células hepáticas se dañan o sufren necrosis, estas enzimas entran en el suero en grandes cantidades (Ying W. *et al*., 2016). Por otro lado, este nivel disminuyó en los grupos administrados con *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22). Este dato puede ser comparado con estudios anteriores, en donde *L. lactis* restauró los niveles de ALT en un 40% en tejido cardíaco, comparados con el grupo CCl_4, posiblemente a través de la reducción de los daños oxidativos inducidos por CCl_4 (Hamed H. *et al*. 2017). Scheiermann P. y cols. (2013) demostraron en un estudio *in vivo* que la administración intravenosa profiláctica de IL-22 redujo significativamente los niveles séricos de ALT y el daño histopatológico en la lesión hepática inducida por acetominofen, atribuyendo esta mejora a las cualidades que posee esta citocina como es el aumento proliferativo de hepatocitos. Recopilando, la cepa en su estado silvestre pudiese tener efectos antioxidantes que repercutan en una mejora metabólica hepática y aunado a esto, la modificación genética de la bacteria la hace capaz de secretar IL-22, pudiese beneficiar en el aumento del número de hepatocitos.

En el presente estudio se administró un pretratamiento de 2 semanas y un posterior tratamiento de 4 semanas de *L. lactis* silvestre (NZ900) y recombinante (pSec: hIL-22) vía oral. Los antígenos administrados oralmente interactuaron con el tejido linfoide asociado a mucosas, que es una red inmunitaria bien desarrollada. La captación de antígenos ocurre a través de un sistema especializado que incluye las células epiteliales membranosas (M) que recubren folículos linfoides de las placas de Peyer, que es el sitio principal de la respuesta inmune intestinal que involucra macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B (Sung H. *et al.,* 2016). Se realizaron tinciones H&E de las Placas de Peyer (Fig. 20), a las que posteriormente se les analizó morfometricamente (Fig. 21) y molecularmente (Fig. 25).

Las figuras 20 y 21 muestran el análisis histológico y morfométrico realizado a las placas de Peyer, respectivamente. La morfometría demostró que no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales. Esto quiere decir que el daño hepático causado por la inyección

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

intraperitonial de CCl_4 no modificó el número de placas de Peyer presentes en el íleon. Por otro lado, Sung H. y cols. (2016) realizaron un estudio donde se administró una dosis alta del antibiótico kanamicina vía oral a ratones (1,000 mg por día durante siete días consecutivos), demostrando que el número de estructuras de placas de Peyer en los animales tratados con kamanicina disminuyó significativamente en comparación con el grupo control; como tratamiento emplearon diferentes cepas LAB (E20, L84, M49, HY8301) vía oral, estos animales tenían un número comparable de estructuras de placas de Peyer como los ratones del grupo control, sin embargo, no eran totalmente similares, pero si mayores a las del grupo kanamicina. Esto se pudiese explicar debido a que el ~~daño~~ tratamiento implementado en nuestro estudio, no fue ~~directo~~ dañino al tejido intestinal, por ende no se modificó la histología ni morfometría de las placas de Peyer.

El hígado y el tracto gastrointestinal poseen una estrecha relación anatómica y funcional (Jaramillo J. *et al.*, 2006). La interacción entre los dos órganos, ya sea en un estado sano o enfermo, incluye la transferencia de moléculas al hígado (Sharma V. *et al*., 2013). Después de la lesión hepática, la secreción de bilis puede verse alterada por el eje del hígado del intestino; esto reduce el suministro de sangre y la peristalsis en el intestino, lo que provoca la alteración de la mucosa intestinal y la alteración de la microbiota intestinal (Ley R. *et al*., 2006). Por lo tanto, examinamos los cambios histológicos en el intestino grueso durante la fibrosis hepática inducida por CCl_4 (Fig. 22). La tinción H&E de las porciones intestinales del ciego, muestran mínima infiltración de células inflamatorias en las ratas control (Figs. 22a-b). En el intestino de las ratas tratadas con CCl_4, se observó una infiltración celular inflamatoria significativa (Figs. 22c-d), por otro lado, los animales administrados con *L. lactis* NZ9000 y pSec: hIL-22 presentaron poca infiltración celular (Figs. 22e-h). Ma W. y colaboradores (2017) realizaron un estudio sobre la decocción de Xia-yu-xue, que consiste en tres medicamentos basados en una mezcla de hierbas (*Radix et Rhizoma Rhei*, *Semen Persicae* y *Eupolyphaga Seu Steleophaga*) sobre el daño intestinal y la fibrosis hepática ocasionada por el CCl_4 en ratones, en donde observaron el mismo patrón histológico en los intestinos. Con esto concluimos que el daño ocasionado por esta hepatotoxina afecta al intestino, reclutando células inflamatorias en la capa mucosa intestinal, y este daño se ve disminuido por la ingesta de *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22).

Las secreciones intestinales, como las hormonas, los mediadores inflamatorios y los productos de absorción digestiva, también afectan directamente la función hepática (Brandl K. *et*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

al., 2017). El microbioma intestinal, especialmente en el intestino grueso, comprende numerosos microorganismos que juegan un papel importante en la digestión de los alimentos y también en otros procesos importantes dentro del organismo (Barratt M. *et al.*, 2017) La evidencia sugiere que algunos componentes microbianos derivados del intestino activan la cascada inflamatoria de las células inmunes en el hígado y regulan la función y la respuesta de las células del parénquima hepático (Tilg H. *et al.*, 2016). Por lo tanto, es importante dilucidar por completo la relación entre la microbiota intestinal y la lesión hepática que podría conducir a cirrosis hepática. Por ende, se llevó a cabo el análisis de la expresión de diferentes marcadores tanto en intestino como en hígado, por medio de qPCR. Este tipo de estudios son necesarios para abordar la influencia que cumple *L. lactis* como probiótico en la expresión génica de diferentes vías, particularmente las que están asociadas con la respuesta inmune, y para comprender mejor el papel que los probióticos podrían tener en la prevención y el tratamiento de la fibrosis hepática.

FOXP3 es un factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función de las células reguladoras T CD4+CD25+ humanas y murinas. FOXP3 ha sido definido por diversos autores como el gen maestro controlador del desarrollo y función de las células reguladoras y es considerado el principal marcador molecular, a la fecha, de esta subpoblación reguladora (González J. *et al.*, 2010). Este factor de transcripción fue evaluado en hígado e intestino delgado (íleon) (Figs. 23 y 25, respectivamente), en donde presentó comportamientos diferentes en cada tejido. En intestino, el grupo Recombinante-CCl_4 fue el único que presento diferencias significativas con todos los grupos experimentales (***$p<0.001$), por otro lado, los grupos intacto y CCl_4 su nivel de expresión fue mínimo, siguiéndole el grupo Silvestre-CCl_4. Pudiendo especular que la modificación genética de *L. lactis* pSec: hIL-22 indujo una sobreexpresión de este factor de transcripción en intestino. En un estudio reciente, evaluaron los efectos inmunomoduladores intestinales de *L. lactis* MG1363 en ratones sanos, con el fin de dilucidar los mecanismos que ejercen este probiótico en un estado de salud óptimo (Maaike J. *et al.*, 2013), en el cual observaron que las transcripciones de FOXP3 fueron bajas y no se vieron alteradas por el consumo de *L. lactis* MG1363. Comparando estos resultados podemos concluir que las cepas bacterianas poseen diferentes mecanismos dependiendo el entorno que los rodee, en este caso salud vs. enfermedad. Una propuesta del mecanismo acción es mediante la activación de diferentes factores de transcripción, en este caso particular, FOXP3. En hígado, FOXP3 se elevó en todos los grupos a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los que se les administro CCl_4, siendo más prominente este aumento en el grupo Silvestre-CCl_4, siguiéndole el grupo CCl_4 y por último el grupo Recombinante-CCl_4.

