



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS Y VETERINARIAS

Tesis

**“Efecto del berro (*Nasturtium officinale*) y *Lactobacillus rhamnosus*
silvestres sobre la fibrosis hepática en rata Wistar”**

Presenta

LAQB. IVONNE PEUGNET GONZÁLEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Comité tutorial

DR. MARTÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA (COTUTOR)

DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN (COTUTOR)

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ (INTEGRANTE)

DR. JOAQUÍN SOSA RAMÍREZ (INTEGRANTE)

Aguascalientes, Ags., 01 Enero de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, como integrante del Comité Tutoral designado del egresado de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, **LAQB. IVONNE PEUGNET GONZALEZ** quien realizó la tesis titulada "EFECTO DEL BERRO (*Nasturtium Officinale*) Y LACTOBACILLUS RHAMNOSUS SILVESTRES SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN RATA WISTAR", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, estoy de acuerdo en emitir el presente **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 6 enero de 2020

Martin Humberto Muñoz O.

DR. Martin Humberto Muñoz Ortega
Cotutor de tesis

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Departamento de Ciencias Veterinarias
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, como integrante del Comité Tutorial designado del egresado de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, **LAQB. IVONNE PEUGNET GONZALEZ** quien realizó la tesis titulada "EFECTO DEL BERRO (*Nasturtium Officinale*) Y LACTOBACILLUS RHAMNOSUS SILVESTRES SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN RATA WISTAR", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, estoy de acuerdo en emitir el presente **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 6 enero de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Teódulo Quezada Tristán'.

DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN
Integrante del Comité Tutorial de tesis

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Departamento de Ciencias Veterinarias
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, como integrante del Comité Tutorial designado del egresado de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, **LAQB. IVONNE PEUGNET GONZALEZ** quien realizó la tesis titulada "EFECTO DEL BERRO (*Nasturtium Officinale*) Y LACTOBACILLUS RHAMNOSUS SILVESTRES SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN RATA WISTAR", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, estoy de acuerdo en emitir el presente **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 6 enero de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Javier Ventura Juárez', enclosed in a light gray rectangular box.

DR. Javier Ventura Juárez
Integrante del Comité Tutorial de tesis

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Departamento de Ciencias Veterinarias
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, como integrante del Comité Tutorial designado del egresado de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, **LAQB. IVONNE PEUGNET GONZALEZ** quien realizó la tesis titulada "EFECTO DEL BERRO (*Nasturtium Officinale*) Y LACTOBACILLUS RHAMNOSUS SILVESTRES SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN RATA WISTAR", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, estoy de acuerdo en emitir el presente **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 6 enero de 2020

DR. Joaquín Sosa Ramírez
Integrante del Comité Tutorial de tesis

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Departamento de Ciencias Veterinarias
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 22-ene-20

NOMBRE: IVONNE PEUGNET GONZÁLEZ ID: 64607

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS Y VETERINARIAS LGAC (del posgrado): Producción y salud animal

TIPO DE TRABAJO: [X] Tesis [] Trabajo práctico
TÍTULO: "EFECTO DEL BERRO (Nasturtium Officinale) Y LACTOBACILLUS RHAMNOSUS SILVESTRES SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA EN RATA WISTAR"

Con el estudio realizado se pudo caracterizar la evolución de la fibrosis en el modelo de ratas Wistar, donde los resultados obtenidos nos dan una idea del desarrollo clínico, que los pacientes con este trastorno presentan durante su proceso patogénico permitiendo con esto poder actuar de una manera preventiva en reducir los efectos de los xenobióticos con el uso de tratamientos alternativos como el uso de los lactobacillus y el berro.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
NO Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
NA El estudiante es el primer autor
NA El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
NA En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
NA La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI CONTINUA
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

* En caso de conflicto de intereses, firmará un tercer miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinta al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 124C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico... para dar la idoneidad formal del programa de posgrado y el Art. 125F las funciones del Secretario Técnico, firmar el reglamento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Calidad/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Social/D. Apoyo al Posg.

Código: DO-002-10-25
Actualización: 01
Fecha: 30/06/19

Agradecimientos

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes** por ser de vanguardia, calidad y filantrópica, por siempre ofrecernos áreas verdes y bien cuidadas, por mantener sus laboratorios de calidad y ponerlos a disposición de los alumnos, por hacer posible que cumpliera aquí mis estudios, así como por sus valiosos profesores e integrantes.

A la **Posta Zootécnica UAA** porque me enseñaron a convivir de cerca con los animales, porque ir a clases era como ir de aventuras a un zoológico (el primer día me topé con una avestruz en la tienda), porque me enseñaron a comunicarme con la naturaleza.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (Conacyt) pues su apoyo hace posible experimentar y avanzar en la ciencia, la cual es la base del progreso, pues nos lleva a encontrar formas de tener mejor calidad de vida. Gracias por darnos las herramientas para tener acceso a la ciencia y por su beca, gracias a la cual pude realizar mis estudios de maestría.

A mi **Comité Tutorial** les agradezco muchísimo el permitirme haber continuado con el posgrado, sin ustedes me hubiera tenido que salir, por haberse arriesgado a aceptarme con seis meses de tardanza, porque siempre confiaron en mí, me impulsaron a seguir adelante y a dar lo mejor de mí. Reitero mi más profundo agradecimiento.

Al **Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega** por aceptar ser mi tutor, por confiar en mí, por apoyarme siempre que lo necesité tanto en lo profesional como en lo personal, por sus valiosos consejos, por siempre escucharme y ofrecerme su ayuda. Por su comprensión y sus palabras en los momentos difíciles. Por sus risas y sus porras en los momentos de estrés. Por su transparencia y su honestidad que hicieron que tuviéramos excelente comunicación. Porque su impulso y su guía hicieron posibles que pudiera culminar con éxito esta tesis.

Al **Dr. Teódulo Quezada Tristán**, porque teniendo un nuevo tema y a una semana del seminario aceptaste ser mi tutor, por la confianza brindada, porque siempre reforzaste mis puntos débiles, por exigirme siempre con una sonrisa y buen humor que mi trabajo fuera de calidad y a ser precisa y ordenada. Admiro mucho como mezclas el buen humor con un trabajo de excelencia, gracias por siempre estar para ayudarnos a ser mejores alumnos en lo personal y en lo profesional. Te admiro, te respeto y te quiero mucho. Te agradezco mucho todo tu apoyo.

Al **Dr. Javier Ventura Juárez** por su calidad humana, por siempre tener espacio y tiempo para escucharme y apoyarme, porque sus palabras de aliento me ayudaron a seguir con más ganas trabajando para ser mejor, por sus consejos personales, por esa chispa de nunca rendirse, por su ejemplo al realizar los experimentos, por sus ganas de trabajar que parecen ser siempre inagotables, por esa pasión que tiene por la investigación y la docencia, por enseñarme que lo importante no es saber contestar al instante sino pensar, pensar y llegar a verdades aún más profundas. Porque cualquier conversación, por muy dura que sea siempre la torna agradable. Porque enseña con amor y con todo su corazón.

Al **Dr. Joaquín Sosa Ramírez**, porque desde el principio estuvo conmigo, porque a pesar del cambio de tema me siguió apoyando, porque siempre me tenía una anécdota o historia que me hacía más humana y mejor persona. Por todas sus enseñanzas. Porque siempre me animó y confió en mí, por

ser tan amable siempre, con ganas de ayudar. Gracias por esa tolerancia y paz que siempre contagia. Gracias por defenderme ante situaciones injustas en el momento exacto.

Al **Dr. Daniel Cervantes García** le agradezco la confianza depositada en mí, gracias porque sin su apoyo no hubiera logrado los objetivos de mi tesis, por su gran profesionalismo, por ser implacablemente trabajador, por sus tan acertados consejos y sus filosas preguntas que siempre me motivaron a seguir preparándome y leer más del tema, gracias porque aún con pocas palabras me expresó mucho con acciones, y porque siempre estuvo al pendiente, gracias por ser tan gran ejemplo a seguir.

A mis **maestros** porque siempre llegaban con buen ánimo, porque se notaban sus ganas de transmitirnos esperanza, porque se involucraron personalmente con cada uno de nosotros, porque nos explicaban con detalle lo que no entendíamos, porque utilizaban todos los recursos habidos y por haber para que, sin importar si alguno de nosotros era visual, quíntésico o auditivo, a todos nos quedara clara la clase, porque siempre se prestaron a escucharnos y atendernos fuera de los horarios de clase y del salón, porque se notaba y se sentía que querían lo mejor para nosotros.

Al **Dr. José de Jesús Luna Ruíz**, por su apoyo constante e incondicional, por sus porras, porque sus palabras me alentaban a creer en mí, porque me brindaba otro punto de vista y me hacía cuestionarme y corregirme, por hacerme ver y así poder cambiar elementos muy importantes de mi tesis, por sus palabras tan motivantes, por la confianza, por enseñarme a mejorar y brindarme su perspectiva de cosas que me pudieran beneficiar, por esos consejos tan prácticos y útiles. Porque es bueno de corazón.

A la **Dra. Esperanza Sánchez Alemán** y al **Dr. Manuel Enrique Ávila Blanco** por su valiosa ayuda y asesoría en la parte experimental de mi tesis, por siempre estar pendientes y dispuestos a resolver mis dudas.

A **Emmanuel**, a **Kassandra**, y a **Mariana** por su ayuda técnica durante los experimentos, y por su excelente actitud siempre. Aprendimos muchas cosas juntos.

A mis pechochos: **Iris Montoya**, **Gabriela Martínez**, **Gina Sánchez**, **Luis Pérez**: y mis pechochos honorarios: **Marcela Viguera** y **Fernando Sánchez**. Nunca en mi vida académica me había topado con un grupo en el que la generación completa sean tan extraordinarias personas. Empezamos como compañeros del salón, como navegantes de un barco que de repente parecía voltearse pero que teníamos el destino puesto en titularnos de la maestría, y al poco tiempo y gracias a las turbulencias del viaje, se convirtieron en una parte de mí, a todos los llevo en el corazón, los quiero tanto como nunca pensé querer a mis compañeros de escuela, y es que para mí son más que compañeros y más que amigos, porque nuestra relación va mucho más allá de la escuela.

A mis **amigos y maestros músicos**, porque siempre me escuchaban y me decían que a pesar de no entender nada todo sonaba super interesante. Porque siempre me alentaron, me apoyaron y me ofrecieron ayuda sin saber que con sus palabras y sus porras ya me estaban ayudando.

Le agradezco a la vida porque tuve la fortuna de conocerlos a todos ustedes.

Dedicatoria

A mi familia que ya no está, porque me acompañan en cada momento.

A mi abuela Tila porque su ejemplo me ha demostrado cómo ser fuerte, cómo salir adelante y por siempre buscar la paz interior.

A mi abuelo Néstor porque me ha enseñado a soportar las desventuras de la vida, siempre con inteligencia y un buen trozo de chocolate.

A mis padres porque me enseñaron a pensar, a razonar, a tener mente científica y a siempre tener sentido del humor.

A **Marcela Thalía González Cevallos**, mi mami. Sin ella no sería quien soy. Porque siempre me impulsa a seguir adelante, me recuerda en los buenos y malos momentos por qué hago lo que hago y me da una razón de ser. Me mantiene motivada todo el tiempo. Su ejemplo me hace ser más fuerte de lo que jamás creí ser, me ha enseñado y me sigue enseñando siempre a encontrar la felicidad aún en los tramos más oscuros y a ser buena persona siempre. Gracias por conservar mi sonrisa y por alentarme a continuamente superarme a mí misma. Me has enseñado a vivir.

A **Alán Joaquín Peugnet Núñez**, mi papi, porque me ha ayudado cuando lo he necesitado, porque siempre encuentra la manera de estar juntos, de acercarnos y de que sin importar lo que pase se mantenga ese lazo tan fuerte de padre e hija. Porque me ha enseñado a reír y ser espontánea, porque me ha enseñado a defenderme, a concretar mis sueños y realizarlos, a vivir sin miedo ya que de cualquier manera de algo nos vamos a morir, entonces es mejor disfrutar la vida, me ha enseñado a ser única y ser capaz de reírme de mí misma.

A **Jock**, porque siempre me recibe con una sonrisa y jugando, por transmitirme tanta felicidad paz y relax por la vida. Por ser tan simpático y enseñarme con acciones. Porque todo lo que tiene de bestia lo tiene de tierno. Por su magnífico carácter. Por su compañía y por su inquebrantable fidelidad. Porque arriesga su vida por mi seguridad.

A **Ibi**, porque siempre me acompaña, por peluda, bigotona y bonita, por reforzar mi compromiso con los animales, por testaruda, porque le gusta estar encima de mí cuando duermo, sin moverse ni un milímetro, porque siempre me recibe y por sus infinitas muestras de cariño.

A mis pechuchos porque los llevo en el alma y son parte de mí, cada paso en la Maestría lo di con ustedes.

Índice general

Agradecimientos	vii
Dedicatoria	ix
Índice general	x
ÍNDICE DE IMÁGENES	xvii
ÍNDICE DE TABLAS	xix
ACRÓNIMOS	xxiii
RESUMEN	xxiv
ABSTRACT	xxvi
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
JUSTIFICACIÓN	3
1. ANTECEDENTES	5
1.1 HÍGADO	5
1.1.1 Descripción, organización y función.....	5
1.1.2 Daño hepático	7
1.2. FIBROSIS HEPÁTICA	8
1.2.1 Definición/ descripción general	8
1.2.2 Importancia de la fibrosis.....	8
1.2.3. Epidemiología. Frecuencia y estadísticas.....	12
1.2.4. Etiología y factores de riesgo	21
1.2.5. Patogénesis de FH	26
1.2.6. Clasificación de las etapas.....	29
1.2.7. Diagnóstico.....	30
1.2.8. Profilaxis	35
1.2.9. Tratamientos	36
1.2.10. Modelo de inducción de fibrosis con tetracloruro de Carbono.....	49
1.3. LACTOBACILOS	50
1.3.1 Lactobacillus rhamnosus	51
1.4. BERRO.....	54
1.4.1 Descripción y origen.....	54
1.4.2 Características y su bioactividad	55
1.4.3 Usos (Componentes, nutrición y aplicaciones del berro)	55

1.4.4 Propiedades antioxidantes del berro	56
1.4.5 <i>Nasturtium officinale</i> contra enfermedades	57
1.4.6 <i>Nasturtium officinale</i> y el hígado	58
2. HIPÓTESIS	59
3. OBJETIVOS	59
3.1 OBJETIVO GENERAL	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4. MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.1 Ubicación del estudio	59
4.2 Diseño de la investigación: Modelo de rata Wistar	59
4.2.1 Animales de laboratorio	59
4.2.2 Alojamiento	60
4.2.3 Modelo de fibrosis hepática	60
4.3 Toma de muestras biológicas	62
4.3.1 Sacrificio de las ratas	63
4.3.2 Punción cardiaca y cirugía a las ratas	63
4.3.3 Toma y preservación de muestras (sangre y órganos)	63
4.4 Procesamiento de las muestras para qPCR	64
4.5 Procesamiento de las muestras histológicas (Deshidratación, aclaramiento, inclusión en parafina y corte en microtomo)	65
4.6 Determinación de variables	66
4.6.1 Peso de las ratas vivas	66
4.6.2 Peso del hígado	66
4.6.3 Análisis macroscópico del hígado	66
4.6.4 Perfil hepático	66
4.6.5 Análisis histopatológico	66
4.6.6 Análisis morfométrico	67
4.6.7 Análisis genético con qPCR	67
4.7 Diseño de la investigación	67
4.8 Análisis Estadístico	68
5. RESULTADOS	68
5.1 Comportamiento de las ratas durante las 8 semanas	68
5.1.1 Distribución de grupos	68
5.1.2 Supervivencia	69

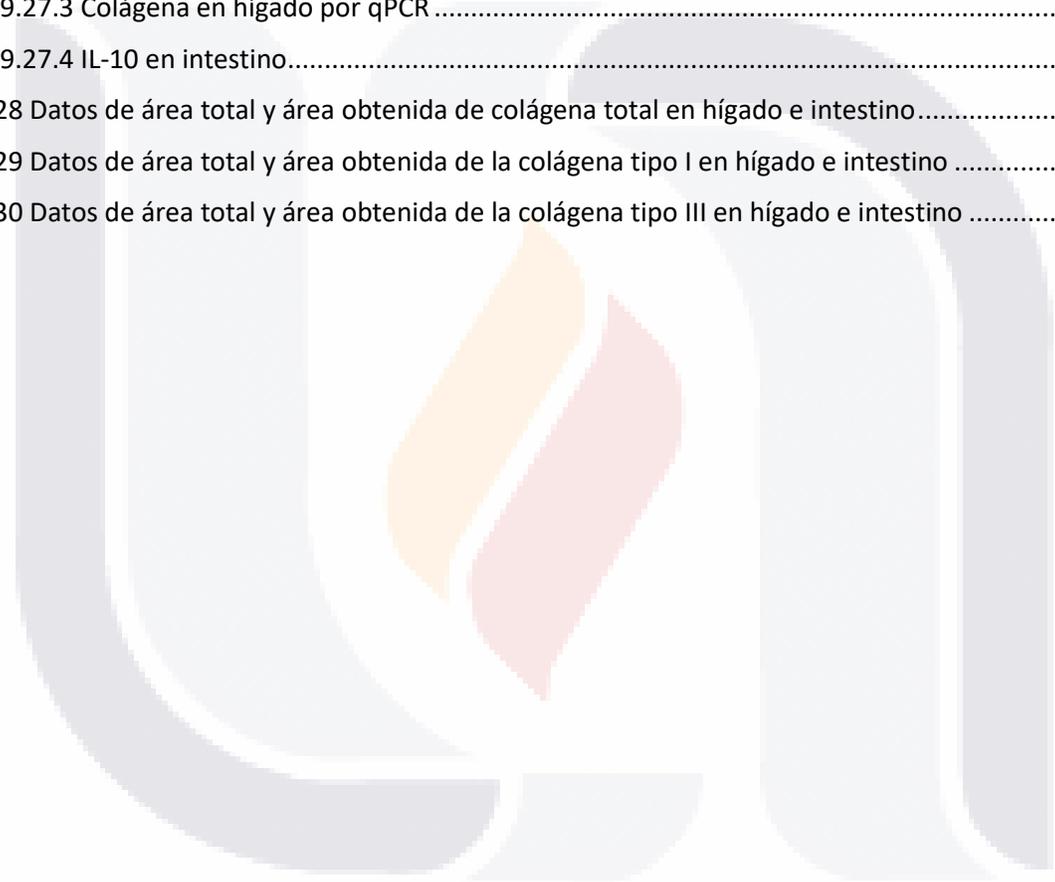
5.1.3 Estadísticos	70
5.1.4 Resultados de las variables analizadas.....	72
5.1.5 Análisis macroscópico del hígado	72
5.1.6 Análisis histopatológico.....	76
5.2 Extracto de berro	88
5.2.1 Pesos de los hígados (Berro)	88
5.2.2 Perfil hepático (Berro).....	89
5.2.3 Análisis morfométrico (Berro).....	94
5.2.4 Análisis genético con qPCR (Berro)	99
5.2.5 Pesos semanales de las ratas vivas (Berro)	103
5.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> silvestre.....	110
5.3.1 Pesos de los hígados (Lactos)	110
5.3.2 Perfil hepático (Lactos).....	111
5.3.3 Análisis morfométrico (Lactos).....	116
5.3.4 Análisis genético con qPCR (Lactos)	121
5.3.5 Pesos semanales de las ratas vivas (Lactos).....	125
5.4 Extracto de berro y de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> silvestres	131
5.4.1 Pesos de los hígados (Berro-Lacto)	131
5.4.2 Perfil hepático (Berro-Lacto).....	132
5.4.3 Análisis morfométrico (Berro-Lacto).....	138
5.4.4 Análisis genético con qPCR (Berro-Lacto)	142
5.4.5 Pesos semanales de las ratas vivas (Berro-Lacto)	146
6. DISCUSIONES.....	152
6.1 Comportamiento de las ratas durante las 8 semanas.....	152
6.1.1 Distribución de grupos	152
6.1.2 Supervivencia	153
6.1.3 Análisis macroscópico del hígado	154
6.1.4 Análisis histopatológico.....	156
6.2 Extracto de berro	160
6.2.1 Pesos de los hígados (Berro)	160
6.2.2 Perfil hepático (Berro).....	161
6.2.3 Análisis morfométrico (Berro).....	170
6.2.4 Análisis genético con qPCR.....	173

6.2.5 Pesos semanales de las ratas vivas	181
6.2.6 Discusiones generales del grupo de berro	182
6.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> silvestre.....	185
6.3.1 Pesos de los hígados (Lactos)	185
6.3.2 Perfil hepático (Lactos).....	186
6.3.3 Análisis morfométrico (Lactos).....	195
6.3.4 Análisis genético con qPCR.....	199
6.3.5 Pesos semanales de las ratas vivas	205
6.3.6 Discusiones generales del grupo de Lactos.....	206
6.4 Extracto de berro y de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> silvestres	210
6.4.1 Pesos de los hígados para Berro-Lacto.....	210
6.4.2 Perfil hepático para Berro-Lacto	211
6.4.3 Análisis morfométrico para Berro-Lacto	220
6.4.4 Análisis genético con qPCR.....	223
6.4.5 Pesos semanales de las ratas vivas	230
6.4.6 Discusiones generales del grupo de Berro-Lacto	231
7. CONCLUSIONES	235
Conclusiones generales.....	237
8. BIBLIOGRAFÍA	238
9. APÉNDICE	261
Anexos de la sección de metodología	261
9.1 Preparación y dosis de CCl ₄	261
9.1.1 Preparación	261
9.1.2 Dosis	261
9.2 Dosis de extracto metanólico de berro.....	263
9.3 Preparación del extracto metanólico de Berro	264
9.4 Metabolitos secundarios del <i>extracto metanólico de berro</i>	266
9.5 Capacidad antioxidante del extracto de berro por las técnicas de DPPH y ABTS	267
9.6 Citotoxicidad (% hemólisis) del extracto de berro	268
9.7 Siembra y resiembra de la cepa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	269
9.8 Medio de cultivo para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> silvestre	269
9.9 Preparación del tratamiento con <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	271
9.10 Preparación de material para el medio de cultivo de <i>L. rhamnosus</i>	272

9.10.1 Esterilización.....	272
9.10.2 Olla de presión	272
9.10.3 Campana de flujo laminar	272
9.11 Cirugía a las ratas	274
9.12 Preparación de Rojo Sirio	275
9.13 Preparación de Hematoxilina de Harris	276
9.14 Técnica para portaobjetos adhesivo	277
9.15 Morfometría.....	278
9.16 Análisis por qPCR.....	279
9.16.1 Extracción de ARN	279
9.16.2 Cuantificación de ARN.....	279
9.16.3 Retro transcripción.....	280
9.16.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)	281
9.17 Procesamiento de las muestras (deshidratación, aclaramiento, inclusión en parafina y corte en microtomo).....	281
9.18 Tinción Hematoxilina-Eosina (HE)	285
9.19 Tinción Rojo Sirio.....	286
9.20 Análisis estadístico	288
Anexos de la sección de resultados	288
9.21 Comparación de sacrificios	288
9.21.1 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 1	289
9.21.2 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 2	290
9.21.3 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 3	291
9.21.4 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 4	292
9.21.5 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 5	293
9.21.6 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 6	294
9.21.7 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 7	296
9.21.8 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 8	297
9.21.9 Comparación de sacrificios para los pesos de los hígados.....	298
9.21.10 Comparación de sacrificios para ALT	299
9.21.11 Comparación de sacrificios para AST	300
9.21.12 Comparación de sacrificios para urea	301
9.21.13 Comparación de sacrificios para Albúmina	302
9.21.14 Comparación de sacrificios para Fosfatasa alcalina	303

9.21.15 Comparación de sacrificios para colágena total en hígado.....	304
9.21.16 Comparación de sacrificios para colágena total en intestino	305
9.21.17 Comparación de sacrificios para Colágena tipo I en hígado	306
9.21.18 Comparación de sacrificios para colágena tipo I en intestino	307
9.21.19 Comparación de sacrificios para Colágena tipo III en hígado	308
9.21.20 Comparación de sacrificios para Colágena tipo III en intestino	309
9.22 Análisis estadístico del peso semanal de las ratas	310
9.22.1 Tabla con los pesos semanales de las ratas	310
ANOVA de los pesos semanales de las ratas.....	312
9.22.2. Semana 1	312
9.22.3 Semana 2	315
9.22.4 Semana 3.....	317
9.22.5 Semana 4.....	320
9.22.6 Semana 5	322
9.22.7 Semana 6.....	324
9.22.8 Semana 7	326
9.22.9 Semana 8.....	329
9.22.10 Todas las semanas.....	332
9.23 Análisis estadístico de los pesos de los hígados.....	333
9.23.1 Tabla de los valores con los pesos de los hígados.....	333
9.23.2 Verificación de supuestos	333
9.23.3 Tabla ANOVA para pesos de los hígados.....	334
9.23.4 Interpretación del ANOVA.....	334
9.23.5 Método de Fisher-LSD para pesos de los hígados.....	334
9.23.6 Gráficos de peso de los hígados	336
9.24 Microfotografías para análisis histopatológico	337
9.24.1 Intactas	337
9.24.2 4S	340
9.24.3 Control Positivo 8 Semanas.....	343
9.24.4 Lacto	345
9.24.5 Berro	353
9.24.6 Berro-Lacto.....	356
9.25 Análisis estadístico del perfil hepático	358

9.25.1 Datos del perfil hepático	358
9.26 Análisis estadístico del análisis morfométrico	370
9.26.1 Colágena total en hígado e intestino	370
9.26.2 Colágena tipo I y tipo III en hígado e intestino.....	375
9.27 Análisis estadístico del PCR	385
Hígado: IL-1, IL-10, Colágena.....	385
9.27.1 IL-1 en hígado	386
9.27.2 IL-10 en hígado	388
9.27.3 Colágena en hígado por qPCR	391
9.27.4 IL-10 en intestino.....	394
9.28 Datos de área total y área obtenida de colágena total en hígado e intestino.....	397
9.29 Datos de área total y área obtenida de la colágena tipo I en hígado e intestino	398
9.30 Datos de área total y área obtenida de la colágena tipo III en hígado e intestino	399



ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 Lóbulo hepático (Tortora, 2013)	5
Imagen 2 Lóbulo portal (Tortora, 2013).....	6
Imagen 3 Acino hepático (Tortora, 2013).	6
Imagen 4 Zonas en que se divide el acino hepático (Tortora, 2013).	7
Imagen 5 Tasa de mortalidad por cirrosis hepática por sexo, 2000-2013. Fuente: INEGI/SS Estadísticas vitales. Defunciones generales 200-2013. CONAPO Proyecciones de población 1990-2030 (Secretaría de Salud, 2015).	17
Imagen 6 Tasa de mortalidad por cirrosis hepática por edad, 2000-2013. Fuente: INEGI/SS Estadísticas vitales. Defunciones generales 200-2013. CONAPO Proyecciones de población 1990-2030 (Secretaría de Salud, 2015).	17
Imagen 7 Tasa de mortalidad por cirrosis hepática por entidad federativa 2000 y 2013. Fuente: INEGI/SS Estadísticas vitales. Defunciones generales 200-2013. CONAPO Proyecciones de población 1990-2030 (Secretaría de Salud, 2015).	18
Imagen 8 Patogénesis de la fibrosis hepática, (ajustada de: Bataller y Brenner, 2005). Se observa en la letra A, la estructura del hígado sano, al que le sigue, tras un daño hepático en B) un hígado fibrótico y sus respectivas alteraciones.	28
Imagen 9 Cromatografía en capa fina del tallo de berro (columna izquierda) y de la hoja (columna derecha) en ambas imágenes	264
Imagen 10 ANOVA para los pesos de la semana 1.....	312
Imagen 11 Test Fisher-LSD pesos semana 1	313
Imagen 12 ANOVA para la semana 2	315
Imagen 13 Test Fisher-LSD pesos semana 2	316
Imagen 14 ANOVA para los pesos de la semana 3.....	318
Imagen 15 Test Fisher-LSD pesos semana 3	318
Imagen 16 ANOVA para los pesos de la semana 4.....	321
Imagen 17 ANOVA para los pesos de la semana 5.....	323
Imagen 18 ANOVA para los pesos de la semana 6.....	325
Imagen 19 Imagen 1 ANOVA para los pesos de la semana 7.....	327
Imagen 20 Test Fisher-LSD pesos semana 7	328
Imagen 21 ANOVA para los pesos de la semana 8.....	330
Imagen 22 Test Fisher-LSD pesos semana 8	330
Imagen 23 ANOVA para pesos de los hígados	334
Imagen 24 Test Fisher-LSD pesos de los hígados.....	334
Imagen 25 ANOVA ALT	359
Imagen 26 Test Fisher-LSD para ALT modificado	359
Imagen 27 ANOVA de ALT	361
Imagen 28 Test Fisher-LSD para AST.....	362
Imagen 29 ANOVA para urea	364
Imagen 30 ANOVA para albúmina	366
Imagen 31 ANOVA de colágena total en hígado	371
Imagen 32 ANOVA de colágena total en intestino.....	373
Imagen 33 ANOVA de colágena tipo I en hígado	377
Imagen 34 Test Fisher-LSD colágena tipo I en hígado.....	377

Imagen 35 ANOVA para porcentaje de colágena tipo I en intestino 380
Imagen 36 ANOVA de colágena tipo III en hígado 382
Imagen 37 ANOVA de colágena tipo III en intestino 384
Imagen 38 ANOVA de IL-1 en hígado (qPCR) 386
Imagen 39 Tests Fischer-LSD para IL-1 en hígado (qPCR) 387
Imagen 40 ANOVA de IL-10 en hígado (qPCR) 389
Imagen 41 Test de Fisher-LSD para IL-10 en hígado (qPCR) 389
Imagen 42 ANOVA de colágena en hígado (qPCR)..... 391
Imagen 43 Test Fisher-LSD para colágena en hígado (qPCR)..... 392
Imagen 44 ANOVA de IL10 en intestino (qPCR) 395
Imagen 45 Test Fisher-LSD para IL-10 en intestino (qPCR) 395



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Acrónimos utilizados en la tesis.....	xxiii
Tabla 2 Principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura para mujeres, en México de 1990-2010 (Lozano et al., 2013).....	14
Tabla 3 Principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura para hombres, en México de 1990-2010 (Lozano et al., 2013).....	15
Tabla 4 Diez principales causas de muerte para ambos sexos, en México 2013 (Lozano et al., 2013).....	16
Tabla 5 Diez principales causas de AVISA perdidos por entidad federativa, México 2013 (Secretaría de Salud, 2015).....	19
Tabla 6 Tendencias para hombres y mujeres en la prevalencia de cirrosis hepática en México, para el año 2030 y 2050 ajustada de (Méndez-Sánchez et al., 2005).....	20
Tabla 7 Tendencias para hombres en la prevalencia de cirrosis hepática en México, ajustada de (Méndez-Sánchez et al., 2005).....	20
Tabla 8 Tendencias para mujeres en la prevalencia de cirrosis hepática en México, ajustada de (Méndez-Sánchez et al., 2005).....	21
Tabla 9 Factores genéticos y no genéticos asociados a la progresión de fibrosis en diferentes tipos de enfermedades crónicas hepáticas (rediseñada de Bataller y Brenner, 2005).	22
Tabla 10 Sistema de puntuación de Child-Pugh para pacientes con cirrosis hepática y su clasificación para indicar prioridad en trasplante hepático (Grattagliano, 2011).	30
Tabla 11 Prueba de laboratorio diagnóstica, etiología sugerida y tratamiento actual ante las formas más frecuentes de cirrosis hepática. Adaptada de (Grattagliano, 2011).....	37
Tabla 12. Grupos de ratas	60
Tabla 13 Distribución de los grupos y número de ratas.....	68
Tabla 14 Mortalidad en el experimento.....	69
Tabla 15 Valores p del ANOVA de todas las variables cuantitativas y su interpretación	70
Tabla 16 Hígados del grupo intacto.....	73
Tabla 17 Hígados del grupo 8S	73
Tabla 18 Hígados del grupo Berro	74
Tabla 19 Hígados del grupo lacto	74
Tabla 20 Hígados del grupo NL.....	75
Tabla 21 Hígados del grupo 4S	75
Tabla 22 Hígados del grupo Berro-lacto.....	76
Tabla 23 Comparaciones histológicas de todos los grupos tomadas al microscopio a 10x con HE y Rojo Sirio	77
Tabla 24 Descripción morfológica de los grupos en HE	78
Tabla 25 Características cualitativas de las muestras teñidas en HE	86
Tabla 27 Perfil hepático (Berro)	89
Tabla 32 Pesos semanales de las ratas control y tratamiento de Berro	103
Tabla 34 Perfil hepático (Lactos)	111
Tabla 39 Pesos semanales de las ratas control y tratamiento de Lactobacillus rhamnosus	125
Tabla 41 Perfil hepático (Berro-Lacto)	132
Tabla 46 Pesos semanales de las ratas control y tratamiento de Berro-Lacto	146
Tabla 47 Detección de metabolitos en extracto de berro	266

Tabla 48 Fórmula del medio de cultivo MRS.....	270
Tabla 49 Preparación del Mix de reacción	280
Tabla 50 Oligonucleótidos de cada gen	281
Tabla 51 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 1	289
Tabla 52 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 2	290
Tabla 53 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 3	291
Tabla 54 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 4	292
Tabla 55 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 5	293
Tabla 56 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 6	294
Tabla 57 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 7	296
Tabla 58 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 8	297
Tabla 59 Comparación entre Lacto-NL para pesos de los hígados.....	298
Tabla 60 Comparación entre Lacto-NL para ALT.....	299
Tabla 61 Comparación entre Lacto-NL para AST.....	300
Tabla 62 Comparación entre Lacto-NL para Urea.....	301
Tabla 63 Comparación entre Lacto-NL para Albúmina	302
Tabla 64 Comparación entre Lacto-NL para Fosfatasa alcalina	303
Tabla 65 Comparación entre Lacto-NL para colágena total en hígado	304
Tabla 66 Comparación entre Lacto-NL para colágena total en intestino.....	305
Tabla 67 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo I en hígado	306
Tabla 68 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo I en intestino.....	307
Tabla 69 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo III en hígado	308
Tabla 70 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo III en intestino.....	309
Tabla 71 Peso de las ratas semanalmente	310
Tabla 72 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 1	312
Tabla 73 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 1.....	312
Tabla 74 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 1	313
Tabla 75 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 2	315
Tabla 76 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 2.....	315
Tabla 77 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 2	316
Tabla 78 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 3	318
Tabla 79 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 3.....	318
Tabla 80 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 3.....	318
Tabla 81 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 4	320
Tabla 82 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 4.....	321
Tabla 83 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 5	322
Tabla 84 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 5.....	323
Tabla 85 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 6	324
Tabla 86 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 6.....	325
Tabla 87 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 7	326
Tabla 88 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 7.....	327
Tabla 89 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 7	328
Tabla 90 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 8	329
Tabla 91 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 8.....	330

Tabla 92 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 8	330
Tabla 93 Pesos de los hígados	333
Tabla 94 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de los hígados	333
Tabla 95 Interpretación ANOVA para los pesos de los hígados	334
Tabla 96 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos de los hígados	335
Tabla 97 Imágenes al microscopio de Intacta 1	337
Tabla 98 Imágenes al microscopio de Intacta 2	338
Tabla 99 Imágenes al microscopio de Intacta 3	339
Tabla 100 Imágenes al microscopio de 4S 1	340
Tabla 101 Imágenes al microscopio de 4S 2	340
Tabla 102 Imágenes al microscopio de 4S 3	342
Tabla 103 Imágenes al microscopio de Control positivo 8S 1.....	343
Tabla 104 Imágenes al microscopio de Control positivo 8S 2.....	344
Tabla 105 Imágenes al microscopio de Control positivo 8S 3.....	345
Tabla 106 Imágenes al microscopio de Lacto 1.....	345
Tabla 107 Imágenes al microscopio de Lacto 2.....	347
Tabla 108 Imágenes al microscopio de Lacto 3.....	348
Tabla 109 Imágenes al microscopio de Lacto 4.....	349
Tabla 110 Imágenes al microscopio de Lacto 5 (NL1)	350
Tabla 111 Imágenes al microscopio de Lacto 6 (NL2)	351
Tabla 112 Imágenes al microscopio de Lacto 7 (NL3)	352
Tabla 113 Imágenes al microscopio de Berro 1	353
Tabla 114 Imágenes al microscopio de Berro 3	355
Tabla 115 Imágenes al microscopio de Berro-Lacto 1	356
Tabla 116 Imágenes al microscopio de Berro-Lacto 2	357
Tabla 117 Marcadores séricos para evaluar el perfil hepático de los diferentes grupos	358
Tabla 118 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de ALT	358
Tabla 119 Interpretación ANOVA para ALT.....	359
Tabla 120 Interpretación del método de Fisher-LSD para ALT	359
Tabla 121 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de AST.....	360
Tabla 122 Interpretación ANOVA para AST.....	361
Tabla 123 Interpretación del método de Fisher-LSD para AST	362
Tabla 124 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de Urea	363
Tabla 125 Interpretación ANOVA para Urea.....	364
Tabla 126 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de albúmina.....	365
Tabla 127 Interpretación ANOVA para albumina.....	366
Tabla 128 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de fosfatasa alcalina	367
Tabla 129 ANOVA para fosfatasa alcalina	367
Tabla 130 Interpretación ANOVA para fosfatasa alcalina.....	367
Tabla 131 Porcentaje de colágena total en hígado e intestino.....	370
Tabla 132 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena total en hígado	371
Tabla 133 Interpretación ANOVA para colágena total en hígado.....	371
Tabla 134 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena total en intestino.....	373
Tabla 135 Interpretación de ANOVA de colágena total en intestino.....	373

Tabla 136 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino 375

Tabla 137 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino 375

Tabla 138 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo I en hígado 376

Tabla 139 Interpretación ANOVA de colágena tipo I en hígado 377

Tabla 140 Interpretación del método de Fisher-LSD para colágena tipo I en hígado..... 378

Tabla 141 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo I en intestino 379

Tabla 142 Interpretación ANOVA para porcentaje de colágena tipo I en intestino 380

Tabla 143 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo III en hígado 381

Tabla 144 Interpretación ANOVA de colágena tipo III en hígado 382

Tabla 145 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo III en intestino 383

Tabla 146 Interpretación ANOVA para colágena tipo III en intestino..... 384

Tabla 147 Expresión relativa de IL-1, IL-10 y colágena en hígado (qPCR)..... 385

Tabla 148 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de IL-1 en hígado (qPCR) 386

Tabla 149 Interpretación de ANOVA para IL-1 en hígado (qPCR) 386

Tabla 150 Interpretación del método de Fisher-LSD para IL-1 en hígado 387

Tabla 151 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de IL-10 en hígado (qPCR) 388

Tabla 152 Interpretación del ANOVA de IL-10 en hígado (qPCR) 389

Tabla 153 Interpretación del método de Fisher-LSD para IL-10 en hígado (qPCR)..... 389

Tabla 154 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena en hígado (qPCR)..... 391

Tabla 155 Interpretación de ANOVA de colágena en hígado (qPCR)..... 391

Tabla 156 Interpretación del método de Fisher-LSD para colágena en hígado (qPCR) 392

Tabla 157 Datos de IL-10 en intestino (qPCR) 394

Tabla 158 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de IL-10 en intestino (qPCR) 394

Tabla 159 Interpretación de ANOVA de IL10 en intestino (qPCR) 395

Tabla 160 Interpretación del método de Fisher-LSD para colágena en hígado (qPCR) 395

Tabla 161 Área total de colágena en hígado e intestino (análisis morfométrico) 397

Tabla 162 Colágena tipo I y sus porcentajes en hígado e intestino, analizada en laminillas a rojo sirio por morfometría con ImageJ 398

Tabla 163 Área total de colágena tipo III por morfometría con ImageJ 399

ACRÓNIMOS

Tabla 1 Acrónimos utilizados en la tesis

%	Por ciento	g	Gramos	mm³	Milímetros cúbicos
°C	Grados centígrados	h	horas	MMP	Metaloproteinasas de matriz
μ	micras	HE	Hematoxilina-Eosina	mol	moles
μL	microlitros	HGNA	Hígado Graso no-alcohólico	MRS	Agar (Man-Rogosa-Sharpe)
4S*	Control positivo de las 4 semanas	HSC	Células Estelares Hepáticas	n	Número de elementos (muestras)
8S*	Control positivo de las 8 semanas	I	Intacto	NL	Nuevo lacto
ALT	Alaninoaminotransferasa	IFN-γ	Interferón gamma	OD	Densidad óptica
AP	Fosfatasa alcalina	i.p.	Intraperitoneal	rpm	Revoluciones por minuto
AST	Aspartato aminotransferasa	kg	Kilogramo	RS	Rojo Sirio
B*	Berro	L*	Lacto	SBP	Peritonitis bacteriana espontánea (Spontaneous Bacterial Peritonitis)
BL*	BerroLacto	MEC	Matriz extracelular	SEM	Error estándar de la media (Standar Error of the mean)
CCl₄	Tetracloruro de Carbono	mg	Miligramos	TGF-β	Factor de crecimiento transformador beta (transforming growth factor beta)
cm	centímetros	min	Minutos	UFC	Unidades formadoras de colonias
Cm²	Centímetros cuadrados	mL	mililitros	v/v	Volumen/volumen
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)	mm	Milímetros		

* Son los grupos de tratamientos utilizados en el experimento de esta tesis

RESUMEN

La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular, en el curso de procesos reactivos y de reparación. La fibrosis se desarrolla debido a diversas enfermedades y representa un problema no resuelto, diagnóstica y terapéuticamente. La fibrosis hepática es un problema de salud mundial. La fibrosis hepática avanzada y las enfermedades crónicas del hígado resultan en cirrosis, con alta mortalidad y morbilidad.

El desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de la fibrosis se ha convertido en un punto importante para los investigadores clínicos y de ciencias básicas. El objetivo del presente trabajo es evaluar los efectos del berro (*Nasturtium officinale*) y *Lactobacillus rhamnosus* como tratamientos antifibróticos en un modelo de inducción de fibrosis con Tetracloruro de Carbono (CCl₄) en rata.

Métodos: Se utilizaron seis grupos de ratas Wistar machos. A cada grupo se le asignó un tratamiento diferente: 1) Grupo control de ratas sanas: no recibieron ni Tetracloruro de Carbono, ni berro, ni *Lactobacillus rhamnosus*. A los demás grupos, del 2 al 6, se les indujo fibrosis hepática mediante Tetracloruro de carbono (0.8 mL/kg de la mezcla 1:1 v/v de CCl₄ y petrolato), dos veces a la semana durante 8 semanas consecutivas, para la inducción de fibrosis hepática, y para el grupo 2 (control positivo de las cuatro semanas), donde se aplicó dos veces a la semana únicamente durante 4 semanas consecutivas. El grupo 3 es el control positivo de las 8 semanas. De los grupos 4-6: recibieron su tratamiento respectivo de la semana cuatro a la ocho, cinco veces a la semana. Grupo 4) Recibió berro (extracto de *Nasturtium officinale*, 600 mg/kg/animal/día). Grupo 5) Recibió cepa silvestre de *Lactobacillus rhamnosus* (5x10⁹UFC/mL/animal/día). Grupo 6) Recibieron extracto de berro (600 mg/kg/animal/día) y *Lactobacillus rhamnosus* (5x10⁹UFC/mL/animal/día) en iguales proporciones.

Se midieron periódicamente el peso de las ratas, rangos de supervivencia. Para evaluar la función hepática, se midieron los niveles de marcadores séricos (urea, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y albumina), se les realizó histopatología a las laminillas con tejido hepático y del intestino grueso (utilizando tinción de Hematoxilina-Eosina, y de Rojo Sirio). Adicionalmente, se analizó mediante qPCR la interleucina-10 (IL-10), interleucina-1 (IL-1) y colágena.

Resultados: De los tres tratamientos, Berro, Lactobacilos y mezcla de ambos, se tienen los siguientes resultados: para el tratamiento de la fibrosis con extracto de Berro se observó una disminución del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

grosor y cantidad de las fibras de colágena, así como una protección en la funcionalidad del hígado ya que no hay incremento en AST y ALT a las 8 semanas, a diferencia del control positivo en el que hay un aumento significativo. Posiblemente este efecto antifibrótico y protector de la función hepática sea en respuesta a la actividad antioxidante del berro ya que generó una respuesta antiinflamatoria a través de IL-10.

Las bacterias probióticas promovieron un efecto atenuante del daño hepático, el daño histológico del parénquima no se recuperó por completo, pero hubo una mejora considerable y visible por la disminución de los depósitos de colágeno, restaurando la funcionalidad del hígado. El efecto del CCl₄ indujo una sobreexpresión de IL-1 en hígado, mientras que el efecto de las bacterias fue disminuir esta expresión e incrementar un perfil antiinflamatorio a nivel hepático e intestinal causando protección al parénquima hepático mediante la reparación del tejido.

La combinación del extracto con las bacterias probióticas, generaron una protección en la funcionalidad hepática ya que hay un leve incremento en AST y ALT sin llegar a los niveles del control positivo. Además, se puede observar el efecto antifibrótico de esta combinación Berro-Lacto, con la elevación de IL-10 tanto en hígado como en intestino, induciendo en hígado la reparación de tejido mediante la proliferación de tejido y la inhibición de apoptosis de células epiteliales.

Conclusiones: Los resultados obtenidos muestran que el extracto de *Nasturtium officinale* y el tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus*, así como su combinación, tienen efectos antifibróticos y hepatoprotectores, en el modelo de rata Wistar.

ABSTRACT

Liver fibrosis is the excessive accumulation of extracellular matrix proteins, in the course of reactive and reparative processes. Fibrosis develops because of several diseases and presents a major diagnostically and therapeutically unsolved problem. Liver fibrosis is a worldwide health problem. Advanced liver fibrosis and chronic liver diseases results in cirrhosis, with high morbidity and mortality.

The development of therapeutic strategies for the treatment of fibrosis has become an important focus for basic and clinical researchers. The aim of the present study is to evaluate the effects of watercress (*Nasturtium officinale*) and *Lactobacillus rhamnosus* as antifibrotic treatments in rodent models of carbon tetrachloride (CCl₄)-induced fibrosis.

METHODS: Six groups of male Wistar rat have been used. Each group was assigned with a different treatment: 1) healthy control group rats: didn't received carbon tetrachloride, neither Watercress or *Lactobacillus rhamnosus*. Groups 2-6 received carbon tetrachloride (0.8 mL/kg of 1:1 v/v mixture of CCl₄ and petrolatum) two times per week for 8 consecutive weeks for induction of liver cirrhosis, and in Group 2 (positive control of 4 weeks): two times per week for 4 consecutive weeks. Groups 4-6 received their respective treatment from week 4 to 8, five times per week. Group 4) Received watercress (*Nasturtium officinale* extract, 600 mg/kg/animal/day). Group 5) Received wild *L. rhamnosus* (5x10⁹ CFU/mL/animal/day). Group 6) Received *Nasturtium officinale* extract (600 mg/kg/animal/day) and *L. rhamnosus* (5x10⁹ CFU/mL/animal/day) in equal proportions.

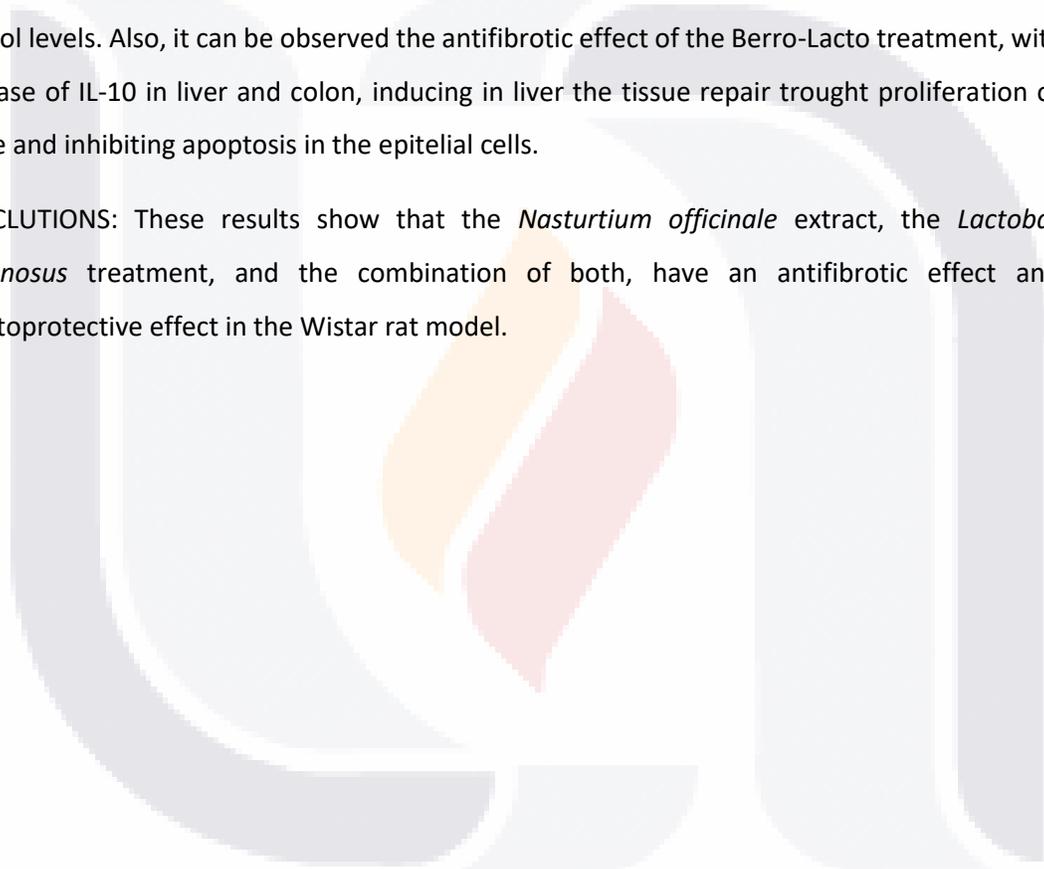
Body weights, survival rates, levels of serum markers (urea, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and albumin) were measured to evaluate hepatic function, histopathology of liver and large intestine tissue slices (using Sirius red and hematoxylin and eosin [HyE] staining). Additionally, interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 (IL-1) and collagen was analyzed trough qPCR.