Nuestros resultados muestran que la administración de CCl_4 junto con el tratamiento preventivo y protector de *L. lactis* (NZ900 y pSec: hIL-22) en un modelo *in vivo*, disminuyeron significativamente los valores de expresión de IL-1β en tejido hepático, siendo más significativo en la cepa recombinante (pSec: hIL-22) (***$p<0.001$), respecto al grupo CCl_4. Sung H. y colaboradores (2016), realizaron un estudio con diferentes cepas LAB, en el cual lograron determinar que Lactobacillus y Bifidubacterium (E20, L84, 49 y HY8301) muestran un efecto protector frente a lipopolisacaridos en células Caco-2, con una exposición de 24 horas de tratamiento. La estimulación con los lipopolisacaridos aumentó significativamente la expresión de ARNm de tres factores inflamatorios TNF-α, IL-1β e IL-8, por otro lado, la administración de las bacterias LAB disminuyó estos valores. Creando la hipótesis de que las bacterias LAB, como *L. lactis*, poseen un efecto inmunomodular directamente en células intestinales como en tejidos distantes, sin embargo, los mecanismos por los cuales ejerce esta acción aún son desconocidos.

La citocina IL-10, fue evaluada en tejido intestinal (íleon) y en tejido hepático (Figs. 23 y 25). El nivel de expresión de IL-10 en íleon fue mínimo en los grupos Intacto y CCl_4; por otro lado, los grupos administrados con *L. lactis* NZ9000 y pSec: hIL-22 aumentaron el nivel de expresión de esta citocina, teniendo mayor significancia en el grupo Silvestre-CCl_4 (*L. lactis* NZ9000). Estos datos contrastan con los autores Maaike J. y colaboradores (2013) en donde las transcripciones de IL10 fueron bajas y no fueron alteradas por la administración de *L. lactis* MG1363 a ratones sanos.

El nivel de expresión de IL-10 en hígado, no presentó diferencias significativas en ningún grupo, presentando gran similitud todos los grupos problema con el grupo control. Esto quiere decir que esta citocina está activa a nivel intestinal pero no a nivel hepático en los animales que recibieron *L. lactis*. En estudios anteriores, el empleo de una formulación simbiótica del probiótico *L. paracasei* B21060 con L-glutamina, arabinogalactano y xilo-oligosacáridos en un modelo experimental de fibrosis hepática inducida por CCl_4 en rata, demostró que la administración de esta sustancia aumento los niveles de RNAm de IL-10 en las ratas fibróticas, en hígado (D'Argenio *et al*., 2013). Estos efectos sobre el sistema inmune dependen de la cepa y respalda la necesidad de seleccionar probióticos para grupos específicos de individuos con diferentes necesidades en lugar de la aplicación generalizada de probióticos para la prevención de cualquier tipo de trastorno.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Se evaluaron dos marcadores fundamentales para determinar el grado de lesión hepática causada por fibrosis, TGF-β y colágeno, por medio de qPCR. Como es sabido, el daño hepático recurrente conduce a una serie de eventos, comenzando con la estimulación de CEH quiescentes a un estado activado productor de colágeno, conocido como fibroblasto; volviendo a las CEH activadas más sensibles a la citocina TGF-β, considerada como la principal causal del proceso fibrogénico (Wick G. *et al.*, 2013). Estos dos marcadores tuvieron un comportamiento similar, en donde el grupo CCl_4 fue el que tuvo mayor nivel de expresión, tanto de TGF-β como de colágeno. Este nivel se vió disminuido por el tratamiento de *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22). Para el marcador TGF-β, la cepa *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22) disminuyó la expresión a un nivel mayor que el del grupo control; por otro lado, el marcador colágeno tuvo su mayor expresión en el grupo CCl_4, y este valor disminuyó en los grupos tratados con *L. lactis* (NZ9000 y pSec: hIL-22) igualando al grupo Intacto. Wei-Jen y colaboradores (2015) realizaron un estudio en hámsteres tratados con *Lactobacillus reuteri* GMNL-263, con dos diferentes dosis (625 y 3125 mg/kg-hámster/día) durante ocho semanas, alimentados con una dieta alta en grasas en cual concluyeron que este bacilo, reduce los efectos de la fibrosis hepática y cardíaca a través de la supresión de TGF-β. Ellos analizaron por medio qPCR y por tinción tricrómico de Masson los niveles de TGF-β y la presencia de colágeno, respectivamente; en donde lograron determinar que la dosis más alta de *L. reuteri* posee un mejor efecto, logrando disminuir los depósitos de colágeno y disminuyendo la expresión de TGF-β. Por ende, llegamos a la conclusión que *Lactococcus lactis* puede disminuir la expresión de TGF-β y con ello los depósitos de colágeno y la expresión del mismo se ven disminuídos.

Se evaluó la expresión del receptor del órgano relacionado con el receptor de ácido retinoico (ROR) en tejido intestinal de los diferentes grupos experimentales (Fig. 25). ROR controla la producción de IL-17A e IL-17F, y estas citocinas tienen un papel redundante pero altamente patógeno en la inflamación intestinal (Leeppkes *et al*., 2009). El nivel de expresión de ROR en intestino fue mínimo en los grupos Intacto y CCl_4, por otro lado, la expresión de este factor aumento gracias a la administración de *L. lactis* silvestre (NZ9000) de manera significativa (***$p<0.001$). Sin embargo, la cepa recombinante no tuvo el mismo comportamiento. Contrastando con los valores obtenidos para el factor de transcripción FOXP3 (Fig. 25), donde la cepa silvestre tuvo un nivel de expresión bajo, pero alto para la cepa recombinante. Por otro lado,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

la evaluación de FOXP3 en tejido hepático los niveles de expresión fueron similares entre las cepa silvestre y recombinante, y significativas debido a que la expresión fue mínima en el grupo Intacto (Fig. 23). Recordando que la lesión se generó directamente en tejido hepático y no en intestino, tal vez esa sea la razón por la cual los niveles de expresión son diferentes en cada tejido. Esto se puede explicar debido a que las células Th17 están estrechamente relacionadas con las células reguladoras T FOXP3, ya que se ha demostrado que ambos tipos de células requieren TGF-β para la diferenciación *in vitro* y que FOXP3 controla la diferenciación Th17 por interacción directa con RORγt (Zhou L. *et al.,* 2008). La eventual elección de linaje para generar RORγt + Tregs en lugar de células Th17 depende del metabolismo de la vitamina A en el ácido retinoico (AR), ya que la ausencia de vitamina A o la inhibición del receptor del AR, inclina la balanza a favor de un perfil Th17. Este autor propone que el AR, requerido en muchos procesos fisiológicos, es una "señal" usada por el sistema inmune para monitorear el estado de salud de un tejido. En el contexto del daño tisular, al producirse una infección o lesión, la producción de AR disminuye y el equilibrio entre RORγt + Tregs se desplaza a favor de un perfil de células Th17 (Elberl G. 2017).

Wang K. y colaboradores (2016) realizaron un estudio donde demostraron que *Lactobacillus casei* podría tener posibles implicaciones sobre la inflamación intestinal inducida por *Escherichia coli* enterotoxigénica, donde observaron que la expresión de ARNm y proteína de FOXP3 en el grupo tratado con la cepa *L. casei* fue mayor que en el grupo de enteritis, mientras que la expresión de ARNm y proteína de RORγt fueron significativamente más bajos ($p<0.05$). Sin embargo, después de que los ratones del grupo de enteririts se trataron con *L. casei,* se alivió la inflamación duodenal. Los autores mencionan que el posible mecanismo de acción es mediante la regulación del desequilibrio de la proporción de células Th17/Treg. Comparando con nuestros resultados, pudiese ser que la cepa en estado silvestre (NZ9000) a nivel intestinal este teniendo una regulación hacia un perfil Th17, pero se ve compensado a nivel hepático, en donde se está generando la lesión ya que aumenta la expresión de FOXP3.

Fue evaluada la expresión del receptor de IL-22 en tejido intestinal (Fig. 25), además se identificaron células positivas para IL-22 en el mismo tejido por medio de inmunohistoquímica (Fig. 26), para su posterior conteo morfométrico (Fig. 27). Los grupos Sivestre-CCl_4 y Recombinante-CCl_4 presentaron expresión de este receptor, teniendo diferencias significativas con el grupo Intacto y CCl_4 (***$p<0.001$). La presencia de células positivas para IL-22 fue

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

predominante en los animales tratados con la cepa recombinante, presentando mayor incidencia en la luz intestinal en la porción mucosa. La cepa recombinante empleada en el presente estudio, es capaz de expresar y secretar IL-22 humana biológicamente activa (Loera-Arias *et al*., 2014). Kong X. y colaboradores (2012) afirman que la sobreexpresión de IL-22 *in vivo* o el tratamiento con IL-22 *in vitro*, mediada por la unión a IL-22R1 y IL-10R2, promueve la proliferación de células progenitoras hepáticas a través de un transductor de señal y la activación del mecanismo dependiente de STAT3, lo que conduce posteriormente a una regulación positiva de una variedad de genes anti-apoptóticos (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) y mitogénicos (por ejemplo c-myc, ciclina D1, Rb2, CDK4), resultando en efectos hepatoprotectores. La sobreexpresión de IL-22, ya sea por orientación génica o por administración exógena, reduce la fibrosis hepática y acelera la resolución de la fibrosis hepática durante la recuperación. Los efectos anti-fibróticos de IL-22 están mediados a través de la activación de STAT3 en CEH y la posterior inducción del supresor de la señalización de citocina 3, que induce la senescencia de CEH (Kong X. *et al*., 2012). En conjunto, los efectos hepatoprotectores, mitogénicos y anti-fibróticos de IL-22 conllevan a la mejora de la lesión hepática. Destacan que debido a la expresión restringida de IL-22R1, se espera que la terapia con IL-22 tenga pocos efectos secundarios, haciendo de esta interleucina un candidato potencial para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

Nuestros resultados muestran que *L. lactis* tuvo un efecto anti-fibrosis, esto es probablemente a sus propiedades de adhesión al epitelio modificando la respuesta inmune local del hospedero (Schiffin *et al.*, 1997), probablemente estas sustancias tienen un efecto probiótico para modular el efecto inflamatorio que inicia en la mucosa del intestino grueso y hace su blanco en el hígado.

Las terapias futuras deberán tener como blanco la interacción del microbioma con otros órganos, para evitar tratamientos invasivos que conlleven un riesgo para la vida del paciente, el uso de *L. lactis* modificada genéticamente y en su forma silvestre, parecen ser una buena opción para tratar de disminuir los procesos inflamatorios en etapas tempranas de la lesión.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6. Conclusiones

- Se estableció un modelo de fibrosis hepática en rata a las 4 semanas por inducción con CCl_4 empleando una dosis de 50mg/kg.
- Se aplicó un tratamiento preventivo y protector vía oral con la cepa bacteriana *L. lactis*, en estado silvestre (NZ9000) y recombinante secretor de IL-22 (pSec: hIL-22).
- *L. lactis* NZ9000 y pSec: hIL-22, disminuyeron el daño hepático de los animales de experimentación ocasionado por la fibrosis hepática, el parénquima no se recuperó por completo pero hubo una mejoría considerable, lo que conllevo a una mejora en la función hepática.
- *L. lactis* NZ9000 y pSec: hIL-22, disminuyeron los niveles de expresión de la citocina proinflamatoria IL-1β, la citocina profibrogénica TGF-β y el colágeno a nivel hepático, corroborando a nivel histológico.
- La administración de *L. lactis* género un efecto inmunodulador a nivel intestinal para la IL-10, la cual se vió expresada en los animales de experimentación. Al mismo tiempo la cepa recombinante generó la sobreexpresión de FOXP3. La cepa silvestre generó la expresión de ROR, con una posible regulación hacia un perfil Th17, que se ve compensado a nivel hepático, en donde se expresa FOXP3.
- Los animales de experimentación tratados con *L. lactis* expresan el receptor de IL-22. La cepa recombinante tiene mayor incidencia en la cantidad de células positivas para IL-22 en intestino delgado.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

7. Bibliografía

1. Ahn M, Park JS, Chae S, Kim S, Moon C, Hyun JW, Shin T. (2014). Hepatoprotective effects of Lycium chinense Miller fruit and its constituent betaine in CCI4-induced hepatic damage in rats. Acta Histochem, 116, 1104-1112, 2014. DOI: 10.1016/j.acthis. 05.004
2. Akdis, M., Burgler, S., Crameri, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M. and Akdis, C. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), pp.701-721.e70.
3. Aujla SJ, Kolls JK: IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. J Mol Med (Berl) 2009, 87:451e454
4. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, et al. (2013) Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. J Hepatol 2013 Dec 25. pii: S01688278 (13)00887-8. doi: 10.1016/j.jhep. 12.019. [Epub ahead of print]
5. Barratt MJ, Lebrilla C, Shapiro HY, Gordon JI. The gut microbiota, food science, and human nutrition: a timely marriage. Cell Host Microbe (2017) 22:134–41. doi:10.1016/j.chom.2017.07.006
6. Bergman, K. (1983) Application and results of whole-body autoradiography in distribution studies of organic solvents. Crit Rev Toxicol 12:59–118.
7. Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, et al. 2010. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. PLoS One 5:e13577
8. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. (1990) Transport and storage of vitamin A. Science. 250: 399–404.
9. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. (1977) Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. Cell Biol; 72: 441–55.
10. Boll, M; Weber, LWD; Becker, E; et al. (2001) Pathogenesis of carbon tetrachloride-induced