RESULTS: In the fibrosis treatment with watercress it was observed a decrease in the thickness of collagen fibers, as well as a protection in the liver functionality since the lack of increment in AST and ALT at the 8 weeks, compared with the positive control in which there is a significant increase. The antifibrotic and protective effect of the liver function maybe due in response to the antioxidant activity of the watercress since it generate an anti-inflammatory action through the IL-10.

The probiotic bacteria promoted a mitigating effect against liver damage, the histological damage in the liver parenchyma were not fully recovered, but there was a considerable and visible improvement in the decrease in the amounts of collagen deposits, retribushing the liver functionality. The CCl₄ effect induced a liver IL-1 overexpression, meanwhile the bacteria effect was to diminish this expression and increase the anti-inflammatory effect of the liver and the colon, causing protection of the liver parenchyma trough tissue repair.

The combination of the extract and the probiotic bacteria, generate a protection in the liver functionality since there is a slight increase in the AST and ALT levels without reaching the positive control levels. Also, it can be observed the antifibrotic effect of the Berro-Lacto treatment, with the increase of IL-10 in liver and colon, inducing in liver the tissue repair trough proliferation of the tissue and inhibiting apoptosis in the epithelial cells.

CONCLUSIONS: These results show that the *Nasturtium officinale* extract, the *Lactobacillus rhamnosus* treatment, and the combination of both, have an antifibrotic effect and an hepatoprotective effect in the Wistar rat model.



INTRODUCCIÓN

El hígado es un órgano vital para el organismo, ya que participa en múltiples funciones esenciales. Las principales funciones del hígado son 1) filtración y almacenamiento de la sangre; 2) metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, grasas, hormonas y compuestos químicos extraños; 3) formación de la bilis; 4) depósito de vitaminas y de hierro, y 5) síntesis de los factores de coagulación.

Las funciones del hígado están relacionadas entre sí, como se manifiesta en los trastornos hepáticos, donde se alteran numerosas funciones a la vez. El hígado es susceptible de padecer diversos males y enfermedades, entre ellos hepatitis A, B, C y E, alcoholismo, hígado graso, lesiones por intoxicación con compuestos químicos, cáncer, fibrosis y cirrosis.

Entrando en materia, la fibrosis hepática es producto de un daño constante al hígado que provoca la acumulación de proteínas de MEC y va formando una cicatriz fibrosa que distorsiona la arquitectura hepática, la cual, de no ser controlada, se convierte en cirrosis, lo que genera disfunción hepatocelular y un incremento en la resistencia intrahepática del fluido sanguíneo, que resulta en insuficiencia hepática e hipertensión portal, respectivamente.

Se creía que la fibrosis era un proceso irreversible, debido a que el tejido sano se aprecia cicatrizado y sustituido con colágeno. Posteriormente se descubrió que podía ser potencialmente reversible, aunque los tratamientos antifibróticos que se han utilizado no han sido lo suficientemente efectivos, pues son inadecuados, limitados y tienden a generar efectos adversos bastante serios. Esto deja al trasplante hepático, que es un procedimiento invasivo con diversas y graves complicaciones, como el único tratamiento efectivo contra la fibrosis.

Para no llegar al extremo de un trasplante, se investigarán tratamientos alternativos con berro y con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus*.

Debido a que el berro, planta perenne de alto valor nutricional, ha sido utilizado desde hace mucho tiempo con fines curativos, como diurético, depurativo y expectorante, puede ser un tratamiento contra diversas enfermedades, como la tuberculosis, cáncer, diabetes o alergias.

En su composición ha presentado compuestos que exhiben propiedades antioxidantes, lo cual lo hace un excelente y prometedor tratamiento para probarlo contra la fibrosis hepática, ya que actuaría contra la hepatotoxicidad, además de que ha demostrado tener efectos hepatoprotectores, lo cual lo hace útil en doble función. Se propone utilizar el berro en su forma de extracto, ya que se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ha reportado que el extracto metanólico es el que mejor capacidad antioxidante obtiene, siendo los flavonoides y fenoles los componentes principales y los responsables de obtener los siguientes beneficios: supresión de peroxidación lipídica, capacidad antioxidante y efectos antiinflamatorios, además de que no hacen daño a la mucosa gástrica.

Por otra parte, se utilizará una cepa silvestre de *Lactobacillus rhamnosus*, ya que se espera que sus cualidades de probióticos ejerzan efecto hepatoprotector en su relación con el microbiota intestinal, para la disminución del daño hepático durante la generación de fibrosis. Los *Lactobacillus rhamnosus* ya han sido probados como tratamiento contra enfermedades hepáticas (encefalopatía hepática, enfermedad del hígado graso no alcohólico, hígado alcohólico, hipertensión hepática y función hepática en cirrosis), así como para la prevención de éstas.

Es de esperarse que funcionen contra la fibrosis hepática debido principalmente a cuatro características: 1) Evitan las uniones epiteliales y el crecimiento de bacterias patógenas, 2) mejoran la función de la barrera intestinal, 3) incentivan citosinas protectoras en el sistema inmunológico y 4) modulan la percepción del dolor intestinal. Los usos del *Lactobacillus rhamnosus* han ido desde la biorremediación, hasta tratamientos contra parásitos, alergias, y males estomacales. Sin embargo, se desea probarlo contra la fibrosis hepática ya que ha demostrado tener muy buena supervivencia en condiciones gastrointestinales debido a que presenta muy buena adherencia a las células epiteliales y mucosa. Ya ha demostrado tener efectos positivos al disminuir los depósitos de colágeno y la expresión de IL-6 en hígado, entre otros beneficios, lo que la hace apta para probarse como posible tratamiento antifibrótico.

Para las pruebas se utilizará un modelo en ratas Wistar a las cuales se les inducirá fibrosis hepática mediante tetracloruro de carbono (CCl₄) y se les administrarán diferentes tratamientos con base en los extractos de berro y el *Lactobacillus rhamnosus*.

El presente trabajo experimental tiene como objetivo evaluar el efecto del extracto de berro (*Nasturtium officinale*) y *Lactobacillus rhamnosus* sobre la fibrosis hepática, esperando encontrar un tratamiento alternativo para la fibrosis hepática, que sea más cercano y certero hacia la disminución del daño generado en la fibrosis hepática.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la fibrosis es un problema de salud mundial; asociada con mortalidad y morbilidad. Aparece como consecuencia de diversas enfermedades crónicas que afectan al hígado. Las causas de fibrosis pueden ser por la exposición a diferentes contaminantes medioambientales, xenobióticos, causas congénitas, metabólicas, inflamatorias, parasitarias, vasculares, toxinas o medicamentos como paracetamol, CCl₄, tioacetamida y alcohol. Los tratamientos estándar están enfocados a controlar la sintomatología generada durante esta patología crónica; de no ser posible retirar el agente causal de la fibrosis, el único tratamiento efectivo es el trasplante de hígado, que es un proceso invasivo.

Es por esto que se sigue buscando con gran interés un tratamiento alternativo no invasivo para prevenir y disminuir la fibrosis hepática generada por diversas etiologías.

JUSTIFICACIÓN

El hígado participa en múltiples funciones relacionadas con la digestión, desintoxicación, balance de fluidos y electrolitos, y hemostasis. Estas actividades pueden ser divididas en a) funciones sintéticas, b) secreciones biliares, y c) desintoxicación. La naturaleza esencial de estas funciones se vuelve aparente en pacientes con cirrosis hepática (cicatrización) o falla hepática, en quienes hay drenaje biliar inadecuado, desintoxicación defectuosa, o defectos en síntesis de proteínas plasmáticas (Stanger, 2015).

Antiguamente se pensaba que la fibrosis hepática era un proceso irreversible, sin embargo, hay estudios que demuestran que es potencialmente reversible. Se ha investigado la patogénesis molecular del daño hepático, sin embargo, la fibrosis hepática no cuenta con un tratamiento específico, ni adecuado; las terapias son limitadas y conllevan serios efectos adversos, donde el único tratamiento efectivo consiste en un procedimiento invasivo: el trasplante hepático. Es por esto que actualmente existe un gran interés por la posibilidad de obtener terapias antifibróticas y un tratamiento preventivo y eficaz contra la fibrosis hepática proveniente de diversas etiologías (Bataller y Brenner, 2005; Hasan et al., 2015; Liu et al., 2016).

Los tratamientos de las enfermedades hepáticas con terapias antioxidantes son consideradas de suma importancia contra la fibrosis/cirrosis hepática, ya que inhiben los cambios oxidativos (Abdulaziz et al., 2013; Favari et al., 2013) y producen efecto hepatoprotector a través de mecanismos antioxidantes que atrapan a los radicales libres y ROS (Abdulaziz et al., 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los fitoquímicos como los compuestos fenólicos exhiben propiedades antioxidantes (Abdulaziz et al., 2013), los tratamientos antioxidantes se consideran como los medicamentos más prometedores ya que inhiben los cambios oxidativos (Bataller y Brenner, 2005; Favari et al., 2013) por lo que se propone utilizar el berro (*Nasturtium officinale*) en el que diversos estudios han demostrado una notable capacidad antioxidante (Gill et al., 2007; Haro et al., 2018; Shahani et al., 2017; Troncoso y Guija, 2013; Yazdanparast et al., 2008) mediante la cual posiblemente podrá controlar la respuesta inflamatoria crónica, que es la fase inicial de la fibrosis.

Por otra parte, los probióticos ofrecen también beneficios contra las enfermedades hepáticas, incluyendo la función hepática en cirrosis/fibrosis (Lo et al., 2014) y la reducción en la inflamación crónica sistémica (Kobyliak et al., 2018). Los probióticos se definen como microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas, confieren beneficios de salud al huésped (Kobyliak, Falalyeyeva, Mykhalchyshyn, Kyriienko, y Komissarenko, 2018; Lo, Austin, y Freeman, 2014). Uno de los probióticos más estudiado es el *Lactobacillus rhamnosus*, que exhibe excelentes efectos beneficiosos a la salud de quien lo consume, pues además de mostrar una muy buena adherencia a las células epiteliales y a la mucosa, lo que le da una alta habilidad de supervivencia en condiciones gastrointestinales (Lebeer et al., 2007), ha demostrado sus efectos tanto en el tratamiento como en la prevención de padecimientos gastro-intestinales (Mantegazza et al., 2018), es ampliamente usado contra enfermedades hepáticas por sus efectos benéficos en la barrera intestinal y el perfil inflamatorio, además tiene efectos en la reducción de endotoxemia y mejoras en la disbiosis intestinal de pacientes con cirrosis. También han demostrado que el *Lactobacillus rhamnosus* tuvo efectos positivos en el tratamiento de la progresión de la fibrosis y redujo el depósito de colágeno, contenido en CK7 y expresión de IL-6 en hígado (Hammes et al., 2017). El tratamiento no mostró cambios en la manifestación clínica general ni en los parámetros del flujo biliar, sin embargo, basados en sus resultados, Hammes y colaboradores (2017), sugieren que *Lactobacillus rhamnosus* puede ser una terapia prometedora como tratamiento adyuvante a la fibrosis hepática (Hammes et al., 2017) pero es necesario seguir investigando su efecto en fibrosis hepática e intentar dilucidar y comprender mejor su comportamiento ante la fibrosis.

Este proyecto de tesis contribuye a esta necesidad que surge de encontrar tratamientos alternativos que eviten el avance del daño hepático durante la fibrosis hepática, para lo cual se evaluará el efecto antifibrótico de *Lactobacillus rhamnosus* silvestre y extracto de berro en un modelo de rata Wistar con fibrosis inducida por CCl₄.

1. ANTECEDENTES

1.1 HÍGADO

1.1.1 Descripción, organización y función

El hígado es el órgano más grande del organismo, su tamaño varía de acuerdo con la especie. El peso de los hígados en los carnívoros es de 3-4% de su peso vivo o peso corporal, el 2% en omnívoros, y del 1-1.5% en herbívoros. El parénquima hepático está conformado por una red compleja de células epiteliales, soportadas por tejido conectivo e irrigado con la vena portal y la arteria hepática (Madhan y Raju, 2014).

Existen tres formas de organización anatómica y funcional donde convergen hepatocitos, conductos biliares y sinusoides hepáticos:

- 1) Lóbulo hepático es la unidad estructural del hígado (Madhan y Raju, 2014), en este modelo cada lóbulo tiene forma hexagonal, en cuyo centro está la vena central y sinusoides hepáticos. Hay una triada portal en tres de sus ángulos. Esta disposición del hígado es muy fácil de apreciarse en cerdos adultos, no tanto en humanos, donde no se encuentran tan definidos (Tortora, 2013).

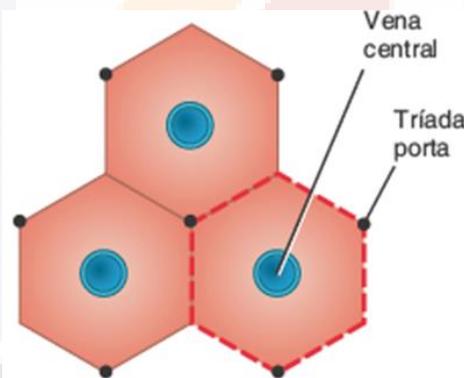


Imagen 1 Lóbulo hepático (Tortora, 2013)

- 2) Lóbulo portal, es donde lo principal es la función exócrina del hígado, colocando al conducto biliar de la triada portal en el centro, lo que hace que el lóbulo portal tenga forma triangular, conectando tres venas centrales a través de líneas imaginarias. Este modelo no es ampliamente aceptado.

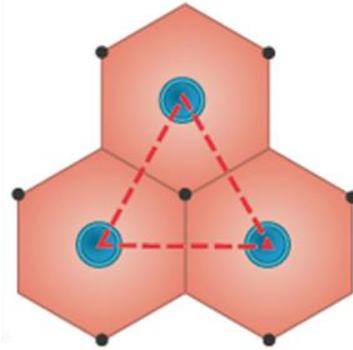


Imagen 2 Lóbulo portal (Tortora, 2013).

3) Acino hepático: Es la unidad estructural y funcional más pequeña del hígado, siendo la más aceptada actualmente. Se conforma de una porción ovalada que contiene porciones de dos lóbulos hepáticos contiguos, donde las orillas del óvalo (eje corto) contienen ramas de la triada portal, mientras que su eje largo de dos líneas curvas, son las que conectan dos venas centrales del eje corto.

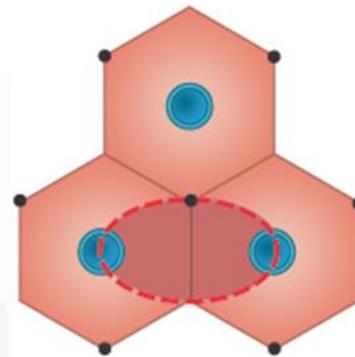


Imagen 3 Acino hepático (Tortora, 2013).

El acino hepático permite dividir en zonas a los hepatocitos, donde:

- a. Zona 1: Son las células más cercanas a las ramas de la triada portal, por lo que son las primeras en recibir de la sangre: Oxígeno, nutrientes y toxinas. También son las primeras en recoger y almacenar glucosa para degradarla en tiempos de ayuno. En cuanto a las toxinas, son las primeras en mostrar cambios fisiológicos tras su exposición a ellas, aunque también sucede al haber obstrucción de los conductos biliares. Estas células son las últimas en morir cuando existen alteraciones en la circulación, y son las primeras en regenerarse.

- b. Zona 2: Tienen características estructurales y funcionales parecidas a las de la zona 1 y zona 3.
- c. Zona 3: Son las más alejadas de la triada portal y su circulación, por ello, son las últimas en mostrar los efectos de una obstrucción biliar o intoxicación, y las últimas en regenerarse, siendo las primeras en mostrar acumulación de grasa.

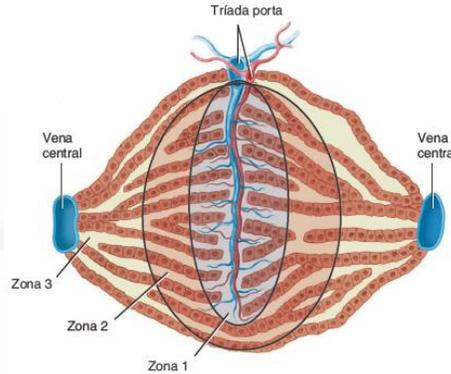


Imagen 4 Zonas en que se divide el acino hepático (Tortora, 2013).

Las principales funciones del hígado son 1) filtración y almacenamiento de la sangre; 2) metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, grasas, hormonas y compuestos químicos extraños; 3) formación de la bilis, excreción de bilirrubina, síntesis de sales biliares; 4) Almacenamiento de glucógeno, vitaminas (A, B₁₂,D,E y K) y minerales (Fe, Cu); 5) síntesis de los factores de coagulación 6) Detoxificación de sustancias y 6) Fagocitosis (Algunas bacterias y glóbulos blancos y rojos) (Guyton y Hall, 2006; Stanger, 2015; Tortora, 2013). El hígado es un órgano vital ya que sus múltiples funciones están relacionadas entre sí, como se manifiesta en los trastornos hepáticos, donde se alteran numerosas funciones a la vez (Guyton y Hall, 2006).

1.1.2 Daño hepático

El hígado como órgano vital es susceptible a diversas enfermedades, principalmente: Hepatitis A,B,C y E, alcoholismo, hígado graso, cáncer y es propenso también a sufrir lesiones por diversos compuestos químicos (Favari et al., 2013), como el tetracloruro de Carbono, tioacetamida, paracetamol, xenobióticos, entre otros. El daño hepático ocasionado por estas causas generan: falla hepática, drenaje biliar inadecuado, detoxificación defectuosa y defectos en la síntesis de proteínas plasmáticas (Stanger, 2015).

1.2. FIBROSIS HEPÁTICA

1.2.1 Definición/ descripción general

Después de un daño hepático agudo, por ejemplo, hepatitis viral, las células del parénquima se regeneran y reemplazan a las células necróticas o apoptóticas. Este proceso es asociado con la respuesta antiinflamatoria y un depósito limitado de MEC. Si el daño hepático persiste, eventualmente fallará la regeneración hepática y los hepatocitos serán sustituidos por abundante MEC, incluyendo colágeno fibrilar (Bataller y Brenner, 2005).

La fibrosis hepática es un proceso caracterizado por el exceso de matriz extracelular (MEC) como el colágeno tipo I (Hasan et al., 2015), o tejido conectivo en el parénquima hepático (Abdulaziz et al., 2013; Domitrović et al., 2010). La acumulación de colágeno en el parénquima hepático lleva a la fibrosis hepática (Hasan et al., 2015). La fibrosis hepática avanzada resulta en cirrosis, falla hepática, hipertensión portal y a menudo requieren de trasplante hepático (Bataller y Brenner, 2005).

La fibrosis hepática avanzada, puede progresar a estadios más severos con falla hepática, hipertensión portal y resultando en cirrosis (Bataller y Brenner, 2005; Yanguas et al., 2016), que ocurre cuando los acinos hepáticos son sustituidos por nódulos y más adelante a carcinoma hepatocelular (Yanguas et al., 2016).

La fibrosis hepática gradualmente evoluciona a cirrosis hepática y es asociada con mortalidad y morbilidad (Abdulaziz Bardi et al., 2013). La cirrosis hepática se conoce desde la época de Hipócrates, donde Laennec fue el que acuñó el término (Mantilla et al., 2016).

1.2.2 Importancia de la fibrosis

La fibrosis hepática gradualmente evoluciona a cirrosis hepática (Abdulaziz Bardi et al., 2013), al existir daño crónico (Hasan et al., 2015b). El conocimiento de los mecanismos ocurridos en la fibrosis hepática resultan de gran importancia, dado que el componente dinámico de la resistencia vascular intrahepática es reversible y, por tanto, una diana terapéutica (Bernal y Bosch, 2018).

1.2.2.1 Cirrosis

En pacientes diagnosticados con daño hepático y posteriormente fibrosis, su progresión a cirrosis puede ocurrir de 15 a 20 años después de su diagnóstico. Pacientes diagnosticados con cirrosis se clasifica como cirrosis compensada o descompensada. En la cirrosis descompensada, existe suficiente daño hepático que el hígado es incapaz de realizar sus funciones vitales de manera efectiva y su declive funcional progresa rápidamente (Muir, 2015).

La transición de una cirrosis compensada a una descompensada se marca por el desarrollo de ciertas complicaciones que incluyen: ascitis, ictericia y várices esofágicas. La supervivencia asociada a las dos etapas de cirrosis difiere notoriamente: sujetos con cirrosis compensada tienen una media de supervivencia mayor a los 12 años, mientras que la media de supervivencia para los pacientes descompensados es menor a 2 años (Muir, 2015).

Los estudios de Ginés et al., (1987) indicaron que una alta proporción de pacientes mantienen su cirrosis compensada durante muchos años después de ser diagnosticada. Diez años después de ser diagnosticados, la probabilidad de permanecer compensados fue del 42% y la tasa de probabilidad de supervivencia del 47%. Una vez que ocurre la descompensación clínica, sin embargo, la prognosis es muy pobre (16% de probabilidad de supervivencia a 5 años) (Ginès, Kamath, y Arroyo, 2011a).

La historia natural de la cirrosis se caracteriza por una fase asintomática, donde la enfermedad puede permanecer oculta durante años, de tal manera que su descubrimiento ocurre de forma accidental, al detectar una hepatomegalia de borde duro y cortante o el hallazgo de anomalías de laboratorio en el curso de una analítica rutinaria, esta primera fase es denominada cirrosis hepática compensada; seguida de una fase sintomática y rápidamente progresiva, marcada por el desarrollo y manifestación de complicaciones derivadas de la hipertensión portal y de la insuficiencia hepática. Esta última fase se conoce como cirrosis hepática descompensada. El fenómeno clave que marca el paso de una fase a la siguiente, es el aumento de la presión portal (hipertensión portal) y la progresión de la cirrosis compensada a descompensada dependerá directamente de la causa y de su posible tratamiento (Bernal y Bosch, 2018).

Hipertensión portal

La hipertensión portal se define como un incremento del gradiente de presión portal (la diferencia entre la presión portal y la presión en la vena cava inferior o en la vena suprahepática). Los valores normales son de 1 a 5 mmHg (Bernal y Bosch, 2018).

El factor inicial que conduce a la aparición de hipertensión portal en la cirrosis es el aumento de la resistencia vascular hepática. Esto se debe tanto a un factor mecánico (la distorsión de la arquitectura vascular originada por la fibrosis, los nódulos de regeneración y fenómenos de microtrombosis u oclusión vascular), como a un componente dinámico (la activación de las células estrelladas perisinusoidales hace que éstas junto con miofibroblastos periportales y células del músculo liso de las vénulas portales desarrollen capacidades contráctiles). La activación de estos elementos contráctiles se ve favorecida por un estado de disfunción endotelial en los sinusoides,

que da lugar a una insuficiente producción de factores vasodilatadores endógenos, como el óxido nítrico (ON), junto con el aumento de factores vasoconstrictores, como el tromboxano A2, la endotelina y el sistema reninaangiotensina (Bernal y Bosch, 2018). Estos vasodilatadores son muy importantes, ya que, cualquier tipo de daño hepático está asociado a angiogénesis, remodelación sinusoidal y expansión de las células estelares hepáticas, por lo tanto, los mediadores vasoactivos como óxido nítrico y monóxido de Carbono, están involucrados en este mecanismo (Karimzadeh-Toosi, 2015).

1.2.2.1.1 Etapas de la cirrosis

La cirrosis es un proceso dinámico que puede subclasificarse en diferentes etapas clínicas (Muir, 2015), que se describen en cuatro fases con unas características clínicas y un pronóstico bien diferenciados: Estadio 1: ausencia de varices esofágicas y de ascitis; 1% de mortalidad al año. Estadio 2: varices esofágicas sin antecedente de hemorragia y sin ascitis; 3.4% de mortalidad al año. Estadio 3: presencia de ascitis con o sin varices esofágicas; 20% de mortalidad al año. Estadio 4: hemorragia gastrointestinal por hipertensión portal, con o sin ascitis; 57% de mortalidad al año. Los estadios 1 y 2 corresponden a pacientes con la fase de cirrosis hepática compensada mientras que los estadios 3 y 4 corresponden con la fase de cirrosis hepática descompensada (Bernal y Bosch, 2018).

La cirrosis es una patología que es considerada como un problema de salud pública ya que afecta a la población económicamente activa (Consejo de Salubridad General, 2009).

1.2.2.2 Importancia de la fibrosis en humanos

La fibrosis hepática actualmente representa un problema de salud mundial, inicia con necrosis tisular e inflamación, posteriormente evoluciona a cirrosis la cual aparece en las etapas finales de diversas enfermedades hepáticas crónicas y a la que se le atribuye un nivel considerable de mortalidad y morbilidad (Abdulaziz Bardi et al., 2013; Bataller y Brenner, 2005; Mantilla et al., 2016), pues trae como consecuencias desarrollo de hipertensión portal e insuficiencia hepática, para lo cual el único tratamiento curativo o alternativa viable para resolver esta problemática es la de realizar el trasplante hepático en los pacientes (Mantilla et al., 2016).

Complicaciones como encefalopatía, ascitis, peritonitis bacteriana, y frecuentes hemorragias de las venas várices alteran dramáticamente el bienestar y la calidad de vida de los pacientes cirróticos. Estudios han demostrado los efectos negativos de la enfermedad en las actividades de los pacientes, su función social, y su estado emocional. Debido a que las terapias actuales no son lo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

suficientemente buenas ni disponibles, la calidad de vida de los pacientes se ha convertido en una preocupación de prioridad (Zandi, et al., 2005).

Existen diversos estudios con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes, encontrando que hay mayor deficiencia en la calidad de vida conforme incrementaba la severidad de la enfermedad; y que los determinantes más relevantes en la deficiencia del estado de salud eran la severidad de la enfermedad y los calambres musculares (Zandi et al., 2005).

En la mayoría de los pacientes, la progresión a cirrosis ocurre en un intervalo de 15-20 años (Bataller y Brenner, 2005; Muir, 2015), pero la fibrosis hepática puede progresar rápidamente a cirrosis en varias situaciones clínicas que incluyen: hepatitis aguda severa alcohólica, hepatitis sub-fulminante, hepatitis colestásica fibrosante en pacientes con reinfección de hepatitis después de su trasplante de hígado (Bataller y Brenner, 2005). La gravedad que radica en esto, es que puede ocurrir la transición de una cirrosis compensada a una descompensada, que además de sus complicaciones clínicas más graves (ascitis, falla renal, encefalopatía hepática, y sangrado de várices), está la supervivencia asociada a ellos, en la que pacientes con cirrosis compensada sobreviven por más de 12 años, mientras que en la cirrosis descompensada es menor a 2 años (Muir, 2015), en la que el trasplante de hígado es la única terapia efectiva indicada. Por otra parte, la cirrosis hepática es un factor de riesgo para desarrollar un carcinoma hepatocelular (Bataller y Brenner, 2005).

1.2.2.3 Importancia de la fibrosis en animales

“El hígado de los animales tiene la misma arquitectura en las estructuras de los vasos sanguíneos, la misma composición celular y, a nivel bioquímico, las mismas funciones que las que tiene el ser humano” (Pérez, 2017; Vilei et al., 2001), por lo tanto, se comporta de la misma manera que la fibrosis hepática, que es un proceso patológico de proliferación anormal del tejido conectivo fibrótico en el hígado cuando ocurre necrosis y simulación de inflamación en las células hepáticas. La fibrosis es resultado de cambios comunes patológicos y la trayectoria de una variedad de enfermedades hepáticas crónicas que conllevan a desarrollar cirrosis e incluso cáncer en hígado (Liu et al., 2016).

Madhan y Raju (2014), en su estudio demostraron en un estudio histológico comparativo entre humanos, vacas, ovejas y cabras, que los lóbulos hepáticos no son distintos a los de los humanos. Los hepatocitos humanos consistentemente fueron encontrados con formas hexagonales y resultaron ser más largos en tamaño que los de cualquier otro animal de este estudio. La forma de los hepatocitos en vacas, ovejas y cabras, fueron consistentemente encontrados con apariencia

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

poligonal. El resto de las estructuras histológicas fueron más o menos similares. La significancia del estudio comparativo del hígado de animales y humanos fue diferente en términos de la arquitectura citológica (Madhan y Raju, 2014). Los signos clínicos de lesión hepática severa se presentan en gran variedad de animales. Las enfermedades hepáticas han sido reportadas en monos, diferentes casos en animales domésticos, ganado, perros, gatos, caballos (Drögemüller et al., 2014). La fibrosis hepática en animales puede ocurrir después del daño ocasionado a las células parenquimatosas por agentes infectivos, toxinas, medicinas, químicos, malnutrición, metabolitos e hipoxia (Milijana et al., 2009). La fascioliasis bovina es altamente prevalente y su característica principal es la fibrosis hepática (Machado et al., 2016). Drögemüller et al., 2014 identificaron a 30 potros con lesiones compatibles a la fibrosis hepática congénita. Hay casos de fibrosis hepática en ovejas que ha sido asociada a la ingesta de *Tephrosia cinerea* en Brasil (Riet-Correa et al., 2013). Los perros sufren de fibrosis sistémica debido a la leishmaniasis visceral canina. Existe una distribución mundial de fibrosis que sufren de esta condición crónica (Silva et al., 2013).

Además, estudiar la fibrosis hepática en animales es de alta importancia para el humano, ya que los avances descubiertos en animales pueden ser utilizados para cirugía hepática en humanos. Entre estos hallazgos se encuentran los del desarrollo de hígados bioartificiales. Nykonenko y colaboradores (2017) compararon las actividades metabólicas en hepatocitos cultivados de ratas, cerdos y humanos para obtener información relevante y descubrieron que los hígados de rata y puerco son semejantes a los humanos, sólo que en las ratas hay cantidad limitada de células disponibles, por lo que propusieron a los cerdos como buenos candidatos para soporte hepático en la práctica clínica. El cerdo es lo suficientemente cercano genéticamente a los humanos. Las formas entre los hígados de los humanos y los cerdos difieren, sin embargo, el hígado de cerdo se divide en el mismo número de segmentos que el del humano y además muestra una estructura similar en el sistema vascular, presentando similitudes considerando la anatomía y características estructurales de sus hígados, por lo que, también se ha propuesto al cerdo como un modelo animal que puede donar el hígado para ser utilizado para una cirugía hepática en humanos (Nykonenko, Vávra, y Zonča, 2017).

1.2.3. Epidemiología. Frecuencia y estadísticas

El costo de cirrosis en términos de sufrimiento humano, carga financiera, y pérdida de años de vida productiva es devastador (Bataller y Brenner, 2005; Zandi et al., 2005).

1.2.3.1 En el mundo

En Estados Unidos, la cirrosis hepática es la tercera causa de muerte en personas con edad entre 25 y 65 años, superada sólo por enfermedad cardiovascular y cáncer. La cirrosis y enfermedades crónicas hepáticas cuentan más de 25,000 muertes y 373,000 altas hospitalarias anuales en adultos en Estados Unidos (Bataller y Brenner, 2005; Zandi et al., 2005).

1.2.3.2 En México

En México, en el año 2003 se registraron 26,810 defunciones por cirrosis hepática; de las cuales 6,332 fueron mujeres y 20,478 hombres (Consejo de Salubridad General, 2009). En el caso de los hombres fue la tercera causa de mortalidad general, precedida por diabetes mellitus e isquemia cardiaca. En las mujeres, representó la octava causa de mortalidad y el hepatocarcinoma secundario a cirrosis hepática correspondió a la tercera neoplasia maligna con 2,523 casos, precedida por los cánceres del cuello uterino y de mama (Consejo de Salubridad General, 2009).

Tradicionalmente, la cirrosis se maneja estimando la morbilidad y mortalidad, en algunos casos discapacidad, y esas con consideradas como pérdidas. Sin embargo, no pueden ser sumadas en otro factor. Para combinarlos se desarrolló un indicador que utiliza una unidad de medida diferente, que es capaz de integrar los daños: daños provocados por muerte prematura y daños por vivir enfermo y discapacitado con diferentes niveles de gravedad por una o varias enfermedades a la vez.

Esto se logra midiendo, además de la mortalidad y morbilidad, el tiempo perdido por muerte prematura (esperanza de vida 2016: 75.2 años en México)^{INEGI} y el tiempo vivido con discapacidad.

$$AVISA = AVMP + AVD$$

años de vida saludable perdidos por enfermedad

años de vida perdidos por muerte prematura

años de vida asociados a discapacidad

(Lozano et al., 2013)

A estas cuantificaciones se les conoce como carga global de la enfermedad, la cual:

- Ofrece una manera de cuantificar las pérdidas de la salud
- Utiliza un indicador compuesto que integra los daños provocados por la muerte prematura y los daños por vivir enfermo y discapacitado.
- Objetivo: se obtiene información fundamental para la priorización de acciones en el campo de la salud, a nivel nacional y por entidad federativa.

- Compara tanto las pérdidas de salud por problemas letales como aquellos que no lo son pero que impactan negativamente sobre la calidad de vida de las personas:
 - Por la discapacidad que producen
 - La demanda de servicios que generan
 - Costos asociados a su tratamiento prolongado
 - Cuidados familiares que requieren fuera del sector médico
 - Comorbilidad asociada a la larga convivencia con estas enfermedades.

(Lozano et al., 2013).

Hay un estudio realizado en México en el que se compararon las principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura en 1990 y cómo cambiaron al 2010 (Lozano et al., 2013). El análisis de causas de muerte prematura modifica la relevancia de algunas de las causas de muerte general en el país. A continuación, se muestra la tabla 2 para mujeres y la tabla 3 para hombres:

Tabla 2 Principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura para mujeres, en México de 1990-2010 (Lozano et al., 2013).

Cambio de las principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura, Mujeres, México 1990-2010							
Orden	1990	Años de vida perdidos	% del total	2010	Años de vida perdidos	% del total	% de cambio
1	Enf. diarreicas	964712	12.9	Diabetes melitus	526724	8.5	57% (42-134)
2	Infecciones respiratorias bajas	881690	11.8	Enf. Renal crónica	476117	7.6	343% (105-421)
3	Prematurez	493113	6.6	Enf. Isquémica del corazón	485824	7.8	69% (49-86)
4	Anomalías congénitas	492709	6.6	Anomalías congénitas	340779	5.5	-27% (-65 a -2)
5	Diabetes melitus	324988	4.3	Enf. Cardiovascular	300586	4.8	29% (14-63)
6	Enf isquémica del corazón	288468	3.8	Inf. Respiratorias bajas	285759	4.6	-67% (-75 a -58)
7	Encefalopatía neonatal	279624	3.7	Cirrosis	227980	3.7	46 % (30-69)
8	Enf. Cerebrovascular	230996	3.1	Prematurez	229642	3.7	-54% (-68 a -25)
9	Desnutrición	219400	2.9	Accidentes de tráfico	196519	3.1	5% (-33 a 21)

10	Accidentes de tráfico	195477	2.6	Cáncer de mama	148643	2.4	110% (75-138)
11	Cirrosis	155382	2.1	Cáncer cervicouterino	149535	2.4	2% (-17 a 68)
12	EPOC	139028	1.8	EPOC	128.368	2.1	-7%

Se observa que, para mujeres, en México la cirrosis ocupaba el onceavo lugar en ser de las principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura, mientras que, en el 2010, pasó a ser el séptimo lugar. Entre 1990 y 2010, el ritmo de cambio para la cirrosis fue un aumento del 46%.

Tabla 3 Principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura para hombres, en México de 1990-2010 (Lozano et al., 2013).

Cambio de las principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura, Hombres, México 1990-2010							
Orden	1990	Años de vida perdidos	% del total	2010	Años de vida perdidos	% del total	% de cambio
1	Inf. respiratorias bajas	1141970	10.2	Homicidios	921106	9.2	57% (42-134)
2	Enf. Diarréicas	1110390	9.9	Enf. Isquémica del corazón	835394	8.3	343% (105-421)
3	Prematurez	742765	6.6	Cirrosis	787497	7.8	69% (49-86)
4	Homicidios	755585	6.8	Accidentes de tráfico	733050	7.3	-27% (-65 a -2)
5	Accidentes de tráfico	637428	5.7	Enf. Renal crónica	565013	5.6	29% (14-63)
6	Anomalías congénitas	586967	5.3	Diabetes melitus	557925	5.6	-67% (-75 a -58)
7	Cirrosis	501419	4.5	Inf. Respiratorias bajas	401005	4.0	46 % (30-69)

Se observa que, para hombres, en México la cirrosis ocupaba el séptimo lugar en ser de las principales causas de años de vida perdidos por muerte prematura, mientras que, en el 2010, pasó a ser el tercer lugar, el ritmo de cambio para la cirrosis fue un aumento del 69%.

Más adelante, en México, en el 2013, la cirrosis representó el cuarto lugar en mortalidad para hombres, y el séptimo para las mujeres, como se muestra a continuación en la tabla 4:

Tabla 4 Diez principales causas de muerte para ambos sexos, en México 2013 (Lozano et al., 2013)

Diez principales causas de muerte por sexo, 2013. México						
Posición	Hombres			Mujeres		
	Causa	Defunciones	%	Causa	Defunciones	%
1	Cardiopatía isquémica	42070	12.6	Diabetes	43238	16.4
2	Diabetes	40619	12.2	Cardiopatía isquémica	33054	12.6
3	Homicidios	19134	5.8	Enfermedades cerebrovasculares	16224	6.2
4	Cirrosis	17454	5.3	Enfermedades respiratorias crónicas	10724	4.1
5	Enfermedades cerebrovasculares	15008	4.5	Enfermedad hipertensiva	10656	4.1
6	Enfermedades respiratorias crónicas	12665	3.8	Infecciones respiratorias agudas	8225	3.1
7	Accidentes de tráfico	12174	3.6	Cirrosis	5831	2.2
8	Infecciones respiratorias agudas	9964	3.0	Cáncer de mama	5338	2.0
9	Enfermedad hipertensiva	8321	2.5	Insuficiencia renal	5086	1.9
10	Insuficiencia renal	6430	1.9	Congénitas	4274	1.6

En hombres, la cirrosis ocupa el cuarto lugar en mortalidad, con 17454 defunciones y en las mujeres, la cirrosis ocupa el séptimo lugar en mortalidad, con 5831 defunciones.

Tasa de mortalidad por cirrosis hepática

Se define como la relación entre el número de muertes por cirrosis hepática entre el total de población en un tiempo determinado. Se expresa como número de muertes por cirrosis por 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2015) y se muestra en la imagen 5.

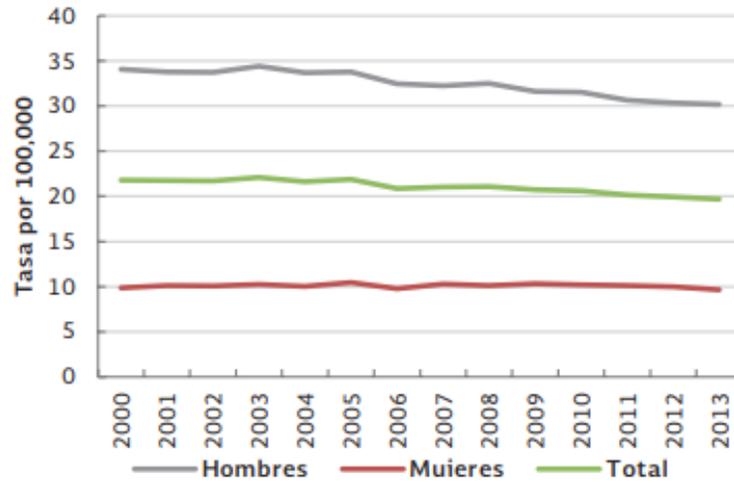


Imagen 5 Tasa de mortalidad por cirrosis hepática por sexo, 2000-2013. Fuente: INEGI/SS Estadísticas vitales. Defunciones generales 200-2013. CONAPO Proyecciones de población 1990-2030 (Secretaría de Salud, 2015).

En 2013, más de 23,000 personas murieron por cirrosis en México, casi ¾ partes del sexo masculino. Tasa de 19.6 para el total de la población, de 30.2 para hombres y 9.6 para mujeres.

También hay un patrón diferencial en el tipo de cirrosis, ilustrada en la imagen 6. Las cirrosis de origen alcohólico son más frecuentes en hombres que en mujeres, entre quienes predominan las de origen infeccioso.

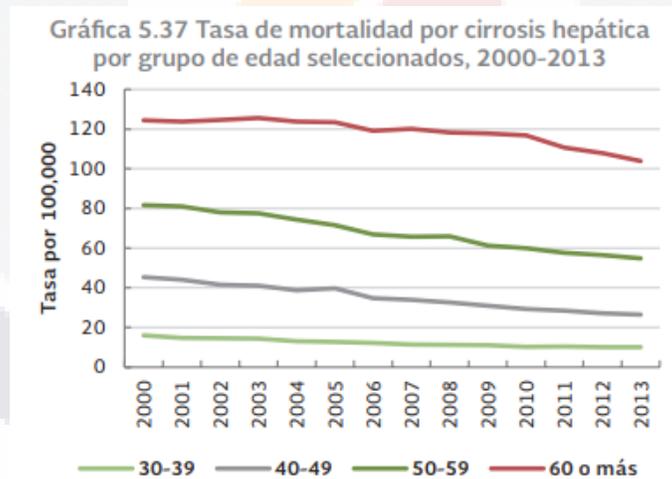


Imagen 6 Tasa de mortalidad por cirrosis hepática por edad, 2000-2013. Fuente: INEGI/SS Estadísticas vitales. Defunciones generales 200-2013. CONAPO Proyecciones de población 1990-2030 (Secretaría de Salud, 2015).

Las defunciones por cirrosis se presentan con mayor frecuencia a partir de los 30 años y en su mayoría se concentran en personas mayores de 50 años. La tasa casi se duplica entre decenios de edad a partir de los 30 años. En México, en 2013, una de cada mil personas de 60 años o más murió por cirrosis.

Tasa de mortalidad por cirrosis hepática por entidad federativa 2000 y 2013

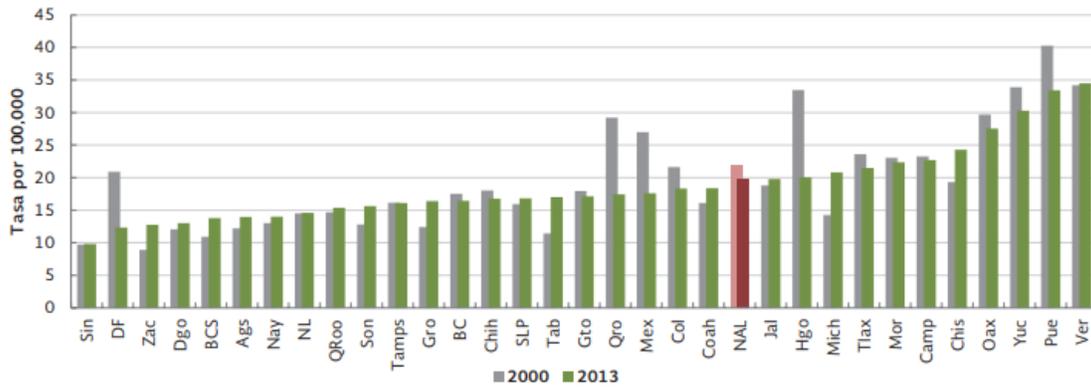


Imagen 7 Tasa de mortalidad por cirrosis hepática por entidad federativa 2000 y 2013. Fuente: INEGI/SS Estadísticas vitales. Defunciones generales 200-2013. CONAPO Proyecciones de población 1990-2030 (Secretaría de Salud, 2015).

El análisis por estados en 2013 de la imagen 7, muestra a tres entidades con cifras claramente superiores a las del resto del país: Veracruz, Puebla y Yucatán, con tasas superiores a 30 defunciones por 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2015).

En Aguascalientes, la cirrosis es la novena causa de AVISA, en México 2013, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5 Diez principales causas de AVISA perdidos por entidad federativa, México 2013 (Secretaría de Salud, 2015).

Entidad Federativa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nacional	DIAB	C ISQ	E.R.C	CIRROS	DEPRE	A.T	CONGE	EPOC	LUMBA	VIOLEN
Aguascalientes	DIAB	E.R.C	C ISQ	DEPRE	A.T	EPOC	CONGE	LUMBA	CIRROS	E.R.C
Baja California	C ISQ	DIAB	E.R.C	DEPRE	LUMBA	VIOLEN	CIRROS	CONGE	E.C.V	A.T
Baja California Sur	C ISQ	DIAB	E.R.C	A.T	DEPRE	LUMBA	CONGE	EPOC	CIRROS	E.C.V
Campeche	DIAB	C ISQ	CIRROS	E.R.C	DEPRE	LUMBA	A.T	CONGE	EPOC	E.C.V
Coahuila	C ISQ	DIAB	E.R.C	DEPRE	LUMBA	A.T	VIOLEN	E.C.V	CONGE	EPOC
Colima	DIAB	C ISQ	E.R.C	CIRROS	A.T	DEPRE	LUMBA	VIOLEN	EPOC	CONGE
Chiapas	DIAB	C ISQ	E.R.C	CIRROS	DEPRE	LUMBA	I.R.B	EPOC	E.C.V	CONGE
Chihuahua	VIOLEN	C ISQ	DIAB	E.R.C	A.T	LUMBA	DEPRE	EPOC	CIRROS	E.C.V
Distrito Federal	DIAB	C ISQ	E.R.C	DEPRE	CIRROS	LUMBA	CONGE	EPOC	I.R.B	E.C.V
Durango	C ISQ	DIAB	VIOLEN	E.R.C	CONGE	DEPRE	A.T	LUMBA	EPOC	PREMAT
Guanajuato	DIAB	E.R.C	C ISQ	A.T	DEPRE	CIRROS	LUMBA	EPOC	CONGE	E.C.V
Guerrero	VIOLEN	DIAB	C ISQ	E.R.C	CIRROS	CONGE	E.C.V	A.T	LUMBA	DEPRE
Hidalgo	DIAB	C ISQ	E.R.C	CIRROS	DEPRE	LUMBA	A.T	CONGE	EPOC	E.C.V
Jalisco	DIAB	C ISQ	E.R.C	A.T	CIRROS	DEPRE	EPOC	CONGE	LUMBA	E.C.V
México	DIAB	E.R.C	C ISQ	CIRROS	I.R.B	CONGE	EPOC	VIOLEN	DEPRE	A.T
Michoacán	DIAB	C ISQ	E.R.C	A.T	DEPRE	VIOLEN	CIRROS	EPOC	LUMBA	CONGE
Morelos	DIAB	E.R.C	C ISQ	LUMBA	CIRROS	DEPRE	VIOLEN	EPOC	CONGE	A.T
Nayarit	DIAB	C ISQ	E.R.C	A.T	DEPRE	VIOLEN	CONGE	LUMBA	EPOC	CIRROS
Nuevo León	C ISQ	DIAB	E.R.C	DEPRE	LUMBA	CONGE	VIOLEN	A.T	E.C.V	EPOC
Oaxaca	DIAB	E.R.C	CIRROS	C ISQ	DEPRE	VIOLEN	CONGE	LUMBA	E.C.V	EPOC
Puebla	DIAB	E.R.C	CIRROS	C ISQ	DEPRE	CONGE	LUMBA	A.T	EPOC	I.R.B
Querétaro	DIAB	C ISQ	CIRROS	E.R.C	A.T	DEPRE	LUMBA	CONGE	EPOC	E.C.V
Quintana Roo	DIAB	C ISQ	CIRROS	E.R.C	DEPRE	LUMBA	A.T	EPOC	CONGE	E.C.V
San Luis Potosí	DIAB	C ISQ	E.R.C	DEPRE	CONGE	LUMBA	A.T	EPOC	CIRROS	E.C.V
Sinaloa	C ISQ	DIAB	VIOLEN	DEPRE	A.T	E.R.C	LUMBA	EPOC	CONGE	E.C.V
Sonora	C ISQ	DIAB	A.T	E.R.C	DEPRE	LUMBA	EPOC	CONGE	VIOLEN	E.C.V
Tabasco	DIAB	E.R.C	C ISQ	A.T	DEPRE	LUMBA	CONGE	EPOC	CIRROS	E.C.V
Tamaulipas	C ISQ	DIAB	E.R.C	VIOLEN	DEPRE	A.T	LUMBA	CONGE	EPOC	E.C.V
Tlaxcala	DIAB	E.R.C	CIRROS	DEPRE	C ISQ	LUMBA	A.T	CONGE	EPOC	E.C.V
Veracruz	DIAB	C ISQ	E.R.C	CIRROS	DEPRE	CONGE	E.C.V	LUMBA	EPOC	A.T
Yucatán	C ISQ	DIAB	CIRROS	E.R.C	DEPRE	A.T	E.C.V	CONGE	EPOC	I.R.B
Zacatecas	DIAB	C ISQ	A.T	E.R.C	DEPRE	EPOC	LUMBA	E.C.V	CONGE	VIOLEN

DIAB	Diabetes mellitus
C ISQ	Cardiopatía isquémica
E.R.C	Enfermedad renal crónica
CIRROS	Cirrosis
DEPRE	Depresión
A.T	Accidentes de tránsito
CONGE	Anomalias congénitas*
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
LUMBA	Lumbalgia
VIOLEN	Violencia
E.C.V	Enfermedad cerebrovascular
I.R.B	Infección respiratoria baja
PREMAT	Complicaciones de parto prematuro

La principal causa de AVISA en Aguascalientes es la diabetes, y la cirrosis ocupa el noveno lugar.