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

11. Borruel N. (2003). Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. Gastroenterol Hepatol. 26(Supl 1):13-22
12. Bouchet A, Cuilleret J. Tomo: Abdomen. Anatomía descriptiva, topográfica y funcional. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana; 1982; 232-237.
13. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, Heeg MH, Weiss TS, et al. (2007). IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 292: G1019–28.
14. Brandl K, Kumar V, Eckmann L. Gut-liver axis at the frontier of hostmicrobial interactions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (2017) 312:G413–9. doi:10.1152/ajpgi.00361.2016
15. British Society for immunology. Interleucina 10 (IL-10). http://inmunologia.eu/receptores-y-moleculas/interleucina-10-il-10. Accessed September 12, 2017.
16. Castillo, T; Koop, DR; Kamimura, S; et al. (1992) Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. Hepatology 16:992–996.
17. Cavalcante LB, Tanaka MH, Pires JR, et al. (2012) Expression of the Interleukin-10 Signaling Pathway Genes in Individuals With Down Syndrome and Periodontitis. *J Periodontol* 83(7):926-35.
18. Chen T, Isomaki P, Rimpilainen M, Toivanen P. (1999) Human cytokine responses by gram-positive cell walls of normal intestinal microbiota. Clin Exp Immunol 118:261-7.
19. Ciccia, F., A. Accardo-Palumbo, R. Alessandro, *et al.* (2012). Interleukin-22 and interleukin-22-producing NKp44+ natural killer cells in subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism* 64(6): 1869–1878.
20. Clawson G. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pathollmmunopath Res, 8,104-112, DOI: 10.1159/000157141
21. Consortium, G. (n.d.). *AmiGO 2: Term Details for "inflammatory response" (GO: 0006954). [online] Amigo.geneontology.org. Available at:* http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0006954 [Accessed 11 May 2017].
22. D'Argenio G, Cariello R, Tuccillo C, Mazzone G, Federico A, Funaro A, De Magistris L, Grossi E, Callegari ML, Chirico M, Caporaso N, Romano M, Morelli L, Loguercio C.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Symbiotic formulation in experimentally induced liver fibrosis in rats: intestinal microbiota as a key point to treat liver damage? Liver Int 2013; 33: 687-697 [PMID: 23448378 DOI: 10.1111/ liv.12117]

23. Dong C. Martinez G. (2010). T cells: the usual subsets. nature REVIEWS IMMUNOLOGY. enero 2018, De abcam Base de datos.
24. Duwat P. Sourice S. Cesselin B. Lamberet G. Vido K. Gaudu P. Le Loir Y. Violet F. Loubiere P. Gruss A. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. J Bacteriol. 183:4509
25. Eberl G. (2016). RORγt, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. Mucosal Immunology, 10, 8.
26. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansssib ML, Willen R, Andersson R. (1993) The effect of exogenous administration of Lactobacillus reuteri R2LC and oat fiber on acetic-acid induced colitis in the rat. Scand J Gastroenterol 28:155-62.
27. Fang H.L. & Lin W.C. (2008). "Lipidperoxidation products do not activate hepatic stellate cells" Toxicology, vol. 253, no. 1–3, pp. 36–45.
28. Foxall RB, Fernandes SM, Sousa AE. (2016). Profile of interleukin-22 in gut mucosal health and disease. Pp.11
29. Freudenberg N, Schalk J, Galanos C, Katschinski T, Datz O, Pein U, et al. (1989) Identification and percentage frequency of isolated non-parenchymal liver cells (NPLC) in the mouse. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 57:109–15.
30. Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA. Oral administration of an IL-10-se- creting Lactococcus lactis strain prevents food-induced IgE sensitization. J Allergy Clin Immunol. 2007; 119:952–9.
31. Garcia -Fruitos E. (2012). Lactic acid bacteria: a promising alternative for recombinant protein production. Microb Cell Fact. 11:157.
32. Garrigues C. Loubiere P. Lindley ND. Cocaign-Bousquet M. (1997). Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD+ ratio. J Bacteriol. 179:5282–7.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

33. Georg Wick, Cecilia Grundtman, Christina Mayerl, Thomas-Florian Wimpissinger, Johann Feichtinger, Bettina Zelger, Roswitha Sgonc, and Dolores Wolfram. (2013). The Immunology of Fibrosis. Immunol, 1, 32.
34. González P, Duque G, Velásquez-Lopera. (2010). FOXP3: MASTER GENE CONTROLLING THE DEVELOPMENT AND FUNCTION OF REGULATORY CELLS. Inmunología, 29, 11.
35. Gordon JI. Ley RE. Wilson R. *et al.* (2015). Washington University. Extending our view of self: the Human Gut Microbiome Initiative (HGMI). https://www.genome.gov/pages/research/sequencing/seqproposals/hgmiseq.pdf.
36. Guarner F. Schaafsma G. (1998). Probiotics. Int J Food Microbiol. 39:237-8.
37. Guillot A. Hamdaoui N. Bizy A. Zoltani K. Souktani R. Zafrani ES. (2013). Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. Hepatology.
38. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin EJ, Blum S. (2000) Nonpathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/lleucocyte co-cultures. Gut; 47: 79-87.
39. Hammer G. Mc Pee S. (2015). Fisiopatología de la enfermedad. *Una introducción a la medicina clínica*. México: McGraw-Hill.
40. Hammerich, L., and F. Tacke. (2014). Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 7: 297.
41. Hernández, C., Cirrosis hepática, q. and Diabetes, p. (2017). *Cirrosis hepática es la 5ta. causa de muerte en México*. [online] Salud180. Available at: http://www.salud180.com/jovenes/cirrosis-hepatica-es-la-5ta-causa-de-muerte-en-mexico [Accessed 13 May 2017].
42. Hessle C, Hanson LA, Wold AE. (1999) Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. Clin Exp Immunol 116:276-82.
43. Hintermann E, Bayer M, Pfeilschifter JM, Luster AD, Christen U. 2010. CXCL10 promotes liver fibrosis by prevention of NK cell mediated hepatic stellate cell inactivation. J. Autoimmun. 35:424–35