1.2.3.2.1 Tendencia en el 2050

En México se estima que para el 2030 habrá aproximadamente 1.3 millones de personas con cirrosis y para el 2050 la cifra será de 1.9 millones (Hasan et al., 2015; Méndez-Sánchez et al., 2005).

Los análisis de tendencia muestran un importante aumento en la prevalencia de enfermedad hepática alcohólica, como la principal causa de enfermedad hepática en hombres (Méndez-Sánchez et al., 2005) , que puede apreciarse en la siguiente tabla:

Tabla 6 Tendencias para hombres y mujeres en la prevalencia de cirrosis hepática en México, para el año 2030 y 2050 ajustada de (Méndez-Sánchez et al., 2005)

SEXO	CAUSA	AÑO	
		2030	2050
Hombres	Carcinoma hepatocelular	33159	36377
	Cirrosis alcohólica	790161	866848
	Cirrosis no-alcohólica	485124	532207
	Virus HB	4076	4471
	Virus HC	10527	11549
Mujeres	Carcinoma hepatocelular	36760	40721
	Cirrosis alcohólica	116628	129407
	Cirrosis no-alcohólica	262838	291159
	Virus HB	4571	5063
	Virus HC	23389	25909
TOTAL		1767233	1943711

Se espera un total de 1,767,233 muertes en el 2030, y hay tendencia a aumentar, esperando un total de 1,943,711 para el 2050.

A continuación, se muestra en la tabla 7, las tendencias por cada 5 años para hombres en la prevalencia de cirrosis hepática en México desde el 2005 hasta el 2050.

Tabla 7 Tendencias para hombres en la prevalencia de cirrosis hepática en México, ajustada de (Méndez-Sánchez et al., 2005)

Tendencias en la prevalencia de cirrosis hepática en México (hombres)										
	2005	2010	2015	2020	2025	2030	2035	2040	2045	2050
Carcinoma hepatocelular	21162	23908	26626	29287	31512	33159	34425	35399	36067	36377
Cirrosis alcohólica	504264	569718	634470	697882	750908	790161	820334	843543	859449	866848
Cirrosis no-alcohólica	309596	349782	389537	428469	461025	485124	503649	517898	527664	532207
Infección VHB	2601	2939	3273	3600	3873	4076	4231	4351	4433	4471
Infección VHC	6718	7590	8453	9298	10004	10527	10929	11238	11450	11549

Se esperan cerca de un millón de casos de enfermedad hepática relacionada con alcohol en la población del 2050.

Sin embargo, en contraste con la población masculina, la enfermedad hepática no alcohólica por hígado graso, será la enfermedad hepática de mayor prevalencia en mujeres como se muestra en la siguiente tabla, seguida por enfermedad hepática alcohólica (Méndez-Sánchez et al., 2005).

A continuación, se muestra en la tabla 8, las tendencias por cada 5 años para mujeres en la prevalencia de cirrosis hepática en México desde el 2005 hasta el 2050.

Tabla 8 Tendencias para mujeres en la prevalencia de cirrosis hepática en México, ajustada de (Méndez-Sánchez et al., 2005)

Tendencias en la prevalencia de cirrosis hepática en México (mujeres)										
	2005	2010	2015	2020	2025	2030	2035	2040	2045	2050
Carcinoma hepatocelular	23363	26406	29414	32361	34860	36760	38260	39443	40285	40721
Cirrosis alcohólica	74252	83921	93482	102848	110791	116628	121595	125357	128032	129407
Cirrosis no-alcohólica	167050	188803	210385	231385	249256	262838	273561	282025	288044	291159
Infección VHB	2905	3283	3657	4024	4335	4571	4757	4904	5009	5063
Infección VHC	14865	16801	18715	20590	22180	23389	24343	25096	25632	25909

La tendencia dice que, para las mujeres en el 2050, la principal causa de cirrosis hepática será por cirrosis no alcohólica.

De manera importante, las enfermedades infecciosas hepáticas constituyen una minoría en las tendencias predictivas, representando menos del 2% de todas las enfermedades hepáticas en hombres y alrededor del 6% de todos los casos esperados en mujeres. La primera y segunda etiología más comunes esperadas por enfermedad hepática para ambos sexos (enfermedad hepática alcohólica y no-alcohólica) representan 1,819,621 casos predichos en 2050. El carcinoma hepatocelular continuará como la tercera causa de enfermedad hepática, contribuyendo con 77,098 casos al final del periodo evaluado (Méndez-Sánchez et al., 2005).

1.2.4. Etiología y factores de riesgo

La etiología de la cirrosis hepática es de amplio espectro y es variable, incluye diversos virus (Abdulaziz Bardi et al., 2013), generalmente infección crónica por el virus de la Hepatitis C (VHC), hepatitis B (VHB), (Liedtke et al., 2013; Mantilla et al., 2016), causas congénitas, metabólicas, inflamatorias, parasitarias, vasculares, toxinas o medicamentos (Liedtke et al., 2013), consumo excesivo de alcohol, enfermedades hepáticas autoinmunes con o sin colestasis, la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) y enfermedades metabólicas (Mantilla et al., 2016).

La distribución del material fibroso (MEC y colágeno fibrilar), depende del origen del daño hepático. En hepatitis viral crónica y desórdenes crónicos colestáticos, el tejido fibrótico se localiza inicialmente alrededor del tracto portal, mientras que, en las enfermedades hepáticas inducidas por alcohol, se localizan en áreas pericentrales y perisinusoidales (Bataller y Brenner, 2005).

La etiología en pacientes con cirrosis en México se distribuye de la siguiente forma: alcohol 39.5%, VHC 36.6%, criptogénica 10.4%, cirrosis biliar primaria 5.7%, otra 2.8% (Patiño y Rangel, 2009).

En el proceso de estudio de la fibrosis hepática, se han identificado factores genéticos y ambientales que tienen influencia en el progreso de la fibrosis (Bataller y Brenner, 2005), como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 9 Factores genéticos y no genéticos asociados a la progresión de fibrosis en diferentes tipos de enfermedades crónicas hepáticas (rediseñada de Bataller y Brenner, 2005).

"Factores genéticos y no genéticos asociados a la progresión de fibrosis en diferentes tipos de enfermedades crónicas hepáticas"			
Tipo de enfermedad hepática	Genes candidatos (siglas en inglés)	Nombre completo de los genes candidatos	Factores NO genéticos
Infección crónica de VHC	HFE	Gen de hemocromatosis hereditaria	Consumo de alcohol
	Angiotensinógeno	Angiotensinógeno	Coinfección con VIH y/o con VHB
	TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β1	Edad en el momento de la infección.
	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α	Trasplante hepático
	ApoE	Apolipoproteína E	Diabetes mellitus
	MEH	Epóxido Hidrolasa microsomal	No responde a la terapia
	MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1	
	MCP-2	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 2	
	Factor V	Factor V (Leiden)	
Inducción alcohólica	IL-10	Interleucina 10	Consumo de alcohol
	IL-1β	Interleucina 1β	Episodios de hepatitis alcohólica
	ADH	Alcohol deshidrogenasa	

	ALDH	Aldehído deshidrogenasa	
	CYP2E1	Citocromo P-450, familia 2, subfamilia E polipéptido 1	
	TNF- α	Factor de necrosis tumoral α	
	CTLA-4	Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico	
	TAP2	Transportador asociado con la presentación de antígeno tipo 2	
	MnSOD	Superóxido dismutasa de Magnesio	
NASH	HFE	Gen de hemocromatosis hereditaria	Edad
	Angiotensinógeno	Angiotensinógeno	Severidad de la obesidad
	TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1	Diabetes mellitus
			Hipertrigliceridemia
PBC	IL-1 β	Interleucina 1 β	
	TNF- α	Factor de necrosis tumoral α	
	ApoE	Apolipoproteína E	
Hepatitis autoinmune	HLA-II	Antígenos Leucocitarios Humanos, haplotipo clase 2	Hepatitis autoinmune tipo 2
			No responde a la terapia

1.2.4.1 Virus: Hepatitis A,B,C

La hepatitis crónica por virus C (VHC) es de las enfermedades infecciosas más frecuentes y de mayor morbi-mortalidad a nivel mundial (Ortiz-Olvera, Herrera-Chi, Méndez-Navarro, Morán-Villota, y Dehesa-Violante, 2010). El virus de hepatitis posee ciertas proteínas que deterioran el metabolismo de los lípidos o alteran la transducción de señales de los hepatocitos infectados, lo cual lleva a la producción de radicales de oxígeno reactivo y mediadores fibrogénicos (Karimzadeh-Toosi, 2015).

Se estima que alrededor del 20-30% de los pacientes que padecen hepatitis C crónica, se desarrolla cirrosis en 20 años (Karimzadeh-Toosi, 2015).

Numerosos estudios han documentado el deterioro de la salud relacionada con la calidad de vida asociada con hepatitis crónica. En 1998, Foster y colaboradores compararon la calidad de vida relacionada con la salud de pacientes con daño hepático causado por el virus de la Hepatitis B y C, y reportaron que el funcionamiento social, energía y fatiga y diversas limitaciones debidas a problemas físicos eran significativamente más deteriorados en pacientes con hepatitis C (Zandi et al., 2005).

1.2.4.2 Enfermedad hepática alcohólica

El consumo excesivo de alcohol es un problema de salud a nivel global, con consecuencias sociales, económicas y clínicas, generando 3.3 millones de muertes en el 2012 (Osna, Terrence, y Kharbanda, 2017). En muchos países, los problemas hepáticos causados por el abuso de alcohol son una de las principales causas de muerte (Karimzadeh-Toosi, 2015) y existencia de una cantidad abrumadora de pacientes con consumo de alcohol excesivo que presentan hepatitis alcohólica con marcada fibrosis (Weiskirchen, Weiskirchen, y Tacke, 2018).

El etanol se metaboliza principalmente en los hepatocitos. Ya que estas células expresan los mayores niveles de las enzimas oxidantes del etanol y alcohol deshidrogenasa, localizadas en el citosol y en el citocromo P450 (Osna et al., 2017). La enfermedad hepática alcohólica lleva a mecanismos de cicatrización hepática, los cuales activan a las células estelares hepáticas y si el daño y la inflamación son persistentes, ocurre la fibrosis (Muriel, 2017).

En la enfermedad alcohólica hepática, la respuesta fibrogénica en el hígado se lleva a cabo por el acetaldehído ya que es el primer metabolito presente durante la detoxificación de alcohol, el cual puede aumentar la transcripción de colágena tipo I directa e indirectamente al desencadenar la síntesis del Factor de crecimiento transformador beta (TGF- β). Además, el consumo crónico de alcohol provoca formación de especies reactivas de Oxígeno, incrementa la multiplicación de bacterias intestinales, y modifica la permeabilidad intestinal a las macromoléculas, de esta manera incrementando las endotoxinas derivadas del intestino hacia la circulación portal y activando las células de Kupffer a través de la ruta de los receptores de peaje (TLR, por sus siglas en inglés: toll-like receptors) (Weiskirchen et al., 2018).

1.2.4.3 Enfermedades Hepáticas No Alcohólicas

La NAFLD (enfermedad del hígado graso no alcohólico), es una anormalidad hepática común en el mundo occidental, la cual progresa a cirrosis y carcinoma hepatocelular en una porción significativa de casos (Karimzadeh-Toosi, 2015). Su frecuencia ha ido incrementando en paralelo con el incremento en la frecuencia de cirrosis hepática (Muriel, 2017). NAFLD es un desorden crónico pero reversible caracterizado por la acumulación de gotas de grasa en el citoplasma de los hepatocitos, acompañada o no por inflamación y fibrosis, en pacientes que no consumen alcohol en exceso (21 unidades en hombres y 14 unidades en mujeres, por semana), está asociada al síndrome metabólico sin factores obvios de riesgo (NAFLD primaria), y a medicamentos (NAFLD secundaria) (Ortega-Alonso y Andrade, 2018).

La NASH (Esteatohepatitis no alcohólica), fue reconocida como la mayor causa de fibrosis hepática, descrita primero por (Lozano et al., 2013) Ludwig y colaboradores (1980) (Bataller y Brenner, 2005), es considerada parte del espectro de las enfermedades del hígado graso no alcohólico. Esta gama de esteatosis a cirrosis puede llevar eventualmente a carcinoma hepatocelular. NASH es un componente del síndrome metabólico, que se caracteriza por obesidad, diabetes mellitus tipo 2, y dislipidemia, tienen como característica en común la resistencia a la insulina. Debido a que la prevalencia de la obesidad ha ido incrementando rápidamente, un aumento en la prevalencia de NASH también es anticipada (Bataller y Brenner, 2005).

También existen varias enfermedades hepáticas originadas por diversas causas en niños y pacientes jóvenes, que pueden complicarse desarrollando fibrosis y su respectiva progresión a cirrosis. En el caso de estas enfermedades hepáticas pediátricas, la fibrosis hepática tiene distintos patrones histopatológicos y su manejo depende del estadio de fibrosis en el que se encuentre (Karimzadeh-Toosi, 2015).

1.2.4.4 Cirrosis Autoinmune

La hepatitis autoinmune es una inflamación crónica (mayor a 6 meses) y progresiva de origen desconocido. En 1950 fue descrita por primera vez por Waldenström, asociada con ictericia, hipergammaglobulinemia, amenorrea y que llevaba a una cirrosis (Dancygier, 2010a).

La fibrosis hepática y cirrosis se desarrolla en aproximadamente el 40% de los pacientes con hepatitis autoinmune que se asocia con la severidad y duración de la inflamación hepática. La

apoptosis y necrosis son los mecanismos principales involucrados en la cascada de pasos que llevan a la fibrogénesis en estos pacientes (Muriel, 2017). La hepatitis autoinmune es distribuida mundialmente presentando del 15-20% de los casos de hepatitis crónica en Europa Occidental y Norteamérica. Las mujeres son afectadas 4-5 veces (en niños hasta 9 veces) más que en hombres (Dancygier, 2010a).

1.2.4.5 Inducidas por medicamentos

Existen diversas reacciones a medicamentos que son una causa importante de daño hepático que pueden requerir, discontinuar el agente causal de daño del medicamento, hospitalización o hasta trasplante hepático, de hecho, la hepatotoxicidad causada por medicamentos es la causa más frecuente de daño hepático agudo en Estados Unidos (David y Hamilton, 2011).

La cirrosis hepática se ha reportado para varios medicamentos diferentes, incluyendo: amiodarona, metotrexato, vitamina A, y ácido valproico (Ortega-Alonso y Andrade, 2018). Dentro de los medicamentos hepatotóxicos, el acetaminofén (paracetamol), es el más estudiado, aunque también se incluyen anestésicos, medicamentos anticancerígenos, antibióticos, agentes antituberculosos, antirretrovirales y medicamentos cardíacos (David y Hamilton, 2011). El daño hepático inducido por medicamentos debe considerarse para todo paciente infectado con VIH con enzimas hepáticas elevadas (Dancygier, 2010a).

1.2.5. Patogénesis de FH

La fibrosis hepática se produce por varias alteraciones anatómicas y funcionales; representa un evento muy frecuente al que le sigue un insulto crónico de suficiente intensidad para detonar una reacción de “curar heridas” (Bataller y Brenner, 2005), una vez que el agente hepatotóxico (virus, metabolitos del alcohol, algún tóxico, ácidos biliares, etc.) llega al hígado a través de la sangre, el hígado cumple su función, ya sea de metabolismo del compuesto químico extraño, la detoxificación de sustancias o fagocitosis en caso de que el agente causal sea una bacteria (Guyton y Hall, 2006).

El insulto crónico, detona una serie de rutas de señalización (Yanguas et al., 2016), las cuales activan a las células estelares hepáticas (HSC por sus siglas en inglés “hepatic stellate cells”), que son el evento central al hablar de fibrosis hepática, además de activar fibroblastos portales y miofibroblastos, que en conjunto producen grandes cantidades de colágeno en el hígado dañado, jugando un papel importante en la fibrogénesis (Bataller y Brenner, 2005; Yanguas et al., 2016). Las

células estelares hepáticas son las principales células productoras de matriz extracelular (MEC) en el hígado dañado. Una vez activadas, las células estelares hepáticas se convierten en una clase de células parecidas a miofibroblastos (Bataller y Brenner, 2005; Domitrović et al., 2010a). También presentan potencial fibrogénico, los miofibroblastos, derivados de las pequeñas vesículas portales que proliferan alrededor de los tractos biliares en fibrosis hepática inducida por colestasis (interrupción o disminución del flujo biliar), inician deposición de colágeno. Tanto la síntesis incrementada de fibroblastos, como la degradación reducida de colágeno generan la acumulación de MEC (Bataller y Brenner, 2005). La importancia relativa de cada tipo de célula en la fibrogenesis hepática puede depender del origen de la lesión hepática. Mientras que las HSC son el tipo de células principales en áreas pericentrales, los miofibroblastos portales pueden predominar cuando ocurre una lesión hepática alrededor de tractos portales (Bataller y Brenner, 2005).

En el hígado normal, las células estelares hepáticas (células Ito) residen en el espacio de Disse y son los sitios de mayor almacenamiento de vitamina A. Tras el daño crónico, las HSC se activan o se diferencian en una clase de células tipo miofibroblastos, adquiriendo propiedades contráctiles, proinflamatorias y fibrogénicas. Las células estelares hepáticas activadas migran y se acumulan en los sitios de reparación de tejido, secretando grandes cantidades de MEC y regulando la degradación de MEC (Bataller y Brenner, 2005).

La fibrosis hepática es el resultado de la respuesta de cicatrización en los daños repetidos al hígado, como se muestra en la siguiente figura (imagen 8):

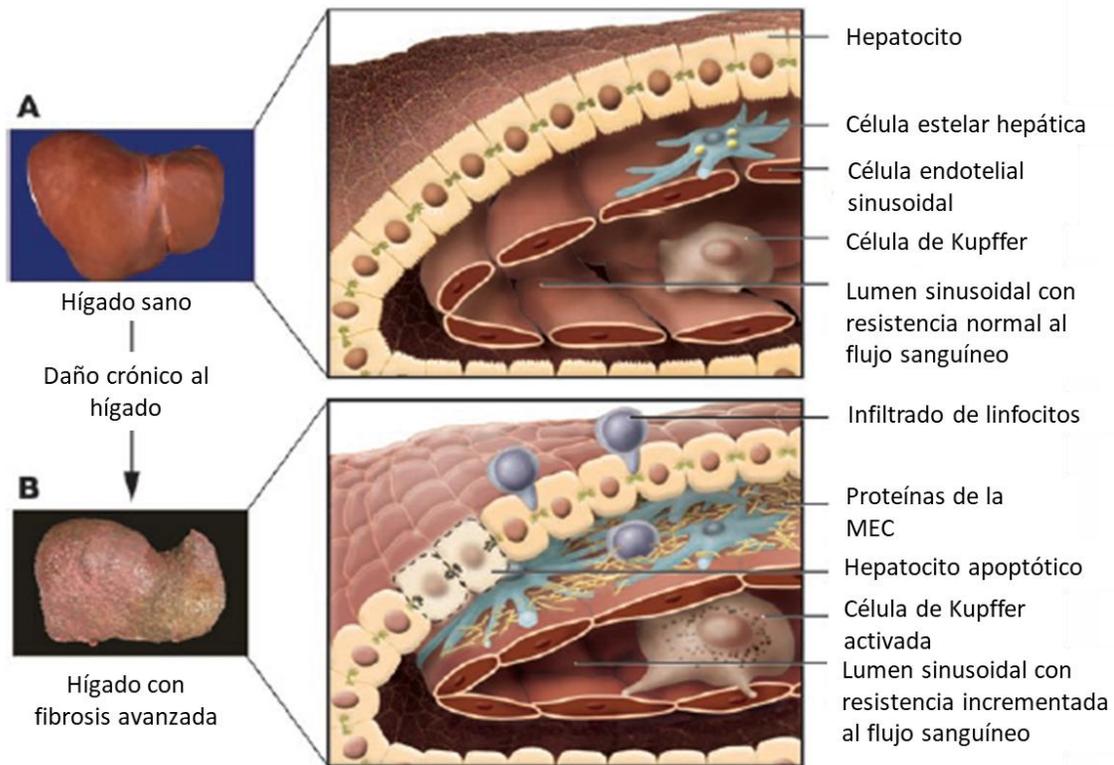


Imagen 8 Patogénesis de la fibrosis hepática, (ajustada de: Bataller y Brenner, 2005). Se observa en la letra A, la estructura del hígado sano, al que le sigue, tras un daño hepático en B) un hígado fibrótico y sus respectivas alteraciones.

Existe una compleja interacción entre los diferentes tipos de células hepáticas durante la fibrogénesis hepática. Los hepatocitos dañados liberan especies reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés “Reactive Oxygen Species”) y mediadores fibrogénicos e inducen el reclutamiento de células inflamatorias, algunos hepatocitos se someten a apoptosis, y las células de Kupffer se activan liberando mediadores fibrogénicos. Las HSC proliferan, se activan y secretan grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular. Las células endoteliales sinusoidales pierden sus fenestraciones y la concentración de HSC causa un incremento en la resistencia del flujo sanguíneo en los sinusoides hepáticos (Bataller y Brenner, 2005). Esta resistencia al flujo sanguíneo evita el intercambio entre los solutos en sangre y los hepatocitos que tiene lugar en los sinusoides; debido a que en un hígado sano los sinusoides, tienen las paredes formadas por células endoteliales con “poros” o fenestraciones que facilitan el pasaje de moléculas del espacio vascular de los sinusoides al espacio perisinusoidal de Disse. En este sitio se establece un contacto directo entre las moléculas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y las microvellosidades de la membrana sinusoidal del hepatocito (Bataller y Brenner, 2005; Kelly, 1993).

Las alteraciones mayores en fibrosis hepática están asociadas tanto a la cantidad como a la composición de la MEC. En estadios avanzados, el hígado contiene aproximadamente 6 veces más MEC que lo normal, incluyendo colágeno (I, III y IV), fibronectina, elastina, laminina, hialuronano y proteoglicanos. La fibrosis viene acompañada de formación de cicatriz, pues el tejido normal es remplazado con tejido cicatrizado, que puede bloquear el flujo sanguíneo en el hígado y atenúa las funciones hepáticas y destrucción de la arquitectura del hígado (Abdulaziz Bardi et al., 2013) En la medida en que avanzan las enfermedades fibróticas del hígado, la progresión de la enfermedad inicia con bandas de colágeno a puentes de fibrosis hasta llegar a la cirrosis (Bataller y Brenner, 2005). El hígado por sí mismo es capaz de regenerar las partes dañadas, excepto durante la última etapa de la cirrosis, donde el hígado ya no es capaz de renovar las células de tejido dañado (Abdulaziz et al., 2013).

1.2.6. Clasificación de las etapas

Debido a que la fibrosis hepática evoluciona a cirrosis en las enfermedades crónicas hepáticas, la estimación del grado de fibrosis constituye un factor determinante para el pronóstico y el manejo de la enfermedad (Ortiz-Olvera et al., 2010).

Se pueden realizar tinciones específicas de las proteínas MEC (como el rojo sirio) para cuantificar el grado de fibrosis, utilizando análisis morfométrico guiado por computadora (Bataller y Brenner, 2005).

Hay varias clasificaciones histológicas de la fibrosis hepática: La escala de la Sociedad Coreana de Hepatología, índice de actividad de Knodell, el sistema Scheuer, escala de Ishak, el sistema Batts-Ludwig, y el sistema METAVIR (Okafor y Ojo, 2004). De los cuales, los más utilizados para evaluar la biopsia hepática son: Knodell, Ishak y METAVIR (Cequera y García de León Méndez, 2014). El más utilizado es METAVIR (Bataller y Brenner, 2005; Carrión, 2009; Cequera y García de León Méndez, 2014) por lo que se describirá brevemente a continuación:

La escala METAVIR que gradúa la fibrosis en 5 estadios: F0 (ausencia de fibrosis), F1: fibrosis leve (fibrosis portal), F2 fibrosis significativa (fibrosis periportal), F3: fibrosis avanzada (puentes de fibrosis entre espacios porta) y F4 (cirrosis) (Bataller y Brenner, 2005; Carrión, 2009). El índice incluye la suma de la puntuación asignada al grado de actividad inflamatoria observada en la

muestra (0-4; siendo, 0: sin actividad y 4: actividad grave), además de la proporcionada por la estadificación, que representa la cantidad de fibrosis: 0 (sin cicatrices), 1 (cicatrices mínimas), 2 (la cicatrización ha ocurrido y se extiende fuera de las áreas que contienen vasos sanguíneos), 3 (puentes de fibrosis extendiéndose y conectándose con otras áreas que contienen fibrosis) y 4 (cirrosis) (Cequera y García de León Méndez, 2014).

Otros exámenes de laboratorio (bilirrubina, albúmina y tiempo de protrombina), combinados con la presencia y severidad de encefalopatía y ascitis se incluyen en la puntuación de Child-Pugh (Tabla 10). En la cual se clasifican los pacientes como A, B o C, según sus resultados. Esta escala es utilizada para conocer la severidad del daño hepático (Grattagliano, 2011).

Tabla 10 Sistema de puntuación de Child-Pugh para pacientes con cirrosis hepática y su clasificación para indicar prioridad en trasplante hepático (Grattagliano, 2011).

Puntuación	1	2	3
Bilirrubina (mg/dL)	< 2	2-3	> 3
Tiempo de protrombina (INR)	< 4 seg (<1.7)	4-6 seg (1.7-2.3)	> 6seg (>2.3)
Albúmina (g/dL)	> 3.5	3.5-2.8	< 2.8
Ascitis	Ausente	Leve	Severo
Encefalopatía	Ausente	Leve	Severo

El puntaje Child-Pugh se obtiene con la suma de la puntuación (1 al 3) de cada uno de los 5 parámetros. El puntaje A es para pacientes con puntaje de 6 o menos, clase B es para los de 7-9 y clase C para los que tengan puntaje mayor a 10.

Otro sistema de puntuación es el modelo para la enfermedad del hígado de la última etapa (MELD), que proporciona mucha información en cuanto a la mortalidad en cirrosis y es utilizada para priorizar a los candidatos a un trasplante (Grattagliano, 2011), ya que puede usarse como predictor de la mortalidad, tiempo de estancia hospitalaria y carga de la enfermedad, este modelo refleja la función renal, hepática y la vía de la coagulación extrínseca, depende de tres variables de laboratorio: creatinina sérica, bilirrubina sérica y el rango proporción internacional normalizada (INR, por sus siglas en inglés) (Roth, Chrobak, Schädelin, y Hug, 2017).

1.2.7. Diagnóstico

El diagnóstico temprano de fibrosis hepática y el monitoreo dinámico de sus cambios ayuda a la formulación del esquema de tratamiento de los pacientes, que es de suma importancia para reducir el daño hepático y prevenir el desarrollo a cirrosis (Bataller y Brenner, 2005; Liu et al., 2016c).

Debido a que la primer fase de la cirrosis es asintomática, un estudio realizado en 2014 que utilizó las cifras de una larga comunidad de base de datos (de prácticas clínicas de experimentación), sugirió que el 50% de los pacientes con cirrosis se les brindó el diagnóstico inicial de enfermedad hepática después de su primera hospitalización por descompensación, que obstaculizó la prognosis independientemente del estado de cirrosis, contra pacientes ambulatorios que fueron diagnosticados (Harman et al., 2015).

Los sistemas para detectar daños hepáticos entre animales y humanos son similares, y en algunos casos idénticos, los cuales incluyen exámenes de sangre, biopsias y técnicas no invasivas de imagen (Liedtke et al., 2013).

1.2.7.1 Hallazgos físicos, síntomas y signos

No es fácil la detección de fibrosis hepática ya que no hay presentación de síntomas hasta evolucionar en cirrosis; la fase asintomática puede durar años y mantener oculta a la enfermedad, de tal manera que su descubrimiento ocurre de forma accidental, al detectar una hepatomegalia de borde duro y cortante o el hallazgo de anomalías de laboratorio en el curso de una analítica rutinaria (Bernal y Bosch, 2018).

Sin embargo, debido a que la fibrosis hepática tiene un amplio espectro de etiologías (Abdulaziz Bardi et al., 2013), hay algunas que pueden detectarse mediante ciertos signos y síntomas presentes, descritos de manera general a continuación.

Para comenzar, la presencia de un daño hepático podría detectarse durante la examinación física, en la cual, existe moderada hepatomegalia y dolor hepático cuando se palpa; además está presente una esplenomegalia leve (Dancygier, 2010a), es importante examinar todo el cuerpo del paciente para poder explicar esta enfermedad multifactorial (Muriel, 2017).

Cuando existe hepatitis viral, una de las etiologías más comunes en la fibrosis hepática. Se observa: fiebre de 38-39°C, fatiga, dolor de cabeza, prurito. Hay disminución de apetito, náusea y vómito, pérdida de peso (2.5-5kg), cambios en los sentidos del gusto y olfato, dolor en el cuadrante superior derecho, ictericia, orina oscurecida, heces decoloradas, hepatomegalia dolorosa (estiramiento de la cápsula hepática), linfadenopatía cervical (en el 10-20% de los casos) (Dancygier, 2010a).

En pacientes con NAFLD, se observa depósito de lípidos, resistencia a insulina, acumulación de hierro, señales de bacterias intestinales, las cuales además pueden inducir o exacerbar el estrés oxidativo (Muriel, 2017).

Los signos y síntomas para pacientes con absceso hepático amebiano varían, pero en general, incluyen anorexia, náusea, vómito, diarrea (con o sin sangre) y disentería. En la examinación física, el signo fundamental es hepatomegalia dolorosa y en la mayoría de los casos, existe dolor en el hipocondrio derecho que se prolonga hasta el hombro derecho y la zona escapular. El dolor incrementa al respirar profundamente, al toser o al caminar y pisar con el pie derecho, los síntomas cambian dependiendo de si el absceso se localiza en el lóbulo izquierdo o derecho, pero al encontrarse en el lóbulo superior izquierdo se complica la mayoría de las veces hasta generar un taponamiento cardíaco y suele ser fatal (Muriel, 2017).

1.2.7.2 Exámenes en el laboratorio

Debido a que el estándar de oro es la biopsia, la cual implica mucho riesgo y es invasivo, existe la necesidad de métodos confiables, simples, prácticos, precisos y no invasivos para valorar la fibrosis hepática (Bataller y Brenner, 2005; Liu et al., 2016). Se han propuesto escalas que incluyen exámenes de rutina de laboratorio como el conteo plaquetario (CP), niveles séricos de las actividades enzimáticas de Alanino Amino Transferasas (ALT) y Aspartato Amino Transferasas (AST), tiempo de protrombina (TP) y niveles séricos de proteínas totales (PT) de fase aguda (Bataller y Brenner, 2005).

La mayoría de los nuevos métodos no invasivos dependen de enfoques biológicos o físicos. En los métodos biológicos, el nivel de daño hepático puede ser indicado mediante biomarcadores séricos (como se explica en la sección de Exámenes de laboratorio). Por otro lado, las bases para el enfoque físico es medir la dureza hepática mediante métodos ultrasónicos, como la elastografía transitoria (TE, por sus siglas en inglés),(como se explica en la sección de Exámenes de gabinete) (Karimzadeh-Toosi, 2015).

1.2.7.2.1 Exámenes de gabinete

1.2.7.2.1.1 Técnicas de imagen

La fibrosis hepática puede estimarse por técnicas de imagen. Ultrasonografía, tomografía computarizada e IRM (Imagen por resonancia magnética), ya que pueden detectar cambios en el parénquima hepático debido a fibrosis de severa a moderada. Por su bajo costo, la ultrasonografía es una técnica atractiva. Es capaz de detectar cirrosis hepática basada en cambios en la ecogenicidad

del hígado y nodularidad, así como signos de hipertensión portal. Sin embargo, los ultrasonidos son altamente operador-dependiente, y la presencia de un incremento en la ecogenicidad del hígado no diferencia de manera confiable la esteatosis hepática de la fibrosis (Bataller y Brenner, 2005).

Se ha mostrado anteriormente que el ultrasonido ecográfico de contraste (CEUS) y perfusión (CT) pueden usarse para evaluar la fibrosis hepática usando análisis a tiempo real de transporte de las vasculaturas hepáticas mayores (Liu et al., 2016).

Dentro de los métodos no invasivos para detectar fibrosis, los más populares son los que utilizan elastografía (FibroScan, Echosenes, France) (Carrión, 2009; Musialik, Jonderko, Jonderko, y Buschhaus, 2015). La elastografía transitoria (TE, FibroScan), es un método físico, ultrasónico, no invasivo, que mediante ondas ultrasónicas permite medir la dureza hepática y evaluar la cantidad de tejido conectivo, para así evaluar el estadio de la fibrosis hepática. Además, es una técnica rápida, fácil de realizar y con resultados con alta reproducibilidad. Este método se utiliza para evaluar la fibrosis hepática en pacientes con enfermedades crónicas hepáticas y es recomendable combinarlo con los marcadores séricos (Karimzadeh-Toosi, 2015; Musialik et al., 2015), descritos más adelante.

1.2.7.2.2 Exámenes de laboratorio

Estos exámenes sirven de herramienta para determinar la prognosis en etapas tempranas y discutir tratamientos específicos, así como la valoración de un trasplante hepático (Karimzadeh-Toosi, 2015).

1.2.7.2.2.1 Biomarcadores séricos

Examen serológico es utilizado ampliamente como un método no invasivo para diagnosticar fibrosis hepática, puede reflejar hasta cierto punto el estado de avance de la fibrosis. Sin embargo, su eficacia en el diagnóstico de la fibrosis hepática temprana y de la etapa en la que se encuentra es ambiguo e incierto (Liu et al., 2016). Los niveles séricos de proteínas directamente relacionadas con el proceso fibrogénico hepático también son utilizadas como marcadores sustitutos de la fibrosis hepática, incluyendo el propéptido N-terminal de colágeno tipo III, ácido hialurónico, inhibidor tisular de la metaloproteinasa tipo I (TIMP-1) y YKL-40. Aunque estos puntajes son útiles en detectar fibrosis avanzada (cirrosis) en pacientes, así como fibrosis mínima o ausencia de fibrosis, no son efectivos para determinar los grados de fibrosis. Los marcadores específicos de fibrosis pueden detectar fibrogénesis en otros órganos (por ejemplo, fibrosis pancreática en pacientes alcohólicos). Aquí también se incluyen los perfiles proteicos en sangre utilizando tecnología proteómica y nueva tecnología glicómica basada en analizadores de

fragmentos/secuencias de ADN capaces de generar perfiles de proteína sérica N-glicanos (Bataller y Brenner, 2005).

Se puede calcular el grado de fibrosis e inflamación hepática a partir de la combinación de varios parámetros bioquímicos, como el uso de APRI (Ortiz-Olvera et al., 2010), índice de Forns (Forns, 2002; Musialik et al., 2015; Ortiz-Olvera et al., 2010), FIB-4 (Guzelbulut et al., 2011), hepascore (Adams, 2005), sin embargo, estos métodos no proporcionan la información suficiente para determinar la capacidad actual del órgano y su reserva funcional (Musialik et al., 2015), descritos a continuación:

APRI: Es el índice de la relación AST/plaquetas, es bastante sensible (Musialik et al., 2015) y se ha concluido que es capaz de identificar fibrosis (Karimzadeh-Toosi, 2015), para calcularlo se utilizan dos mediciones bioquímicas: AST y conteo plaquetario, además se debe conocer el límite superior normal (LSN) utilizando la fórmula: $APRI = ((AST / LSN) \times 100) / \text{Plaquetas (10}^9\text{/L)}$ (Ortiz-Olvera et al., 2010).

Índice de Forns (IF): es un sistema de puntaje basado en la dependencia entre: edad (años cumplidos), gamma-glutamyl-traspeptidasa (GGT), colesterol y el número de plaquetas (Musialik et al., 2015; Ortiz-Olvera et al., 2010). Para realizar el cálculo del puntaje se utiliza la siguiente fórmula: $IF = 7.811 - 3.131 \cdot \ln(\text{conteo de plaquetas}) + 0.781 \cdot \ln(\text{GGT}) + 3.467 \cdot \ln(\text{edad}) - 0.014(\text{colesterol})$ (Forns, 2002).

FibroIndex: Es el índice de fibrosis que utiliza la actividad de AST, concentración de gamma globulina y conteo plaquetario (Musialik et al., 2015).

FIB-4: Es una prueba basada en AST, ALT, edad y conteo plaquetario. Originalmente fue desarrollada para predecir fibrosis significativa y cirrosis entre pacientes cointectados con virus de hepatitis C y VIH (Guzelbulut et al., 2011).

Prueba de aliento con metacetina: El fundamento de esta prueba es evaluar el hígado mediante sustancias no tóxicas, que sean metabolizadas por el hígado, administradas oralmente y en material fácil de coleccionar y evaluar (orina, saliva o aliento). La prueba de aliento utiliza una sustancia marcada con carbono, que es metabolizada por el hígado a dióxido de carbono (CO₂) y lo exhala el paciente; de esta manera, la medición de este marcador y el tiempo de su aparición en el aire exhalado, permite medir la función hepática (Musialik et al., 2015). La severidad de la cirrosis

se correlaciona con la supresión de recuperación de CO₂, tras una dosis de fenilalanina. La oxidación de fenilalanina es un indicador muy valioso en la función hepática, pues representa la actividad de la enzima citosólica (Moran et al., 2009).

Hepascore: Es una prueba que consiste en determinar la actividad fibrótica y necro-inflamatoria; utilizando los siguientes parámetros: edad, sexo, bilirrubina, GGT, ácido hialurónico y alfa2-macroglobulina. Mostró tener sensibilidad y especificidad (Adams, 2005).

1.2.7.2.2.2. Exámenes histopatológicos (biopsia)

Actualmente el método estándar de diagnóstico de cirrosis y cuantificación de fibrosis es la biopsia hepática, ya que permite realizar una examinación histológica (Karimzadeh-Toosi, 2015; Liu et al., 2016a). Los resultados de la biopsia pueden compararse con los marcadores séricos bioquímicos (Karimzadeh-Toosi, 2015).

Biopsia de hígado es un procedimiento invasivo, y sigue siendo el método estándar de referencia para detectar cambios en la fibrosis hepática, así como para evaluar la fibrosis e inflamación (Liu et al., 2016a; Ortiz-Olvera et al., 2010; Truong et al., 2014). La examinación histológica es útil para identificar la causa subyacente de la enfermedad hepática y valorar el grado necroinflamatorio en la etapa de fibrosis. Sin embargo, la biopsia hepática es un procedimiento riesgoso e invasivo, causa dolor en el 40% de los pacientes y complicaciones en el 0.5% de pacientes. El error de muestreo puede ocurrir sobre todo cuando son pequeñas muestras de biopsia las analizadas, el sesgo de muestreo debido al tamaño tan pequeño de muestra conduce a 32% de falsos negativos en el diagnóstico de cirrosis. El examen histológico es propenso a la variación del intra e interobservador y no predice la progresión de la enfermedad. Por su naturaleza invasiva tiene una morbilidad de alrededor del 0.5%. Por lo tanto, se requieren métodos no invasivos, prácticos y precisos (Bataller y Brenner, 2005; Liu et al., 2016b).

1.2.8. Profilaxis

La forma más atractiva de protección ante la cirrosis hepática es prevenir o disminuir la evolución de varios factores de riesgo que puedan desencadenar la secuencia de fibrosis hepática (Grattagliano, 2011).

Cuando la etiología de la fibrosis hepática es viral, se puede prevenir mediante la vacunación. Para una prevención primaria se recomienda la vacunación. La vacunación masiva a niños ha demostrado

ser sumamente efectiva para prevenir infecciones de hepatitis B; y la transmisión de hepatitis C se reduce considerablemente al monitorear la sangre de los donadores (Grattagliano, 2011). Se recomienda este tipo de profilaxis a los que viajarán a países con alta prevalencia en Hepatitis (Dancygier, 2010a). Para una prevención secundaria, que va dirigida a prevenir la aparición de cirrosis en pacientes que ya padecen de enfermedad crónica hepática, la profilaxis incluye tratamiento etiológico para hepatitis viral, abstinencia del alcohol (Grattagliano, 2011; Muriel, 2017), flebotomía en hemocromatosis, pérdida de peso y mejora de la resistencia a insulina en pacientes con NASH. Además, la detección temprana de hepatocarcinoma mediante ultrasonografía cada seis meses y mediciones en sangre de la alfa-fetoproteína puede permitir un trasplante hepático o tratamientos que no sean tan invasivos. En los enfermos con cirrosis hepática debería conocerse su estado de inmunización frente a los virus de las hepatitis A y B y, en su caso, proceder a la vacunación frente a éstos (Grattagliano, 2011).

Además existe la profilaxis pre-exposición, la cual es eficaz en el 80-85% de los casos, y esta protección la provee la globulina (0.06mL/kg dura de 3-5 meses) (Dancygier, 2010a).

1.2.9. Tratamientos

Actualmente no existe un fármaco terapéutico que esté autorizado como medicamento antifibrogénico para la fibrosis hepática o cirrosis. Los tratamientos clínicos son muy difíciles de diseñar e implementar por diversas razones, como que la lenta progresión a fibrosis requiere un alto número de pacientes bien clasificados y estables. Además, la fibrosis no es un proceso lineal y el grado de progresión de fibrosis varía entre pacientes individuales, generando diferentes patrones fibróticos dependiendo de la etiología del daño hepático (Muriel, 2017).

Sin embargo, desde que se demostró, en 1990s, que incluso la fibrosis hepática avanzada es reversible, los investigadores han tratado de encontrar terapias antifibróticas (Bataller y Brenner, 2005), y está documentada esta reversibilidad especialmente cuando la enfermedad causal es erradicada (Liu et al., 2016). Es por esto, que la identificación de la etiología de la cirrosis hepática es esencial para comenzar las medidas preventivas y diseñar una intervención específica (Grattagliano, 2011).

1.2.9.1 *Tratamientos convencionales*

A pesar de que se ha estudiado mucho la patogénesis molecular del daño hepático, los medicamentos convencionales o sintéticos utilizados para tratar las enfermedades hepáticas son inadecuadas, limitadas y pueden conllevar serios efectos adversos (Abdulaziz et al., 2013; Favari et al., 2013a). La terapia más efectiva para tratar la fibrosis hepática sigue siendo remover el agente causal y a menudo requiere trasplante de hígado (Bataller y Brenner, 2005).

La mayoría de los tratamientos existentes para la hipertensión portal se centran en la corrección de las alteraciones hemodinámicas mediante fármacos vasoactivos (terlipresina, somatostatina, betabloqueantes no selectivos). A su vez, el componente mecánico podría modificarse favorablemente mediante tratamientos que mejoren la enfermedad hepática subyacente (abstención de alcohol, tratamiento antiviral, fármacos antifibróticos, etcétera) (Bernal y Bosch, 2018).

A continuación, se muestra en la tabla 11 las formas más frecuentes de cirrosis hepática con las etiologías sugeridas y las pruebas de laboratorio diagnóstica que salen alteradas:

Tabla 11 Prueba de laboratorio diagnóstica, etiología sugerida y tratamiento actual ante las formas más frecuentes de cirrosis hepática. Adaptada de (Grattagliano, 2011).

Prueba de laboratorio con resultado anormal	Etiología	Tratamiento
γ-GT (elevada), VGM eritrocitario (elevado)	Alcohol	Abstinencia
Ag S VHB, ADN-VHB, ARN-VHB (positividad)	Virus de Hepatitis B	Interferón α-2b, nucleósidos (Lamivudina, Telbivudina, Entecavir) y nucleótidos (Adefovir, Tenofovir) análogos
ARN-HCV	Virus de Hepatitis C	Interferón con ribavirina
γ-GT (elevada), FA (elevada), AMA (positividad)	Cirrosis biliar primaria	Ácido Ursodesoxicólico
ANA, ASMA, LKM (positividad)	Hepatitis autoinmune	Prednisona y azatioprina
Ferritina (elevado), contenido de hierro en hígado (elevado), mutación del gen HFE por herencia	Hemocromatosis	Flebotomía, deferoxamina
Ceruloplasmina (baja), excreción de cobre en suero (bajo) en orina de 24h (elevado)	Enfermedad de Wilson	D-penicilamina, Zinc
Colesterol HDL (bajo), glucosa (elevada), triglicéridos (elevados)	NAFLD/NASH	Dieta hipocalórica, ejercicio, medicamentos que reduzcan la

		resistencia a insulina (George et al., 2018; Grattagliano, 2011).
--	--	---

YGT: gamma-glutamyltransferasa; VGM: volumen corpuscular medio, Ag S VHB: antígeno de superficie del virus de hepatitis B; ADN-VHB: ADN del virus de hepatitis B; ARN-VHB ARN del virus de hepatitis B; ARN-HCV: ARN del virus hepatitis C; FA: fosfatasa alcalina; AMA: Anticuerpos anti-mitocondriales; ANA: anticuerpos antinucleares; ASMA: Anticuerpo antimúsculo liso; LKM (por sus siglas en inglés Liver kidney macrosomes): antimicrosomas de hígado y riñón; HFE: gen de la hemocromatosis

El único tratamiento efectivo contra la NAFLD es la pérdida de peso, para lo cual se requiere realizar modificaciones en la forma de vida. Esto debido a que los enfermos con NAFLD son individuos obesos en el 90% de los casos y con diabetes en el 50% (George et al., 2018).

1.2.9.1.1 Trasplante hepático

La fibrosis hepática cuando no es tratada y continua avanzando hasta llegar a cirrosis, falla hepática e hipertensión portal, a menudo requiere de trasplante hepático (Bataller y Brenner, 2005), el cual es considerado como la última opción terapéutica (Dancygier, 2010a).

Los objetivos oncológicos se alcanzan mejor mediante un trasplante hepático y es la única terapia en pacientes con falla hepática aguda, ya que son incapaces de lograr la regeneración de suficiente masa hepatocitaria. Es por esto que pacientes con falla hepatocitaria pueden morir debido a una enfermedad subyacente y son a los que se les da prioridad en las listas de trasplante (Dancygier, 2010a). Sin embargo, muchos otros pacientes continúan muriendo debido a que las listas de espera para un hígado son muy largas (Grattagliano, 2011).

Que los pacientes que reciben trasplante hepático sobrevivan depende de una correlación entre la edad del paciente y etiología de la enfermedad subyacente. Los rangos de sobrevivencia en pacientes con falla hepática aguda de las edades entre 10 y 40 años es del 30-35%, mientras que para los pacientes mayores a 40 años o menores de 10 años, es menos del 10% (Dancygier, 2010a).

El trasplante hepático es considerado una opción de tratamiento viable para pacientes con falla hepática aguda o que se encuentren en la última etapa de la enfermedad hepática. En pacientes cirróticos, se considera el trasplante cuando el paciente ha sufrido ya sea una complicación por hipertensión portal o una manifestación de que la función de síntesis del hígado ha sido comprometida. Sin embargo, debido al elevado costo, tasa de mortalidad y la insuficiencia de donadores de órganos, el trasplante se justifica únicamente en casos de una prognosis de largo plazo, y soporte psicológico, intelectual financiero y familiar (Grattagliano, 2011).

1.2.9.2 *Tratamientos alternativos*

Frente a un diagnóstico de hepatopatía aguda o crónica los pacientes buscan medicina alternativa como tratamiento coadyuvante. Se ha estimulado la investigación de compuestos con efectos protectores hepáticos (Ochoa et al., 2008) para desarrollar medicamentos antiinflamatorios (Bataller y Brenner, 2005).

La Pirfenidona (PFD), es un fármaco que ha sido capaz de prevenir el desarrollo de lesiones fibróticas, de resolver lesiones ya existentes tanto a nivel pulmonar como nivel hepático en estudios in vivo e in vitro. La PFD posee diversas propiedades antiinflamatorias y antifibróticas, las cuales tienen sustento molecular para su aplicación como tratamiento potencial de la cirrosis hepática. Sin embargo, en los estudios más completos y largos sobre el uso de PFD ha demostrado padecimiento progresivo y de elevada mortalidad. En un estudio piloto, abierto, se incluyeron tan solo 15 pacientes con fibrosis hepática de diversas etiologías y diverso estadio funcional hepático. Las biopsias hepáticas realizadas después de 12 meses, sugirieron que en el 53.3% de los pacientes hubo una reducción de dos puntos o más en el índice necro-inflamatorio (HAI), 60% de la esteatosis disminuyó y 30% mejoró de la fibrosis, mientras que se detectó un 70% de actividad de regeneración (Armendariz-Borunda et al., 2006).

Se ha utilizado la Crisina (5,7-dihidroxi-2-fenil-4H-chromen-4-uno; 5,7-dihidroxi-flavona), pertenece a la clase de los flavonoides y tiene compuestos polifenólicos con esqueleto natural de 15-Carbonos. Está presente en la miel, muchas frutas, extractos de plantas e incluso hongos. Tiene actividades farmacológicas como antioxidante, acción antihipercolesterolemica, antidiabetogénica y actividad antitumoral. Además, tiene efectos antiinflamatorios y protege al hígado de agentes hepatotóxicos. Se ha demostrado su eficacia en la inhibición de la activación y proliferación de células estelares hepáticas, así como la disminución de acumulación de MEC (Balta et al., 2018).

1.2.9.1.1 *Terapias antifibróticas*

El descubrimiento de nuevos medicamentos para tratamiento de cirrosis hepática es algo que debe preocuparnos (Abdulaziz Bardi et al., 2013) y que interesa mucho a compañías de biotecnología y farmacológicas para el desarrollo de programas antifibróticos con pruebas clínicas que se están llevando a cabo actualmente (Bataller y Brenner, 2005).

Un marcador común entre la fibrosis y cirrosis hepática es la cantidad excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC) como colágeno tipo I. Los contenidos de colágeno en el tejido hepático son controlados por múltiples mecanismos celulares y moleculares que incluyen: 1) proliferación y activación de células productoras de colágeno, células primarias estelares hepáticas (HSC); 2) aumento transcripcional y postranscripcional de la expresión génica de colágeno; 3) apoptosis de HSC activadas; 4) degradación de colágenos acumulados por las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Basados en estos mecanismos subyacentes, existen muchos acercamientos para tratar la fibrosis hepática. Entre ellos incluyen la eliminación de la causa del daño hepático, inhibición de la producción de MEC por las células activadas HSC, degradación de las proteínas de MEC acumuladas por las MMPs, y finalmente la promoción de la regeneración del hígado con fibrosis (Inagaki, Higashiyama, y Higashi, 2012). El tratamiento se puede dar desde dos puntos de vista, uno es la supresión transcripcional del gen de la expresión de colágeno al focalizar la señal del factor de crecimiento transformador beta TGF- β /Smad, y el otro es la contribución a las células derivadas de la médula espinal y sus factores de expresión para reparar el hígado fibrótico (Inagaki et al., 2012).

Se pueden usar tratamientos que utilizan receptores adrenérgicos antagonistas para prevenir enfermedades hepáticas, entre ellos el Carvediol ($\alpha\beta$ adrenobloqueador) utilizado clínicamente para reducir la hipertensión portal en pacientes con daño hepático por sus efectos antioxidantes y antifibróticos. Otro fármaco utilizado es la Doxazosina, la cual provoca una disminución en la fibrosis y al tratarse cirrosis hepática en hámsteres, ha demostrado reversión de fibrosis. La combinación del Carvediol y la Doxazosina mejoraron la regeneración hepática en un modelo cirrótico de hámster (Serna-Salas et al., 2018).

1.2.9.1.2 Tratamientos con probióticos

1.2.9.1.2.1. Microbiota intestinal

Debido a la importancia del eje intestino-hígado en la progresión de fibrosis, se ha hipotetizado que la modulación del microbiota intestinal utilizando probióticos puede mejorar la barrera intestinal y reducir la respuesta inflamatoria y fibrogénica en las enfermedades hepáticas (Hammes et al., 2017).

1.2.9.1.2.2. Probióticos

El concepto de los probióticos no es nuevo. Hace más de un siglo, el ganador de premio nobel Eli Metchnikoff sugirió que la larga vida de los campesinos búlgaros se debía a su consumo de productos lácteos fermentados. Por lo cual, él mismo introdujo en su dieta leche agria fermentada con una bacteria que llamó "Bulgarian Bacillus" y encontró sus beneficios a la salud (Lo et al., 2014).

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios de salud (Kobyliak et al., 2018; Lo et al., 2014).

La práctica de utilizar probióticos en la vida diaria para mejorar la salud ha sido utilizada por milenios. Incluso en los antiguos imperios griego y romano, el uso de productos de queso fermentado era altamente recomendado. Aunque el término “probiótico” se le acredita a Lilly y Stillwell quienes en 1965 describieron los probióticos como microorganismos que tienen efectos sobre otros microorganismos, la terminología moderna y definición de probióticos fue acuñada por Parker, quien en 1974 definió a los probióticos como organismos y sustancias que tienen un efecto benéfico en el animal hospedero al contribuir en su balance de microbiota intestinal. El consumo de los probióticos de la nueva era ha prevalecido por décadas aún antes de que se estableciera propiamente su terminología. En 1930, Shirota en Japón comenzó un cultivo mixto de bacterias lácticas (*Lactobacillus casei* cepa Shirota) que fue introducida al mercado como Yakult en 1935. El Yakult hoy en día se vende en 33 países y se consumen 30 millones de botellas diarias (Lo et al., 2014).

Las bacterias benéficas, como los probióticos, tienen la habilidad de modular el microbioma intestinal normal por intervención directa y a través de un ajuste de la respuesta inmune por parte del hospedero. Actualmente existen muchos resultados de tratamientos con probióticos que se conoce que están relacionados con diferentes enfermedades (Hammes et al., 2017; McClemons et al., 2014).

Los probióticos pueden utilizarse contra enfermedades hepáticas considerando: prevención de la infección, encefalopatía hepática, función hepática en cirrosis, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedad de hígado alcohólico, e hipertensión hepática (Lo et al., 2014).

1.2.9.1.2.3 Probióticos y microbiota intestinal

Existe una fuerte relación entre el hígado y los intestinos, el llamado eje intestino-hígado. El intestino provee la sangre al sistema portal y el contenido de sangre en el intestino activa las funciones hepáticas. Por otro lado, el hígado secreta bilis y tiene influencia en la función intestinal. La microflora intestinal forma un complejo sistema ecológico. Contiene grandes cantidades de microorganismos que pesan más de 1kg. Esta cantidad excede el número de células del cuerpo humano. La comunidad microbiana del intestino consiste en más de 500 especies, muchas de las cuales no han sido cultivadas, y puede que aún no hayan sido identificadas. La microflora intestinal contiene ambas, tanto bacterias que yacen fijas en el intestino (autóctonas, residentes) como bacterias que solo van de paso por el intestino (alóctonas, transitorias). La mayoría de las bacterias

en el intestino forman un biorreactor anaeróbico que ayudan en la digestión de difíciles polisacáridos, y sintetizan micronutrientes como vitaminas y ácidos grasos de cadena corta. Los productos de fermentación de estas bacterias pueden brindar hasta un 10% de la energía diaria necesaria por individuo. La microflora intestinal tiene una variedad de funciones fisiológicas importantes. Produce vitaminas, degrada ácidos biliares, digiere nutrientes, y forma importantes barreras contra patógenos generando inmunidad local y general (Lo et al., 2014).

1.2.9.1.2.1. Cambios en la flora bacteriana intestinal en pacientes con cirrosis hepática

En pacientes con cirrosis hepática, se ve establecida una colonización anormal en el intestino delgado con bacterias del colon. Al menos un 50% tienen crecimiento excesivo de bacterias intestinales, comparados con individuos sanos que tienen pequeñas cantidades de estas bacterias en el intestino delgado (Lo et al., 2014).

También se observa traslocación bacteriana en pacientes cirróticos. La translocación bacteriana se define como la migración de bacterias desde el lumen intestinal a los nódulos mesentéricos linfáticos de otros sitios extraintestinales. Las bacterias más efectivas para la translocación hacia los nódulos mesentéricos linfáticos son las Gram negativas, en especial miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae*. En pacientes cirróticos se han encontrado bacterias entéricas en los nódulos mesentéricos linfáticos; lo cual generó la mayoría de las infecciones postoperatorias. El ADN bacteriano es encontrado en aproximadamente 1/3 de los pacientes cirróticos con hipertensión portal y cultivo negativo para ascitis, siendo *Escherichia coli* la especie bacteriana más frecuentemente identificada; la presencia de ADN bacteriano es asociado con un incremento significativo en los niveles de citosinas proinflamatorias (Lo et al., 2014).

Los cirróticos exhiben cambios en la mucosa intestinal y en la inmunología intestinal. La patogénesis de la translocación bacteriana en cirrosis es compleja, ya que generan endotoxemia, la cual incrementa la presión portal y que afecta a la homeostasis, además de ayudar a la inducción de sangrado variceal (sangrado de várices). Presentan paredes engorsadas, capilares dilatados junto con edema de la lámina propia, proliferación fibromuscular, un radio reducido de vellos/cripta, y muscularidad mucosa engrosada en el intestino delgado, aparte del crecimiento excesivo de bacterias intestinales. El óxido nítrico contribuye a los cambios morfológicos de la pared intestinal y afecta la primera línea de defensa de la mucosa contra la absorción paracelular, es decir, que

compromete la inmunidad intestinal, incrementando el potencial de translocación bacteriana (Lo et al., 2014).

Los principales mecanismos que llevan a la translocación bacteriana son excesivo crecimiento bacteriano, déficit en la respuesta inmune local de la membrana mucosa, disminución en la actividad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, y un incremento en la permeabilidad de la barrera intestinal (Lo et al., 2014).

1.2.9.1.2.2 Probióticos como tratamiento contra encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática es un conjunto de manifestaciones neuromusculares y neuropsiquiátricas que aparece en las enfermedades hepáticas agudas y crónicas como factor de mal pronóstico, incluso en su forma subclínica. El mecanismo patogénico es el insuficiente aclaramiento hepático de sustancias neurotóxicas de origen mayoritariamente intestinal. Dichas neurotoxinas actúan sobre distintos sistemas neurotransmisores ocasionando las manifestaciones clínicas de tipo neuropsiquiátrico y neuromuscular (Kobyliak et al., 2018; Puigserver, 2000).

La microflora intestinal derivada del amoníaco ha sido la reconocida como el mayor contribuyente a la patogénesis de la encefalopatía hepática. Los tratamientos actuales se basan en modular la flora intestinal, ya sea con el uso de lactulosa, antibióticos (neomicina y rifaximina) o probióticos: altas dosis de *Lactobacillus acidophilus* tuvieron efectos beneficiosos en pacientes con cirrosis descompensada y encefalopatía hepática (Lo et al., 2014).

Los probióticos han demostrado reducir los niveles de amoníaco en suero y resulta en mejoras de varios exámenes neurocognitivos, así como mejoras en el estado mental. Además, se han administrado cocteles de probióticos (como el VSL#3), siendo efectivos para prevenir la encefalopatía hepática en pacientes con cirrosis y que además redujo los niveles de amoníaco arterial, sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO, por sus siglas en inglés), tiempo de tránsito orocecal junto con incremento en los niveles psicométricos de encefalopatía hepática, comparados con la base de referencia. (Lo et al., 2014).

1.2.9.1.2.3 Terapias de probióticos contra Hígado graso no alcohólico (HGNA) y enfermedad alcohólica hepática (ALD por sus siglas en inglés “alcoholic liver disease”)

Estudios con animales demuestran que el crecimiento excesivo de bacterias intestinales juega un rol significativo en la patogénesis del HGNA (hígado graso no alcohólico). Se ha demostrado que los probióticos mejoran los niveles de aminotransferasas hepáticas, y reducen los niveles de

lipopolisacáridos en pacientes con HGNA. Sin embargo, los parámetros antropométricos y los factores de riesgo cardiovascular se mantuvieron sin cambios después del tratamiento. Otro estudio más largo comparó probióticos y fructo-oligosacáridos a cambios en el estilo de vida en HGNA resultando en que el uso de probióticos redujo significativamente: TNF- α , CRP, niveles séricos de AST, el modelo de valoración de la homeostasis de la resistencia a la insulina, endotoxinas séricas, esteatosis y el índice de actividad de esteatohepatitis no alcohólica. El uso a largo plazo de probióticos puede reducir significativamente las grasas en hígado y los niveles séricos de la actividad enzimática AST (Lo et al., 2014). Otros estudios realizados por Lo et al. (2014), demostraron que las terapias realizadas con el uso de los probióticos pueden reducir las actividades enzimáticas de las aminotrasferasas (AST y ALT), colesterol total, y TNF- α y mejorar la resistencia a la insulina en pacientes con HGNA.

La esteatohepatitis alcohólica y la enfermedad severa del hígado alcohólico (ALD, por sus siglas en inglés “alcoholic liver disease”) pueden tratarse con probióticos. El alcoholismo crónico también es asociado con altos niveles de proteobacteria (bacterias Gram-negativas que incluyen varias especies patógenas como *Salmonella* y *Escherichia*) y poca abundancia de Bacteroidetes. La endotoxemia resultante dispara los mecanismos proinflamatorios causando esteatohepatitis alcohólica. Los tratamientos con probióticos con *Escherichia coli* de Nissle han demostrado restaurar la microflora intestinal incluyendo *Lactobacilli* y *Bifidobacilli*, para reducir la endotoxemia y mejorar la función hepática. Los datos emergentes también muestran los efectos benéficos del *Lactobacillus casei* Shirota en restaurar la capacidad fagocítica de los neutrófilos, un marcador asociado al incremento en el riesgo de infección y mortalidad en la enfermedad hepática alcohólica (Lo et al., 2014).

1.2.9.1.2.4 Mecanismos benéficos de los probióticos en la fibrosis

Se ha demostrado que la relación tan cercana entre el hígado y la flora del intestino, intervienen en las complicaciones hepáticas debido al papel que tienen en la barrera intestinal y la patogénesis de enfermedades hepáticas (Lo et al., 2014).

Los datos obtenidos mediante estudios animales sugieren que los efectos benéficos de los probióticos pueden afectar su peso, influenciar en el metabolismo de la grasa y la glucosa, mejorar la sensibilidad a la insulina y reducir la inflamación crónica sistémica (Kobyliak et al., 2018).

Los mecanismos de beneficio de los probióticos en enfermedades hepáticas no son completamente entendidos. Sin embargo, hay cuatro beneficios generales que ya han sido descritos:

- 1) Supresión de crecimiento, uniones epiteliales, o invasión por bacterias patógenas
- 2) mejoramiento de la función de la barrera intestinal,
- 3) modulación del sistema inmune; esto incluye el incentivar a las citosinas protectoras como la IL-10, y TGF- β y la supresión de citosinas proinflamatorias como la TNF; supresión de la migración de las células T-Helper,
- 4) modulación de la percepción del dolor intestinal al inducir la expresión de los receptores microopioides y cannabinoides (Lo et al., 2014).

En cuanto al tratamiento de enfermedades hepáticas, existe un creciente reconocimiento de que la alteración de la microflora intestinal tiene un efecto causal sobre la patogénesis de numerosas afecciones hepáticas. Como consecuencia, existe un interés creciente en el uso de probióticos para prevenir y tratar dichas afecciones. Sin embargo, el papel de los probióticos en este contexto sigue siendo controversial. Son necesarios más estudios antes de poder incluir a los probióticos como tratamientos respectivos contra enfermedades hepáticas (Lo et al., 2014).

1.2.9.1.3 Tratamientos con antioxidantes

1.2.9.1.3.1 Plantas medicinales

Debido a la ineficiencia de los tratamientos actuales, existe una tendencia mundial a regresar a la medicina tradicional con plantas. Los bloqueadores del sistema renina-angiotensina (SRA) y los antioxidantes son los medicamentos más prometedores antiinflamatorios (Bataller y Brenner, 2005). La humanidad tuvo conocimiento de las virtudes toxicológicas, farmacológicas y alucinógenas de las plantas con mucha anterioridad a su real descubrimiento por la fitoquímica (Jadon y Dixit, 2014). Como parte de su metabolismo, las plantas sintetizan componentes que se conocen como metabolitos secundarios, cuyas propiedades químicas se han investigado ampliamente desde mediados del siglo XIX (Croteau, Kutchan, y Lewis, 2000).

1.2.9.1.3.2 Extractos de plantas y su aplicación en medicina

La importancia de las plantas se debe a que contienen principios activos (compuestos fenólicos, flavonoides, ciertas vitaminas como la A y la E) en alguno de sus órganos, los cuales, extraídos en forma adecuada y administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos, atribuidos a la combinación de metabolitos, no a la acción de únicamente uno de sus compuestos (Jadon y Dixit, 2014) que permiten el manejo de insectos-plaga, de microorganismos fitopatógenos y manejo de problemas fitosanitarios ocasionados por hongos (Barrera y Bautista, 2008; Hernández, Baustista, y Velázquez, 2007; Ramírez, Ramirez, y Jacobo, 2007); además de tener un papel importante en la

medicina tradicional y ortodoxa, curando diferentes tipos de enfermedades, demostrando propiedades antimicrobianas (Jadon y Dixit, 2014).

Recientemente, los estudios han demostrado que el consumo por ratas de plantas medicinales, muestran un incremento en las actividades de enzimas antioxidantes, colesterol-HDL, y una disminución en la peroxidación de lípidos, que puede disminuir el riesgo de enfermedades cardiacas (Yazdanparast et al., 2008).

Muchos productos naturales de origen herbal están en uso para el tratamiento de enfermedades hepáticas (Hasan et al., 2015), los medicamentos provenientes de hierbas son un recurso prometedor para el tratamiento de cirrosis hepática. Los fitoquímicos como los compuestos fenólicos exhiben propiedades antioxidantes que atrapan a los radicales libres y a las especies reactivas de Oxígeno (Abdulaziz et al., 2013). Los compuestos fenólicos debido a sus propiedades redox y a sus grupos químicos como los hidroxilos, le confieren importantes efectos antioxidantes debido a su capacidad de atrapar radicales libres, quelar iones metálicos, apagar singletes y tripletes de oxígeno o descomponer peróxidos (Favari et al., 2013), además de intervenir en diversos mecanismos como inhibir la peroxidación de lípidos, agregación plaquetaria y el mejoramiento de la defensa antioxidante (Yazdanparast et al., 2008). Otras sustancias con capacidad antioxidante, que también son encontrados en plantas y pueden ingerirse a través de la dieta son: flavonoides, polifenoles, β -caroteno, vitamina E, vitamina C, dimetilsulfóxido entre otros (Troncoso y Guija, 2013). Datos experimentales indican que los polifenoles pueden ofrecer protección indirecta activando los sistemas de defensa endógena (Yazdanparast et al., 2008).

Las terapias antifibróticas emergentes están dirigidas para inhibir la acumulación de células fibrogénicas y/o prevenir la deposición de proteínas de la matriz extracelular (Bataller y Brenner, 2005). Los tratamientos de las enfermedades hepáticas con terapias antioxidantes son considerados de suma importancia ya que inhiben los cambios oxidativos deletéreos (Favari et al., 2013). Varios fitoquímicos se han reportado que tienen actividad hepatoprotectora, entre ellos el *Zingiber officinale* (Abdulaziz Bardi et al., 2013) y el berro (*Nasturtium officinale*) (Shahani et al., 2017).

1.2.9.1.3.3 Antioxidantes

La respiración aeróbica normal, leucocitos y macrófagos polimorfonucleares estimulados, y los peroxisomas parecen ser las fuentes principales endógenas de la mayoría de los oxidantes producidos en las células (Akir, Mavi, Kazaz, y Yildirim, 2006).

Los antioxidantes biológicos son componentes naturales que pueden prevenir la formación descontrolada de radicales libres y especies activas de Oxígeno, o inhibir su reacción con estructuras biológicas. Entre estos compuestos se incluyen enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) y los antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (GSH), vitamina C y vitamina E (Yazdanparast et al., 2008).

Según Yazdanparast et al., (2008), existe un interés universal para evaluar los constituyentes antioxidantes de las plantas y hierbas para mejorar la calidad de vida (Yazdanparast et al., 2008). El efecto antioxidante es, probablemente, el más importante para aliviar los síntomas de hepatopatías (Ochoa et al., 2008).

1.2.9.1.3.4 Radicales libres.

Los radicales libres de Oxígeno son compuestos químicos altamente reactivos debido a que poseen uno o varios electrones de valencia desapareados en su capa externa (Haro et al., 2018; Troncoso y Guija, 2013). El estrés oxidativo genera radicales libres y especies reactivas de Oxígeno (ROS) (Yazdanparast et al., 2008).

ROS y RNS

Las especies reactivas de Oxígeno (ROS) y especies reactivas de Nitrógeno (RNS) son varias formas de Oxígeno y Nitrógeno activado que incluyen radicales libres como el hidroxilo (-OH), el anión del superóxido (O_2^-) y radicales de óxido nítrico (NO), así como especies que no son radicales libres, como el peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y el ácido Nitroso (HNO_2) (Akir et al., 2006; Troncoso y Guija, 2013).

1.2.9.1.3.4.1 Daños de radicales libres.

Cuando el sistema de defensa se ve deteriorado, la generación de radicales libres se vuelve nociva en la medida en que no son eliminados por los sistemas antioxidantes endógenos (Yazdanparast et al., 2008), dañan las membranas celulares ejerciendo una acción nociva al organismo mediante lesiones producidas en carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Troncoso y Guija, 2013).

Los radicales libres y las ROS han demostrado tener roles benéficos y perjudiciales. A concentraciones bajas, puede actuar como un segundo mensajero en algunos caminos de señales de trasudación, mientras que, a concentraciones elevadas, pueden causar daños a muchos componentes celulares vitales como los tejidos y se generan condiciones patológicas (Yazdanparast et al., 2008).

El daño oxidativo parece ser el mecanismo fundamental subyacente en los procesos de inflamación, lesión isquemia-reperfusión, shock circulatorio, envejecimiento y en la patogénesis de enfermedades como cáncer, artritis reumatoide, catarata senil, diabetes mellitus, arteriosclerosis, enfermedades coronarias del corazón, Alzheimer y Kwashiorkor (Haro et al., 2018; Troncoso y Guija, 2013; Yazdanparast et al., 2008), Síndrome de Down, Parkinson, Esclerosis múltiple, infecciones virales, inflamación gastrointestinal, úlceras, desórdenes autoinmunes, mutagénesis y carcinogénesis (Haro et al., 2018).

Por lo tanto, los esfuerzos para la prevención y tratamiento adecuado son necesarios para reducir las enfermedades degenerativas (Haro et al., 2018). Y se han estudiado productos naturales y fármacos sintéticos con potencial antioxidante que puedan tener efectos benéficos en todo el proceso de enfermedad (Yazdanparast et al., 2008).

1.2.9.1.3.4.2 Defensa ante radicales libres

Los sistemas de defensa antioxidante con los que cuenta el organismo actúan impidiendo la formación de radicales libres, bloqueando su propagación o interaccionando directamente con ellos; a través de: las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, así como de ácido úrico, proteínas, glucosa, glutatión, grupos sulfidrilos (-SH), entre otros (Troncoso y Guija, 2013).

Los niveles de ROS, incrementan a medida que disminuye la actividad de muchas enzimas antioxidantes de tejido (Yazdanparast et al., 2008). Si se consumen en la dieta frutas y verduras con alto contenido en antioxidantes reducen significativamente las enfermedades degenerativas. Una planta útil y prometedora es el berro (*Nasturtium officinale* R.Br.) que ha sido utilizado por años por su amplia variedad en los usos medicinales (Haro et al., 2018).

1.2.9.1.3.5 Compuestos con actividad antioxidante encontrados en plantas

El berro (*Nasturtium officinale*) tiene efectos hepatoprotectores (Sadeghi et al., 2014) y actividad antioxidante (Gill et al., 2007b; Haro G et al., 2018; Shahani et al., 2017; Troncoso y Guija, 2013) como se explica más adelante (sección 1.4 Berro).

1.2.10. Modelo de inducción de fibrosis con tetracloruro de Carbono

El tetracloruro de carbono es una de las sustancias más utilizadas mundialmente en modelos animales para inducir la hepatotoxicidad por el estrés oxidativo que este tóxico produce, así como, estudiar los daños hepáticos que llevan progresivamente a una fibrosis hepática y finalmente a la cirrosis (Domitrović, et al., 2010; Favari et al., 2013).

El CCl_4 al ser metabolizado libera radicales libres, en forma de triclorometil ($-\text{CCl}_3$) que a su vez reacciona con el O_2 para formar el radical triclorometil peroxil ($\text{CCl}_3\text{COO}\cdot$)⁴ que puede interaccionar con la membrana destruyendo los ácidos grasos poliinsaturados de sus fosfolípidos. Esta destrucción es llamada peroxidación lipídica y se considera un importante mecanismo de toxicidad de numerosos compuestos químicos. La peroxidación lipídica implica daños directos e indirectos, el efecto directo es la destrucción de membrana y el indirecto es la liberación de enzimas asociadas a la membrana, pérdida de antioxidantes y la necrosis (Favari et al., 2013).

El modelo animal utilizado para inducir fibrosis en hígado utilizando químicos como el tetracloruro de carbono (CCl_4) es popular debido a que induce repetitivamente la muerte de hepatocitos, lesión hepática, fibrosis avanzada, es reversible, altamente reproducible, es rápido, con propiedades similares a la fibrosis humana, con buena comparabilidad debido a la gran cantidad de estudios de referencia (Chen et al., 2015; Liedtke et al., 2013). Las desventajas del modelo incluyen necrosis severa de hepatocitos y su dependencia en estrés oxidativo masivo, que no es encontrado a un nivel tan severo en las enfermedades crónicas hepáticas humanas (Chen et al., 2015a).

El daño hepático producido en humanos por diversos compuestos químicos puede ser reproducido por el modelo experimental de daño hepático con tetracloruro de carbono en ratas Wistar (Favari et al., 2013). Los datos actuales de estos modelos animales prueban que los descubrimientos realizados son altamente relevantes y que pueden traducirse a la clínica humana (Liedtke et al., 2013).

1.3. LACTOBACILOS

Las bacterias ácido-lácticas (LAB, por sus siglas en inglés) son un grupo de Gram-positivas, no esporulantes, bacterias aereotolerantes, con un metabolismo fermentativo que tiene como principal producto final al ácido láctico. El grupo de bacterias ácido-lácticas (LAB) comprende siete géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*. La importancia práctica de estos organismos es muy alta ya que pueden aplicarse a la industria (Stefanovic, Fitzgerald, y McAuliffe, 2017), alimentos (yogurt, queso, col fermentada, encurtidos, cerveza, vino, sidra, kimchi, cacao y kéfir) (Trinder et al., 2016), y campos relacionados con la salud. En alimentos, los LAB son usados ampliamente en: producción de lácteos fermentados, carne, productos vegetales, vino y producción de masa. Además, se han usado como agentes bio-preservadores de la comida gracias a la producción de bacteriocinas o antimicrobianos por ciertas especies de LAB. En la salud, algunas LAB son comúnmente usados como probióticos en el tratamiento de infecciones intestinales, enfermedad intestinal inflamatoria y desarrollo de alergias (Stefanovic et al., 2017). El género *Lactobacillus* es el más grande y diverso género de LAB, que comprende un diverso grupo de bacterias que actualmente consiste en más de 200 especies y subespecies (Stefanovic et al., 2017).

Las especies *Lactobacillus* son probióticos que se usan como tratamiento para revertir o incluso prevenir condiciones patológicas gastrointestinales mediante efectos locales, como la promoción de la función de barrera o modificación del sistema inmune. (Hammes et al., 2017; McClemens et al., 2014). Los lactobacilos han demostrado ser miembros naturales y beneficiosos de la microbiota gastrointestinal en humanos, ganado, abejas y peces (Trinder et al., 2016).

La habilidad de supervivencia en las condiciones gastrointestinales, habilidad de adherencia en las células epiteliales del intestino y actividad antagonista frente a patógenos, son los criterios comunes para investigación de cepas potenciales de probióticos. Para poder sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal, las bacterias probióticas deben ser tolerantes a pH bajo (2.5-3.5) y a la pepsina del estómago, sales biliares y pancreatina (enzimas del páncreas), en la parte alta del intestino, además de tener la habilidad de adherirse a la mucosa intestinal. Las cepas adherentes tienen preferencia, ya que su establecimiento en los intestinos parece ser necesario para que se cumplan los efectos de los probióticos. Una buena capacidad de adherencia de los lactobacilos probióticos puede promover el tiempo de permanencia en el intestino, exclusión de patógenos, e interacción con células del huésped para la protección de la modulación epitelial o inmune. Las bacterias probióticas pueden

inhibir las bacterias enteropatógenas que invaden e infectan las células epiteliales intestinales mediante la producción de sustancia antibacterial (ácido orgánico o sustancia proteínica). Tanto los lactobacilos vivos como los inactivados mostraron actividad inmunoreguladora. Dicha actividad de inmunoregulación se debe a algunos componentes macromoleculares de la pared celular (peptidoglicanos, ácido lipoteicoico y polisacáridos capsulares) y al ADN cromosómico de los lactobacilos. Los lactobacilos pueden inducir células inmunocompetentes, como células mononucleares de la sangre periférica, para producir citosinas incluyendo entre otras a IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ . La IL-12 y IFN- γ implicadas en los mecanismos de defensa innata en la respuesta ante bacterias. IL-12 estimula potentemente a las Células T citotóxicas y a las células NK (natural killer) y aumentan la producción de citosinas Th1 (IFN- γ), que pueden activar respuestas inmunes específicas y se ha reportado que también actividad antitumoral (Tuo et al., 2013).

1.3.1 *Lactobacillus rhamnosus*

El *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), ATCC 53103 fue aislado por primera vez por Gorbach y Goldwin (GG). Se identificó como probiótico por su resistencia al ácido y a la bilis, por sus características de buen crecimiento y capacidad de adhesión al epitelio intestinal. Desde entonces, ha sido una de las cepas probióticas más estudiadas y utilizadas mundialmente. Sus efectos benéficos han sido extensamente estudiados en ensayos clínicos, y estudios de intervención humanas (Segers y Lebeer, 2014).

1.3.1.1 Descripción y origen

Los *Lactobacillus rhamnosus* están presente en varios productos diarios, como el queso y el yogurt, (Stefanovic et al., 2017), pero también en leche materna (Riaz Rajoka et al., 2017), cavidades humanas y son miembros de la flora autóctona normal del tracto gastrointestinal humano (Stefanovic et al., 2017; Tuo et al., 2013).

1.3.1.2 Reproducción y control

Lactobacillus rhamnosus GG es capaz de colonizar la boca y puede cultivarse a partir de la saliva por 2 semanas después de su ingesta (Lebeer et al., 2007).

Para la preparación e inoculación de cultivo de probióticos, como *Lactobacillus rhamnosus* GG, se utilizan medios de cultivo sintéticos, como caldo MRS (denominado de esta manera por ser las siglas

del apellido de sus inventores Man-Rogosa-Sharpe) o medio sintético de durazno (Randazzo, Pitino, Licciardello, Muratore, y Caggia, 2013).

El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* necesita una temperatura controlada de 37°C para su cultivo, y requiere de su centrifugación (10,000 rpm, 10 minutos), para su recolección (Randazzo et al., 2013). La incubación a 37°C puede mantenerse con agitación continua o en condiciones estáticas (microaeróbicas) (Lebeer et al., 2007). Una vez recolectados, pueden resuspenderse utilizando agua fisiológica (NaCl al 0.9% p / v). Para su almacenamiento, deben mantenerse en refrigeración a 5 ° C y 25 ° C (Randazzo et al., 2013), o a -20°C (McClemens et al., 2014). La concentración final a la que se desean llevar los probióticos se realiza mediante su densidad celular, medida en unidades formadoras de colonias (UFC), a través de su densidad óptica leyendo a 600nm (DO₆₀₀), una vez obtenida la concentración final deseada, son diluidas en medio nuevo o en agua (Lebeer et al., 2007; Randazzo et al., 2013).

1.3.1.3 Usos y aplicaciones

Los *Lactobacillus rhamnosus* son de los más utilizados en el mundo, aplicándolos en el cultivo de probióticos (Stefanovic et al., 2017), en microbiología de alimentos y nutrición humana (Faghfoori, Gargari, Saber, Seyyedi, y Khosroushahi, 2017), en la producción de comida fermentada (Faghfoori et al., 2017; Tuo et al., 2013), en la biorremediación, utilizándolas para la absorción de toxinas ambientales (pesticidas, metales pesados y aflatoxinas) (Trinder et al., 2016), o en el área de la salud (Lebeer et al., 2007; Segers y Lebeer, 2014) para inhibir enfermedades orales (caries dentales, gingivitis, periodontitis, y halitosis) al producir bacteriocinas (sustancias antimicrobianas) (Rungsri et al., 2017), como defensa antiparasitaria contra infección del nemátodo *Trichuris muris* (McClemens et al., 2014), para prevención y tratamiento de diarrea aguda (Lebeer et al., 2007) e infecciones gastrointestinales, como tratamiento a la enfermedad del hígado graso (Hammes et al., 2017), prevención de ciertos síntomas de alergia y en la simulación de respuestas inmunes que promueven la vacunación (Segers y Lebeer, 2014).

1.3.1.4 *Lactobacillus rhamnosus* contra enfermedades

Se reportó que *Lactobacillus rhamnosus* tiene muchas funciones en mantener la salud humana, la modulación del sistema inmune y la protección contra microbios invasores patógenos (Riaz Rajoka et al., 2017), ya que tiene efectos benéficos en la barrera intestinal y perfil inflamatorio (Hammes et al., 2017), juegan un papel importante en la defensa innata durante las infecciones parasitarias

(McClemens et al., 2014). *Lactobacillus rhamnosus* muestra muy buena adherencia a las células epiteliales y a la mucosa intestinal humana (donde pueden permanecer por más de una semana después de que adultos sanos la hubieran ingerido vía oral y la administración oral en mujeres embarazadas a resultado en la colonización de sus hijos, en los que han durado hasta sus más de 24 meses de edad). La capacidad de adherencia y colonización se consideran como factores que contribuyen a la modulación inmune, expulsión de patógenos, y contacto mejorado con la mucosa por parte de las bacterias probióticas; fortaleciendo el microbiota residente y la resistencia a la colonización por parte de patógenos (Lebeer et al., 2007; Riaz Rajoka et al., 2017).

1.3.1.4.1 Mecanismos de funcionamiento en la clínica

Las propiedades de superficie celular, hidrofobia, autoagregación, y co-agregación están relacionadas a las propiedades de adhesión de las cepas de lactobacilos y son esenciales para la protección y colonización del tracto gastrointestinal. Se requiere un valor mínimo de 40% de hidrofobia para que funcione como cepa probiótica (Riaz et al., 2017).

El *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) es una cepa probiótica utilizada como tratamiento y prevención de enfermedades gastrointestinales. Su capacidad de colonizar el intestino se debe a sus apéndices o extremos que parecen fimbrias y la producción de proteínas solubles que son capaces de incrementar la adherencia al epitelio intestinal, una vez adheridas los LGG, producen un biofilm que puede proteger mecánicamente la mucosa, y diferentes factores solubles (inhibidor de la proteasa serpina porcina, proteínas p75 y p40, hidrolasas asociadas a la pared celular, deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato, y otros) que benefician a los intestinos al mejorar la supervivencia de las criptas intestinales, disminuir la apoptosis del epitelio intestinal, y preservar la integridad del citoesqueleto. Además, LGG son capaces de proteger contra infecciones a través de su proteína 1 y 2 parecida a la lectina, que muestran una actividad pronunciada en actividad inhibitoria contra la producción de biofilm de varios patógenos como las especies de *Salmonella* o los uropatógenos como *E. coli*. LGG es capaz de promover la reacción inmune tipo I, al reducir la expresión de la activación e inflamación de varios marcadores en monocitos y macrófagos, y al incrementar la producción de interleucinas, IL-10, IL-12 y el TNF- α en macrófagos. Sin embargo, las especies de lactobacilos, en particular LGG, es sensible a algunos antibióticos, en particular las penicilinas, es por eso que su habilidad de colonizar el intestino y actuar como probiótico puede verse limitado si se administra terapia antibiótica (Mantegazza et al., 2018).

1.3.1.4.2 *Lactobacillus rhamnosus* contra enfermedades hepáticas

Se ha utilizado el *Lactobacillus rhamnosus* GG como tratamiento adyuvante contra la fibrosis hepática, demostrando ser capaz de reducir la deposición de colágeno, contenido CK7, y la expresión de IL-6 en hígado (Hammes et al., 2017).

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés), ha sido tratado con *Lactobacillus rhamnosus* GG demostrando capacidad como terapia potencial contra las enfermedades relacionadas a la obesidad pediátrica en niños que son incapaces de perder peso (Vajro et al., 2011). También en pacientes cirróticos, se ha demostrado la reducción de endotoxemia y el incremento en la disbiosis intestinal (desequilibrio en la flora intestinal), al ser tratados con *Lactobacillus rhamnosus* GG (Hammes et al., 2017).

1.4. BERRO

1.4.1 Descripción y origen

El berro (*Nasturtium officinale* R. Br) es una planta perenne rizomatosa, perteneciente a las crucíferas (Yambay, 2013) de la familia Brassicaceae (Haro G et al., 2018; Macpherson y Bidaisee, 2015; Sadeghi et al., 2014; Shahani et al., 2017; Yazdanparast et al., 2008), nativa de Europa que crece en algunas partes de Asia (Sadeghi et al., 2014; Yazdanparast et al., 2008) y que es cultivada en numerosos países, pues se considera un vegetal de alimento básico, por su alto valor nutricional (Macpherson y Bidaisee, 2015), es rica en nutrientes como vitaminas y minerales (Shahani et al., 2017).

La clasificación taxonómica según (CONABIO, 2018; Monsalve y Cano, 2005; Yazdanparast et al., 2008):

Reino: plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

Clase : Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Dilleniidae

Orden: Capparales.

Familia: Brassicaceae (= Cruciferae)

Género: *Nasturtium*

Especie: *N. officinale*

Nombre científico: *Nasturtium Officinale*

Nombres Comunes: Berro, cresón, Canidejé (otomí, Ixmiquilpan, Hidalgo), cresón huanéburí (tarahumara, Chihuahua).

El berro crece dentro y alrededor del agua (Shahani et al., 2017), con amplio crecimiento cerca de arroyos, fuentes, zonas encharcadas o de poca corriente, (Yambay, 2013), ríos pequeños, estanques, pantanos, y lagos poco profundos (Haro et al., 2018), sus tallos miden entre 10-80cm de largo y sus hojas carnosas pueden ser de lámina simple (si tienen forma ovalada) o partida (con 1-5 pares de hojas pequeñas de forma elíptica u ovalada con margen sinuoso). El fruto es una vaina alargada y estrecha. Posee pequeñas flores blancas de cuatro pétalos, en racimos terminales. Las semillas son color amarillo-rojizo muy pequeñas (Yambay, 2013).

Puede consumirse fresco o hervido y salteado. De sabor único, amargo con un toque agridulce (Haro et al., 2018). Se consume como vegetal en ensaladas, sopas y otras recetas (Sadeghi et al., 2014; Yazdanparast et al., 2008).

1.4.2 Características y su bioactividad

Varios estudios han reportado considerables efectos antioxidantes de los extractos de *N. officinale* (Gill et al., 2007b; Haro G et al., 2018; Shahani et al., 2017; Troncoso y Guija, 2013). Los análisis fitoquímicos muestran que de entre todos los vegetales, el berro en particular presenta una de las más altas concentraciones de glucosinolatos por gramo de peso, así como altas concentraciones de carotenoides como la luteína y el β -caroteno (Gill et al., 2007b) y a los flavonoides y fenoles como los mayores componentes de la planta (Shahani et al., 2017).

1.4.3 Usos (Componentes, nutrición y aplicaciones del berro)

El berro contiene gran cantidad de minerales como Calcio, Potasio, Sodio y Magnesio que son muy importantes para el cuerpo humano; su contenido calórico es muy bajo y contiene bastante fibra, por lo que es muy buen alimento para las dietas bajas en calorías (Haro et al., 2018).

Ha sido clasificada como la primera en “potencia de las frutas y verduras” por tener la más fuerte relación en cuanto a la disminución de ocurrencia de las enfermedades crónicas, su ranking es alto

debido a que contiene tanto nutrientes esenciales como fitoquímicos que promueven la salud (Voutsina et al., 2016).

Los fitoquímicos, especialmente los fenólicos encontrados en frutas y verduras, han sido propuestos como los mayores componentes bioactivos que proveen beneficios en salud asociado a dietas ricas en comidas de plantas. Los flavonoides son una clase de fenoles secundarios en plantas encontrados en todas las frutas y verduras, así como en productos alimenticios que actúan como compuestos farmacológicos activos en muchas plantas medicinales. Muchas de las acciones biológicas de los flavonoides se les atribuyen a sus poderosas propiedades antioxidantes. Pueden actuar en diferentes caminos, incluyendo la extinción directa de ROS, quelación de iones metálicos y regeneración de antioxidantes limitados por la membrana. Para la evaluación de la actividad antioxidante, los métodos más comunes aplicados son los ensayos de actividad atrapadora de radicales libres (DPPH) y el ensayo FRAP (poder antioxidante reductor del hierro) (por sus siglas en inglés: "Ferric reducing/antioxidant power") (Yazdanparast et al., 2008).

El berro (*Nasturtium officinale*) es rico en vitaminas, como la vitamina C (62mg/100g porción), Vitamina A (420 µg / 100 g porción (convertida del contenido de β-caroteno), vitamina E ((1.46 mg / 100 g porción), vitamina K (250 µg / 100 g porción), gluconasturtina, ácido fólico, yodo, hierro, proteína y calcio, sodio y Magnesio. El berro contiene compuestos flavonoides (quercitina, kaempferol) que pueden actuar como antioxidantes y minerales (Haro et al., 2018). Según Shahani et al., 2017, la vitamina C y vitamina E, entre otros (melatonina, zinc, glicirricina, extracto de Ginkgo biloba, extracto de ajo y L-carnitina) han sido reportados como reductores de la nefrotoxicidad de la Gentamicina a través de la inhibición de daños oxidativos (Shahani et al., 2017).

1.4.4 Propiedades antioxidantes del berro

Nasturtium officinale tiene propiedades antioxidantes poderosas (Sadeghi et al., 2014).

Diversas investigaciones han confirmado la presencia de compuestos fenólicos antioxidantes, principalmente de flavonoides y β-caroteno en *N. officinale* (Haro et al., 2018; Yazdanparast et al., 2008). El extracto metanólico del berro mostró tener la mejor capacidad antioxidante comparada con los extractos con acetato de etilo y hexano (Haro et al., 2018), presenta una notable actividad de recolección contra los radicales DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil), así como un potente poder

férrico reductor antioxidante (ensayos FRAP). A esa elevada capacidad antioxidante, se le atribuye su alta actividad hipolipidémica (Yazdanparast et al., 2008).

1.4.5 *Nasturtium officinale* contra enfermedades

Según Haro et al., (2018), el berro es una fuente nutricional y farmacéutica prometedora. Además de ser consumido como vegetal ha sido utilizado como planta medicinal (Yazdanparast et al., 2008) para tratamientos médicos desde tiempos inmemoriales, como tratamiento contra la tuberculosis, como antidiabético, antialérgico (Haro et al., 2018) y contra el cáncer (Haro G et al., 2018; Sadeghi et al., 2014; Shahani et al., 2017). Las hojas del berro son también ampliamente utilizadas como remedio casero como depurativo, diurético, expectorante e hipoglucémico (Sadeghi et al., 2014; Yazdanparast et al., 2008).

El berro ha demostrado tener efectos anti-hiperlipidémicos (Sadeghi et al., 2014; Shahani et al., 2017). Yazdanparast y colaboradores (2008), han reportado que la suplementación de berro en la dieta (mediante administración intragástrica), reduce los lípidos séricos (redujo un 37% su colesterol total en sangre (TC), 44% los triglicéridos (TG), y 48% el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C)) y alteran el estado de antioxidantes en la sangre en ratas hipercolesterolémicas (Yazdanparast et al., 2008).

Sadeghi et al., (2014) demostraron los efectos antiinflamatorios (debidos a los fitoquímicos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto) del extracto hidro-alcohólico del *Nasturtium officinale* aplicado sistémicamente y tópicamente en diferentes modelos experimentales de inflamación. Apoyan el uso del berro en el manejo de desórdenes inflamatorios sin generar daño a la mucosa gástrica (Sadeghi et al., 2014).

El berro, es una buena fuente de glucosinolatos, que son una clase de glucósidos que contienen sulfuro y nitrógeno que son hidrolizados (por la microflora intestinal o la mirosinasa en las plantas) para formar isotiocianatos. Dichos isotiocianatos son responsables de mostrar propiedades anticancerígenas (Gill et al., 2007b).

El berro puede utilizarse para mantener una digestión y riñones saludables, para depurar toxinas en el cuerpo, inhibir el desarrollo de células cancerígenas, y como tratamiento de la garganta irritada, tuberculosis y sarna (Haro et al., 2018).

Gill et al., (2007), reportaron que la suplementación en la dieta con berro reduce el daño del ADN de los linfocitos y altera el estatus de los antioxidantes sanguíneos en adultos sanos. También se han reportado efectos antimicóticos y anticancerígenos del berro (*Nasturtium officinale*) (Yazdanparast et al., 2008).

La Comisión Alemana E (“German Commission E”) aprobó el uso del berro para el tratamiento de tos y bronquitis. En la medicina tradicional, se ha utilizado para el catarro y el tracto respiratorio, como un aperitivo y para malestares digestivos. La decocción de las hojas puede ser también aplicada externamente para la artritis. Estudios previos de esta planta han mostrado efectos anti-hiperlipidémicos y antiinflamatorios (Sadeghi et al., 2014; Shahani et al., 2017).

1.4.6 *Nasturtium officinale* y el hígado

Muchos estudios proponen efectos hepatoprotectores del berro (Sadeghi et al., 2014).

El berro (*Nasturtium officinale*) es un alimento que tiene poderes antioxidantes y puede ser utilizado para prevenir la hepatotoxicidad con un mecanismo en el que intervienen tanto la producción de radicales libres, como la alteración del sistema antioxidante a nivel hepático (Troncoso y Guija, 2013).

Debido al alto contenido de fenoles y flavonoides en el extracto de *N. officinale*, éstos pueden ser responsables de la supresión de las medidas de peroxidación lipídica y del aumento en la capacidad antioxidante del hígado en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. El extracto de *N. officinale* regula la actividad enzimática antioxidante, suprime la peroxidación lipídica e incrementa los niveles de glutatión en el hígado (Yazdanparast et al., 2008).

2. HIPÓTESIS

El extracto de berro y *Lactobacillus rhamnosus* silvestres revierten la fibrosis hepática en rata Wistar.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de reversión del extracto metanólico del berro y el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* silvestre sobre la fibrosis hepática en rata Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Analizar el efecto de reversión de la fibrosis hepática del extracto de berro en rata Wistar.
- II. Analizar el efecto de reversión de la fibrosis hepática de *Lactobacillus rhamnosus* silvestres en rata Wistar.
- III. Analizar el efecto de reversión de la fibrosis hepática de la combinación del extracto de berro y de *Lactobacillus rhamnosus* silvestres en un modelo de rata Wistar.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de ciencias morfológicas del departamento de morfología del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

4.2 Diseño de la investigación: Modelo de rata Wistar

4.2.1 Animales de laboratorio

La unidad experimental es la rata Wistar. Se seleccionaron 26 ratas Wistar machos de un mes de edad, que fueron obtenidas del Bioterio del Centro de Ciencias Básicas de la UAA con un peso promedio de $120 \pm 22.1g$.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con el Reglamento del comité de Ética para el uso de Animales en la Docencia e Investigación en la UAA (CEADI-UAA) y acorde con el Reglamento para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés "National Institutes of Health").

Antes de iniciar con el experimento, se desparasitaron y se les administró un antibiótico. El día que llegaron, las ratas se desparasitaron vía oral utilizando una dosis de 5 mg de Ivermectrina la cual se

colocó en medio litro de agua que tenían para beber; al día siguiente, se les administró un antibiótico antibacteriano vía oral, diluyendo en una botella de agua de 250 mL, un mL de Enroxil al 10%.

Para comenzar con el experimento, se formaron seis grupos de ratas, utilizando un diseño no balanceado, es decir, con diferente número de ratas (repeticiones por grupo).

Los grupos formados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 12. Grupos de ratas

#	Nombre del grupo	(n) INICIAL
1	Intacto (I)*	3
2	Control positivo de las 8 semanas (OchoS ó 8S)	5
3	Control positivo de las 4 semanas (Cuarta Semana ó 4S)	4
4	Berro (B)	4
5	Lactos**	7
6	Berro-Lacto (BL)	3
	TOTAL	26

* El grupo Intacto es el control negativo del experimento. **Hubo dos rondas de sacrificios, en la primera se le llamó Lacto (L) y la segunda Nuevo Lacto (NL), ambos grupos tuvieron exactamente las mismas condiciones.

4.2.2 Alojamiento

Las ratas se mantuvieron en jaulas metálicas tamaño estándar (215 x 465 x 145 mm) dentro del bioterio.

Las ratas tuvieron libre acceso al alimento que consistió en croquetas de la marca comercial Purina y agua *ad libitum*. Fueron mantenidas en condiciones 12:12 h luz: oscuridad a temperatura de 24±2°C.

4.2.3 Modelo de fibrosis hepática

4.2.3.1 Inducción de fibrosis

El experimento tuvo una duración de ocho semanas.

Durante todo este tiempo (ocho semanas), se indujo químicamente la fibrosis mediante Tetracloruro de Carbono (CCl₄) (Anexo 9.1).

El daño al hígado necesario para inducirles fibrosis se realizó inyectando vía intraperitoneal 0.8 mL/kg de la mezcla 1:1 v/v de CCl₄ y petrolato.

El tetracloruro de carbono (CCl₄), se administró dos veces por semana (martes y viernes) en la mañana (8am), esto para lograr establecer el modelo de fibrosis (de acuerdo con el método descrito por Atta et al., 2014).

4.2.3.2 Administración de tratamientos

Los tratamientos utilizados fueron tres:

- 1) Extracto metanólico de berro
- 2) *Lactobacillus rhamnosus*
- 3) Combinación de extracto metanólico de berro y *Lactobacillus rhamnosus*

La administración de todos los tratamientos fue vía oral, de lunes a viernes mediante una cánula, iniciando a la cuarta semana de haber comenzado la inducción de fibrosis y hasta terminar la octava semana.

Tras haber cumplido las ocho semanas a partir de la inducción de fibrosis mediante CCl₄, las ratas fueron sacrificadas.

4.2.3.2.1 Extracto metanólico de berro

Se utilizó extracto metanólico de berro (Anexo 9.3: Preparación del extracto metanólico de berro), el cual fue mantenido en forma seca en el laboratorio a condiciones controladas de temperatura y en un frasco cerrado de vidrio cubierto con papel aluminio protegiéndolo de la luz natural y artificial.

Las propiedades del extracto de berro son: metabolitos secundarios (Anexo 9.4), capacidad antioxidante (Anexo 9.5) y citotoxicidad (Anexo 9.6).

Como metabolitos secundarios contiene dobles enlaces, grupo carbonilo, esteroides y triterpenos, cumarinas, sesquiterpenlactonas, quinonas, grupo carboxilo, taninos, carbohidratos y flavonoides. Respecto a la capacidad antioxidante resulta ser de baja a mediana (ya que no mostró ser mayor a 200 µmol equivalentes de Trolox).