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

44. Hoegl, S., M. Bachmann, P. Scheiermann, *et al.* (2011). Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 44(3): 369–376.
45. Houda Hamed, Fatma Chaari, Zied Ghannoudi, Abdelfattah ElFeki, Semia Chaabouni Ellouz, Ahmed Gargouri. (2017). Beneficial effects of fermented camel milk by *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* on cardiotoxicity induced by carbon tetrachloride in mice. ELSEVIER, pp. 8.
46. Houda Hamed, Manel Gargouri, Salha Boulila, Fatma Chaari, Ferdaws Ghrab, Rim Kallel, Zied Ghannoudi, Tahia Boudawara, Semia Chaabouni, Abdelfattah El Feki and Ahmed Gargouri. (2018). Fermented camel milk prevents carbon tetrachloride induced acute injury in kidney of mice. Journal of Dairy Research, pp. 6.
47. http://documents.tips/documents/higado-patologia-de-robbins-y-html. [Accessed 29 april 2017].
48. http://higado-med-uaa.blogspot.mx/2009/04/fisiologia-hepatica.html. [Accessed 29 april 2017].
49. http://images.slideplayer.es/13/4056185/slides/slide_19.jpg. [Accessed 29 april 2017].
50. https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/fatty_change/index.htm [Accessed 22 november 2017].
51. https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hepatobiliary/liver/necrosis/index.htm [Accessed 27 december 2017].
52. https://www.mindomo.com/es/mindmap/unidades-estructural-higado. [Accessed 29 april 2017].
53. https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/cell-signaling-pathways/il-10-pathway.html [Accessed 29 december 2017].
54. Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB (2007) Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol* 82(2):237-43. Epub 2007 May 14. Review.
55. INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2015. Registros Administrativos de Mortalidad. México. INEGI. [En Línea] Disponible en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/vitales/mortalidad/ (Consultado el día 05 de junio de 2017)

56. Jaramillo J. Rincón S. Posada R. (2006). TOXICOLOGIA BASICA. Aguascalientes, Ags. : Textos Universitarios.
57. Jungermann K Kietzmann T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu Rev Nutr 16: 179-203.
58. Kai Wang, Hao Dong, Yu Qi, Zhihua Pei, Shushuai Yi, Xiaojie Yang, Yanli Zhao, Fanxing Meng, Shouping Yu, Tiezhong Zhou, Guixue Hu. (2016). *Lactobacillus casei* regulates differentiation of Th17/Treg cells to reduce intestinal inflammation in mice. The Canadian Journal of Veterinary Research, pp. 7.
59. Kent G, Gay S, Inouye T. (1976) Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. Proc Natl Acad Sci U S A; 73: 3719–22.
60. Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. 2003. Liver fibrosis and inflammation. A review. Ann. Hepatol. 2:159–63
61. Klinger W, Devereux T, Fouts JR. (1988) Functional and structural zonal hepatocyte heterogeneity – dynamics and ontogenic development. Exp Pathol; 35: 69–91.
62. Kong, Q., W. Wu, F. Yang, *et al.* (2012). Increased expressions of IL-22 and Th22 cells in the coxsackievirus B3-induced mice acute viral myocarditis. *Virology Journal* 9: 232.
63. Kotenko S.V., L.S. Izotova. O.V. Mirochnitchenko. *et al.* (2001). Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rβ) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry* 276(4): 2725–2732.
64. Kuipers OP. Beerthuyzen MM. de Ruyter PG. Luesink EJ. de Vos WM. (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J Biol Chem. 270:27299–304.
65. Lai, EK; McCay, PB; Noguchi, T; et al. (1979) In vivo spin-trapping of trichloromethyl radicals formed from carbon tetrachloride. Biochem Pharmacol 28:2231–2235.
66. Latarjet M., Ruíz L. Anatomía Humana. Tomo 2. 4ª ed. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana; 2005; 1377-91

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

67. Le Loir Y. Azevedo V. Oliveira SC. Freitas DA. Miyoshi A. Bermudez- Humaran LG. Nouaille S. Ribeiro LA. Leclercq S. Gabriel JE. *et al.* (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. Microb Cell Fact. 4:2.
68. Lee CH, Park SW, Kim YS, Kang SS, Kim JA, Lee SH, Lee. (2007). Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. Biol Pharm Bull, 30, 1898-1904, DOI: 10.1248/bpb.30.1898
69. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. 2001. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. Immunol. Cell Biol. 79:502–6
70. Leppkes M, Becker C, Ivanov I, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, Pouly S, Murphy A, Valenzuela D, Yancopoulos G, Becher B, Littman D and Neurath M, (2009). RORγ-Expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of il-17a and il-17f. gastroenterology, pp.11.
71. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature (2006) 444:1022–3. doi:10.1038/ 4441022ª
72. Linares DM. Kok J. Poolman B. (2010). Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. J Bacteriol. 192:5805–12.
73. Loera-Arias, M., Vilatoro-Hernández, J., Parga-Castillo, M., Slacido-Montenegro, A., Barboza-Quintana, O., Muñoz-Maldonado, G., Mondes-de-Oca-Luna, R. and Saucedo-Cárdenas, O., (2014). Secretion of biologically active human interleukin 22 (IL-22) by Lactococcus lactis. Biotechnology Letter, 36(12), pp. 2489-2494
74. Maaike J. Smelt, Bart J. de Haan, Peter A. Bron, Iris van Swam, Marjolein Meijerink, Jerry M. Wells, Marijke M. Faas, Paul de Vos. (2013). Probiotics Can Generate FoxP3 T-Cell Responses in the Small Intestine and Simultaneously Inducing CD4 and CD8 T Cell Activation in the Large Intestine. PLOS ONE, 12.
75. Mamatha Bhat, Bianca M Arendt, Venkat Bhat, Eberhard L Renner, Atul Humar, Johane P Allard. (2016). Implication of the intestinal microbiome in complications of cirrosis. World Hepatol. Semptember 28, 8 (27): 1128-1136.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

76. Mao Y, Nobaeck S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, et al. (1996) The effects of Lactobacillus strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. Gastroenterology 111:334-44

77. McGee JO, Patrick R. (1972) The role of perisinusoidal cells in hepatic fibrogenesis. Méndez-Sánchez N, Villa AR, Zamora-Valdés D, Morales-Espinosa D, Uribe M. (2007). Worldwide mortality from cirrhosis. Ann Hepatol 6: 194-5.

78. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, et al. (1998;) Lactobacilli and streptococci induce IL-12, IL-18 and IFN-γ production in human peripheral blood mononuclear cells. Infect Immun 66:6058-62.

79. Mizoguchi A. (2012) Inflamm Bowel Dis. Healing of intestinal inflammation by IL- 22. 18(9):1777-84.

80. Monga, S. (2011). *Molecular pathology of liver diseases*. 1st ed. New York: Springer.

81. Moraes-Filho JP. Quigley EM. (2015). The intestinal microbiota and the role of probiotics in irritable bowel syndrome: a review. Arq Gastroenterol. 52(4):331-338.

82. Morello E. Bermudez-Humaran LG. Llull D. Sole V. Miraglio N. Langella P. Poquet I. (2008). *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. J Mol Microbiol Biotechnol. 14:48–58.

83. Muhl H, Scheiermann P, Bachmann M et al (2013) IL-22 in tissue-protective therapy. Br J Pharmacol 169:761–771

84. Muir AJ. (2015). Understanding the complexities of cirrhosis. Clin Ther. 37(8):1822-1836.

85. Nagalakshmi ML, Rascle A, Zurawski S *et al* (2004) Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. Int Immunopharmacol 4:679–691

86. Naturforsch Z. Hepatocyte injury: bioactivation of CCl4 by cytochrome P450 and effects on lipid homeostasis. 56:111–121.