La citotoxicidad exhibió 0% de hemólisis en todas sus concentraciones evaluadas (100-1000 µg/mL). A cada rata de los grupos de Berro y Berro-Lacto se le administraron vía oral mediante cánula 0.5mL de una solución que contenía 600mg/Kg de extracto de berro disuelto en 0.5mL de agua purificada (Anexo 9.2), de lunes a viernes, iniciando en la cuarta semana y terminando al finalizar la octava semana.

4.2.3.2.2 *Lactobacillus rhamnosus*

Se utilizó una cepa silvestre de *Lactobacillus rhamnosus* GG, la cual se cultivó diariamente durante todo el tiempo que duró el experimento (Anexo 9.7). Se comenzó a sembrar una semana antes de que iniciaran los tratamientos.

La preparación del tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus* (Anexo 9.9), se realizó dentro de la campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad.

Se tomaron del cultivo la cantidad suficiente de mililitros para contener por cada 0.5mL una concentración de 1×10^{10} células de bacterias. La cantidad de células de bacterias por mililitro se calculó utilizando lecturas en el espectrofotómetro, leyendo a densidad óptica de 600.

A cada rata de los grupos de Lactos y Berro-Lacto se le administraron vía oral mediante cánula 0.5mL (1×10^{10} UFC) del preparado de *Lactobacillus rhamnosus* disuelto en agua purificada, de lunes a viernes, iniciando en la cuarta semana y terminando al finalizar la octava semana.

4.2.3.2.3 Combinación de extracto metanólico de berro y *Lactobacillus rhamnosus*

A cada rata del grupo Berro-Lacto se le administraron vía oral mediante cánula 0.5mL de una solución que contenía 600mg/Kg de extracto de berro disuelto en 0.5mL de agua purificada, de lunes a viernes, iniciando en la cuarta semana y terminando en la primera mitad de la sexta semana.

Posteriormente, de la *segunda* mitad de la sexta semana hasta terminar la octava semana se le administró a cada rata del grupo Berro-Lacto vía oral mediante cánula 0.5mL (1×10^{10} UFC) del preparado de *Lactobacillus rhamnosus* disuelto en agua purificada, de lunes a viernes.

4.3 Toma de muestras biológicas

Una vez concluidas las ocho semanas del experimento, las ratas fueron pesadas y sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico 1:10 con PBS (vía i.p.). Posteriormente se les colocó en posición decúbito dorsal y se les realizó la toma de muestras de sangre por punción cardiaca, se les realizó una incisión en la región media del abdomen, de la región hipergástrica a la región inguinal, se extrajeron primero el hígado el cual fue pesado y posteriormente seccionado para almacenarse en diferentes frascos y con diferente tratamiento de fijación dependiendo de las pruebas a las que iría dirigido, seguido de eso se extrajo el intestino grueso del cual se seleccionó el colon y fue seccionado para almacenarse en diferentes frascos y con diferente tratamiento de fijación dependiendo de las pruebas a las que sería sometido. A continuación, se describen con mayor detalle estos procesos.

4.3.1 Sacrificio de las ratas

Cada rata fue pesada en una balanza de equilibrio para laboratorio (triple beam) con jaula metálica.

El peso de cada rata se utilizó para calcular la sobredosis de solución anestésica que recibirían. Una vez realizado el cálculo se le administró a la rata via i.p. una sobredosis de Pentobarbital sódico (por cada 100mL contiene 6.3g de pentobarbital sódico), el cual se diluye 1:10 con PBS. El cálculo de la dosis es 1.5mL de solución anestésica por cada 150g de peso corporal de la rata.

4.3.2 Punción cardiaca y cirugía a las ratas

Una vez dormida, la rata se colocó en posición decúbito dorsal para su cirugía y se retiraron las muestras de sangre y de órganos (Anexo 9.11) para su preservación y posterior análisis.

4.3.3 Toma y preservación de muestras (sangre y órganos)

4.3.3.1 Sangre

La muestra de sangre se obtuvo mediante punción cardiaca. Se colocó la sangre extraída (10-14mL) en frascos Falcon de 15mL previamente etiquetados.

Una vez terminados los sacrificios se procesaron esas muestras colocándolas en la centrífuga (OHAUS Línea YRC) a 3500 rpm durante 5 min. Una vez separada la sangre en suero y paquete globular, se tomó con pipeta de plástico el suero y se pasó a tubos Eppendorf limpios y etiquetados. Éstos se congelaron a -20°C hasta su análisis (perfil hepático).

4.3.3.2 Hígado e intestino

4.3.3.2.1 Toma de muestra de hígado para PCR

Para la toma de muestra de hígado para PCR se utilizó la metodología de (Hasan et al., 2015).

Se seccionó el hígado en cubos de aproximadamente 3mm^3 , se colocaron 2 cubos por rata en un tubo Eppendorf de $600\mu\text{L}$, previamente etiquetado, con $150\mu\text{L}$ de la solución RNA later, asegurándose que el hígado seccionado estuviera tocando la solución.

Se almacenaron hasta su procesamiento en el ultracongelador (Thermo Scientific, TSU600A) a -80°C

4.3.3.2.2 Toma de muestra de hígado para pruebas histológicas

Para la toma de muestra de hígado para pruebas histológicas se utilizó la metodología de (Domitrović et al., 2010).

Por cada rata, se tomó una muestra de aproximadamente $1.5\text{cm} \times 3\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ de hígado y se colocó en un tubo Falcon de 15mL, previamente etiquetado, con 9mL de formalina neutra al 4%.

Las muestras se almacenaron en un lugar donde no les diera la luz, a temperatura ambiente hasta su inclusión en parafina.

4.3.3.2.3 Toma de muestra del intestino grueso

4.3.3.2.3.1 Extracción y lavado de intestino grueso

La muestra obtenida en este punto se utilizó para su análisis en PCR y en pruebas histológicas, como se describe en los siguientes dos puntos.

Una vez retirado el colon, se colocó en una placa de vidrio para su disección.

Se abrió por el mesenterio y se cortaron aproximadamente 4cm de largo de colon.

Se colocó en una jeringa solución PBS 1X y se distribuyó a chorro la solución a lo largo de la muestra de colon cortado, para que con la presión se lavaran los restos de materia fecal que pudiera contener.

4.3.3.2.3.1.1 Toma de muestra de intestino para PCR

Una vez lavadas las muestras se cortaron 2 trozos de aproximadamente 3mm de largo, los cuales se procesaron igual a lo descrito anteriormente en la toma de muestra de hígado para PCR.

4.3.3.2.3.1.2 Toma de muestra de intestino para pruebas histológicas

Se tomó el resto de la muestra de intestino grueso lavado, aproximadamente 3cm, y se dividió en dos, cortando a lo ancho, ambos pedazos se procesaron igual a lo descrito anteriormente en la toma de muestra de hígado para pruebas histológicas.

4.4 Procesamiento de las muestras para qPCR

Las muestras de hígado e intestino recolectadas de las ratas se procesaron para su análisis genético con qPCR. Dicho análisis consistió en realizarles extracción de ARN, cuantificación de ARN, retrotranscripción y finalmente reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

Extracción de ARN

Las muestras obtenidas de tejidos de hígado e intestino fueron almacenadas en RNA later® a -80°C hasta su utilización. La extracción de ARN se llevó a cabo con el kit Direct-zol RNA miniprep (R2070, Zymo Research Corporation) siguiendo el protocolo del fabricante. Los tejidos fueron homogenizados con el homogenizador de tejidos (IKA® T10 basic- homogenizer workcenter). La concentración y pureza del ARN se determinó en el Biodrop (Isogen Life Science) y se almacenó a -80°C en ultracongelador (Thermo-Scientific® Forma 88000 SERIES).

Retrotranscripción de ARN

Se sintetizó cDNA a partir de 500ng de RNA total utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcripción System (Promega®) usando el protocolo del fabricante. Las muestras fueron colocadas en el termociclador (Techne Genius FGEN02TP). Las especificaciones para la retrotranscripción se describen a continuación: Alineación: 25 °C durante 5 minutos, Extensión: 42°C durante 120 minutos, Inactivación de la Transcriptasa Reversa: 70°C durante 15 minutos. El cDNA obtenido se cuantificó en el Nanodrop-2000 (Thermo-Scientific®) y almacenado a -80°C en ultracongelador (Thermo-Scientific® Forma 88000 SERIES).

El procesamiento de las muestras se realizó conforme a lo descrito en el Anexo 9.16.

4.5 Procesamiento de las muestras histológicas (Deshidratación, aclaramiento, inclusión en parafina y corte en microtomo)

Las muestras de hígado e intestino recolectadas de las ratas se procesaron para su análisis.

Se han desarrollado diversas técnicas para preparar tejidos con el fin de estudiarlos, de tal manera que semejen cuanto más su estado natural en vivo.

Las etapas necesarias son:

- 1) Fijación,
- 2) Deshidratación y aclaramiento,
- 3) Inclusión (en un medio estable),
- 4) Sección en cortes delgados para poderlos observar mediante transiluminación,
- 5) Montaje, en una superficie para facilitar su manipulación

Estas cinco etapas, se encuentran descritas a detalle en el anexo 9.17: procesamiento de las muestras.

- 6) Tinción (para diferenciar los diversos componentes celulares y tisulares) (Gartner y Hiatt, 2004).

Para poder trabajar con las muestras procesadas, se prepararon laminillas para poder cumplir el punto 5 de montaje, con la técnica de portaobjetos adhesivo descrito en el anexo 9.14, para facilitar que se mantuvieran adheridas a las laminillas y no sufrieran pérdidas al momento de su tinción.

Con respecto a la sexta etapa, referente a la tinción, se realizaron tinciones tanto de Hematoxilina-Eosina (HE) (Anexo 9.18) como de Rojo Sirio (RS) (Anexo 9.19) para las muestras de tejidos de hígado e intestino.

4.6 Determinación de variables

Para poder analizar el comportamiento, así como el efecto que tuvieron los tratamientos sobre la fibrosis hepática, se determinaron 27 variables, de las cuales son en su mayoría cuantitativas (24 variables) y las restantes cualitativas (hay una variable en el análisis macroscópico del hígado y dos en el análisis histopatológico). Se describen a continuación:

4.6.1 Peso de las ratas vivas

Al inicio del estudio se pesaron cada una de las ratas de cada tratamiento y posteriormente cada ocho días mientras duró el estudio. El peso de las ratas fue medido cada semana, siempre el mismo día (jueves) a la misma hora (8pm).

De las cuales salen ocho variables, debido a que fueron ocho semanas.

4.6.2 Peso del hígado

Una vez sacrificadas las ratas y retirado el hígado, antes de proceder a seccionarlo para las diferentes pruebas, se pesaron uno por uno en una balanza analítica (Electronic Balance Labtron C scientific).

4.6.3 Análisis macroscópico del hígado

Una vez obtenido el peso del hígado, se procedió a tomarle una foto y realizar el análisis descriptivo del mismo a través de su inspección.

4.6.4 Perfil hepático

Mediante la técnica de química seca con el sistema Inmunodiagnóstico Vitros 3600, Autorizado por FDA USA, (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA), se analizó el suero de la sangre obtenida mediante punción cardiaca para determinar el perfil funcional hepático.

De donde salen las siguientes cinco variables: AST, ALT, AP, albúmina y urea.

4.6.5 Análisis histopatológico

Con la tinción mencionada anteriormente de HE, se realizó con el apoyo de un patólogo experto un análisis histopatológico tanto del hígado como del intestino para todas las ratas de todos los tratamientos; de esta manera se obtienen dos variables: HE de hígado y HE de intestino.

4.6.6 Análisis morfométrico

Con la tinción mencionada anteriormente de Rojo Sirio, se realizó un análisis morfométrico tanto del hígado como del intestino para todas las ratas de todos los tratamientos.

La tinción del Rojo Sirio nos permite observar y diferenciar entre los tipos de colágena (I y III) presentes en el tejido, para lo cual fue necesario el microscopio invertido utilizando un filtro de polarización. De aquí se obtuvieron fotos, las cuales son procesadas a través de un software especializado ImageJ (Anexo 9.15) que permite cuantificar la cantidad de los tipos de colágena presentes y de ahí obtener su porcentaje; de esta manera se obtienen seis variables: Colágena total en hígado, Colágena total en intestino, Colágena tipo I en hígado, colágena tipo I en intestino, colágena tipo III en hígado y colágena tipo III en intestino.

4.6.7 Análisis genético con qPCR

En esta etapa se determinaron los cambios moleculares que existen en el tejido hepático e intestinal para cada rata de todos los grupos. Las muestras de hígado e intestino que se encontraban con RNA later en los tubos Eppendorf almacenados en el ultracongelador fueron empleados para evaluar la expresión de genes marcadores de inflamación (IL-10 e IL-1 para hígado e IL-10 para intestino) y fibrosis (Colágena para hígado) mediante qPCR en tiempo real.

Los niveles de expresión de cada uno se determinaron en relación con la β -actina.

De esta manera, en este punto se obtienen cuatro variables: Colágena en hígado, IL-10 en hígado, IL-1 en hígado e IL-10 en intestino.

4.7 Diseño de la investigación

Bajo un diseño completamente al azar, las ratas fueron distribuidas en seis grupos de diferente número de animales cada uno de ellos, a los cuales se les asignaron diferentes tratamientos:

Tratamiento uno [n=3] (Intacto) ratas que no recibieron ningún tratamiento ni tuvieron inducción de fibrosis; Tratamiento dos [n=4] (Control positivo de la cuarta semana 4S) ratas que recibieron CCl_4 durante 4 semanas y fueron sacrificadas inmediatamente después de cumplir las 4 semanas; Tratamiento tres [n=5] (Control positivo de 8 semanas 8S) ratas que recibieron CCl_4 durante 8 semanas; Tratamiento cuatro [n=4] (Tratamiento de berro) ratas que recibieron CCl_4 durante 8 semanas y recibieron a partir de la cuarta semana tratamiento con extracto de berro a una concentración de 600mg/kg/día vía oral, mediante cánula, de lunes a viernes, de acuerdo a lo descrito por (Domitrović et al., 2010; Hasan et al., 2015), cada rata recibió 600mg/Kg de extracto de berro en 0.5mL de agua purificada (anexo 9.2); Tratamiento cinco [n=7] (Tratamiento de

lactobacillus rhamnosus) ratas que recibieron CCl₄ durante 8 semanas y recibieron a partir de la cuarta semana tratamiento con *lactobacillus rhamnosus* a 1x10¹⁰ UFC/ml/animal vía oral, mediante cánula, de lunes a viernes; Tratamiento seis (Tratamiento de Berro-Lacto) ratas que recibieron CCl₄ durante 8 semanas y recibieron a partir de la cuarta semana tratamiento con extracto de berro a una concentración de 600mg/kg/día (cuarta, quinta y primera mitad de sexta semana), cada rata recibió 600mg/Kg de extracto de berro en 0.5mL de agua purificada y *lactobacillus rhamnosus* a 1x10¹⁰ UFC/ml/animal (segunda mitad de sexta semana, séptima y octava semana), vía oral, mediante cánula, de lunes a viernes.

4.8 Análisis Estadístico

Bajo un diseño completamente aleatorizado, se hicieron las pruebas de normalidad y homocedasticidad, sobre todas las variables cuantitativas.

Posteriormente se obtuvo el ANOVA y la prueba Fischer-LSD (Anexo 9.22 - 9.27). Utilizando como mínimo un nivel de significancia de 0.05 aplicando el programa estadístico R para los análisis y GraphPad Prism 6.07 para las gráficas.

5. RESULTADOS

5.1 Comportamiento de las ratas durante las 8 semanas

5.1.1 Distribución de grupos

Se realizaron diferentes grupos de ratas, cada uno siguiendo un tratamiento diferente. A continuación, se describen dichos grupos en forma de tabla para apreciar la cantidad de ratas que tenían al inicio del experimento y las que tuvieron al finalizar el experimento (antes del sacrificio, previo a cumplir las 8 semanas que establece el modelo).

Tabla 13 Distribución de los grupos y número de ratas

GRUPOS	(n) INICIAL	(n) FINAL	MUERTES
Intacto	3	3	0
Control positivo octava semana 8S	5	3	2
Control positivo cuarta semana 4s	4	3	1
Berro	4	3	1
LACTOS: Lacto (4) + NL (3)	7	7	0
Berro-lacto	3	2	1
TOTAL	26	21	5

Se tienen 5 grupos, de los cuales, dos son controles positivos y uno (intacto) es control positivo. Además, el grupo llamado Lactos está integrado por los grupos Lacto y NL. Se utilizaron un total de 26 ratas y hubo 5 muertes.

5.1.2 Sobrevivencia

A lo largo del experimento con duración de 8 semanas (56 días), la mortalidad de las ratas se muestra en la tabla 14, en donde se observa el día en que fallecieron, así como el porcentaje de sobrevivencia por grupo. Podemos resaltar que dos de los grupos tuvieron un 100% de sobrevivencia y de los demás grupos, el más bajo fue de 60% de sobrevivencia y corresponde al control positivo de las ocho semanas.

Tabla 14 Mortalidad en el experimento

GRUPO	Número inicial de ratas	Número de muertes de las ratas					Porcentaje de sobrevivencia
		Día 10	Día 28	Día 29	Día 32	Día 43	%
Intacto	3	0	0	0	0	0	100.00
Control + 8S	5	0	0	0	1	1	60.00
Control + 4S	4	1	0	-	-	-	75.00
Lacto	7	0	0	0	0	0	100.00
Berro	4	0	0	1	0	0	75.00
Berro-Lacto	3	0	1	0	0	0	66.67
TOTAL ACUMULATIVO	26	1	2	3	4	5	80.76

En total hubo una mortalidad de 5 ratas, de un total de 26, lo que implica una sobrevivencia del 81%, con una mortalidad del 19%.

A continuación, se muestra en la figura 1, la gráfica de sobrevivencia:

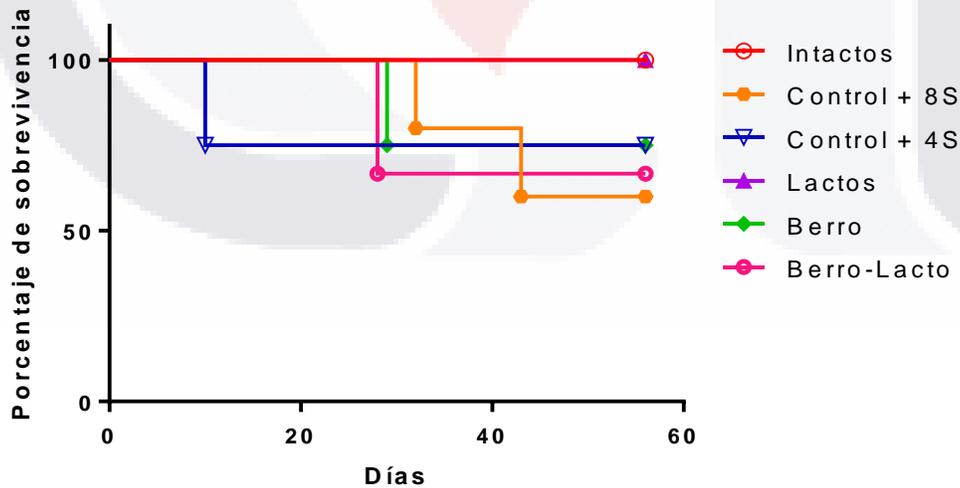


Figura 1 Sobrevivencia de las ratas

5.1.3 Estadísticos

Para todas las variables cuantitativas, se analizó a través de las pruebas de: Kolmogorov-Smirnov, Distribución F y t-test, si los grupos Lacto y Nuevo Lacto se podrían considerar como un mismo grupo.

Como resultado de las pruebas (Anexo 9.21), para todas las variables excepto pesos de las ratas de la semana 1 y albúmina, sí se pueden considerar que son del mismo grupo.

Es importante mencionar, que en las variables de la excepción (pesos de las ratas de la semana 1 y albúmina) se trabajó con el grupo de Lacto.

Posteriormente, para todos los grupos se verificaron los supuestos de normalidad (mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov) y de homocedasticidad (Levene's test), para todas las variables cuantitativas. En todos los casos se cumplieron ambos supuestos, presentando normalidad y homocedasticidad.

Por lo tanto, se hizo el análisis de varianza (ANOVA) para todas las variables y se procedió a su interpretación.

Se procedió a verificar la igualdad de medias para todos los grupos ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H_1 : al menos hay un grupo diferente), con el criterio de que si las p eran menores a 0.05 se rechazaba H_0 . En los casos en los que se rechazó H_0 , se corrió la prueba estadística Fischer-LSD para identificar cuáles de los grupos eran iguales y cuáles eran diferentes.

Tabla 15 Valores p del ANOVA de todas las variables cuantitativas y su interpretación

Variables	Valor p del ANOVA	Interpretación con una confianza del 95% para la hipótesis: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H_1 : al menos hay un grupo con media diferente
Pesos de la semana 1	3.138×10^{-10}	Hay al menos un tratamiento diferente
Pesos de la semana 2	3.715×10^{-10}	Hay al menos un tratamiento diferente
Pesos de la semana 3	0.002072	Hay al menos un tratamiento diferente
Pesos de la semana 4	0.11	Todos los tratamientos son iguales

Pesos de la semana 5	0.1103	Todos los tratamientos son iguales
Pesos de la semana 6	0.06868	Todos los tratamientos son iguales
Pesos de la semana 7	0.04904	Hay al menos un tratamiento diferente
Pesos de la semana 8	0.01659	Hay al menos un tratamiento diferente
Pesos de los hígados	0.01908	Hay al menos un tratamiento diferente
ALT	1.889×10^{-07}	Hay al menos un tratamiento diferente
AST	3.422×10^{-05}	Hay al menos un tratamiento diferente
Urea	0.224	Todos los tratamientos son iguales
Albúmina	0.1673	Todos los tratamientos son iguales
Fosfatasa alcalina	0.7015	Todos los tratamientos son iguales
Porcentaje de colágena total en hígado	0.1774	Todos los tratamientos son iguales
Porcentaje de colágena total en intestino	0.7742	Todos los tratamientos son iguales
Porcentaje de colágena tipo I en hígado	0.03371	Hay al menos un tratamiento diferente
Porcentaje de colágena tipo I en intestino	0.7411	Todos los tratamientos son iguales
Porcentaje de colágena tipo III en hígado	0.2256	Todos los tratamientos son iguales
Porcentaje de colágena tipo III en intestino	0.1503	Todos los tratamientos son iguales
IL-1 en hígado	4.297×10^{-07}	Hay al menos un tratamiento diferente
IL-10 en hígado	1.404×10^{-07}	Hay al menos un tratamiento diferente
Colágeno en hígado	9.662×10^{-08}	Hay al menos un tratamiento diferente
IL-10 en intestino	0.002654	Hay al menos un tratamiento diferente

De las 24 variables cualitativas, los tratamientos se comportan igual en 11 de ellas, mientras que las restantes 13 variables tienen al menos un tratamiento con diferencia significativa.

Se puede observar que de acuerdo a los ANOVAs realizados a las variables, las únicas variables en las que todos los datos de todos los tratamientos se comportan estadísticamente igual son: Porcentaje de colágena tipo III en intestino, Porcentaje de colágena tipo III en hígado, Porcentaje de colágena tipo I en intestino, Porcentaje de colágena tipo I en hígado, Porcentaje de colágena total en hígado, Porcentaje de colágena total en intestino, Pesos de la semana 4, 5 y 6, Urea, Albúmina, Fosfatasa alcalina.

5.1.4 Resultados de las variables analizadas

Como se describió en la sección 4.6, se determinaron 27 variables, de las cuales 24 son cuantitativas y 3 cualitativas.

Para cada una de las variables cuantitativas, se corrieron las pruebas estadísticas explicadas anteriormente cuyos resultados se encuentran en los anexos; cada variable tiene su anexo con el proceso estadístico que se llevó a cabo, describiendo desde los valores (datos crudos) obtenidos en el experimento, la verificación de supuestos para poder realizar el ANOVA, con sus respectivas hipótesis, valores de p y conclusiones para cada supuesto, seguido de su tabla ANOVA con todos sus valores y rescatando el valor p, necesario para su interpretación, así como la explicación de la misma, en caso de que resultaran haber diferencias entre los grupos, se explica paso a paso los resultados del método Fischer-LSD, así como su interpretación estadística (describiendo cuál hipótesis se acepta y cuál se rechaza) y su interpretación en cuanto al significado de dichos resultados.

Los anexos mencionados por variable, son los siguientes: Peso de las ratas vivas (Anexo 9.22); Peso del hígado (Anexo 9.23); Análisis macroscópico del hígado (Sección 5.15); Perfil hepático (Anexo 9.25): ALT, AST, Albúmina, Urea y Fosfatasa Alcalina; Análisis histopatológico (Anexo 9.24); Análisis morfométrico (Anexo 9.26): Colágena tipo I en hígado, colágena tipo I en intestino, colágena tipo III en hígado y colágena tipo III en intestino; y Análisis genético con qPCR: Colágena en hígado, IL-10 en hígado, IL-1 en hígado e IL-10 en intestino.

5.1.5 Análisis macroscópico del hígado

Bajo anestesia, con pentobarbital sódico al 10%, a dosis de 1mL por cada 150g de peso, se realizó la laparotomía a las ratas y se extrajeron el hígado y el intestino. A continuación, se muestran los hígados y se describen los hallazgos.

Tabla 16 Hígados del grupo intacto

GRUPO	RATA 1	RATA 2	RATA 3
INTACTO			
	Hígados de aspecto normal con característico color rojizo pardo sin alteracion visible de la superficie hepática.		

Tabla 17 Hígados del grupo 8S

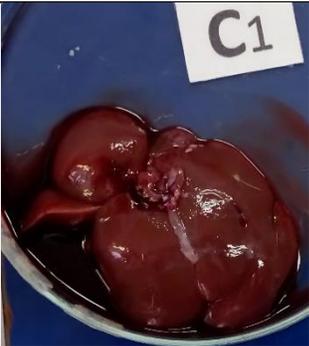
GRUPO	RATA 1	RATA 2	RATA 3
CONTROL POSITIVO 8 SEMANAS (8S)			
	Los hígados de este grupo muestran una superficie rugosa, debido a la gran cantidad de gránulos que se forman por los pequeños nódulos de regeneración, al formarse las bandas de colágeno en el parénquima subyacente. Resalta la presencia de un color rojo más pálido respecto a los hígados intactos.		

Tabla 18 Hígados del grupo berro

GRUPO	RATA 1	RATA 2	RATA 3
BERRO			
	Los hígados de este grupo muestran superficie con aspecto granular y un color pálido, respecto al intacto.		

Tabla 19 Hígados del grupo lacto

GRUPO	RATA 1	RATA 2	RATA 3	RATA 4
LACTO				
	La mayoría (3/4) de los hígados de este grupo muestran una superficie lisa con color rojo característico del hígado sano, solo un hígado (L2) muestra una superficie ligeramente rugosa y pálida.			

Tabla 20 Hígados del grupo NL

GRUPO	RATA 1	RATA 2	RATA 3
NUEVO LACTO			
	<p>Dos de tres hígados muestran una superficie lisa de color rojo oscuro, característico del hígado normal, el tercer hígado (NL1) muestra solo palidez de su superficie sin rugosidades y presenta depósitos de grasa superficiales.</p>		

Tabla 21 Hígados del grupo 4S

GRUPO	RATA 1	RATA 2	RATA 3
CONTROL POSITIVO 4S (CUARTA SEMANA)			
	<p>Hígados con superficie rugosa y granular, solo uno de ellos con color característico del hígado, los otros dos muestran palidez.</p>		

Tabla 22 Hígados del grupo Berro-lacto

GRUPO	RATA 1	RATA 2
BERRO-LACTO		
	La superficie hepática muestra depósitos de grasa y muestra aspecto liso.	

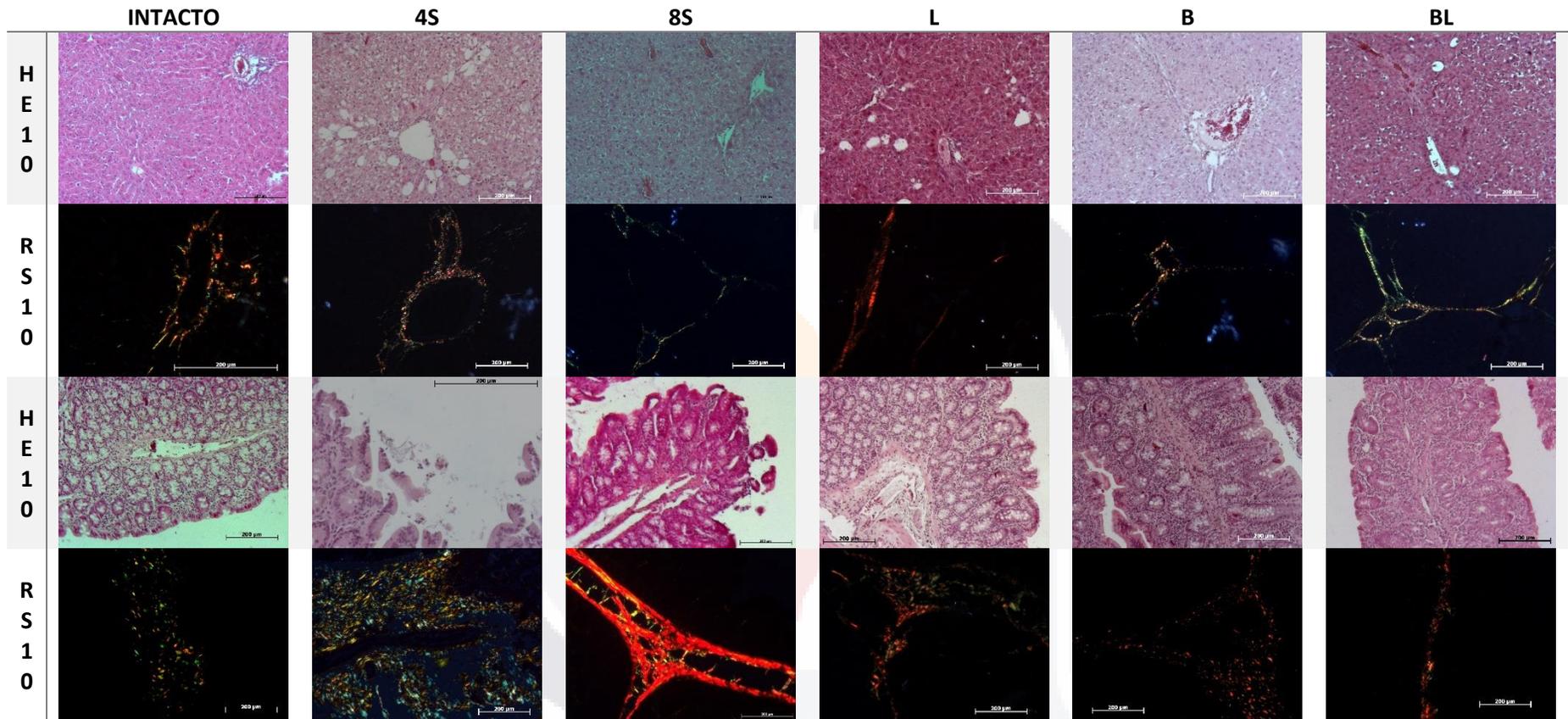
5.1.6 Análisis histopatológico

5.1.6.1 Microfotografías más representativas

Se tienen las 250 microfotografías (Anexo 9.24) de las tinciones de HE y Rojo Sirio para todas las ratas de todos los grupos.

A continuación, se presentan en la tabla 23 las diferentes microfotografías histológicas para todos los grupos, teñidas tanto con HE como con Rojo Sirio, mostrando únicamente una rata por grupo, la más representativa. Su descripción y características se muestran en la tabla 24.

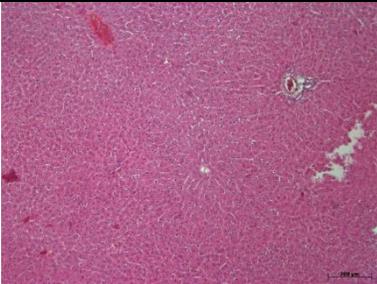
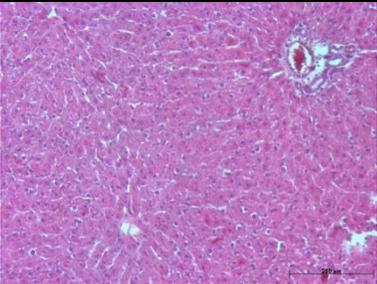
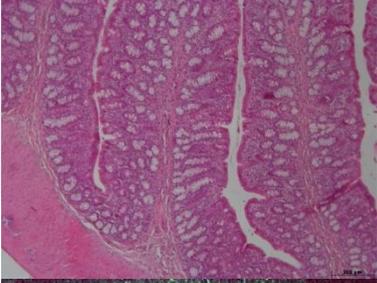
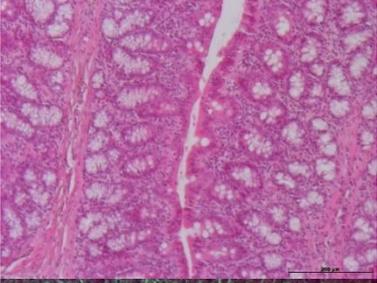
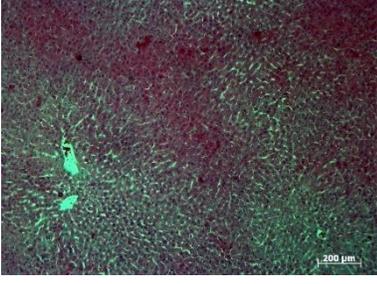
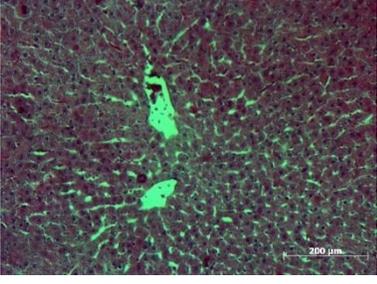
Tabla 23 Comparaciones histológicas de todos los grupos tomadas al microscopio a 10x con HE y Rojo Sirio

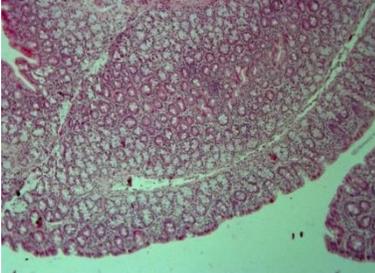
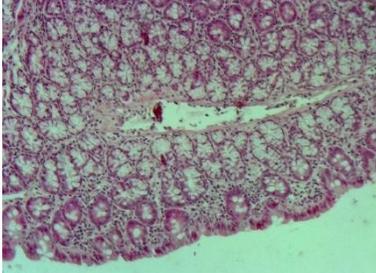
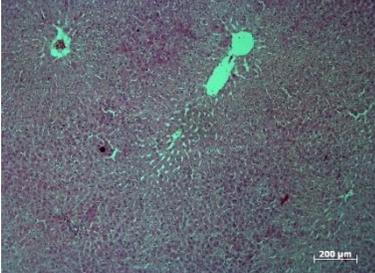
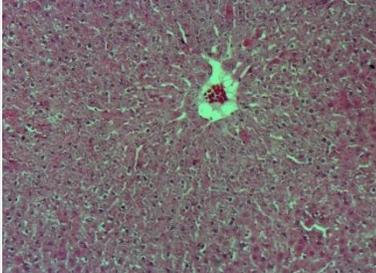
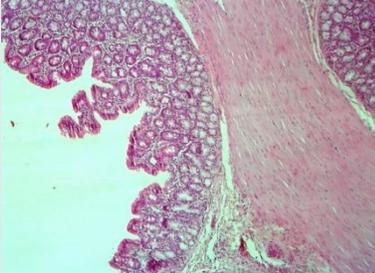
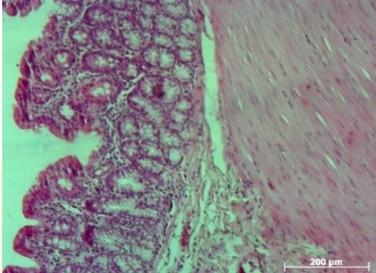
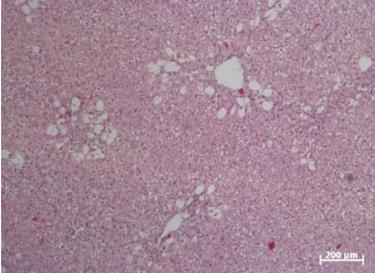
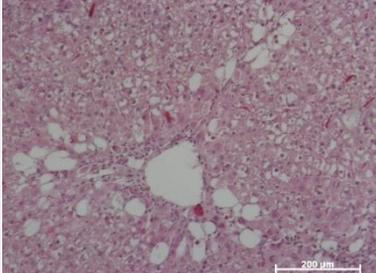
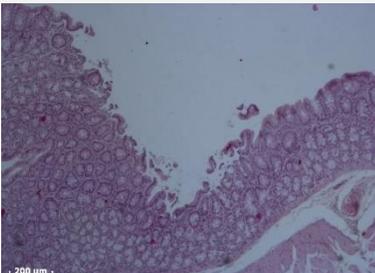
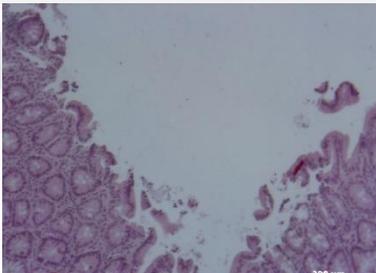


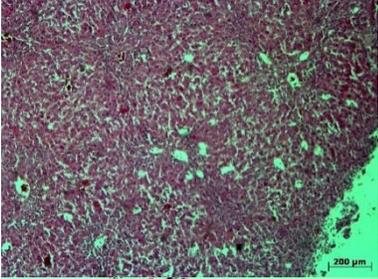
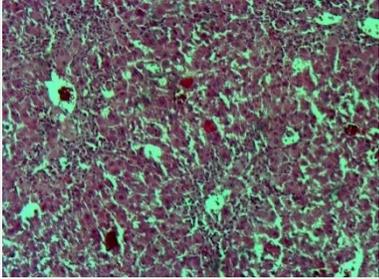
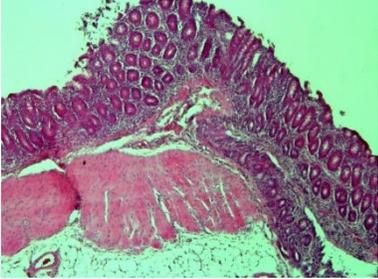
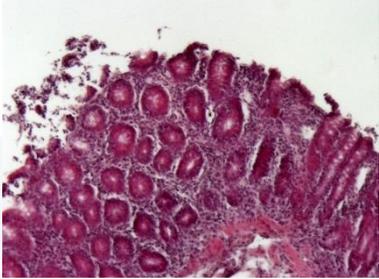
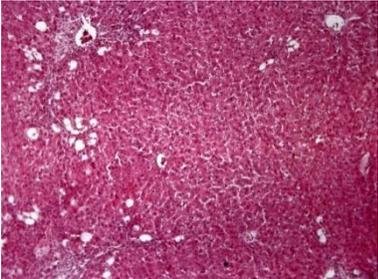
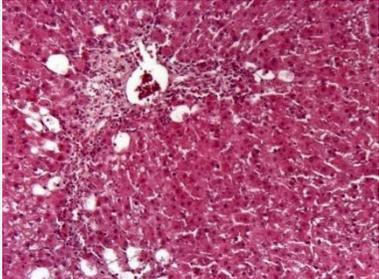
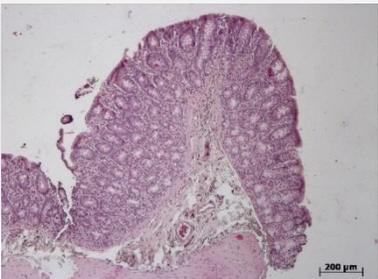
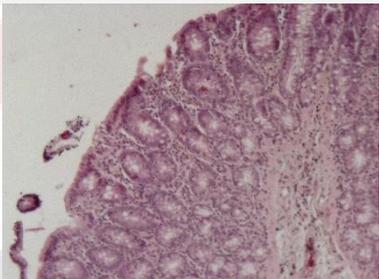
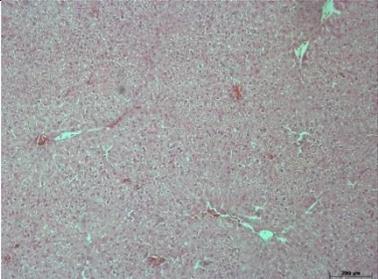
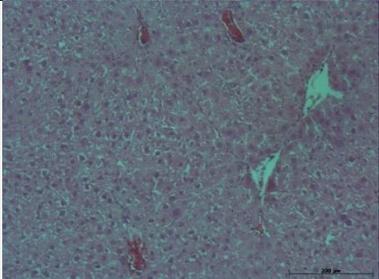
5.1.6.2 Análisis histopatológico de las laminillas teñidas con HE

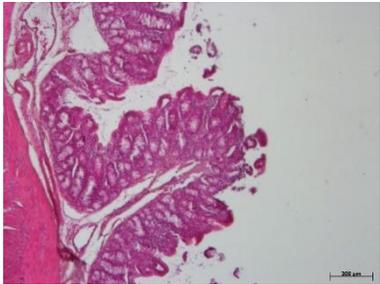
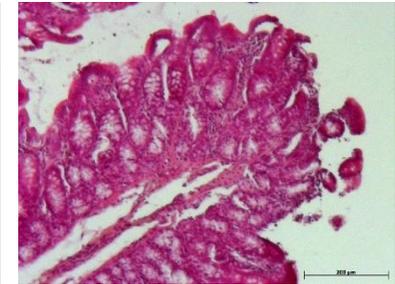
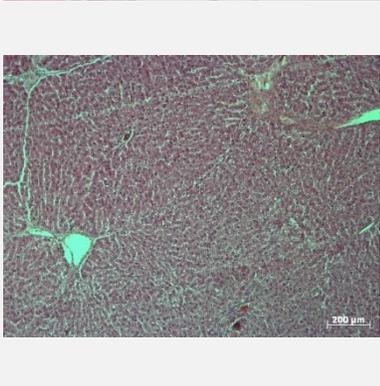
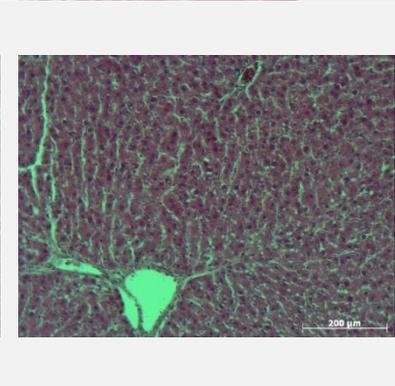
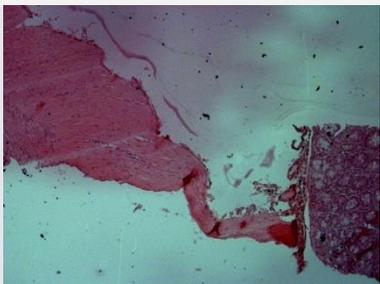
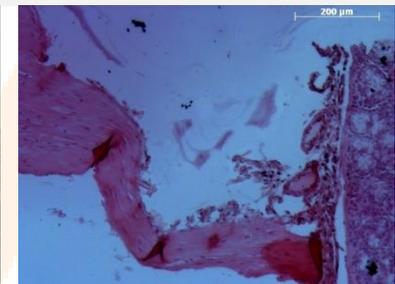
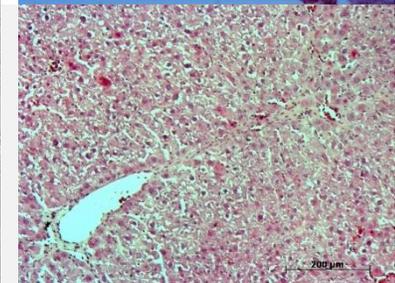
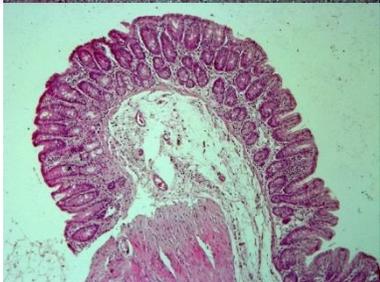
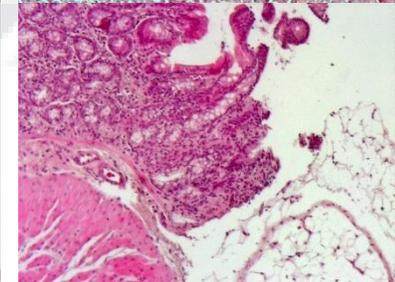
Las muestras fijadas en formalina, incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina se utilizaron para el análisis histopatológico y por ende la descripción de sus características estructurales se muestran en la tabla 24, donde podemos observar que el control negativo mostró morfología normal en hígado e intestino, los controles positivos mostraron daños histopatológicos tanto en hígado como en intestino y los grupos tratados con *Lactobacillus rhamnosus*, berro, así como su combinación, muestran regeneración de hepatocitos en comparación con los controles positivos.

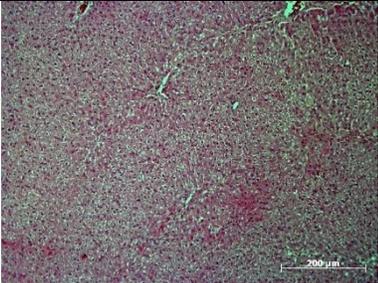
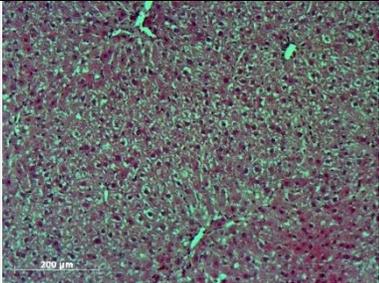
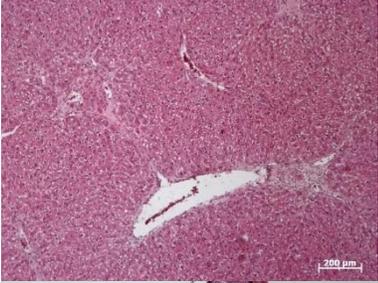
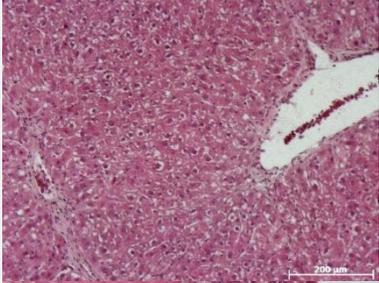
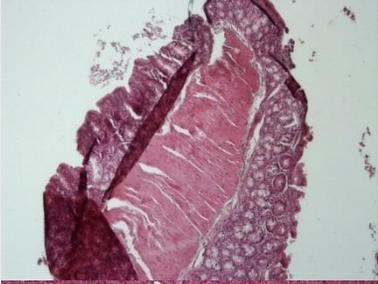
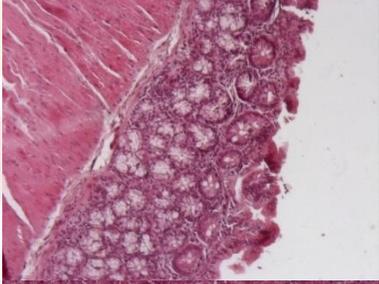
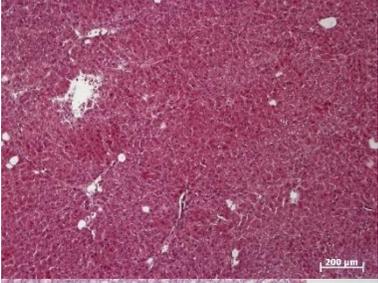
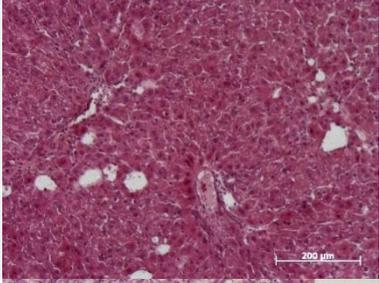
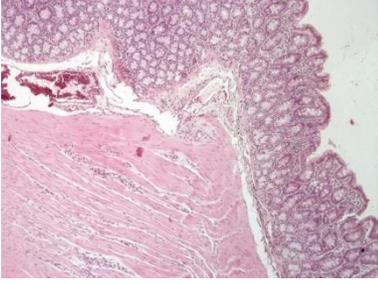
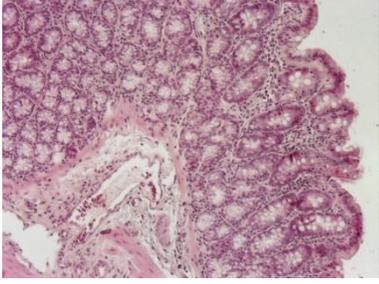
Tabla 24 Descripción morfológica de los grupos en HE

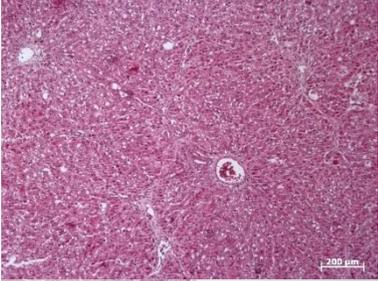
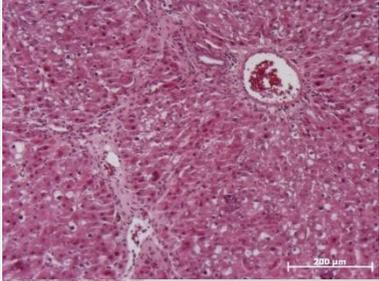
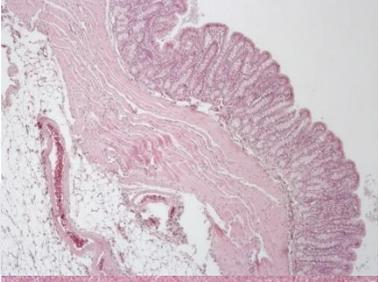
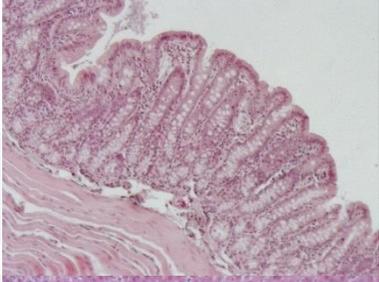
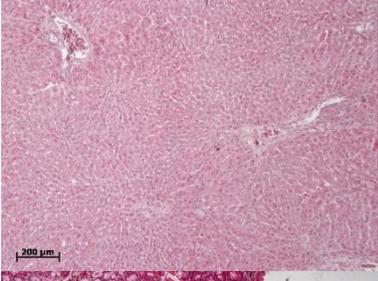
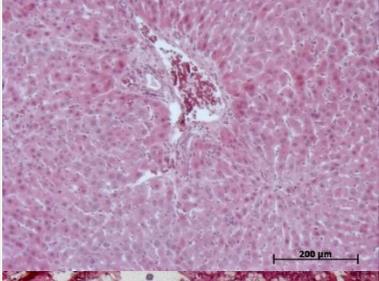
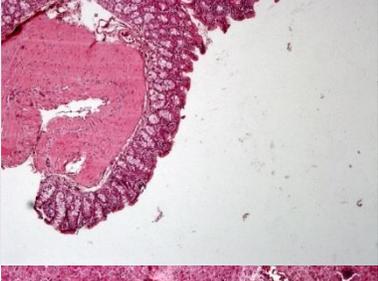
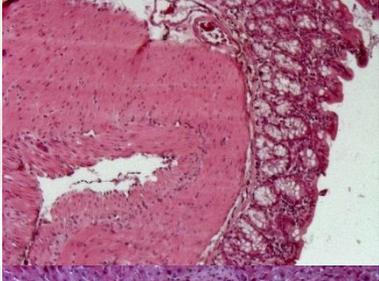
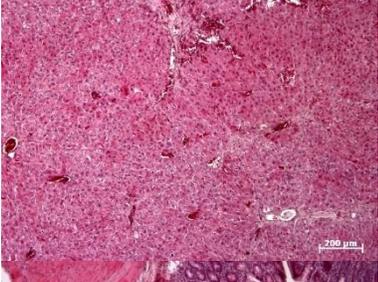
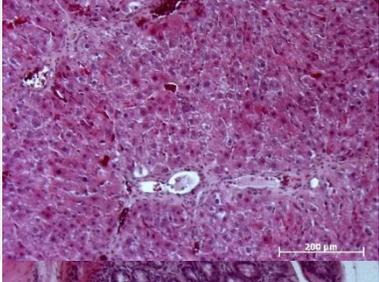
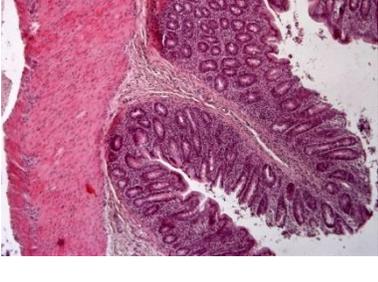
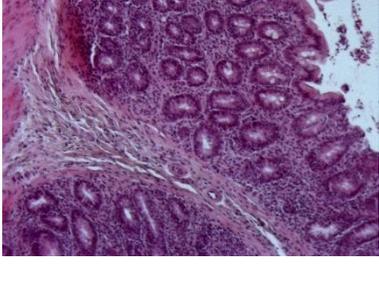
GRUPO	ÓRGANO	5X	10X	OBSERVACIONES
I1	Hígado			Normal. Sin edema. Sin esteatosis. Sin infiltrado inflamatorio.
	Intestino			Normal.
I2	Hígado			Normal. Sin edema. Sin esteatosis. Sin infiltrado inflamatorio.

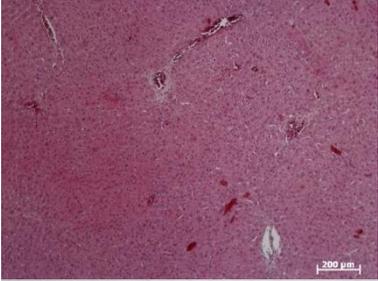
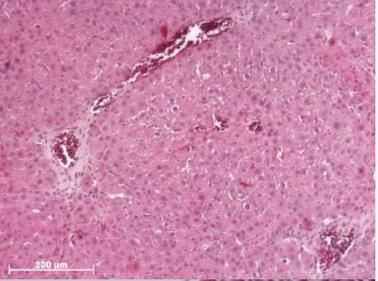
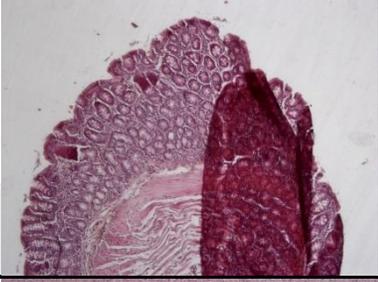
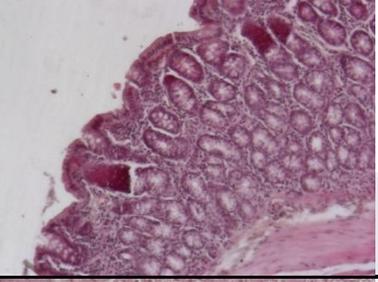
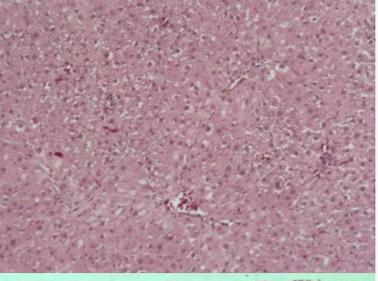
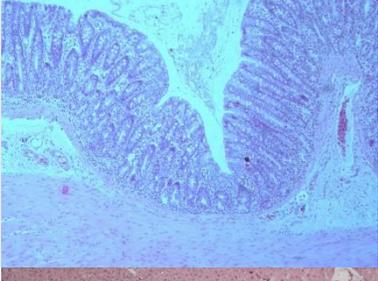
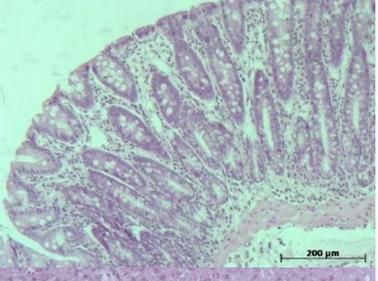
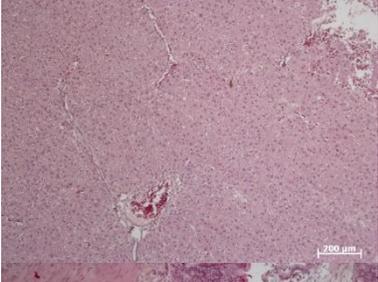
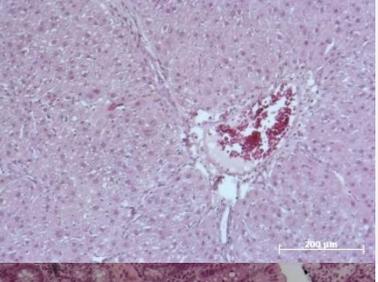
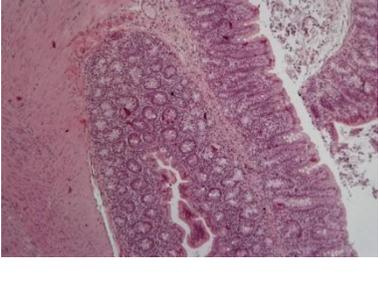
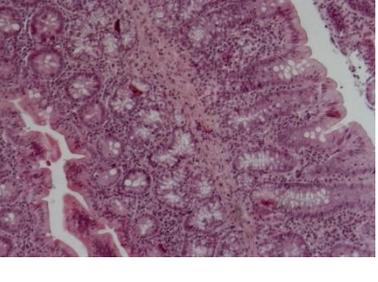
I3	Intestino			Normal.
	Hígado			Normal. Sin edema. Sin esteatosis. Sin infiltrado inflamatorio.
	Intestino			Normal.
4S1	Hígado			Esteatosis multivesicular (macro y microvesicular) Poco infiltrado inflamatorio alrededor de la vena porta Mucho edema
	Intestino			Desprendimiento epitelial. Infiltrado inflamatorio normal.

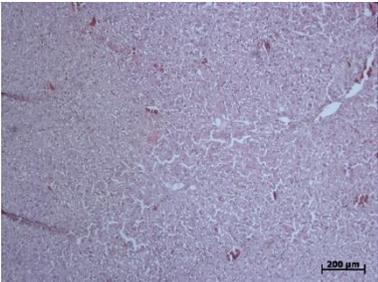
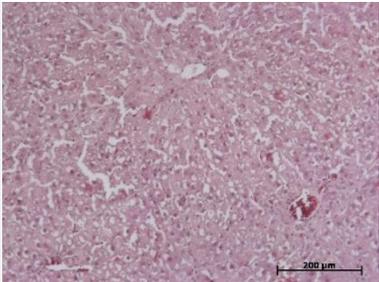
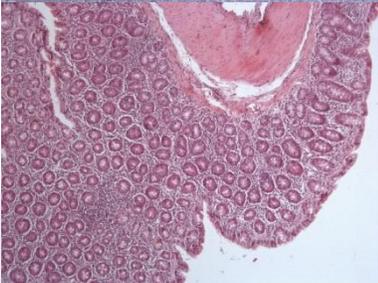
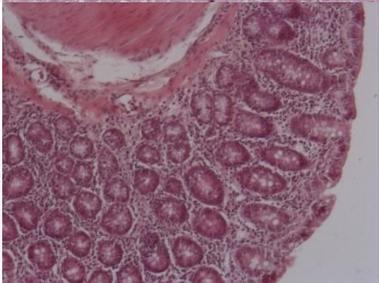
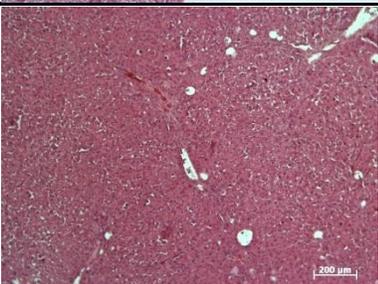
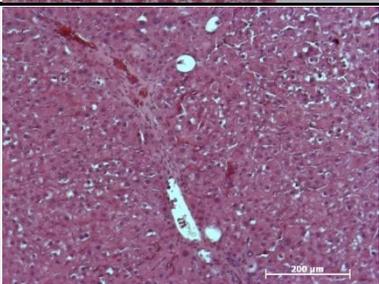
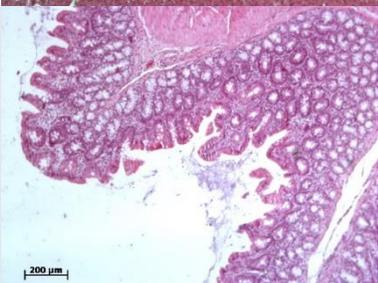
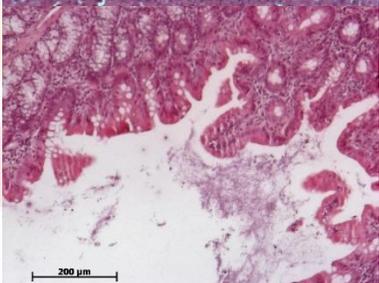
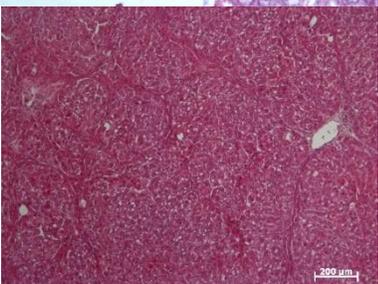
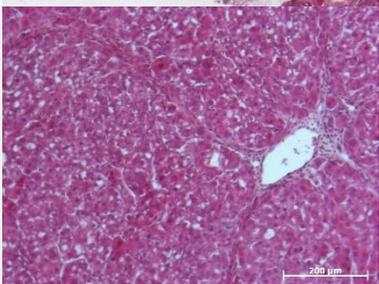
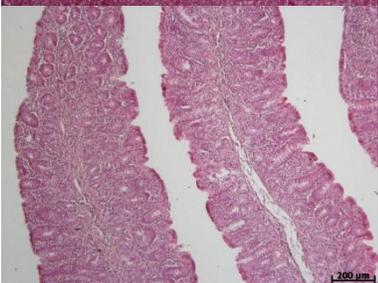
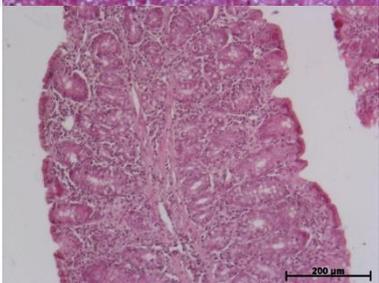
4S2	Hígado			Predomina infiltrado inflamatorio. Poca esteatosis. Fibrosis incipiente
	Intestino			Desprendimiento epitelial. Necrosis epitelial con infiltrado inflamatorio.
4S3	Hígado			Tabiques fibróticos más avanzados que el grado incipiente. Esteatosis macrovesicular. Más daño en parénquima que fibrosis. Infiltrado inflamatorio.
	Intestino			Desprendimiento epitelial ligero. No hay infiltrado inflamatorio.
C1	Hígado			Estasis vascular ligera en venas centrolobulillares. Fibrosis incipiente muy ligera. Ligero edema hepatocitario.

	Intestino			Edema de la mucosa con desprendimiento epitelial.
C2	Hígado			Fibrosis regular alrededor de la vena porta. Ligeramente edema hepatocitario. Hepatocitos en general bien. Muy ligera esteatosis. Núcleo agrandado en hepatocitos
	Intestino			Desprendimiento epitelial y daño en todas sus capas.
C3	Hígado			Ligera fibrosis. Vena porta con fibrosis. Edema hepatocitario.
	Intestino			Desprendimiento epitelial. Infiltrado inflamatorio en la parte apical de la mucosa.

L1	Hígado			No se observan caminos de fibrosis. Sin estasis sin franca fibrosis.
	Intestino			Normal, con nódulo linfático normal.
L2	Hígado			Fibrosis incipiente. Edema perinuclear. Ligera esteatosis.
	Intestino			Desprendimiento epitelial ligero
L3	Hígado			No hay lesión hepatocitaria. Esteatosis ligera.
	Intestino			Infiltrado inflamatorio en lámina propia.

L4	Hígado			Infiltrado inflamatorio en vena porta. Ligero edema hepatocitario. Ligera esteatosis.
	Intestino			Normal
L5 (NL 1)	Hígado			Hepatocitos normales. Vena porta con estasis vascular. Vaso sanguíneo y conducto normal. Fibrosis incipiente.
	Intestino			Normal.
L6 (NL 2)	Hígado			Tabiques claros de fibrosis formando nódulos. Estasis vascular. Ligero edema perinuclear.
	Intestino			Mucosa ligeramente desprendida.

L7 (NL 3)	Hígado			Tabiques de fibrosis incipiente. Infiltrado inflamatorio. Estasis vascular.
	Intestino			Normal.
B1	Hígado			Edema hepatocitario. Sin fibrosis. Estasis ligera.
	Intestino			Normal.
B2	Hígado			Estasis vascular. Fibrosis ligera en tabiques.
	Intestino			Normal

B3	Hígado			Edema hepatocitario. Escasa esteatosis.
	Intestino			Normal.
NB L1	Hígado			Fibrosis incipiente con infiltrado inflamatorio. Estasis vascular. Edema perinuclear hepatocitario. Ligera esteatosis.
	Intestino			Ligero desprendimiento epitelial.
NB L2	Hígado			Fibrosis formando nódulos. Infiltrado inflamatorio. Ligera esteatosis. Edema perinuclear hepatocitario.
	Intestino			Normal.

5.1.6.3 Características cualitativas resultantes del análisis histopatológico

El análisis de las imágenes teñidas con HE, se concentró en la tabla 25 como características cualitativas, para que su lectura fuese más rápida y comprensible:

Tabla 25 Características cualitativas de las muestras teñidas en HE

GRUPOS	VARIABLES CUALITATIVAS (HE)						
	DAÑO CELULAR 0, 1, 2, 3	ESTASIS VASCULAR SÍ/NO	HIGADO			INFILTRADO INFLAMATORIO Hígado (H) Intestino (I)	INTESTINO DESPRENDIMIENTO EPITELIAL ausente, muy ligero, ligero, Sí
			EDEMA 0, 1, 2, 3	ESTEATOSIS 0, 1, 2, 3	FIBROSIS ausente, incipiente, presente, muy ligera, engrosada, nódulos (1,2,3)		
4s1	3	NO	3	3	Presente 1	H1	SÍ
4s2	0	SÍ	0	1	Incipiente 1	H3 / I3	SÍ + necrosis epitelial
4s3	3	SÍ	0	3	Presente 1	H2	ligero
Int1	0	SÍ	0	0	Ausente	0	Ausente
Int 2	0	SÍ	0	0	Ausente	0	Ausente
Int 3	0	NO	0	0	Ausente	0	Ausente
C1		SÍ	3	1	Incipiente 1	0	SÍ + edema
C2	núcleo grande	SÍ	1	1	Presente 1	0	SÍ
C3	2	SÍ	3	0	incipiente 1	I	SÍ
L1	0	SÍ	3	0	muy ligera (no hay caminos)	0	Ausente
L2	0	SÍ	1	1	incipiente	0	Ligero

L3	0	NO	0	2	Incipiente 1	I	Ausente
L4	0	SÍ	1	1	Presente 1	H1.5	Ausente
NL1	0	SÍ	0	0	Engrosada 1	0	Ausente
NL2	0	SÍ3	1	0	Engrosada 1, nódulos 2	H 1	muy ligero
NL3	0	SÍ	1	0	Incipiente 1, engrosada 1	H1	Ausente
B1	0	SÍ	3	0	Ausente	0	Ausente
B2	0	SÍ	0	0	nódulos 1	0	Ausente
B3	0	SÍ	3	1	ausente	0	Ausente
NBL1	0	NO	3	1	nódulos 1	0	muy ligero
NBL2	0	NO	2	1	presente 3	0	Ausente

Con 0 siendo el valor nulo, y aumentando hasta 3 como el valor máximo.

A continuación, se presentan los resultados en alineación a los objetivos específicos (sección 3.2), analizando primero el efecto antifibrótico del extracto de berro (5.2), *Lactobacillus rhamnosus* silvestres (5.3) y por último de la combinación del extracto de berro y de *Lactobacillus rhamnosus* silvestres (5.4).

5.2 Extracto de berro

5.2.1 Pesos de los hígados (Berro)

Al momento de realizar la cirugía de las ratas sacrificadas y una vez retirado el hígado quirúrgicamente, se pesó antes de proceder a su disección.

Los pesos de los hígados (media \pm SEM) para los controles positivo, negativos y Berro van desde los 11.3 \pm 0.3g (grupo intacto) hasta los 12.8 \pm 0.6g (grupo control positivo de las 8S), sin embargo, todos los pesos de los hígados para los grupos son estadísticamente iguales, como se muestra en los gráficos de barra de la figura 2:

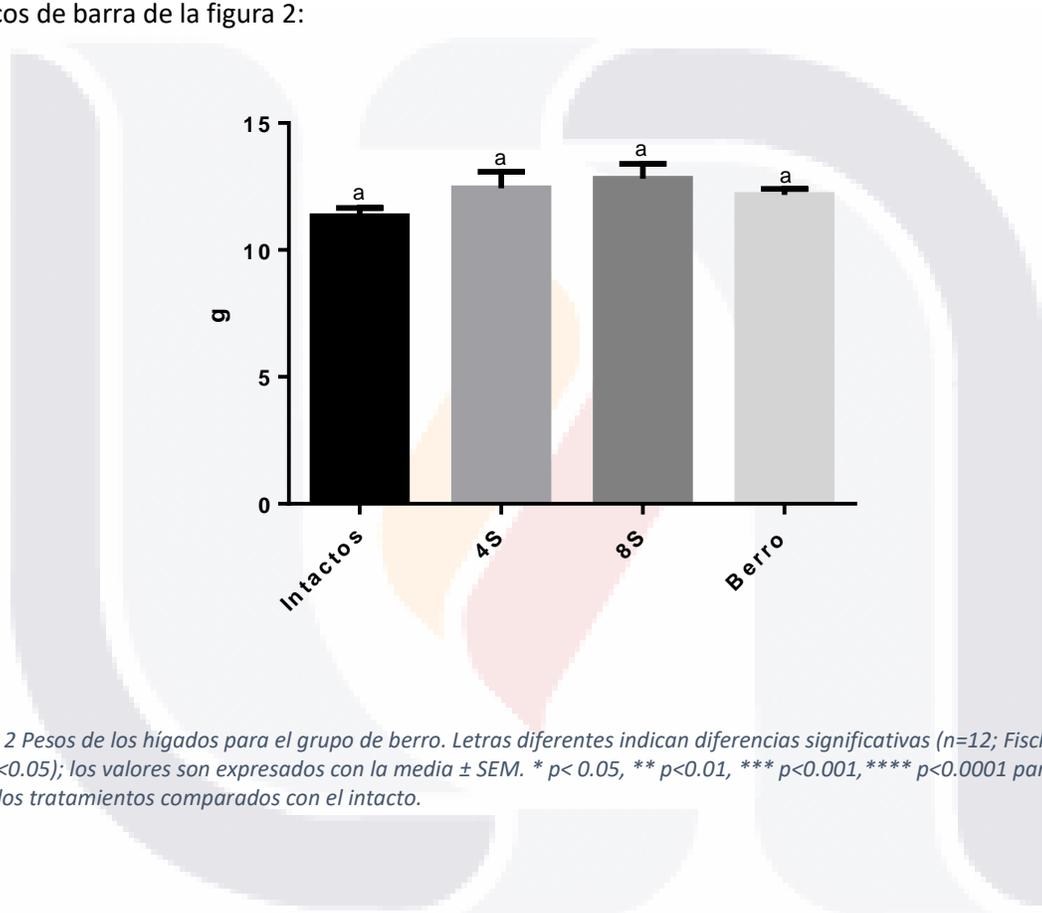


Figura 2 Pesos de los hígados para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.2 Perfil hepático (Berro)

En la tabla 27, se muestran los resultados obtenidos del perfil hepático para ALT, AST, Urea, albúmina y fosfatasa alcalina.

Tabla 26 Perfil hepático (Berro)

GRUPO	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea (mg/dL)	Albúmina (mg/dL)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
Intacto	3	30 ± 1.16	131.3 ± 8.97	38.00 ± 3.22	2.73 ± 0.03	249.7 ± 6.94
Control positivo 4S	3	822.0 ± 108.00	961.0 ± 73.80	39.67 ± 3.18	3.20 ± 0.21	474.3 ± 54.67
Control positivo 8S	3	52 ± 5.51	214.3 ± 43.32	45.00 ± 2.31	2.93 ± 0.09	314.7 ± 42.31
Berro	3	117.3 ± 57.94	269.0 ± 69.51	46.33 ± 2.73	2.73 ± 0.09	280.7 ± 35.73

Los valores están expresados en la media ± SEM

5.2.2.1 ALT (Berro)

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos para los niveles séricos de ALT, donde se observa que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media ± SEM) más elevados de ALT, siendo estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia (p<0.0001) con respecto al intacto. Mientras que los demás grupos son estadísticamente iguales.

El grupo intacto tuvo valores (media ± SEM) de 30 ± 1.16 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 822.0 ± 108.00 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 52 ± 5.51 (U/L) y el tratamiento con Berro mostró valores de 117.3 ± 57.94 (U/L). Los niveles de ALT para el grupo intacto y el de berro se comportan de manera similar.

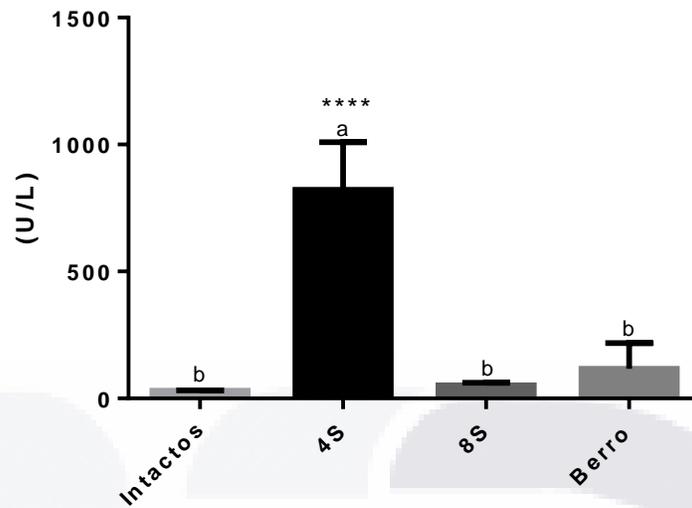


Figura 3 ALT para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=12$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.2.2 AST (Berro)

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos para los niveles séricos de AST, donde se observa que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de AST, siendo estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p<0.0001$) con respecto al intacto. Mientras que los demás grupos son estadísticamente iguales ($p<0.05$).

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de 131.3 ± 8.97 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 961.0 ± 73.80 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 214.3 ± 43.32 (U/L) y el tratamiento con Berro mostró valores de 46.33 ± 2.73 (U/L). Los niveles de AST para el grupo intacto y el de berro se comportan de manera similar.

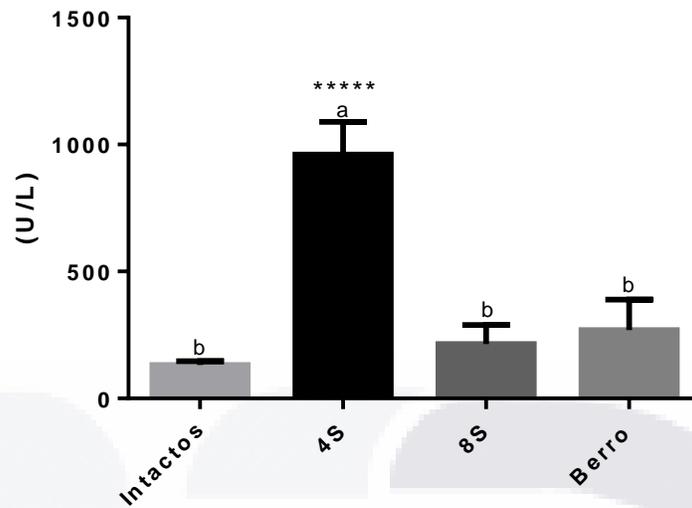


Figura 4 AST para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.2.3 Urea (Berro)

En la figura 5 se muestran la gráfica con los niveles séricos de urea, la cual es una forma de desintoxicación específica del hígado, a través de la cual el amonio que es tóxico es convertido en urea mediante el hígado para perder toxicidad y excretarlo en la orina.

Podemos observar que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de urea de 38.00 ± 3.22 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 39.67 ± 3.18 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 45.00 ± 2.31 (mg/dL) y el grupo de berro de 46.33 ± 2.73 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de urea normales y estadísticamente iguales.

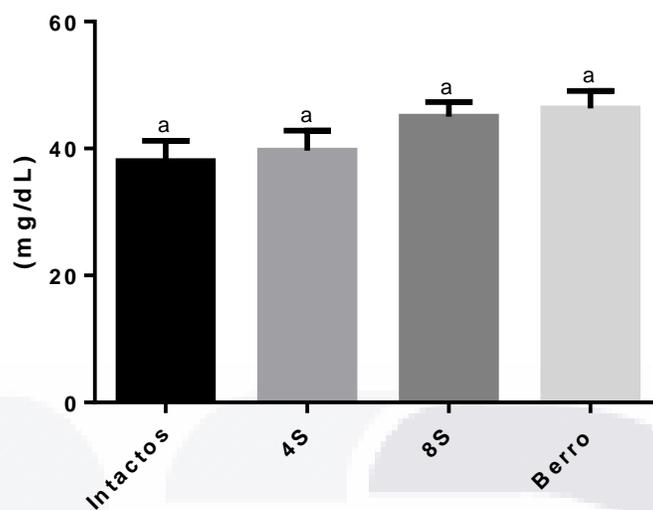


Figura 5 Urea para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=12$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.2.4 Albumina (Berro)

En la figura 6 se muestran la gráfica con los niveles séricos de albumina, la cual es producida exclusivamente por los hepatocitos, por lo tanto, es un reflejo de la función de síntesis hepática.

Se observa que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de albumina de 2.73 ± 0.03 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 3.20 ± 0.21 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 2.93 ± 0.09 (mg/dL) y el grupo de berro de 2.73 ± 0.09 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de albumina estadísticamente iguales.

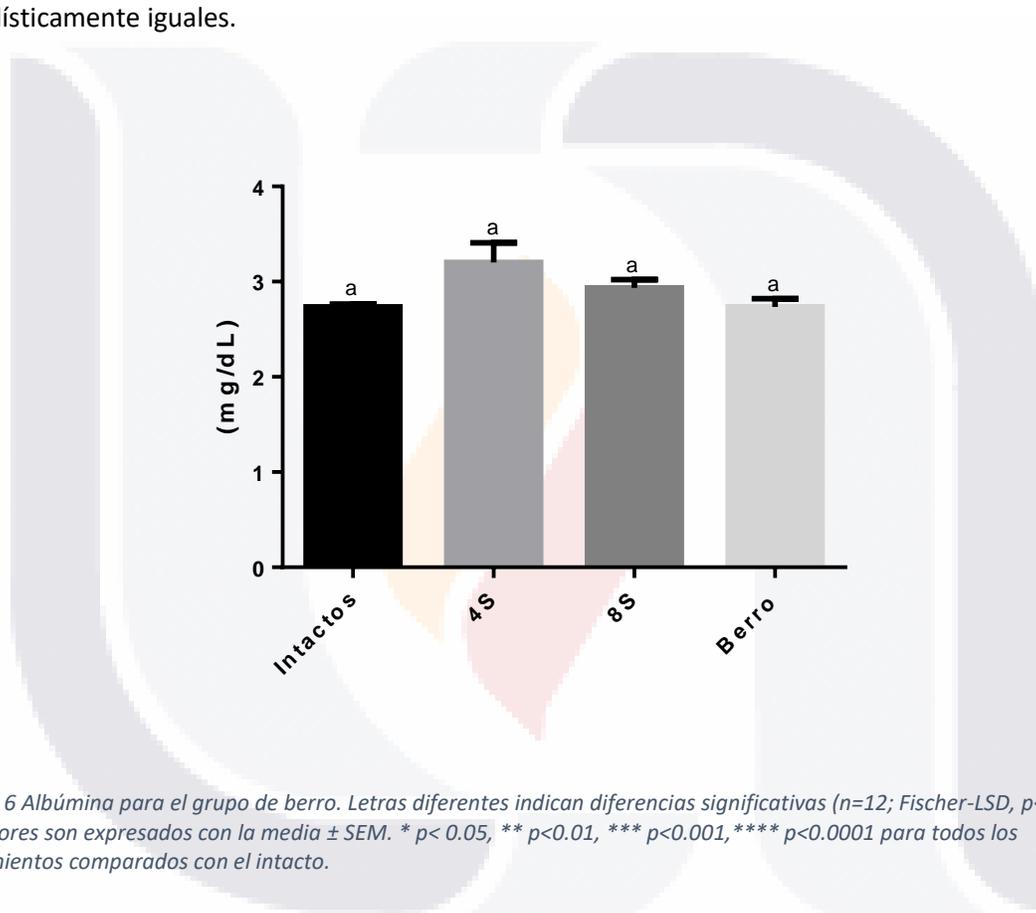


Figura 6 Albúmina para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=12$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.2.5 Fosfatasa alcalina (Berro)

En la figura 7 se muestran la gráfica con los niveles séricos de fosfatasa alcalina, los cuales se ven elevados en enfermedades hepáticas.

Se puede observar que el grupo intacto tuvo valores (media ± SEM) de fosfatasa alcalina de 249.7 ± 6.94 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 474.3 ± 54.67 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 314.7 ± 42.31 (U/L) y el grupo de berro de 280.7 ± 35.73 (U/L). Todos los grupos muestran niveles de fosfatasa alcalina estadísticamente iguales.

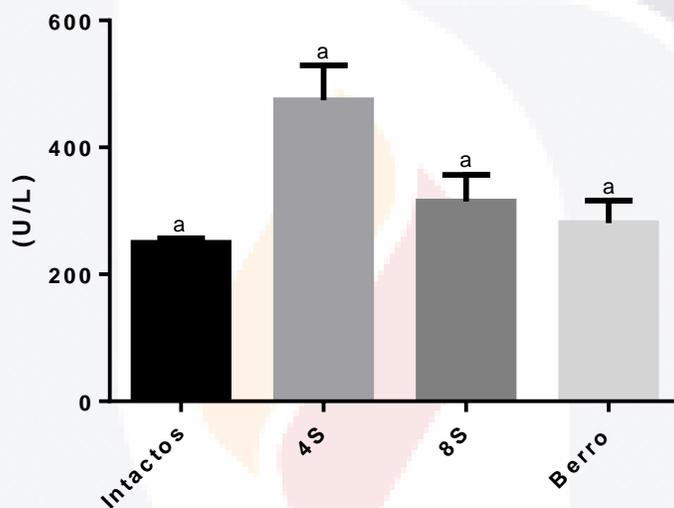


Figura 7 Fosfatasa alcalina para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.3 Análisis morfométrico (Berro)

Se realizó un análisis morfométrico de las imágenes obtenidas en el microscopio invertido, de las muestras teñidas con Rojo Sirio, obteniendo los porcentajes de colágena total, colágena tipo I y colágena tipo III, para hígado e intestino.

5.2.3.1 Porcentaje de colágena total (Berro)

El porcentaje de colágena total en hígado para el grupo intacto fue de 0.27 ± 0.05 % y para el intestino fue de 1.8 ± 1.6 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.98 ± 0.36 % en hígado y para el intestino fue de 4.33 ± 1.62 %; mientras que en el grupo control positivo

de la octava semana (8S) en hígado fue de $1.79 \pm 0.67 \%$ y para el intestino fue de $2.99 \pm 1.52 \%$; para el grupo de berro en hígado fue de $1.05 \pm 0.32 \%$ y para el intestino fue de $2.38 \pm 0.65\%$. Todos los grupos son estadísticamente iguales tanto para la colágena total en hígado como en intestino como se muestra en la gráfica de la figura 8 para hígado y figura 9 para intestino.

Gráfico de porcentaje de colágena total (Berro) en hígado

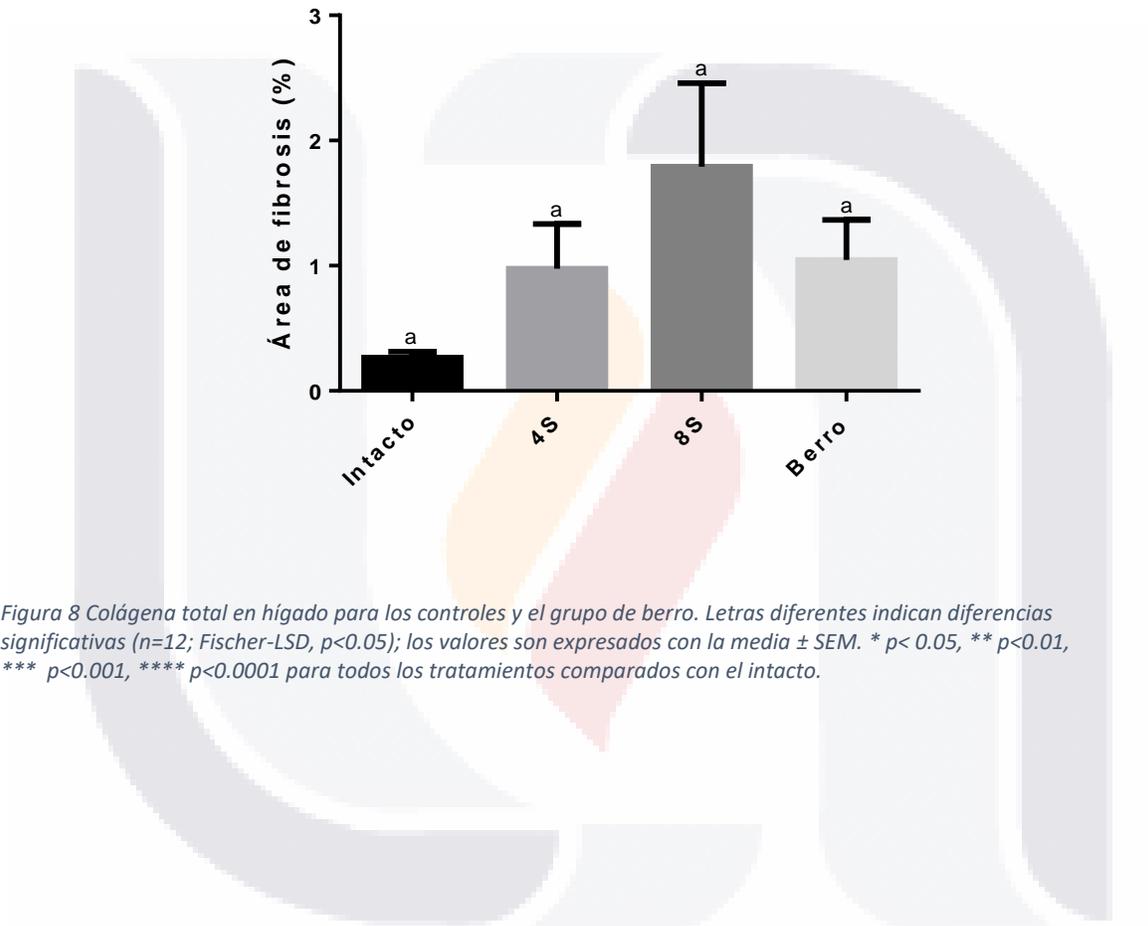


Figura 8 Colágena total en hígado para los controles y el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=12$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena total (Berro) en intestino

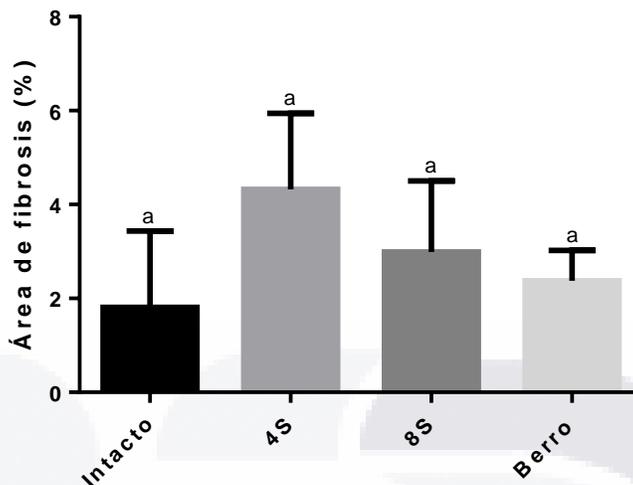


Figura 9 Colágena total en intestino para los controles y el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=12$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.3.2 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino (Berro)

El porcentaje de colágena tipo I (media \pm SEM) en hígado para el grupo intacto fue de $1.72 \pm 0.99\%$ y para el intestino fue de $20.54 \pm 8.57\%$; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de $2.59 \pm 0.77\%$ en hígado y para el intestino fue de $19.21 \pm 5.91\%$; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de $7.32 \pm 1.72\%$ y para el intestino fue de $12.77 \pm 5.49\%$; para el grupo de berro en hígado fue de $3.81 \pm 0.34\%$ y para el intestino fue de $14.23 \pm 4.62\%$. Todos los grupos son estadísticamente iguales para la colágena tipo I en intestino como se muestra en la figura 11, en cambio, para la colágena tipo I en hígado, los grupos intacto, 4S y berro son estadísticamente iguales ($p<0.05$) y el control positivo de las ocho semanas (8S) es el único estadísticamente diferente a los demás grupos ($p<0.05$), y difiere del grupo intacto ($p<0.01$), como se muestra en la gráfica de la figura 10.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo I en hígado (Berro)

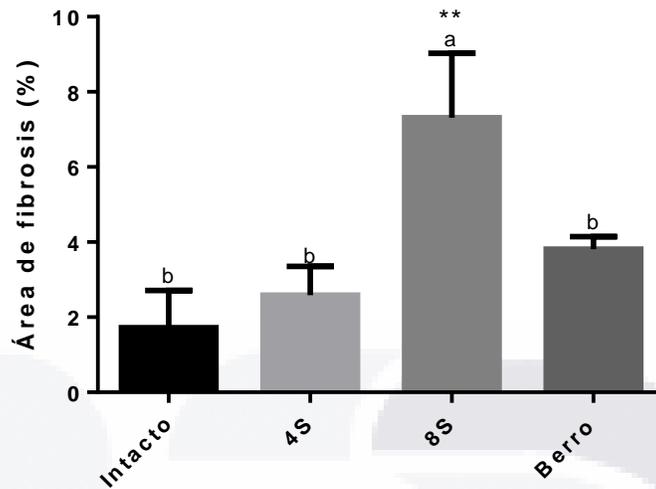


Figura 10 Colágena tipo I en hígado para los controles y el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo I en intestino (Berro)

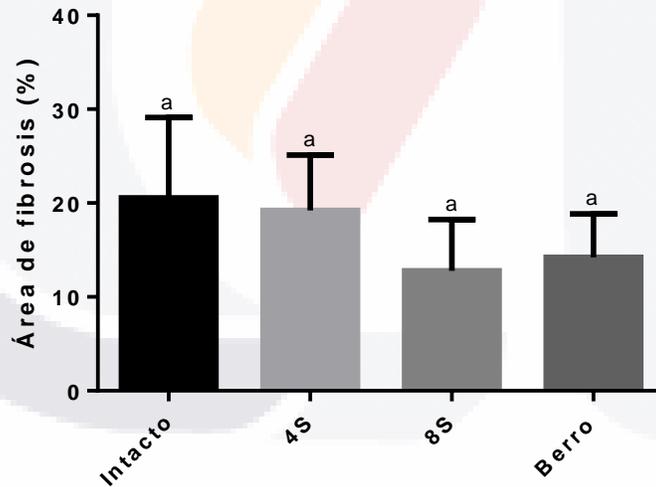


Figura 11 Colágena tipo I en intestino para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.3.3 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino (Berro)

El porcentaje de colágena tipo III está asociada más bien a la protección del hospedero y como herramienta para la curación de heridas que al daño hepático. Se observa que el porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo III en hígado para el grupo intacto fue de 2.46 ± 1.94 % y para el intestino fue de 22.18 ± 9.05 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.65 ± 0.60 % en hígado y para el intestino fue de 22.49 ± 4.37 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 3.70 ± 0.92 % y para el intestino fue de 13.41 ± 1.70 %; para el grupo de berro en hígado fue de 2.68 ± 0.422 % y para el intestino fue de 17.28 ± 3.11 %.

Todos los grupos son estadísticamente iguales para la colágena tipo III en hígado como se muestra en la figura 12 y en intestino como se muestra en la figura 13.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo III en hígado (Berro)

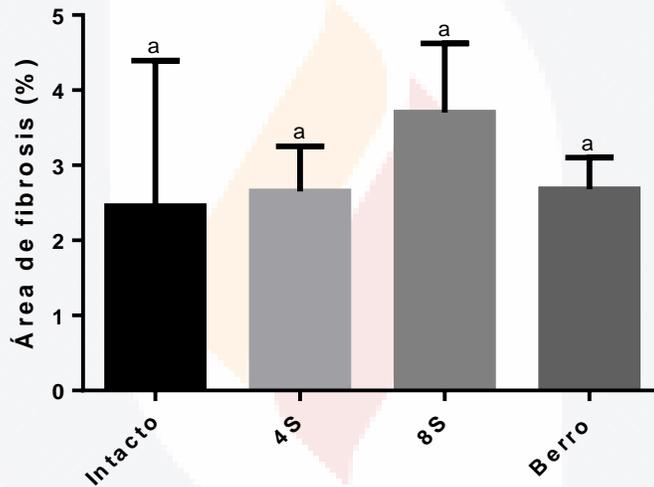


Figura 12 Colágena tipo III en hígado para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo III en intestino (Berro)

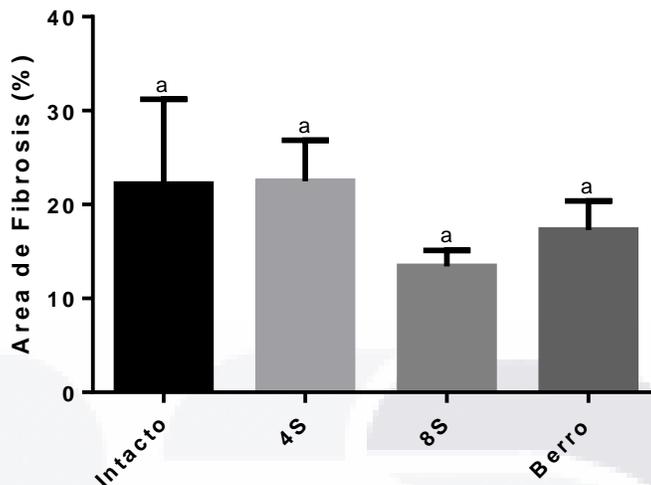


Figura 13 Colágena tipo III en intestino para el grupo de berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.4 Análisis genético con qPCR (Berro)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis genético mediante qPCR, en hígado se obtuvieron los valores de expresión de IL-1, IL-10 y colágena, mientras que en intestino se obtuvo la expresión de la IL-10.

5.2.4.1 IL-1 en hígado

La expresión de IL-1, que es una citocina proinflamatoria, tuvo mayor expresión en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado con respecto a los demás, y la que menor expresión tuvo de IL-1 fue el grupo intacto.

Se observa que la expresión de IL-1 en hígado (media ± SEM) para el grupo intacto fue de 0.821 ± 0.096; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 3.573 ± 0.198; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 12.53 ± 1.342; para el grupo de berro fue de 5.676 ± 0.33.

Todos los grupos son estadísticamente diferentes para la IL-1 en hígado. El grupo de mayor expresión de IL-1 fue el control positivo de las ocho semanas, seguido del tratamiento con berro, control positivo de las cuatro semanas, y el grupo intacto que fue el de menor expresión, como se muestra en la figura 14.

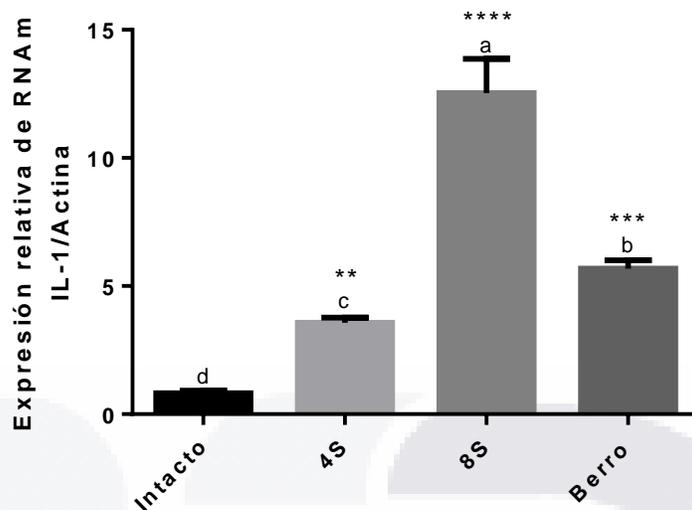


Figura 14 Expresión de IL-1 en hígado para Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.4.2 IL-10 en hígado

La expresión de IL-10, que es una citocina antiinflamatoria, tuvo mayor expresión en el grupo tratado con berro, los controles positivos y negativo son estadísticamente iguales, como se muestra en la figura 15.

Se observa que la expresión de IL-10 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.87 ± 0.13 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.41 ± 0.07 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.98 ± 0.12 y para el grupo de berro fue de 24.87 ± 2.41 .

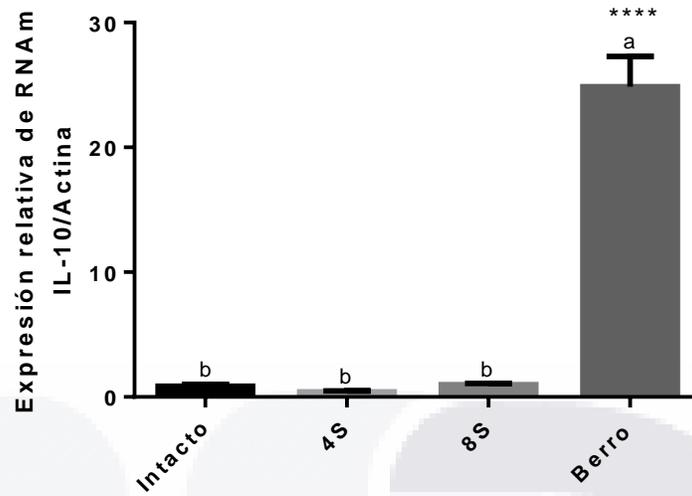


Figura 15 Expresión de IL-10 en hígado para Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.4.3 Colágena en hígado

La expresión de colágena en hígado tuvo mayor expresión en los grupos de control positivo, de las cuatro y de las ocho semanas, estadísticamente iguales, comparados contra el grupo intacto y de berro que fueron iguales presentando los menores valores, como se muestra en la figura 16.

Se observa que la expresión de colágena en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.05 ± 0.06 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 4.06 ± 0.31 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 3.70 ± 0.28 y para el grupo de berro fue de 1.36 ± 0.20 .

La expresión de colágena en hígado, para el grupo Intacto es de (1.05 ± 0.06) , siendo diferente ($p < 0.05$) a los grupos control positivo (de las cuatro semanas y de las ocho semanas), e igual al grupo de berro, siendo el berro y el intacto los grupos con los valores más bajos de colágena.