87. Netter F. Atlas de Anatomía Humana. 4ª ed. Barcelona, Ed. Masson; 2007; 300-02.

88. Noguchi, T; Fong, K-L; Lai, EK; et al. (1982) Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of CCl4treated rats. Relationship to cytochrome P-450 content. Biochem Pharmacol 31:609–614.

89. Parapouli M. Delbes-Paus C. Kakouri A. Koukkou AI. Montel MC. Samelis J. (2013). Characterization of a wild, novel nisin a-producing Lactococcus strain with an *L. lactis*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

subsp. *cremoris* genotype and an *L. lactis* subsp. *lactis* phenotype, isolated from Greek raw milk. Appl Environ Microbiol. 79:3476–84.

90. Pardio VT, Krzysatof N, Waliszewski KN, Robledo G. Los probióticos y su futuro. Arch Latinoam Nutr 1994; 4681):6-10.
91. Penna FJ. Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Rev Enfer Infec Ped 1998; XI (6):182.
92. Pérez Tamayo R. SM (2007). Is cirrhosis of the liver experimentally producedby CCI_4 and adequate model of human cirrhosis? Hepatology, 3, 112-120, 1983. DOI: 10.1002/hep.l840030118
93. Pestka S. Krause D. Sarkar *et al*. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review of Immunology* 22: 929–979.
94. Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. (1989) Effects of plateletderived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat storing cells. J Clin Invest. 84: 1786–93.
95. Pohl, LR; Schulick, RD; Highet, RJ; *et al*. (1984) Reductive-oxygenation mechanism of metabolism of carbon tetrachloride to phosgene by cytochrome P-450. Mol Pharmacol 25:318–321.
96. Poquet I. Saint V. Seznec E. Simoes N. Bolotin A. Gruss A. (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. Mol Microbiol. 35:1042–51.
97. Pouwels PH. Leer RJ. Shaw M. Heijne den Bak-Glashouwer MJ. Tielen FD. Smit E. Martinez B. Jore J. Conway PL. (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. Int J Food Microbiol. 41:155–67.
98. Poyer, JL; Floyd, RA; McCay, PB; *et al.* (1978) Spin-trapping of the trichloromethyl radical produced during enzymic NADPH oxidation in the presence of carbon tetrachloride or bromotrichloromethane. Biochim Biophys Acta 539:402– 409.
99. Poyer, JL; McCay, PB; Lai, EK; *et al. (*1980) Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during 13C-carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 94:1154–1160.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

100. Ramm GA, Britton RS, O'Neill R, Bacon BR. (1994). Identification and characterization of a receptor for tissue ferritin on activated rat lipocytes. J Clin Invest. 94: 9–15.

101. Raucy, JL; Kraner, JC; Lasker, JM. (1993) Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. Crit Rev Toxicol 23:1–20.

102. Robbins. (2000). PATOLOGIA ESTRUCTURA Y FUNCIONAL. Mexico D. F.: Mc GRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.

103. Scheiermann, P., M. Bachmann, I. Goren, *et al.* (2013). Application of interleukin-22 mediates protection in experimental acetaminophen-induced acute liver injury. *The American Journal of Pathology* 182(4): 1107–1113.

104. Schiffin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. J Dairy Sci Aug. 1997; 66(2):515S-20S.

105. Schneewind O. Missiakas DM. (2012). Protein secretion and surface display in gram-positive bacteria. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 367:1123–39.

106. Sharma V, Garg S, Aggarwal S. Probiotics and liver disease. Perm J 2013; 17: 62-67 [PMID: 24361022 DOI: 10.7812/ TPP/12-144]

107. SIDSS: Subsecretaría de Integración y Desarrollo del Sector Salud Dirección General de Evaluación del Desempeño, Informe sobre la Salud de Los Mexicanos. 2015. México. Gob.mx. [En línea] Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/64176/INFORME_LA_SALUD_DE_LOS_MEXICANOS_2015_S.pdf (Consultado el día 05 Junio 2017)

108. Sipes, IG; Krishna, G; Gillette, JR. (1977) Bioactivation of carbon tetrachloride, chloroform and bromotrichloromethane: role of cytochrome P-450. Life Sci 20:1541–1548.

109. Slater, TF. (1982) Activation of carbon tetrachloride: chemical principles and biological significance. In: McBrien, DCH; Slater, TF; eds. Free radicals, lipid peroxidation and cancer. New York, NY: Academic Press, pp. 243–274.

110. Song A. In L. Lim S. Rahim R. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to Factory. Microbial Cell Factories. 16:55

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

111. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D (2011) Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. Nat Immunol 12: 383–390

112. Sonnenberg, G.F., L.A. Fouser, and D. Artis. (2010). 1 Functional biology of the IL-22-IL-22R pathway in regulating immunity and inflammation at Barrier surfaces. *Advances in Immunology* 107: 1.

113. Sriraman K. Jayaraman G. (2008). HtrA is essential for efficient secretion of recombinant proteins by *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol. 74:7442–6.

114. Steidler L. Hans W. Schotte L. Neirynck S. Obermeier F. Falk W. Fiers W. Remaut E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. Science. 289:1352–5.

115. Steven L. (2017) Diagnosis of Cirrhosis and Evaluation of Hepatic Encephalopathy: Common Errors and Their Significance for the PCP. *Journal of Family Practice.* , Vol. 66 Issue 4, pS34-S39. 6p.

116. Sung Hwan Kim, Woonhee Jeung, Il-Dong Choi, Ji-Woong Jeong, Dong Eun Lee, Chul-Sung Huh, Geun-Bae Kim, Seong Soo Hong, Jae-Jung Shim, Jung Lyoul Lee, Jae-Hun Sim, and Young-Tae Ahn. (2016). Lactic Acid Bacteria Improves Peyer's Patch Cell-Mediated Immunoglobulin A and Tight-Junction Expression in a Destructed Gut Microbial Environment. J. Microbiol. Biotechnol, pp. 11.

117. Szymaāska R, Schmidt-Pospuła M. (1979) Studies of liver's reticuloendothelial cells by Tadeusz Browicz and Karl Kupffer. [A historical outline]. Arch Hist Med (Warsz). 42: 331–6.

118. Tachiiri A., R. Imamura, Y. Wang, *et al.* (2003). Genomic structure and inducible expression of the IL-22 receptor α chain in mice. *Genes and Immunity* 4(2): 153–159.

119. Tilg H, Cani PD, Mayer EA. Gut microbiome and liver diseases. Gut (2016) 65:2035. doi:10.1136/gutjnl-2016-312729

120. Tomasi, A; Albano, E; Banni, S; et al. (1987) Free-radical metabolism of tetrachloride metabolism in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 94:1154–1160.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

121. Torres R. Flora intestinal, probióticos y salud. Guadalajara. Edit Gráfica Nueva, Yakult, 1999.

122. Troncone, E., I. Marafini, F. Pallone, *et al*. (2013). Th17 cytokines in inflammatory bowel diseases: discerning the good from the bad. *International Reviews of Immunology* 32(5-6): 526–533.