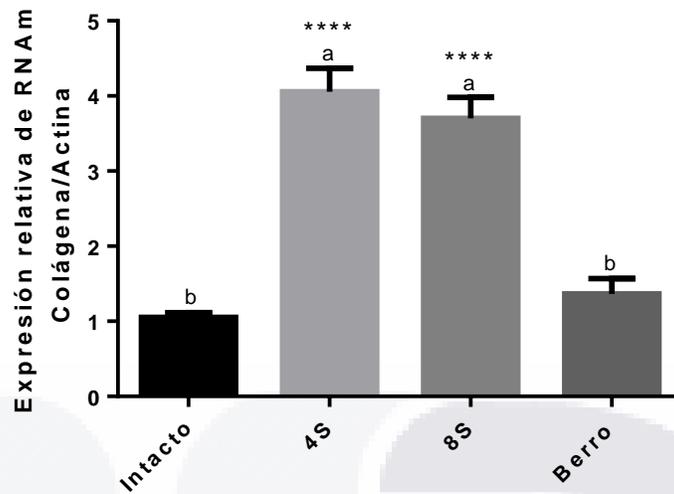


Figura 16 Expresión de colágeno en hígado para Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.4.4 IL-10 en intestino

La citocina antiinflamatoria IL-10 en colon, es producida por macrófagos activados y otras células (Morhardt et al., 2019; Schreiber, 1997), su expresión en colon fue mayor para el grupo intacto y el grupo de berro, y menor para el control positivo de las cuatro semanas como se muestra en la figura 17.

Se observa que la expresión de IL-10 en intestino (media ± SEM) para el grupo intacto fue de 1.06 ± 0.08; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.38 ± 0.00; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.40 ± 0.07 y para el grupo de berro fue de 0.90 ± 0.09.

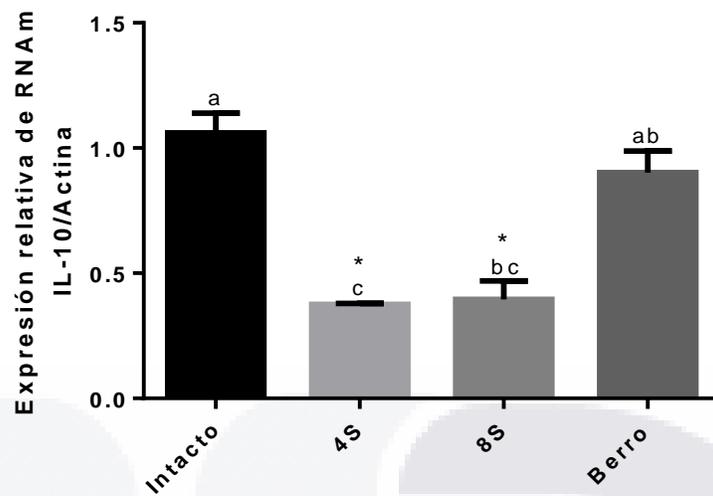


Figura 17 Expresión de IL-10 en intestino para Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=12; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.2.5 Pesos semanales de las ratas vivas (Berro)

El peso de las ratas (Anexo: 9.22) fue medido cada semana, siempre el mismo día (jueves) a la misma hora (8pm).

El comportamiento de los controles y del extracto de berro se observa en la tabla 32:

Tabla 27 Pesos semanales de las ratas control y tratamiento de Berro

GRUPO	PESO PROMEDIO (g)							
	SEMANA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Intacto	135.5±0	174.3±	201.7±	228.6±	248.9±	261.9±13	275.4±14	291.8±
	.0	4.85	7.67	8.56	12.05	.67	.76	14.56
n	3	3	3	3	3	3	3	3
Control positivo 4S	189.7±1	228±8.	242.5±	390.5±	-	-	-	-
	2.37	31	2.78	3.22				
n	4	3	3	3	-	-	-	-
Control positivo 8S	123.3±2	161.8±	188.0±	204.9±	220.8±	233.0±7.	241.5±10	252.1 ±
	.65	1.93	3.71	4.91	5.24	05	.78	13.01
n	5	5	4	4	5	4	3	3
Berro	169.7±2	186.5±	207.9±	214.6±	215.0±	233.1±7.	239.2±8.	243.1±
	.396	3.027	1.901	6.728	8.847	259	323	6.993
n	4	4	4	4	3	3	3	3

TODOS	153.8 ± 7.21	184.1 ± 6.57	208.3 ± 5.68	252.5 ± 20.3	226.9 ± 5.99	241.7 ± 6.48	252.0 ± 8.24	262.3 ± 9.58
N	16	15	14	14	11	10	9	9

Los valores son expresados con la media ± su error estándar de la media (S.E.M)

5.2.5.1 Pesos de las ratas vivas con Berro

Para la semana 1 se observa que todos los grupos son estadísticamente diferentes, como lo muestra la figura 18.

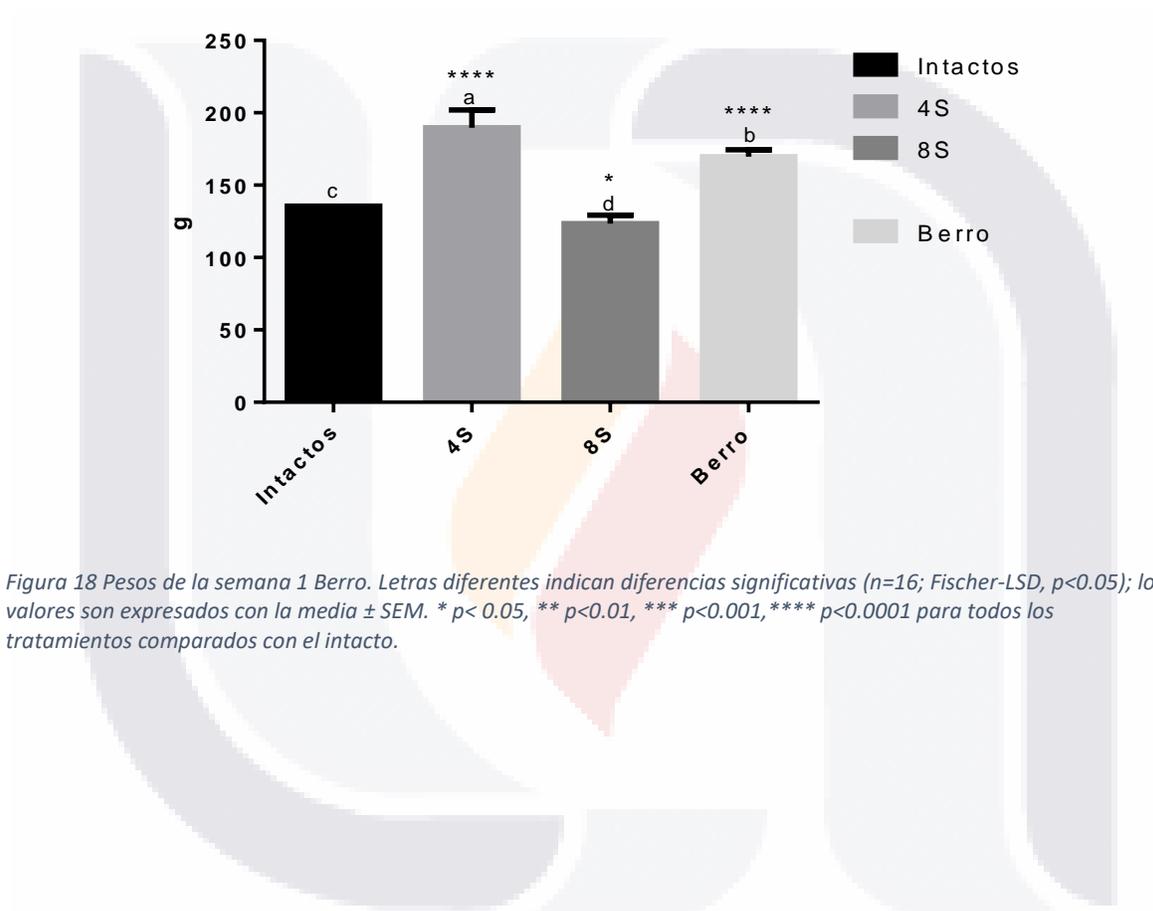


Figura 18 Pesos de la semana 1 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 2 se observa que todos los grupos son estadísticamente diferentes, como lo muestra la figura 19.

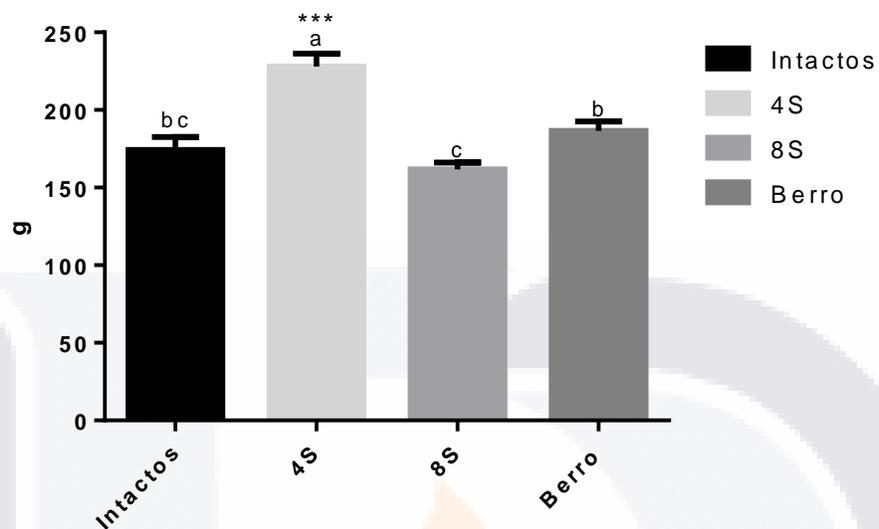


Figura 19 Pesos de la semana 2 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=15; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 3 se observa que todos los grupos son diferentes, como lo muestra la figura 20.

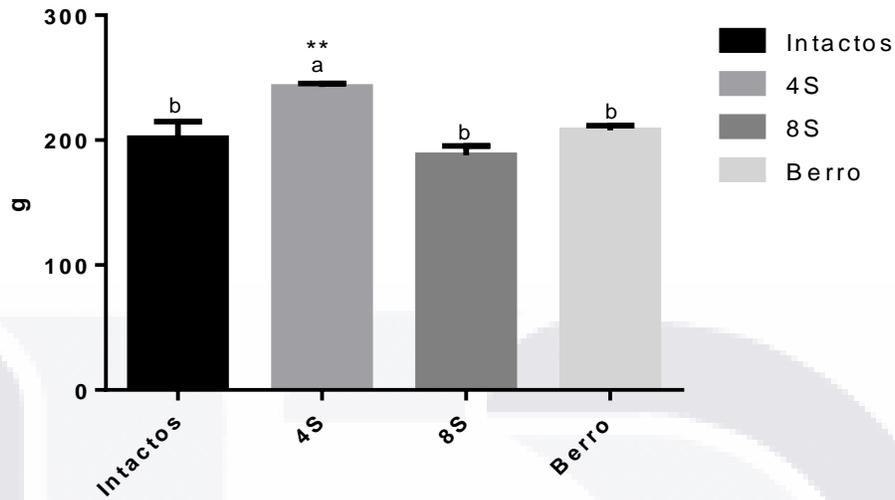


Figura 20 Pesos de la semana 3 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=14; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 4 no se observan diferencias entre los grupos, como lo muestra la figura 21.

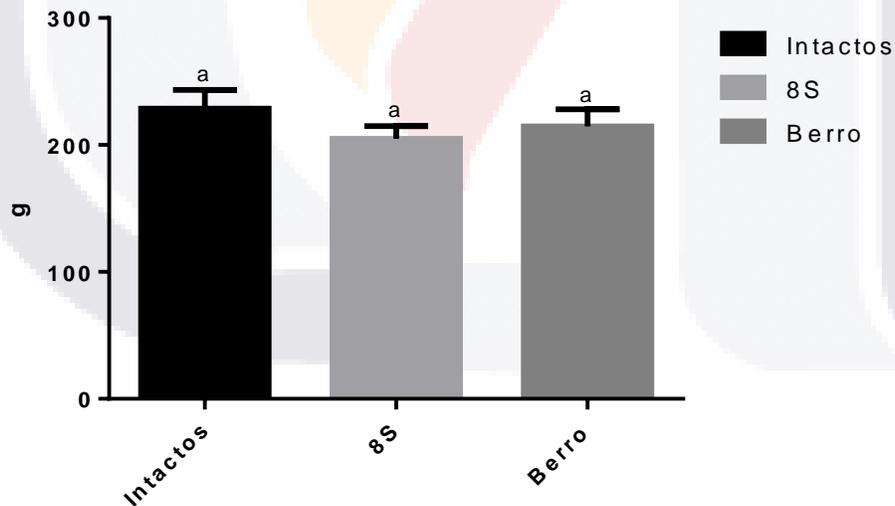


Figura 21 Pesos de la semana 4 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 5 no se observan diferencias entre los grupos, como lo muestra la figura 22.

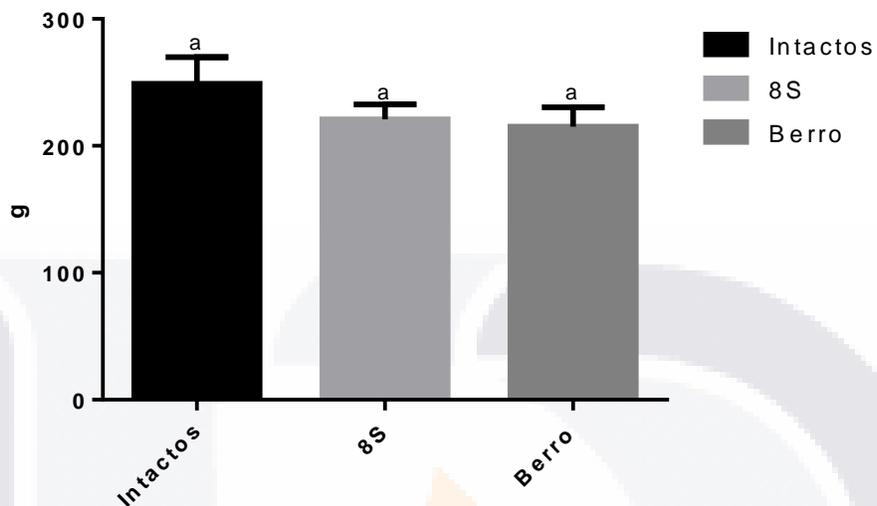


Figura 22 Pesos de la semana 5 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 6 no se observan diferencias entre los grupos, como lo muestra la figura 23.

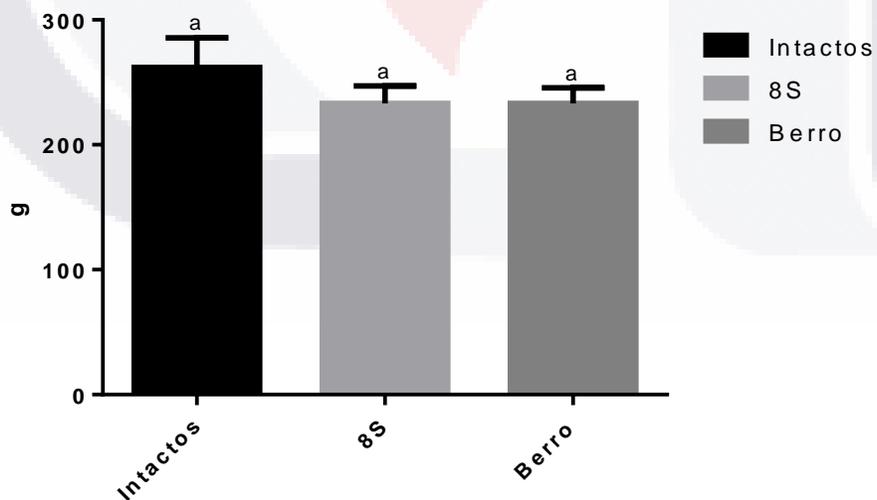


Figura 23 Pesos de la semana 6 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=10; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 7 no se observan diferencias entre los grupos, como lo muestra la figura 24.

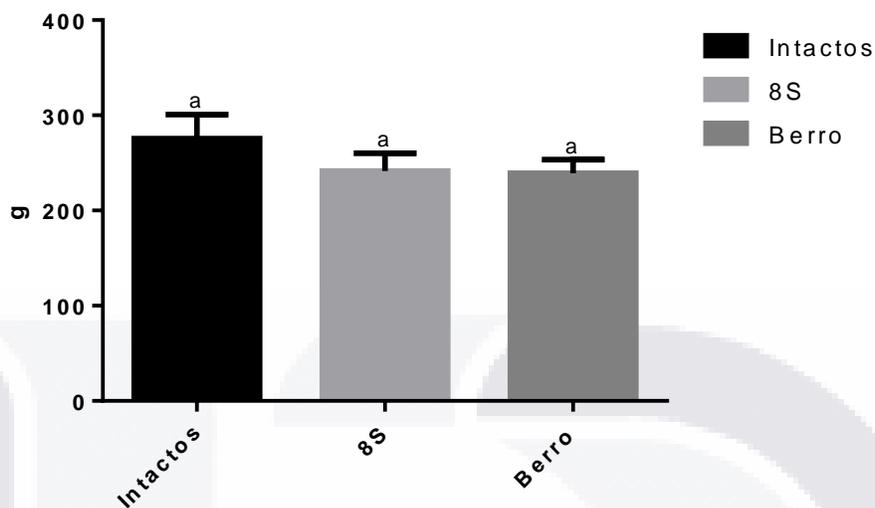


Figura 24 Pesos de la semana 7 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=9; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 8 se observan diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 25.

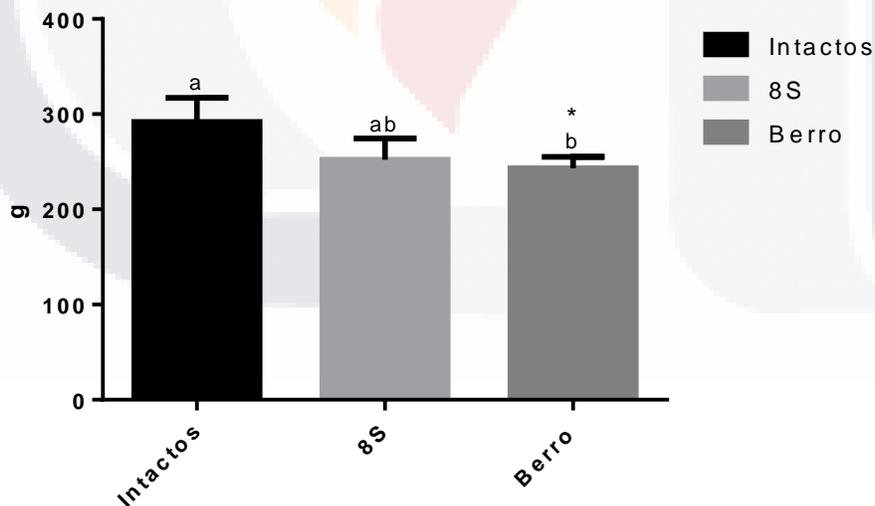


Figura 25 Pesos de la semana 8 Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=9; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

A continuación, se muestran en la figura 26 los gráficos de todas las semanas en una sola vista:

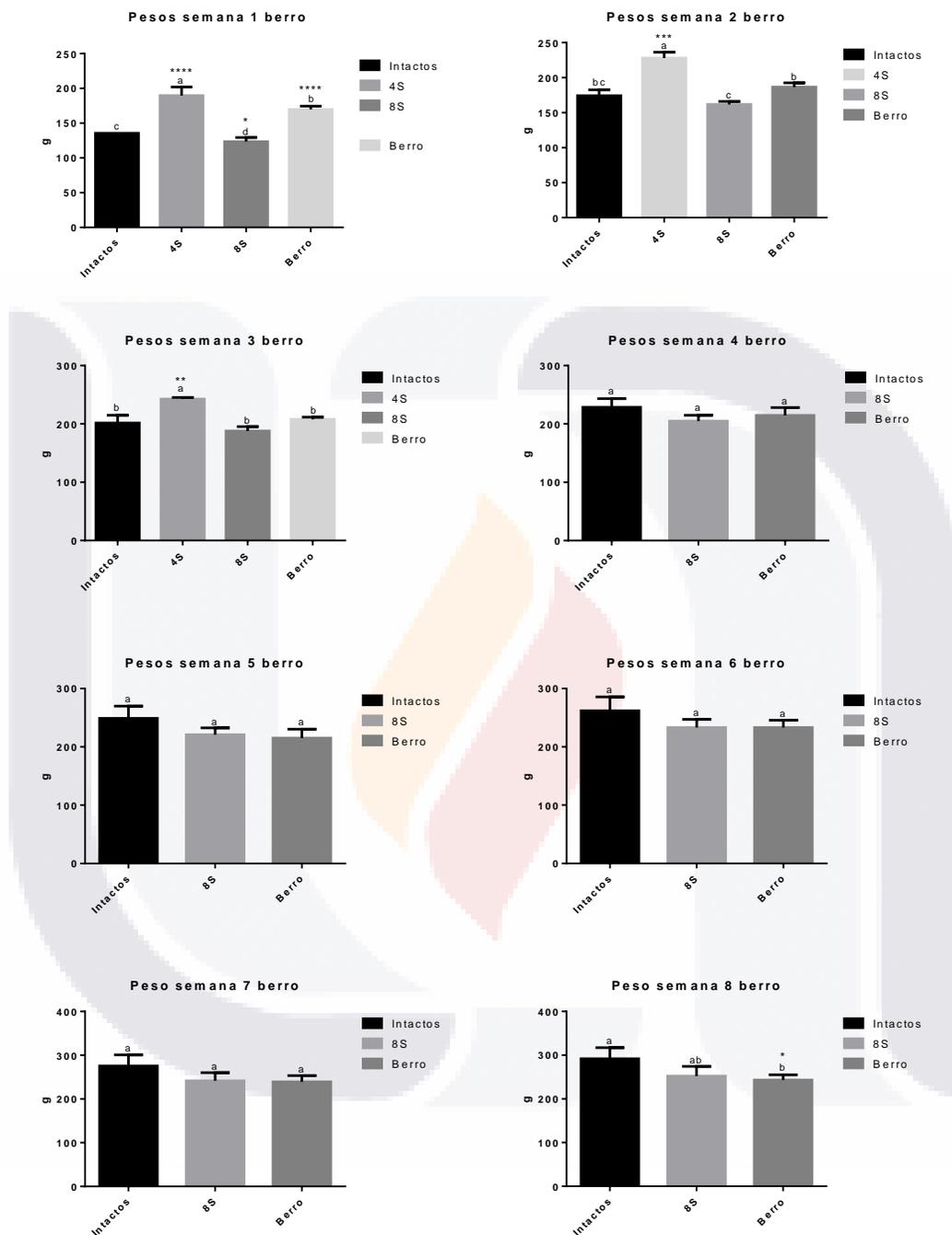


Figura 26 Pesos de las 8 semanas Berro. Letras diferentes indican diferencias significativas (Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3 *Lactobacillus rhamnosus* silvestre

5.3.1 Pesos de los hígados (Lactos)

Al momento de realizar la cirugía de las ratas sacrificadas y una vez retirado el hígado quirúrgicamente, se pesó antes de proceder a su disección.

Se observa que los pesos de los hígados (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de $11.34 \pm 0.32g$; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de $12.44 \pm 0.65g$; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de $12.80 \pm 0.59g$ y para el grupo de berro fue de $10.50 \pm 0.50g$. Los pesos de los hígados para los controles positivos y negativo son estadísticamente iguales, mientras que el grupo de menor peso de hígado fue el de Lactos, siendo igual al grupo intacto, como se muestra en la figura 27.

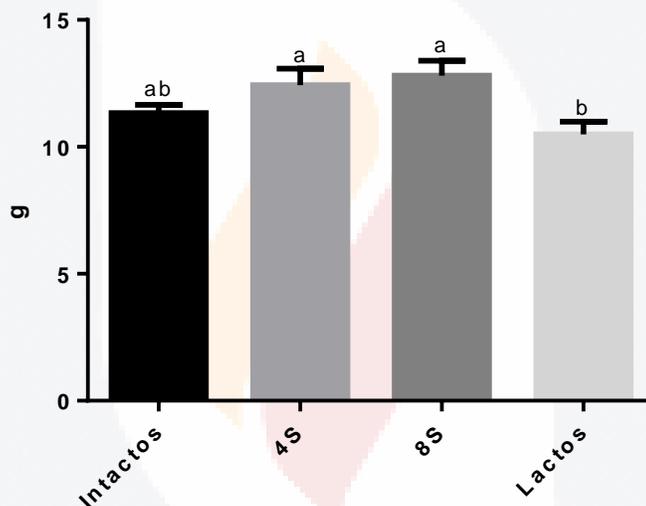


Figura 27 Pesos de los hígados para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.2 Perfil hepático (Lactos)

En la tabla 34, se muestran los resultados obtenidos del perfil hepático para ALT, AST, Urea, albúmina y fosfatasa alcalina para los controles positivos y negativo, así como su comparación con el grupo de Lactos.

Tabla 28 Perfil hepático (Lactos)

GRUPO	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea (mg/dL)	Albúmina (mg/dL)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
Intacto	3	30 ± 1.16	131.3 ± 8.969	38.0 ± 3.22	2.73 ± 0.03	249.7 ± 6.94
Control positivo 4S	3	822 ± 108.00	961 ± 73.80	39.67 ± 3.18	3.20 ± 0.21	474.3 ± 54.67
Control positivo 8S	3	52 ± 5.51	214.3 ± 43.32	45 ± 2.31	2.93 ± 0.09	314.7 ± 42.31
Lactos	7	117.9 ± 30.86	353.7 ± 68.77	44.71 ± 1.74	2.975 ± 0.12	460.4 ± 137.6

Expresados con la media ± SEM

5.3.2.1 ALT para Lactos

En la figura 28 se muestran los resultados obtenidos para los niveles séricos de ALT, donde se observa que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles más elevados de ALT, siendo estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p < 0.0001$) con respecto al intacto. Mientras que los demás grupos son estadísticamente iguales.

El grupo intacto tuvo valores (media ± SEM) de 30 ± 1.16 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 822.0 ± 108.00 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 52 ± 5.51 (U/L) y el tratamiento con Lactos mostró valores de 117.9 ± 30.86 (U/L). Los niveles de ALT para el grupo intacto y el de Lactos se comportan de manera similar.

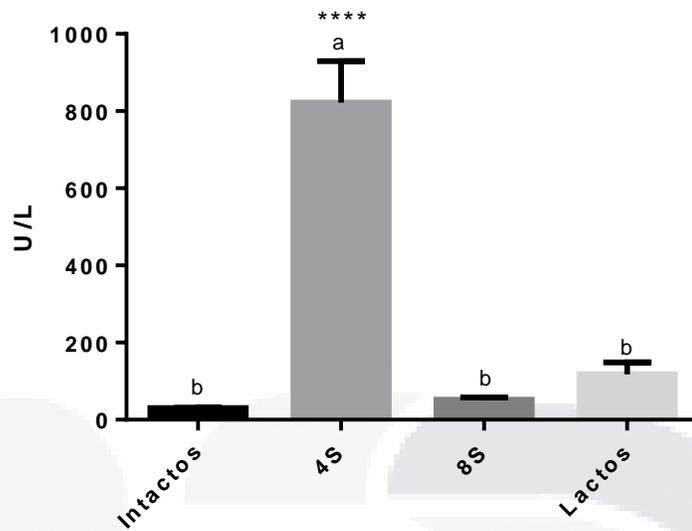


Figura 28 ALT para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.2.2 AST para Lactos

En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos para los niveles séricos de AST, donde se observa que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de AST, siendo estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p < 0.0001$) con respecto al intacto, y los de menores niveles fueron el grupo el de intactos y el del control positivo de las ocho semanas (8S), que son estadísticamente iguales.

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de AST de 131.3 ± 8.97 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 961.0 ± 73.80 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 214.3 ± 43.32 (U/L) y el tratamiento con Lactos mostró valores de 353.7 ± 68.77 (U/L).

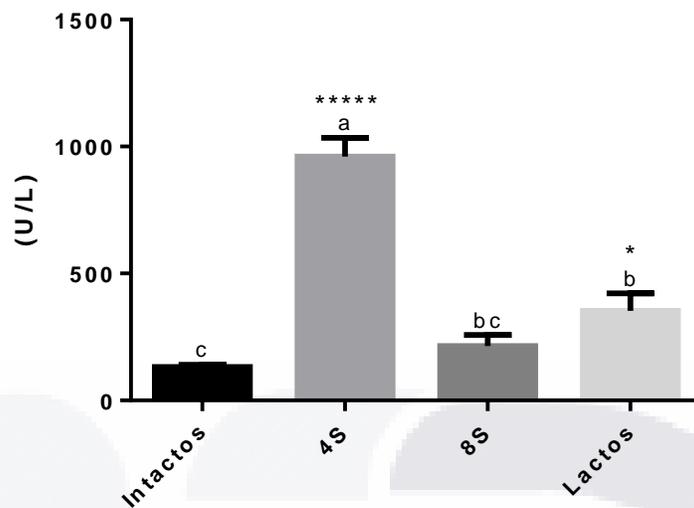


Figura 29 AST para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media \pm SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.2.3 Urea para Lactos

En la figura 30 se muestran la gráfica con los niveles séricos de urea, la cual es una forma de desintoxicación específica del hígado, a través de la cual el amonio que es tóxico es convertido en urea mediante el hígado para perder toxicidad y excretarlo en la orina.

Podemos observar que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de urea de 38.00 ± 3.22 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 39.67 ± 3.18 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 45.00 ± 2.31 (mg/dL) y el grupo de Lactos de 2.975 ± 0.12 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de urea normales y estadísticamente iguales.

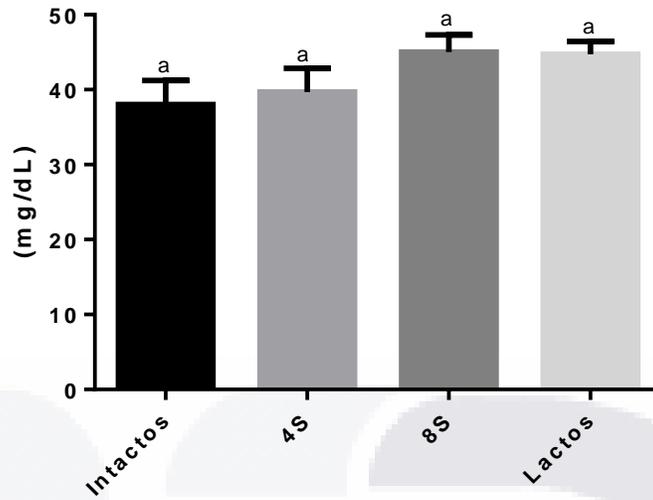


Figura 30 Urea para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media \pm SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.2.4 Albúmina para Lactos

En la figura 31 se muestran la gráfica con los niveles séricos de albumina, la cual es producida exclusivamente por los hepatocitos, por lo tanto, es un reflejo de la función de síntesis hepática.

Se observa que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de albumina de 2.73 ± 0.03 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 3.20 ± 0.21 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 2.93 ± 0.09 (mg/dL) y el grupo de Lactos de 2.98 ± 0.12 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de albumina estadísticamente iguales.

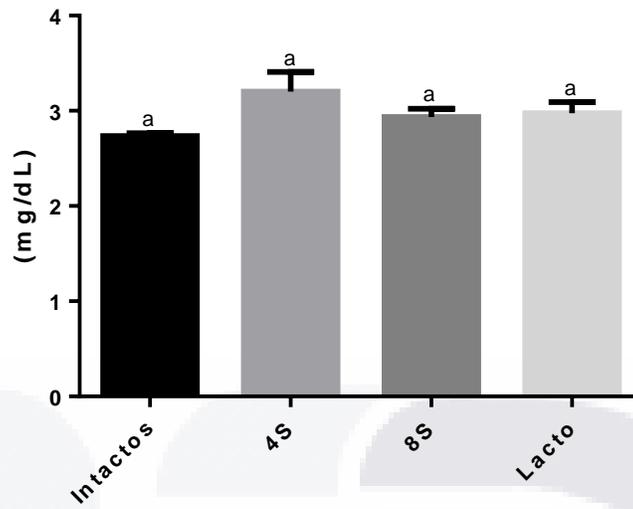


Figura 31 Albúmina para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.2.5 Fosfatasa Alcalina para Lactos

En la figura 32 se muestran la gráfica con los niveles séricos de fosfatasa alcalina, los cuales se ven elevados en enfermedades hepáticas.

Se puede observar que el grupo intacto tuvo valores (media ± SEM) de fosfatasa alcalina de 249.7 ± 6.94 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 474.3 ± 54.67 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 314.7 ± 42.31 (U/L) y el grupo de Lactos de 460.4 ± 137.6 (U/L). Todos los grupos muestran niveles de fosfatasa alcalina estadísticamente iguales.

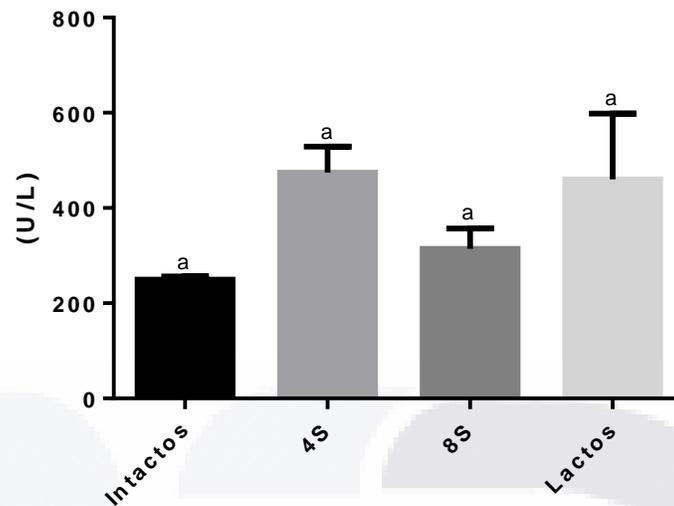


Figura 32 Fosfatasa alcalina para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.3 Análisis morfométrico (Lactos)

Se realizó un análisis morfométrico de las imágenes obtenidas en el microscopio invertido, de las muestras teñidas con Rojo Sirio, obteniendo los porcentajes de colágena total, colágena tipo I y colágena tipo III, para hígado e intestino.

5.3.3.1 Porcentaje de colágena total (Lactos)

El porcentaje de colágena total en hígado para el grupo intacto (media ± SEM) fue de 0.27 ± 0.05 % y para el intestino fue de 1.8 ± 1.6 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.98 ± 0.36 % en hígado y para el intestino fue de 4.33 ± 1.62 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 1.79 ± 0.67 % y para el intestino fue de 2.99 ± 1.52 %; para el grupo de Lactos en hígado fue de 1.78 ± 0.38 % y para el intestino fue de 2.69 ± 0.41%. Todos los grupos son estadísticamente iguales tanto para la colágena total en hígado como en intestino como se muestra en la gráfica de la figura 33 para hígado y figura 34 para intestino.

Gráfico de porcentaje de colágena total (Lactos) en hígado

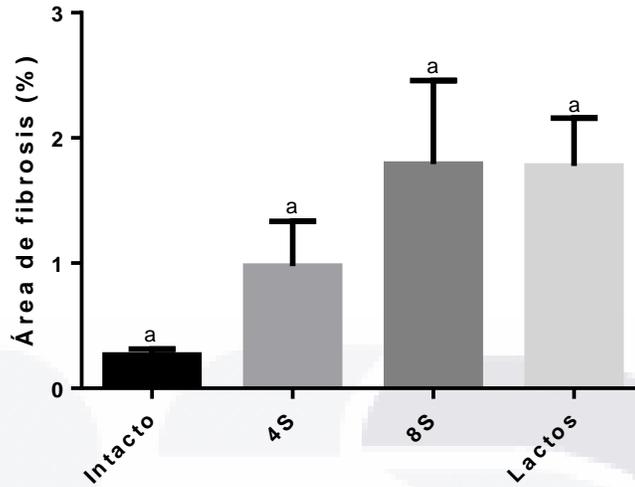


Figura 33 Porcentaje de colágena total en hígado para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena total (Lactos) en intestino

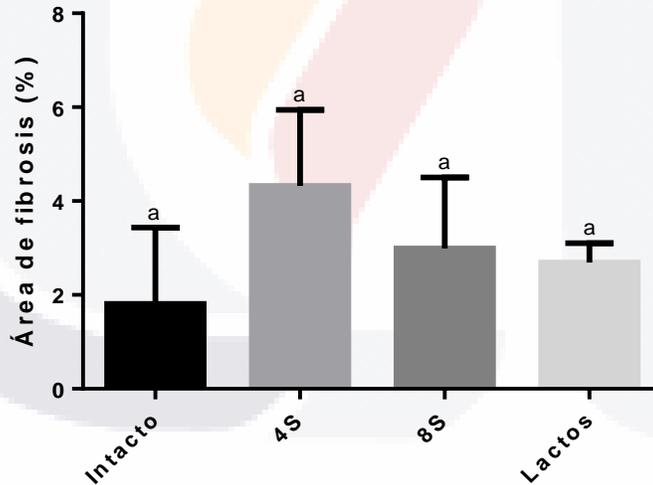


Figura 34 Porcentaje de colágena total en intestino para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.3.2 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino para Lactos

El porcentaje (media ± SEM) de colágena tipo I en hígado para el grupo intacto fue de 1.72 ± 0.99 % y para el intestino fue de 20.54 ± 8.57 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.59 ± 0.77 % en hígado y para el intestino fue de 19.21 ± 5.91 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 7.32 ± 1.72 % y para el intestino fue de 12.77 ± 5.49 %; para el grupo de Lactos en hígado fue de 3.06 ± 0.72 % y para el intestino fue de 10.67 ± 3.04 %. Todos los grupos son estadísticamente iguales para la colágena tipo I en intestino como se muestra en la figura 36, en cambio, para la colágena tipo I en hígado, los grupos intacto, 4S y berro son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) y el control positivo de las ocho semanas (8S) es el único estadísticamente diferente a los demás grupos ($p < 0.01$), como se muestra en la gráfica de la figura 35.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo I en hígado para Lactos

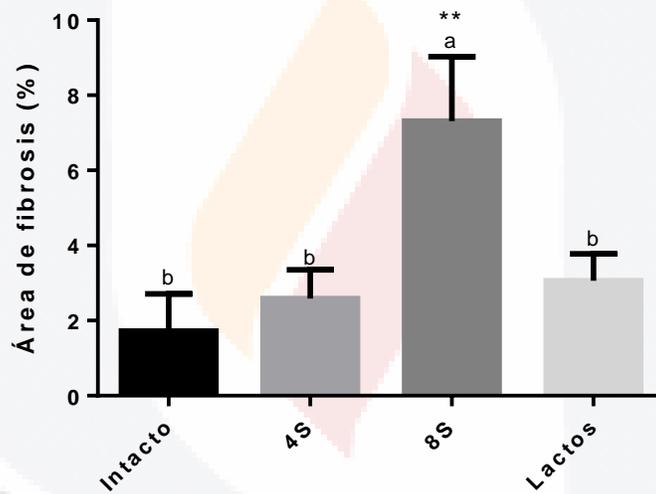


Figura 35 Porcentaje de colágena tipo I en hígado para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo I en intestino para Lactos

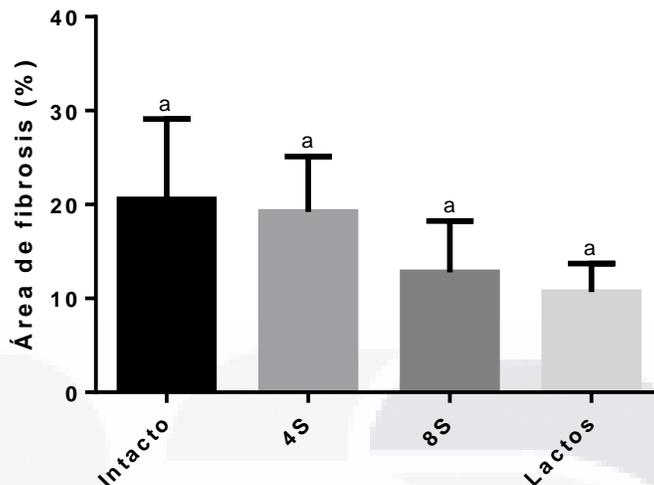


Figura 36 Porcentaje de colágena tipo I en intestino para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.3.3 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino para Lactos

El porcentaje de colágena tipo III está asociada más bien a la protección del hospedero y como herramienta para la curación de heridas que al daño hepático. Se observa que el porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo III en hígado para el grupo intacto fue de 2.46 ± 1.94 % y para el intestino fue de 22.18 ± 9.05 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.65 ± 0.60 % en hígado y para el intestino fue de 22.49 ± 4.37 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 3.70 ± 0.92 % y para el intestino fue de 13.41 ± 1.70 %; para el grupo de Lactos en hígado fue de 3.25 ± 0.73 % y para el intestino fue de 7.33 ± 3.34 %.

Todos los grupos son estadísticamente iguales para la colágena tipo III en hígado como se muestra en la figura 37 y en colon como se muestra en la figura 38.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo III en hígado para Lactos

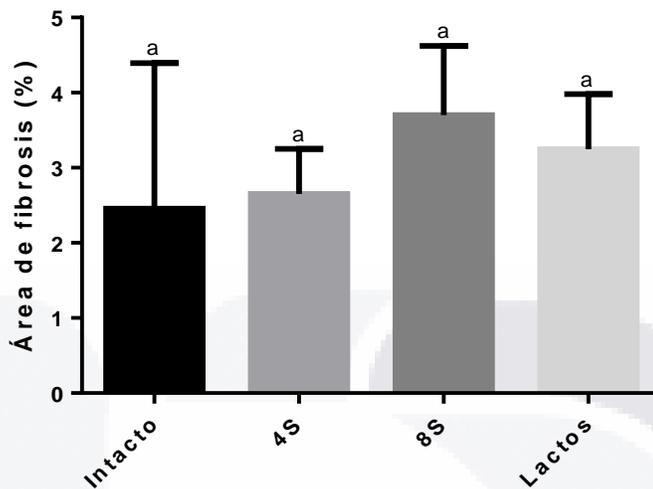


Figura 37 Porcentaje de colágena tipo III en hígado para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo III en intestino para Lactos

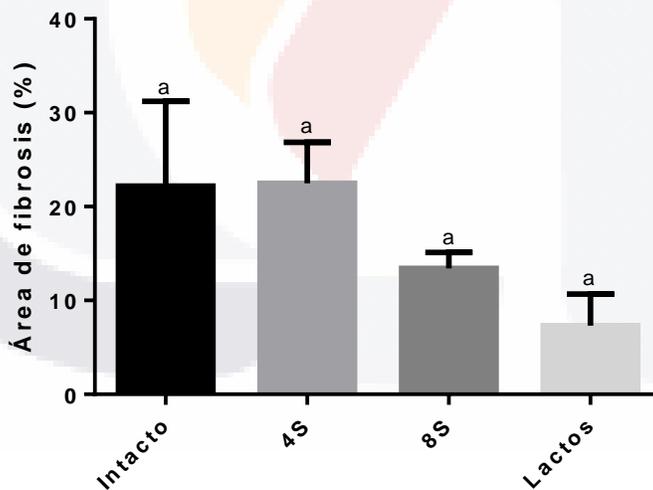


Figura 38 Porcentaje de colágena tipo III en intestino para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.4 Análisis genético con qPCR (Lactos)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis genético mediante qPCR, en hígado se obtuvieron los valores de expresión de IL-1, IL-10 y colágena, mientras que en intestino se obtuvo la expresión de la IL-10.

5.3.4.1 IL-1 en hígado

La expresión de IL-1, que es una citocina proinflamatoria, tuvo mayor expresión en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado con respecto a los demás, y la que menor expresión tuvo de IL-1 fue el grupo intacto y el de Lactos, estadísticamente iguales.

Se observa que la expresión de IL-1 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.821 ± 0.096 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 3.573 ± 0.198 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 12.53 ± 1.342 ; para el grupo de Lactos fue de 1.386 ± 0.378 .

Los únicos grupos estadísticamente iguales para la IL-1 en hígado son el grupo intacto y el de Lactos, presentando diferencias significativas con los demás grupos, como se muestra en la figura 39.

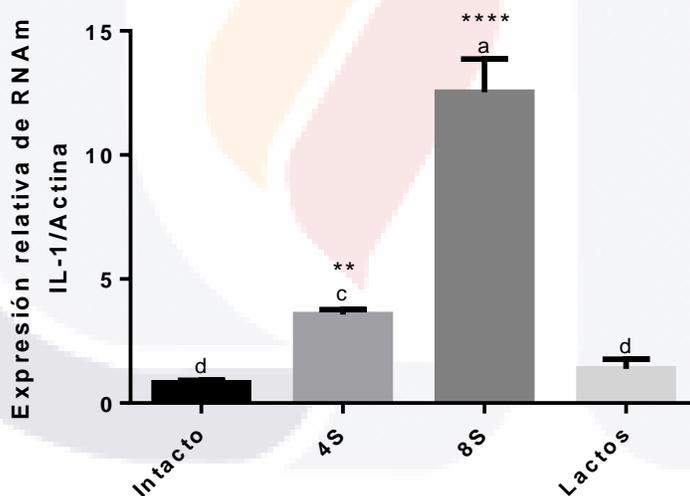


Figura 39 Expresión de IL-1 en hígado para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.4.2 IL-10 en hígado

La expresión de IL-10, que es una citocina antiinflamatoria, tuvo mayor expresión en el grupo tratado con Lactos, los controles positivos y negativo son estadísticamente iguales, como se muestra en la figura 40.

Se observa que la expresión de IL-10 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.87 ± 0.13 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.41 ± 0.07 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.98 ± 0.12 y para el grupo de Lactos fue de 9.01 ± 1.57 .

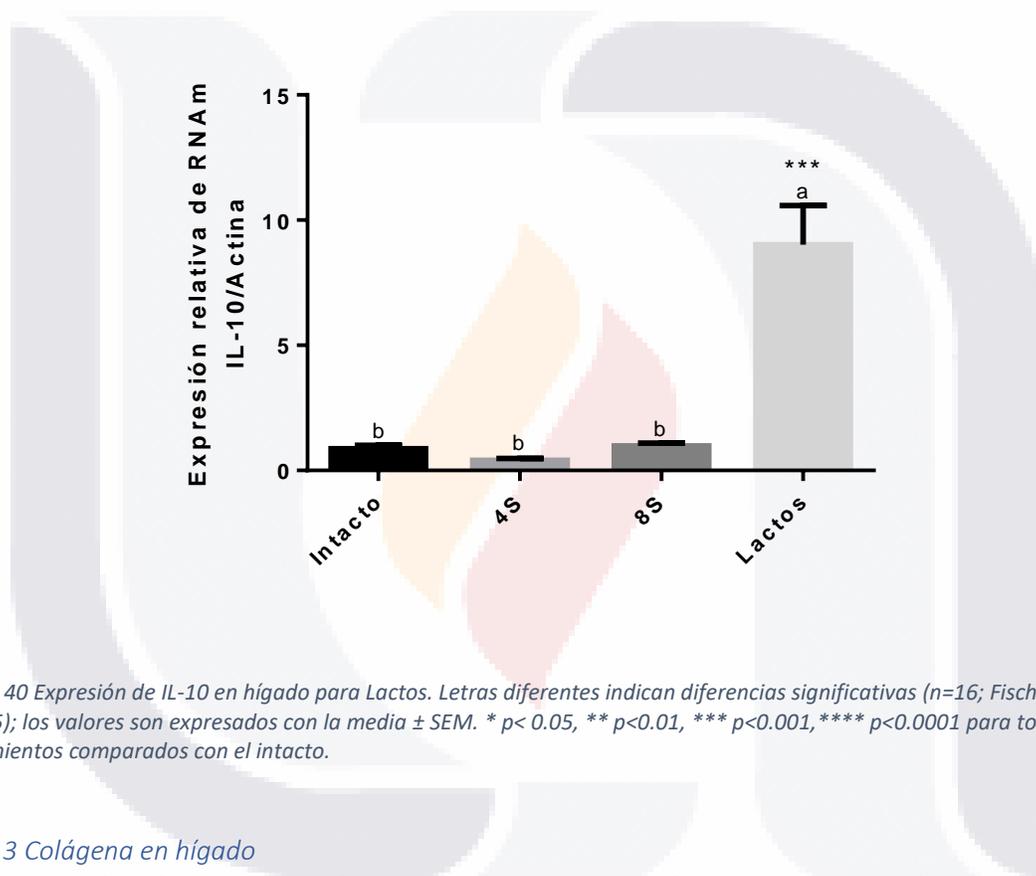


Figura 40 Expresión de IL-10 en hígado para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.4.3 Colágena en hígado

La expresión de colágena en hígado tuvo mayor expresión en los grupos de control positivo, de las cuatro y de las ocho semanas, estadísticamente iguales, mientras que el grupo intacto fue el que presentó los menores valores, como se muestra en la figura 41.

Se observa que la expresión de colágena en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.05 ± 0.06 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 4.06 ± 0.31 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 3.70 ± 0.28 y para el grupo de Lactos fue de 3.17 ± 0.25 .

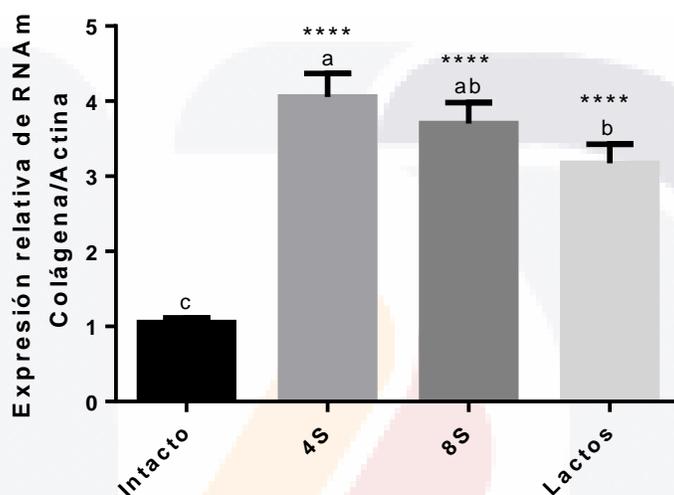


Figura 41 Expresión de colágena en hígado para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.4.4 IL-10 en intestino

La expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 en colon, fue mayor para el grupo intacto y el grupo de Lactos, que son estadísticamente iguales y menor para los controles positivos de las cuatro y ocho semanas, estadísticamente iguales, como se muestra en la figura 42.

Se observa que la expresión de IL-10 en intestino (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.06 ± 0.08 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.38 ± 0.00 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) fue de 0.40 ± 0.07 y para el grupo de Lactos fue de 1.45 ± 0.32 .

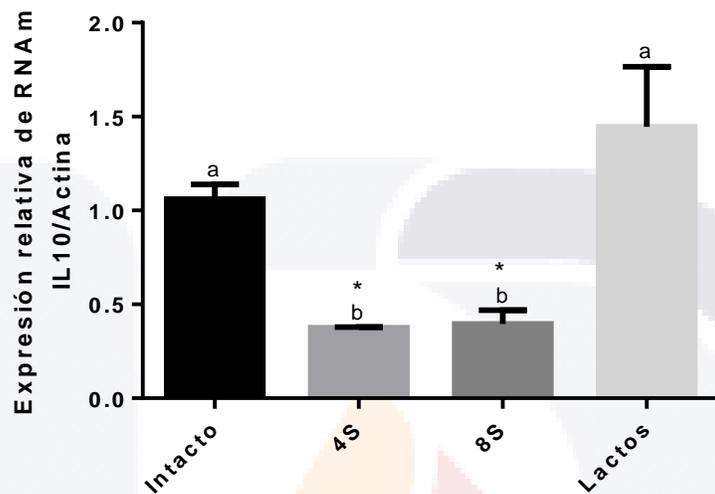


Figura 42 Expresión de IL-10 en intestino para Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.3.5 Pesos semanales de las ratas vivas (Lactos)

El comportamiento de los controles y del *Lactobacillus rhamnosus* se observa en la tabla 39:

Tabla 29 Pesos semanales de las ratas control y tratamiento de *Lactobacillus rhamnosus*

GRUPO	PESO PROMEDIO (g)							
	SEMANA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Intacto	135.5 ± 0.0	174.3 ± 4.85	201.7 ± 7.67	228.6 ± 8.56	248.9 ± 12.05	261.9 ± 13.67	275.4 ± 14.76	291.8 ± 14.56
n	3	3	3	3	3	3	3	3
Control positivo 4S	189.7 ± 2.37	228 ± 8.31	242.5 ± 2.78	390.5 ± 3.22	-	-	-	-
n	4	3	3	3	-	-	-	-
Control positivo 8S	123.3 ± 2.65	161.8 ± 1.93	188.0 ± 3.71	204.9 ± 4.91	220.8 ± 5.24	233.0 ± 7.05	241.5 ± 10.78	252.1 ± 13.01
n	5	5	4	4	5	4	3	3
Lactos	175.5 ± 10.02	187.4 ± 8.737	197.0 ± 8.915	203.8 ± 9.989	207.8 ± 7.839	219.4 ± 7.738	224.1 ± 8.409	223.9 ± 10.70
n	7	7	7	7	7	7	7	7
TODOS	150.3 ± 6.86	184.9 ± 6.31	203.7 ± 5.97	241.4 ± 17.92	220.3 ± 5.99	232.4 ± 6.64	240.0 ± 8.21	246.1 ± 10.42
N	16	18	17	17	15	14	13	13

Para la semana 1 se observa diferencia entre todos los grupos, como lo muestra la figura 43.

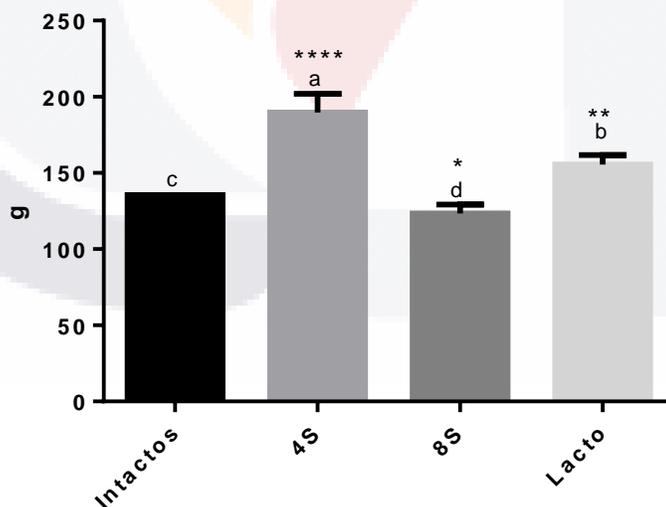


Figura 43 Pesos de la semana 1 Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 2 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 44.

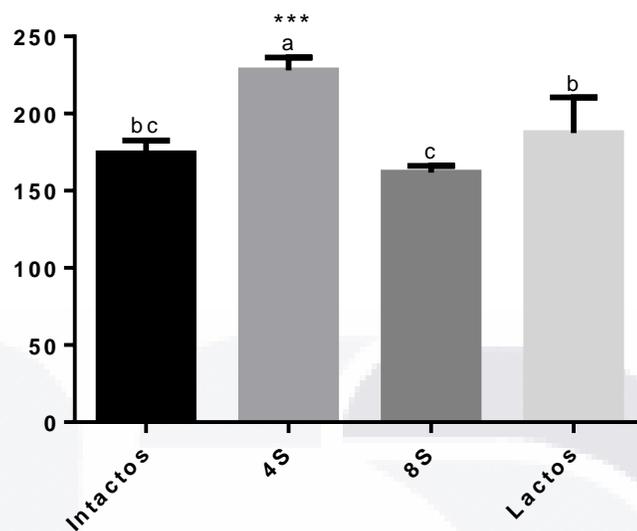


Figura 44 Pesos de la semana 2 Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=18; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 3 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 45.

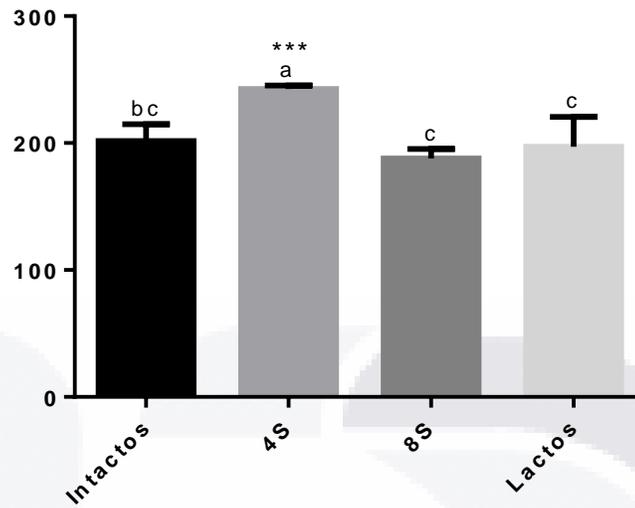


Figura 45 Pesos de la semana 3 Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=17; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 4 no se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 46.

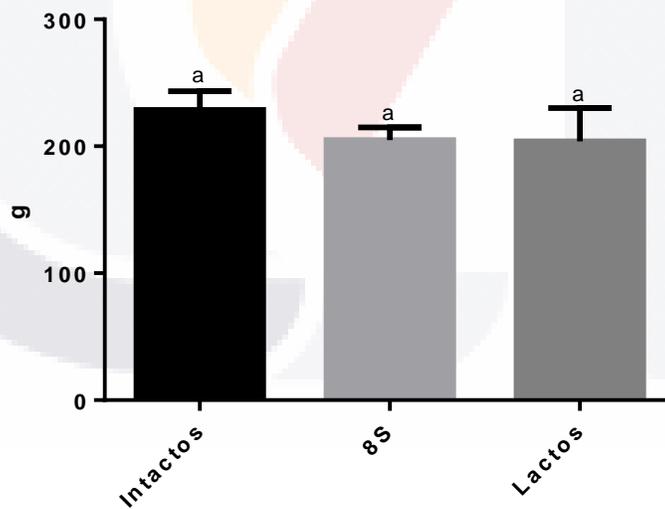


Figura 46 Pesos de la semana 4 Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=14; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 5 no se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 47.

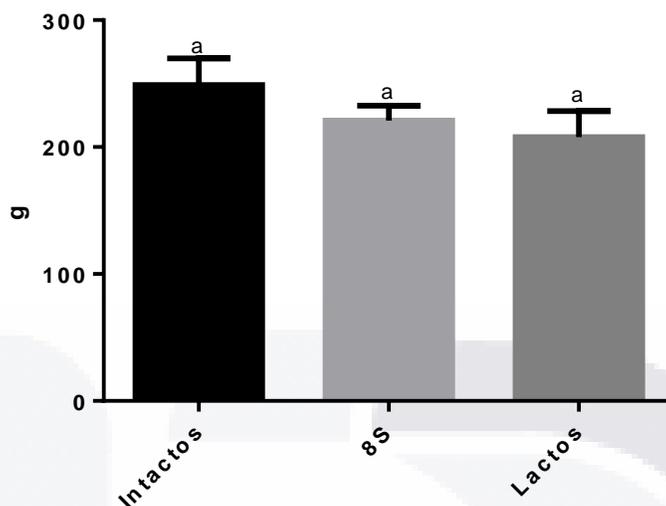


Figura 47 Pesos de la semana 5 Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=15; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 6 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 48.

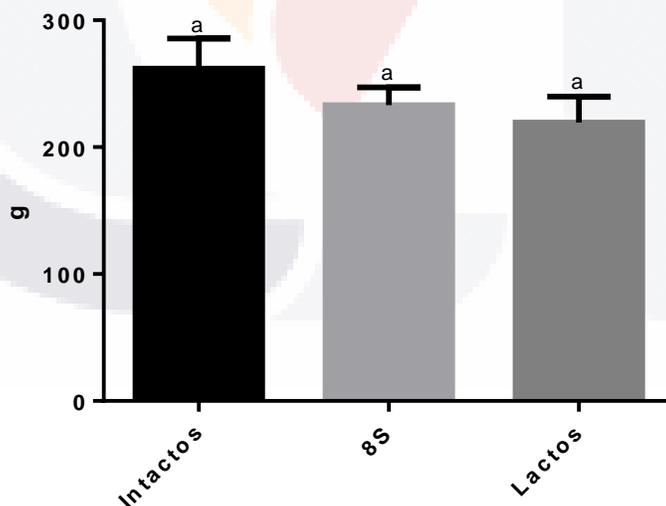


Figura 48 Pesos de la semana 6 Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=14; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 7 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 49.

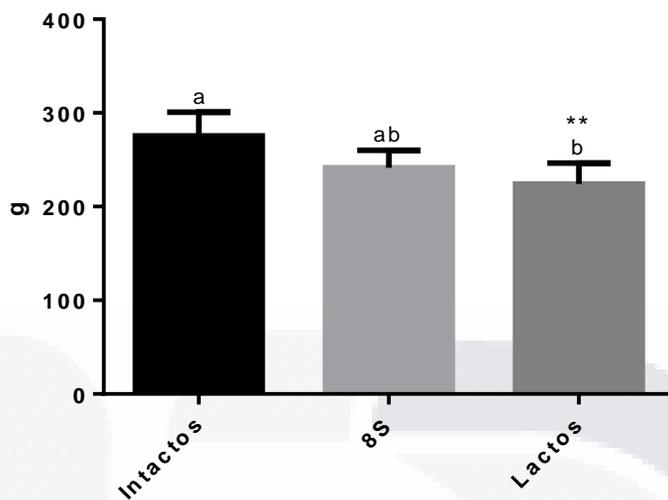


Figura 49 Pesos de la semana 7 Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=13; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 8 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 50.

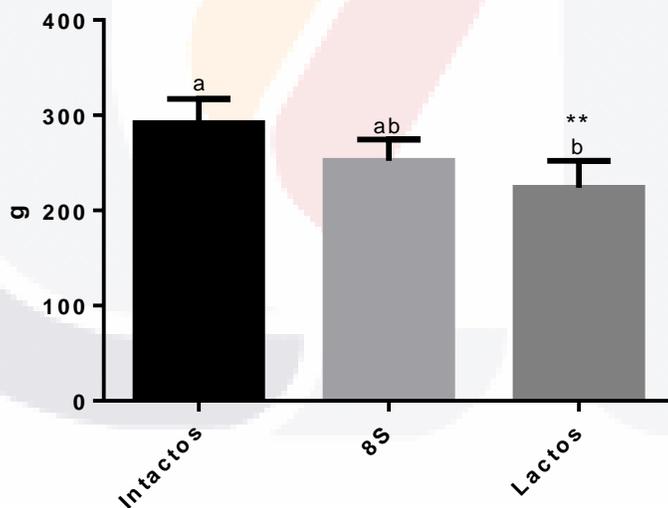


Figura 50 Pesos de la semana 8 Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=13; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

A continuación, se muestran en la figura 51 los gráficos de todas las semanas en una sola vista:

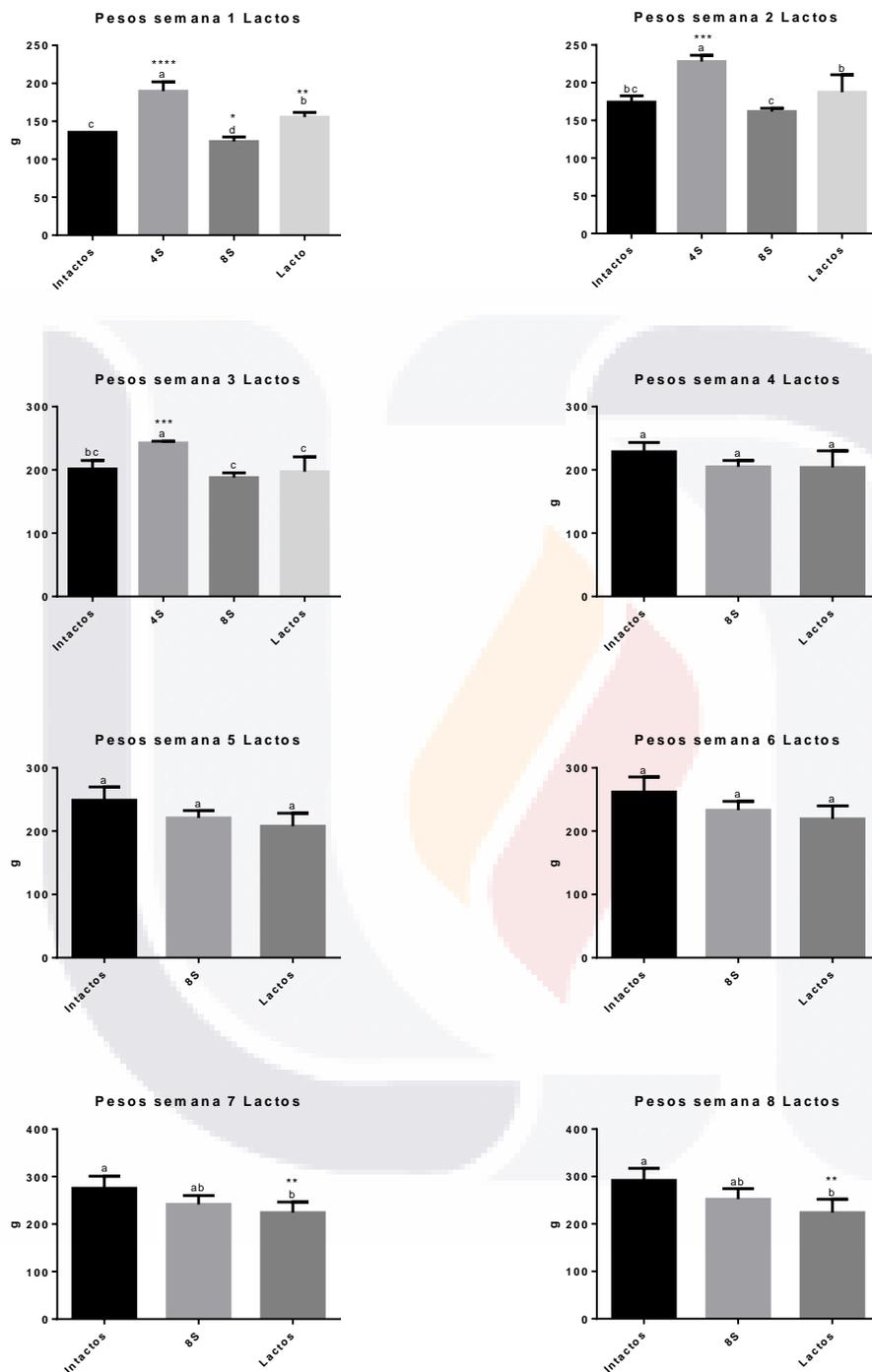


Figura 51 Pesos de las 8 semanas Lactos. Letras diferentes indican diferencias significativas (Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4 Extracto de berro y de *Lactobacillus rhamnosus* silvestres

5.4.1 Pesos de los hígados (Berro-Lacto)

Al momento de realizar la cirugía de las ratas sacrificadas y una vez retirado el hígado quirúrgicamente, se pesó antes de proceder a su disección.

Se observa que el peso de los hígados (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 11.35 ± 0.56 g; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 12.44 ± 1.13 g; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) fue de 12.80 ± 1.02 g y para el grupo de Berro-Lacto fue de 13.25 ± 0.73 g, sin embargo, todos los pesos de los hígados para los grupos son estadísticamente iguales, como se muestra en la figura 52:

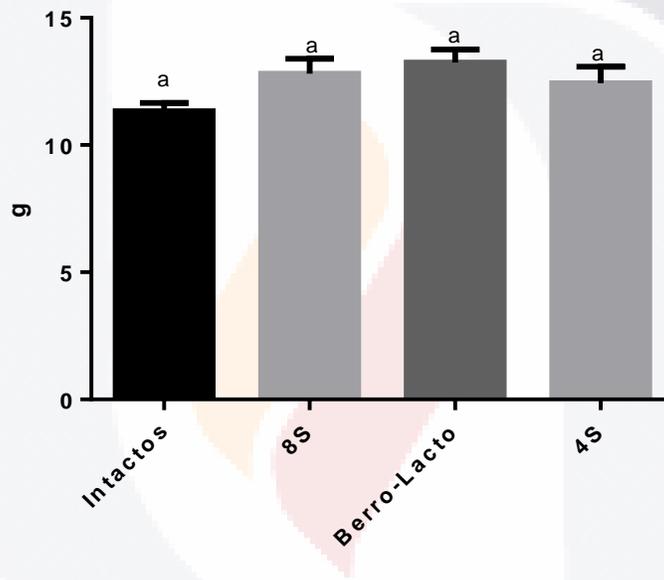


Figura 52 Pesos de los hígados para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.2 Perfil hepático (Berro-Lacto)

En la tabla 41, se muestran los resultados obtenidos del perfil hepático para ALT, AST, Urea, albúmina y fosfatasa alcalina para los controles positivos y negativo, así como su comparación con el grupo de Berro-Lacto.

Tabla 30 Perfil hepático (Berro-Lacto)

GRUPO	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea (mg/dL)	Albúmina (mg/dL)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
Intacto	3	30 ± 1.16	131.3 ± 8.97	38.00 ± 3.22	2.73 ± 0.03	249.7 ± 6.94
Control positivo 4S	3	822.0 ± 108.00	961.0 ± 73.80	39.67 ± 3.18	3.20 ± 0.21	474.3 ± 54.67
Control positivo 8S	3	52 ± 5.51	214.3 ± 43.32	45.00 ± 2.31	2.93 ± 0.09	314.7 ± 42.31
Berro-Lacto	2	117.9 ± 30.86	460.0 ± 85.00	41.00 ± 3.00	2.80 ± 0.20	355.0 ± 14.00

Los valores son expresados con la media ± SEM.

5.4.2.1 ALT (Berro-Lacto)

En la figura 53 se muestran los resultados obtenidos para los niveles séricos de ALT, donde se observa que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles más elevados de ALT, siendo estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p < 0.0001$) con respecto al intacto, seguido del grupo Berro-Lacto y por último los grupos intacto y control positivo de las ocho semanas (8S), que son estadísticamente iguales.

El grupo intacto tuvo valores (media ± SEM) de 30 ± 1.16 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 822.0 ± 108.00 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 52 ± 5.51 (U/L) y el tratamiento con Berro-Lacto mostró valores de 117.9 ± 30.86 (U/L).

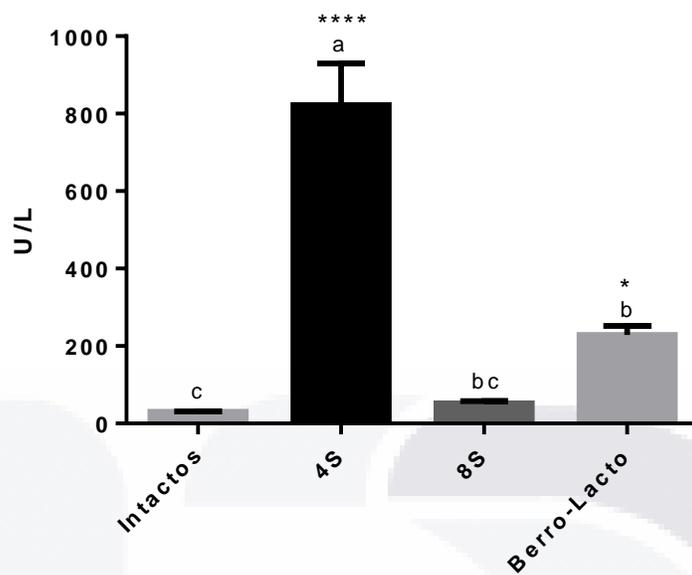


Figura 53 ALT para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.2.2 AST (Berro-Lacto)

En la figura 54 se muestran los resultados obtenidos para los niveles séricos de AST, donde se observa que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles más elevados de AST, siendo estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p < 0.0001$) con respecto al intacto, y los de menores niveles fueron el grupo el de intactos y el del control positivo de las ocho semanas (8S), que son estadísticamente iguales.

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de AST de 131.3 ± 8.97 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 961.0 ± 73.80 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 214.3 ± 43.32 (U/L) y el tratamiento con Berro-Lacto mostró valores de 460.0 ± 85.00 (U/L).

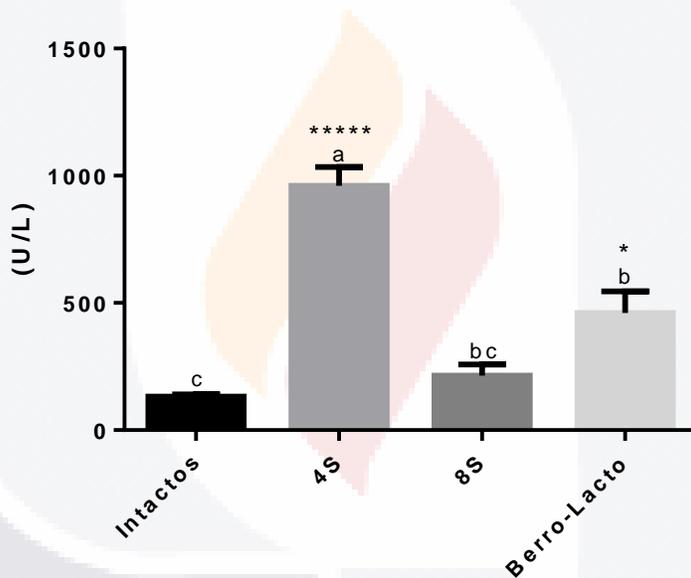


Figura 54 AST para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=16$; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.2.3 Urea (Berro-Lacto)

En la figura 55 se muestran la gráfica con los niveles séricos de urea, la cual es una forma de desintoxicación específica del hígado, a través de la cual el amonio que es tóxico es convertido en urea mediante el hígado para perder toxicidad y excretarlo en la orina.

Podemos observar que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de urea de 38.00 ± 3.22 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 39.67 ± 3.18 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 45.00 ± 2.31 (mg/dL) y el grupo de Berro-Lacto de 41.00 ± 3.00 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de urea normales y estadísticamente iguales.

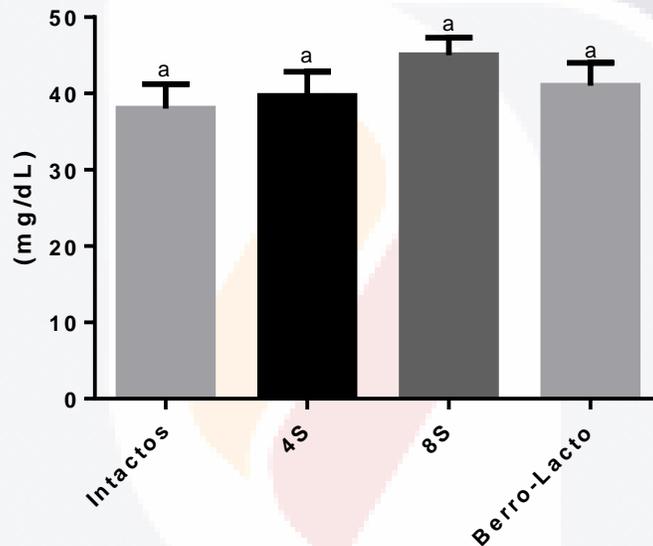


Figura 55 Urea para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.2.4 Albumina (Berro-Lacto)

En la figura 56 se muestran la gráfica con los niveles séricos de albumina, la cual es producida exclusivamente por los hepatocitos, por lo tanto, es un reflejo de la función de síntesis hepática.

Se observa que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de albumina de 2.73 ± 0.03 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 3.20 ± 0.21 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 2.93 ± 0.09 (mg/dL) y el grupo de Berro-Lacto de 2.80 ± 0.20 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de albumina estadísticamente iguales.

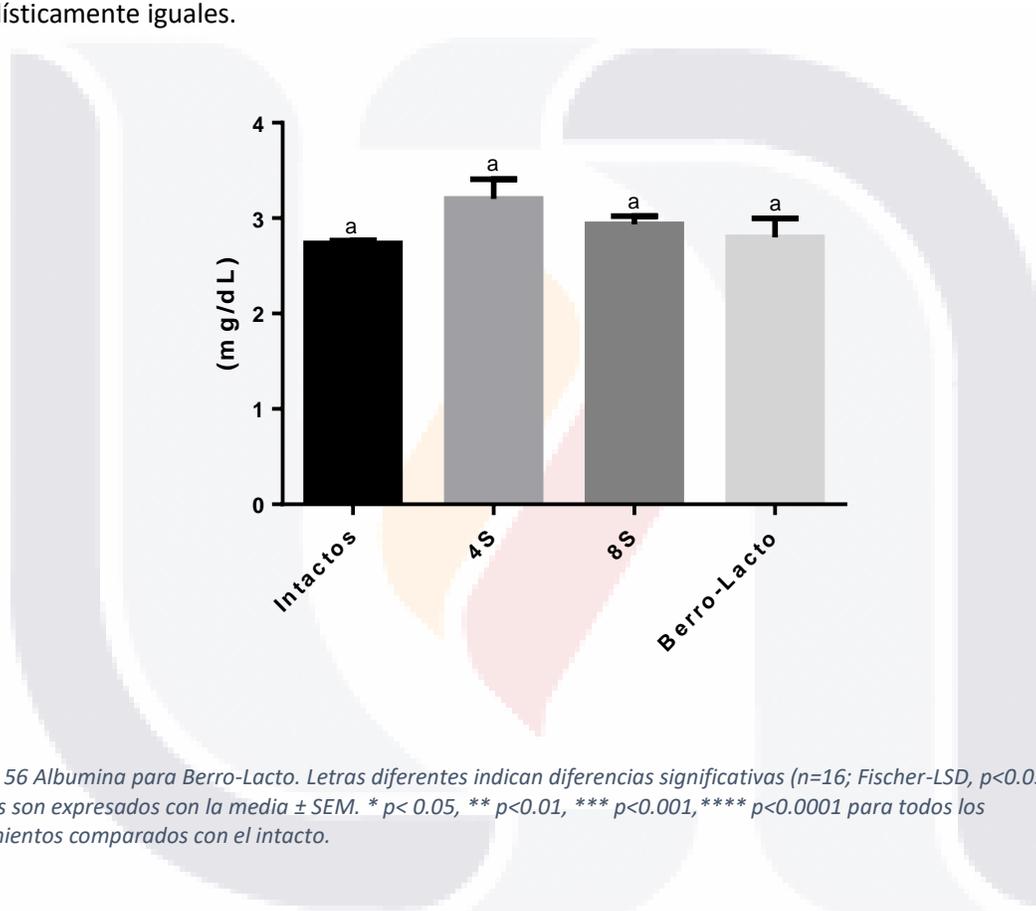


Figura 56 Albumina para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.2.5 Fosfatasa alcalina (Berro-Lacto)

En la figura 32 se muestran la gráfica con los niveles séricos de fosfatasa alcalina, los cuales se ven elevados en enfermedades hepáticas.

Se puede observar que el grupo intacto tuvo valores (media ± SEM) de fosfatasa alcalina de 249.7 ± 6.94 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 474.3 ± 54.67 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 314.7 ± 42.31 (U/L) y el grupo de Berro-Lacto de 355.0 ± 14.0 (U/L). Todos los grupos muestran niveles de fosfatasa alcalina estadísticamente iguales.

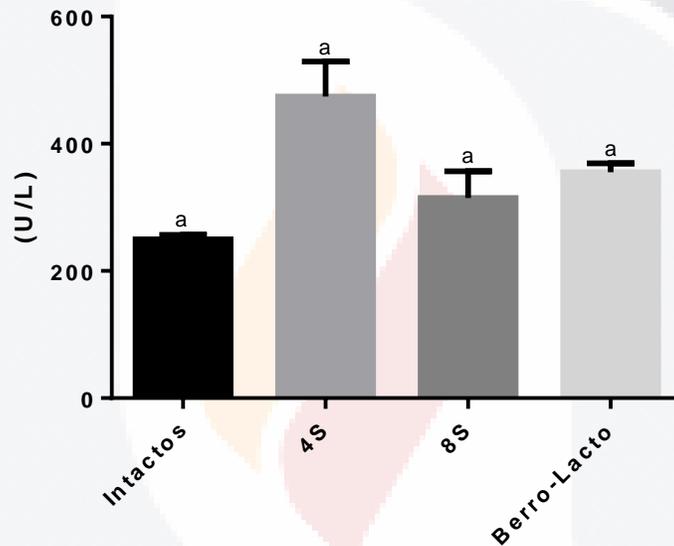


Figura 57 Fosfatasa alcalina para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.3 Análisis morfométrico (Berro-Lacto)

Se realizó un análisis morfométrico de las imágenes obtenidas en el microscopio invertido, de las muestras teñidas con Rojo Sirio, se obtuvieron de esta manera los porcentajes de colágena total, colágena tipo I y colágena tipo III, para hígado e intestino.

5.4.3.1 Porcentaje de colágena total (Berro-Lacto)

El porcentaje de colágena total en hígado para el grupo intacto (media \pm SEM) fue de 0.27 ± 0.05 % y para el intestino fue de 1.8 ± 1.6 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.98 ± 0.36 % en hígado y para el intestino fue de 4.33 ± 1.62 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 1.79 ± 0.67 % y para el intestino fue de 2.99 ± 1.52 %; para el grupo de Berro-Lacto en hígado fue de 2.06 ± 0.91 % y para el intestino fue de 2.82 ± 1.44 %. Todos los grupos son estadísticamente iguales tanto para la colágena total en hígado como en intestino como se muestra en la gráfica de la figura 58 para hígado y figura 59 para intestino.

Gráfico de porcentaje de colágena total en hígado (Berro-Lacto)

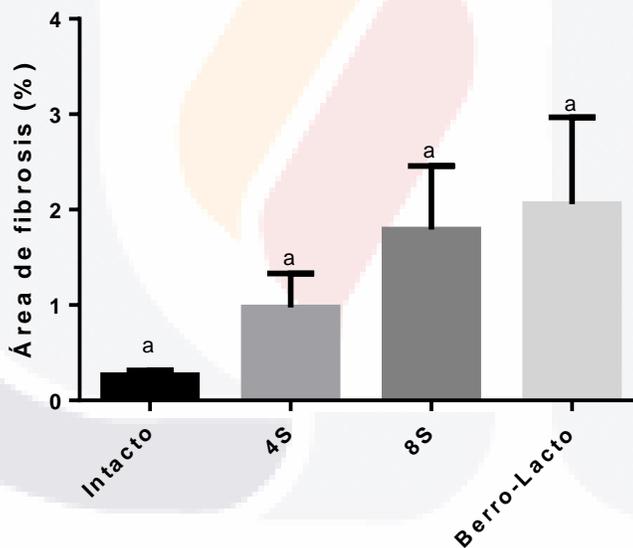


Figura 58 Porcentaje de colágena total en hígado para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=11$; Fischer-LSD, $p<0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena total en intestino (Berro-Lacto)

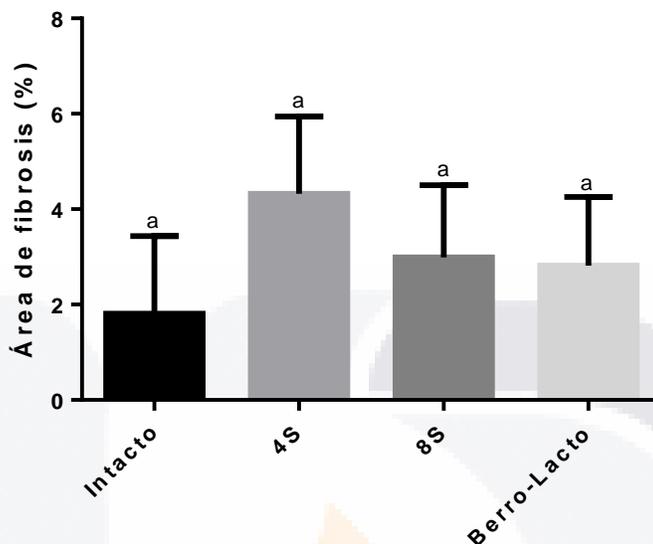


Figura 59 Porcentaje de colágena total en intestino para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.3.2 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino (Berro-Lacto)

El porcentaje (media ± SEM) de colágena tipo I en hígado para el grupo intacto fue de 1.72 ± 0.99 % y para el intestino fue de 20.54 ± 8.57 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.59 ± 0.77 % en hígado y para el intestino fue de 19.21 ± 5.91 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 7.32 ± 1.72 % y para el intestino fue de 12.77 ± 5.49 %; para el grupo de Berro-Lacto en hígado fue de 5.70 ± 1.04 % y para el intestino fue de 16.54 ± 11.99 %. Todos los grupos son estadísticamente iguales para la colágena tipo I en intestino como se muestra en la figura 61, en cambio, para la colágena tipo I en hígado, los grupos intacto, 4S y Berro-Lacto son estadísticamente iguales (p< 0.05) y el control positivo de las ocho semanas (8S) es el de mayor porcentaje de colágena tipo I, como se muestra en la gráfica de la figura 60.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo I en hígado (Berro-Lacto)

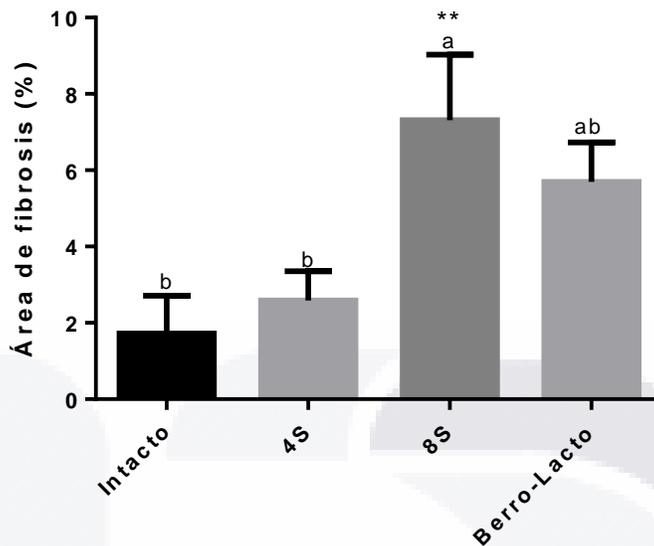


Figura 60 Porcentaje de colágena tipo I en hígado para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo I en intestino (Berro-Lacto)

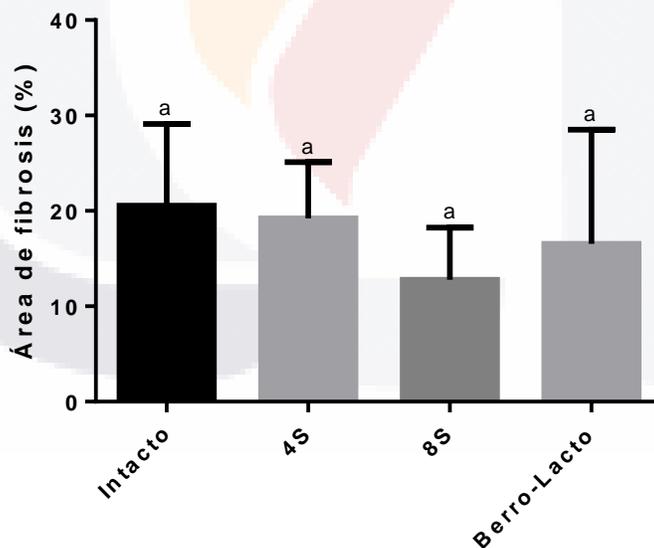


Figura 61 Porcentaje de colágena tipo I en intestino para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.3.3 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino (Berro-Lacto)

El porcentaje de colágena tipo III está asociada más bien a la protección del hospedero y como herramienta para la curación de heridas que al daño hepático. Se observa que el porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo III en hígado para el grupo intacto fue de 2.46 ± 1.94 % y para el intestino fue de 22.18 ± 9.05 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.65 ± 0.60 % en hígado y para el intestino fue de 22.49 ± 4.37 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 3.70 ± 0.92 % y para el intestino fue de 13.41 ± 1.70 %; para el grupo de Berro-Lacto en hígado fue de 7.18 ± 2.54 % y para el intestino fue de 11.87 ± 5.09 %.

Todos los grupos son estadísticamente iguales para la colágena tipo III en hígado como se muestra en la figura 62 y en colon como se muestra en la figura 63.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo III en hígado (Berro-Lacto)

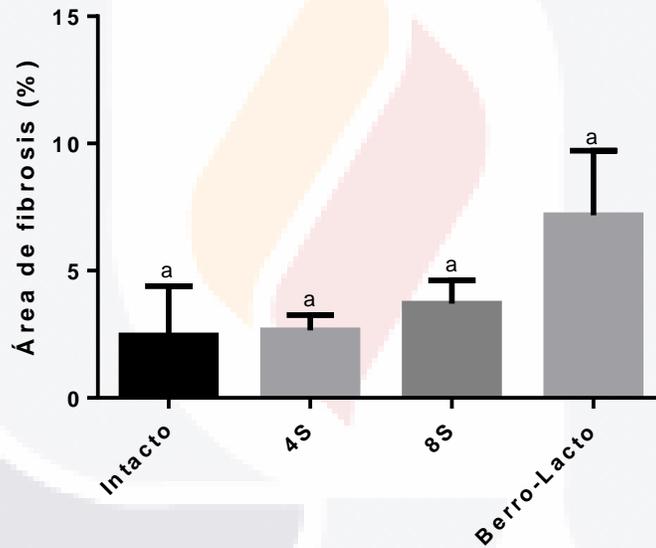


Figura 62 Porcentaje de colágena tipo III en hígado para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Gráfico de porcentaje de colágena tipo III en intestino (Berro-Lacto)

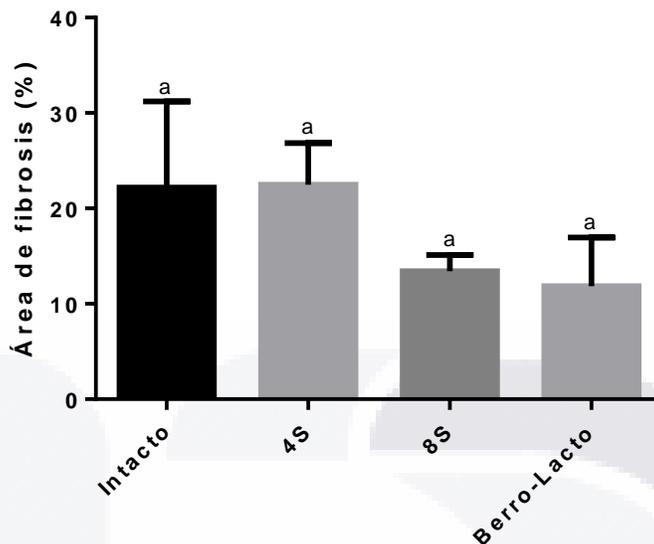


Figura 63 Porcentaje de colágena tipo III en intestino para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.4 Análisis genético con qPCR (Berro-Lacto)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis genético mediante qPCR, en hígado se obtuvieron los valores de expresión de IL-1, IL-10 y colágena, mientras que en intestino se obtuvo la expresión de la IL-10.

5.4.4.1 IL-1 en hígado

La expresión de IL-1, que es una citocina proinflamatoria, tuvo mayor expresión en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado con respecto a los demás, y la que menor expresión tuvo de IL-1 fue el grupo intacto y el de Lactos, estadísticamente iguales.

Se observa que la expresión de IL-1 en hígado (media ± SEM) para el grupo intacto fue de 0.821 ± 0.096; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 3.573 ± 0.198; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 12.53 ± 1.342; para el grupo de Berro-Lacto fue de 2.823 ± 0.165.

El tratamiento con Berro-Lacto fue estadísticamente igual al grupo intacto y al grupo control positivo de las cuatro semanas (4s), como se muestra en la figura 64.

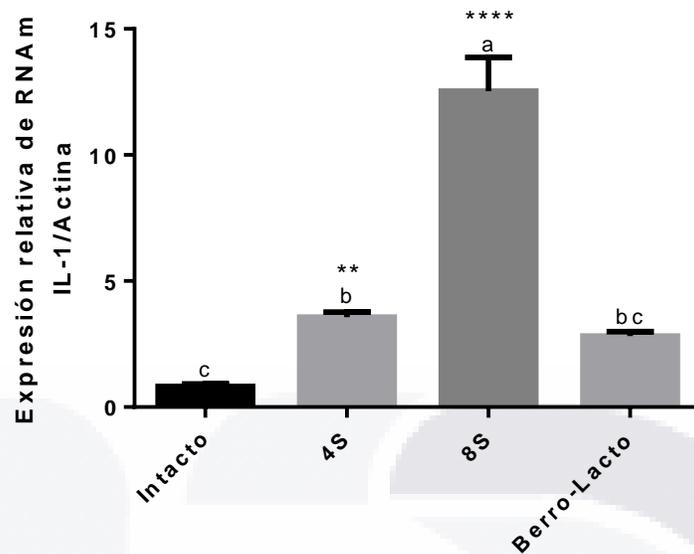


Figura 64 Expresión de IL-1 en hígado para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.4.2 IL-10 en hígado

La expresión de IL-10, que es una citocina antiinflamatoria, tuvo mayor expresión en el grupo tratado con Berro-Lacto, los controles positivos y negativo son estadísticamente iguales, como se muestra en la figura 65.

Se observa que la expresión de IL-10 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.87 ± 0.13 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.41 ± 0.07 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.98 ± 0.12 y para el grupo de Berro-Lacto fue de 11.49 ± 0.854 .

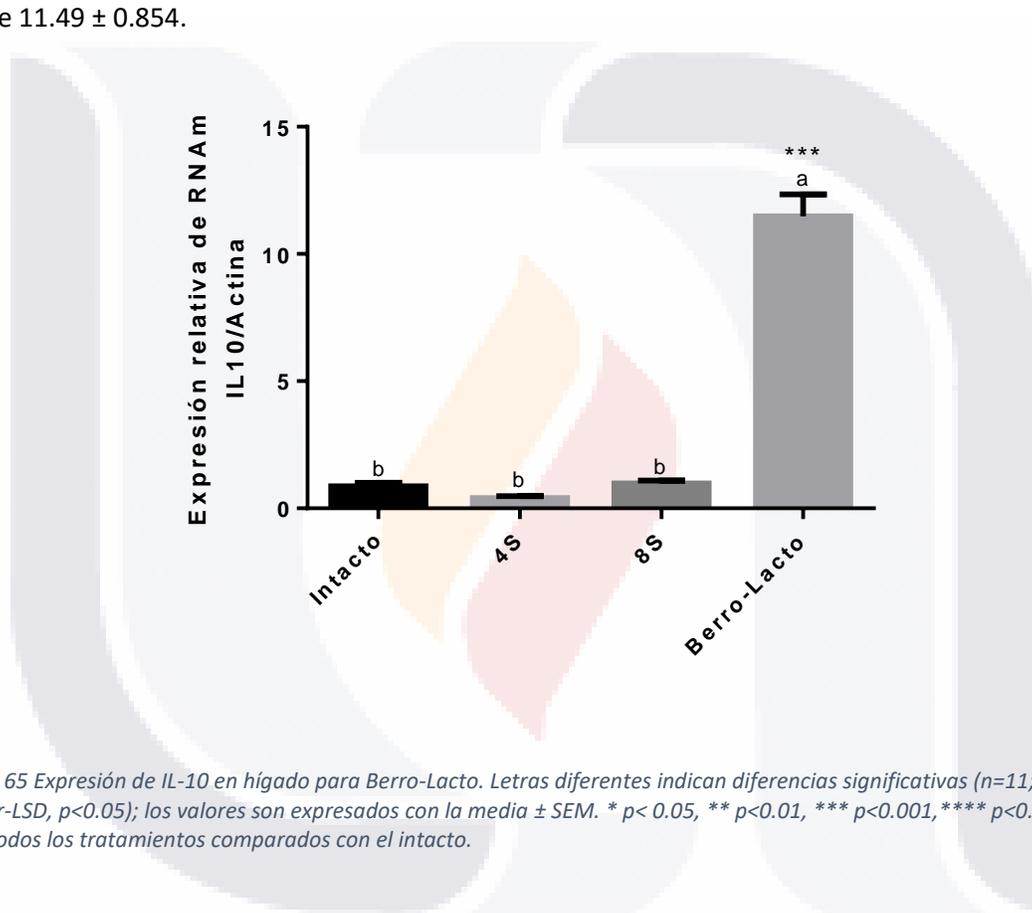


Figura 65 Expresión de IL-10 en hígado para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.4.3 Colágena en hígado

La expresión de colágena en hígado tuvo mayor expresión en el grupo Berro-Lacto, mientras que el grupo intacto fue el que presentó los menores valores, como se muestra en la figura 66.

Se observa que la expresión de colágena en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.05 ± 0.06 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 4.06 ± 0.31 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 3.70 ± 0.28 y para el grupo de Berro- Lacto fue de 6.74 ± 0.21 .

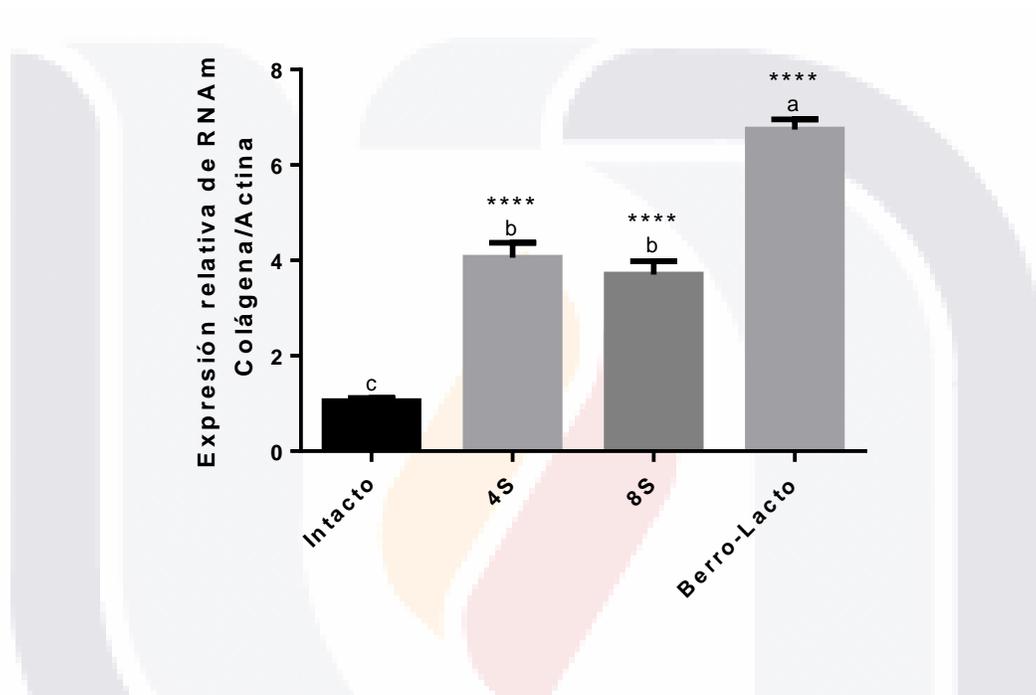


Figura 66 Expresión de Colágena en hígado para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.4.4 IL-10 en intestino

La expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 en colon, fue mayor para el grupo intacto y el grupo de Berro-Lacto, que son estadísticamente iguales y menor para los controles positivos de las cuatro y ocho semanas, estadísticamente iguales, como se muestra en la figura 67.

Se observa que la expresión de IL-10 en intestino (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.06 ± 0.08 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.38 ± 0.00 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.40 ± 0.07 y para el grupo de Lactos fue de 1.46 ± 0.31 .