123. Tsulada N. et al. (1995). The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. Hepatology

124. US National Institutes of Health. (2016). NIH human microbiome project. About the HMP. http://hmpdacc.org/overview/about.php. Accessed February 14, 2017.

125. Villarruel, M; de Toranzo, EGD; Castro, JA. (1977) Carbon tetrachloride activation, lipid peroxidation and the mixed function oxygenase activity of various rat tissues. Toxicol Appl Pharmacol 41:337–344.

126. von Kupffer K. Uber Sternzellen der Leber. Briefliche Mitteilung an Professor Waldeyer. Arch Mikr Anat. 1876; 12: 353–8.

127. Walker M. El-Serag HB. Sada Y. *et al*. (2016). Cirrhosis is under-recognised in patients subsequently diagnosed with hepatocellular cancer. Aliment Pharmacol Ther. 43(5):621-630.

128. Weber LW, Boll M, Stampfl A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. CRC Crit RevToxicol, 33,105-136, DOI: 10.1080/713611034

129. Wei-Jen Ting, Wei-Wen Kuo, Dennis Jine-Yuan Hsieh, Yu-Lan Yeh, Cecilia-Hsuan Day, Ya-Hui Chen, Ray-Jade Chen, Viswanadha Vijaya Padma, Yi-Hsing Chen, and Chih-Yang Huang. (2015). Heat Killed Lactobacillus reuteri GMNL-263 Reduces Fibrosis Effects on the Liver and Heart in High Fat Diet-Hamsters via TGF-β Suppression. International Journal of Molecular Sciences, 16.

130. Wenting Ma, Le Tao, Wei Zhang, Yinshen Zhu, Dongying Xue, Jie Zhang Cheng Liu. (2017). Xia-Yu-Xue Decoction Inhibits Intestinal Epithelial Cell Apoptosis in CCl_4-Induced Liver Fibrosis. Cellular Physiology and Biochemistry, pp. 12.

131. Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, Plank N, Schwentner C, Sgonc R. 2010. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. Trends Immunol. 31:110–19

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

132. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, et al. (2004) Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* 113(3):281-92. Review.

133. Wolk K. Witte E. WitteK *et al.* (2010) Biology of interleukin-22. Semin Immunopathol 32:17–31

134. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, *et al.* (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21(2): 241–254.

135. Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. (1994) Induction of platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. J Clin Invest. 94:1563–9.

136. Wong, FW; Chan, W; Lee, SS. (1998) Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. Toxicol Appl Pharmacol 153:109–118.

137. Wynn AT. 2004. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. Nat. Rev. Immunol. 4:583–94

138. Yang L, Chan CC, Kwon OS, Liu S, McGhee J, Stimpson SA, et al. (2006). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptorgamma in liver fibrosis. Am J Physiol. 291:G902–11.

139. Yang YS, Ahn TH, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, Park SC, Kim HC, Kim JC. (2008). Protective effects of pycnogenol on carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol, 46, 380-387, DOI: 10.l016/j.fct.2007.08.016

140. Ying W, Wan Y, Ye G, Pu W, Xue X, Wu G, et al. Hepatoprotective effects of adiporon against D-galactosamine-induced liver injury in mice. Eur J Pharm Sci (2016) 93:123–31. doi:10.1016/j.ejps.2016.08.017

141. Zangar, RC; Benson, JM; Burnett, VL; et al. (2000) Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. Chem Biol Interact 125:233–243.

142. Zhao, Y., J. Sun, W. Dou, *et al.* (2015). Curcumin inhibits proliferation of interleukin-22-treated HaCaT cells. *International journal of clinical and experimental medicine* 8(6): 9580.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

143. Zhou L, Lopes JE, Chong MM. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T (H) 17 cell differentiation by antagonizing rorgammat function. nature 2008; 453:236–240.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo A

Inclusión de tejidos en parafina

Los tejidos fueron colocados en casetes metálicos, y posteriormente montados en Histoquinet (MICROM STP 120) para someterse al siguiente procedimiento.

Cubas	Compuesto	Tiempo
1	Agua destilada	1 hora
2	Alcohol 70%	1 hora
3	Alcohol 80%	1 hora
4	Alcohol 96%	1 hora
5	Alcohol 96%	1 hora
6	Alcohol 100%	1 hora
7	Alcohol 100%	1 hora
8	Alcohol-Xilol 1:1	1 hora
9	Xilol 100%	1 hora
10	Xilol 100%	1 hora
11	Parafina	1 hora
12	Parafina	1 hora

Una vez que el tejido pasó por todo el procedimiento, se formaron bloques de parafina empleando el Thermo scientific microm (EC150-1 y EC150-2), para posteriormente realizar los cortes histológicos de 5 micras en el micrótomo LEICA RM2125RT.

Silanizado de laminillas

El silanizado de laminillas se llevó a cabo utilizando los siguientes reactivos en campana de extracción de gases.

Reactivo	Volumen	Tiempo
Acetona-Silano al 2%	100ml	5 minutos
Agua destilada	100ml	2 minutos por duplicado

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las laminillas se sumergieron en cada uno de los reactivos, y se colocaron en horno a 40-50ºC por 24h.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo B

Tinción hematoxilina y eosina (H&E).

Procedimiento:

1. Colocar laminillas en xilol por 5 minutos dos lavados.
2. Alcohol 100% por 2 minutos dos lavados.
3. Alcohol al 96% por 2 minutos dos lavados.
4. Alcohol al 70% por 2 minutos dos lavados.
5. Agua del grifo por dos minutos.
6. Hematoxilina por 1 minutos.
7. Agua del grifo por 5 minutos.
8. Eosina 30 segundos.
9. Agua del grifo 5 minutos.
10. Alcohol al 70% por dos minutos dos lavados.
11. Alcohol al 96% por dos minutos dos lavados.
12. Alcohol 100% 2 minutos dos lavados.
13. Xilol 5 minutos dos lavados.
14. Montado en Entellan (1.07961.0500; Merck).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo C

Tinción Rojo Sirio

Preparación de Agua acidificada

Reactivo	Volumen
Agua Destilada	100ml
Ácido acético	500µl

Preparación de rojo sirio-picro

Reactivo	Cantidad
Rojo sirio	0.5g
Solución acuosa de ácido pícrico (Rojo sirio (Sigma-Aldrich 365548), ácido pícrico (sigma P6744-1GA)	500ml
Ácido acético glacial	3ml
Agua destilada	Aforar a 1lt

Nota: añadir el ácido acético glacial al agua destilada.

Preparación de hematoxilina de Weigert

I. Solución A (100ml)

Reactivo	Cantidad
Cristales de Hematoxilina	1g
Alcohol al 95%	100ml

II. Solución B (100ml)

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	95ml
Ácido clorhídrico concentrado	1ml
Cloruro Férrico	4ml

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Diluir partes iguales de ambas soluciones (A y B) según la cantidad utilizada.

1.- Hidratar los cortes (5µm) provenientes de los bloques de parafina bajo el procedimiento convencional. Tiempos:

- Xilol- 7min
- Xilol- 7min
- Alcohol al 100%- 5min
- Alcohol al 100%- 5min
- Alcohol al 96%- 3 min
- Alcohol al 96%- 3min
- Agua destilada- 3min

2.- Incubar los cortes en una solución de hematoxilina de Weigert para tinción de núcleos, durante 8 min y luego lavar los portaobjetos durante 5 min en agua corriente y después colocar las laminillas en PBS 1X durante 5 min.

3.- Incubar con la solución de rojo sirio-picro durante una hora.

4.- Lavar dos veces con agua acidificada (2 baños en cada lavado) rápidos 1 seg.

5.- Deshidratar en dos cambios de etanol al 96% (45 seg/lavado).

6.- Deshidratar en dos cambios de etanol al 100% (2 min/lavado).

7.- Lavar en xileno durante 5 min y montar con Entellan (1.07961.0500; Merck).

8.- Revisar los cortes en campo claro y luz polarizada.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo D

Inmunohistoquímica

1) **Desparafinación del tejido**

- Xilol por 5 minutos dos lavados.
- Alcohol 100% por 5 minutos dos lavados
- Alcohol 96% por 5 minutos dos lavados
- Alcohol 80% por 5 minutos un lavado
- Agua destilada por 5 minutos un lavado

2) **Desenmascaramiento de epítopos**

Colocar dentro de la olla de presión 1.5 litros de buffer de citrato de sodio 1X, encender y dejar subir la máximo la presión, apagar y colocar las laminillas ya desparafinadas, quedando totalmente cubiertas por el buffer, nuevamente encencer la olla, una vez que salga el vapor se dejan reposar por un minuto, luego apagar y dejar reposar durante 15 minutos dentro del buffer, pasado el tiempo lavar las laminillas con PBS 1X (1 vez/ 5 min).

3) **Inactivactivación de peroxidasas endógenas**

Sumergir las laminillas en una solución de metanol-peroxido (10%) durante 30 min. a temperatura ambiente, lavar con PBS 1X (3 veces/5min.).

4) **Permeabilizar membranas**

Colocar las laminillas en una solución de PBS + Tritón X-100 (0.2%) durante 30 min. a temperatura ambiente, lavar las laminillas con PBS 1X (1 vez/5 min.), delimitar el tejido de interés con el PAP pen (Z377821-1EA; SIGMA).

5) **Bloquear uniones inespecífica**

Incubar las laminillas con suero fetal de bovino (20%) en PBS + Tritón X-100 (0.2%) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

6) **Anticuerpo primario**

Diluir el anticuerpo primario Anti-hIL-22 1:100 en PBS + Tritón X-100 (0.2%). Colocar 30µl de anticuerpo primario diluido sobre el tejido e incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Lavar las laminillas con PBS + Tritón X-100 (0.2%) 3 veces/5 min.

7) **Anticuerpo secundario**

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Incubar con el anticuerpo secundario Anti-goat IgG, dilución 1:500. Colocar 30µl de anticuerpo secundario diluido sobre el tejido e incubar en oscuridad durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente, lavar con PBS 1X (3 veces/5 min), revelar con 3'3 diaminobenzidina dilución 1:10 con buffer hasta que ocurra el viraje de color, lavar con PBS 1X (2 veces/5 min), contrastar con hematoxilina diluida 1:10 con agua destilada durante 1 minuto a temperatura ambiente, lavar con agua de grifo 2 veces/5min.

8) Deshidratación del tejido

- Alcohol 80% (1 vez/5 min)
- Alcohol 96% (1 vez/5 min)
- Alcohol 100% (2 vez/5 min)
- Xilol (2 vez/10 min)
- Montado en Entellan (1.07961.0500; Merck).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo E

Extracción de ARN

- Tomar 50mg de tejido en un tubo de microcentrifuga (2 ml).
- Añadir 500µl buffer de lísis (previamente mezclado con 2-mercapto etanol) y homogenizar.
- Agitar con vortex por 2 minutos.
- Centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4ºC.

Carga de la columna

- Agregar 100µl de buffer de activación en la columna de extracción.
- Centrifugar a 10000 rpm por 30 segundos.
- Descartar el filtrado

Activacion de muestras

- Agregar 300µl de isopropanol a la columna y agite con vortex durante 2 minutos.
- Colocar una columna de extracción en un tubo recolector de 2ml.
- Centrifugar a 10000 rpm por 30 segundos.
- Descartar el filtrado.

Lavado de la columna

- Agregar 700µl del primer tampón de lavado (etanol añadido) a la columna de extracción.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.
- Descartar el filtrado

Segundo lavado

- Agregar 700 µl de segundo tampón de lavado (etanol añadido) a la columna de extracción.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.
- Descartar el filtrado

Elución del ARN

- Colocar la columna de extracción en un tubo de microcentrífuga sin DNasa / RNasa.
- Agregar 70µl de tampón de elución al centro de la membrana de la columna.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 1 min para eluir el ARN
- Dividir la muestra en 3 alicuotas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Cuantificar la concentración de RNA de una de las alícuotas en Nanodrop.
- Almacenar las el ARN a -80 ° C en ultracongelador.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo F

Rerotranscripción de RNA

1. Colocar en un tubo para PCR (200 µl) 4 microlitros del RNA que se desee retrotranscribir, y agregar 1 microlitro de Oligo dT, para obtener un volumen total de 5 µl.
2. Calentar ésta mezcla en el termociclador a 70 °C durante 5 minutos.
3. Inmediatamente colocar el o los tubos en hielo por lo menos durante 5 minutos.
4. Centrifugar 10 segundos en microcentrifuga.
5. Conservar en hielo nuevamente hasta que sea agregado el mix de la Transcriptasa Reversa.

Preparación del Mix de Transcriptasa Reversa:

Reactivo	Cantidad
Buffer de Reacción 5X	4.0 µl
Cloruro de Magnesio ($MgCl_{2)}$	1.5 µl
Mezcla de Nucleotidos para PCR	1.0 µl
Inhibidor de Ribonucleasas Recombinante RNasin	0.5 µl
Transcriptasa Reversa	1.0 µl
Agua libre de Nucleasas	7.0 µl

Para obtener un volumen final de 15 µl para cada muestra de RNA que se quiera retrotranscribir.

NOTA: Si se van a retrotranscribir varias muestras al mismo tiempo, puede prepararse un Master Mix que contenga el volumen total correspondiente de 15 µl para cada muestra de RNA (5 µl), y distribuir las cantidades exactas para obtener los volúmenes totales de 20 µl.

6. Combinar los 15 µl del mix de transcriptasa reversa con los 5 µl iniciales del tubo de PCR.
7. **Alineación**: calentar en el termociclador a 25 °C durante 5 minutos.
8. **Extensión:** calentar en el termociclador a 42 °C durante 120 minutos.
9. **Inactivación de la Transcriptasa Reversa:** calentar en el termociclador a 70 °C durante 15 minutos (programa 16).
10. Cuantificar el cDNA obtenido en el Nanodrop.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

11. Almacenar las muestras a -80 °C.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS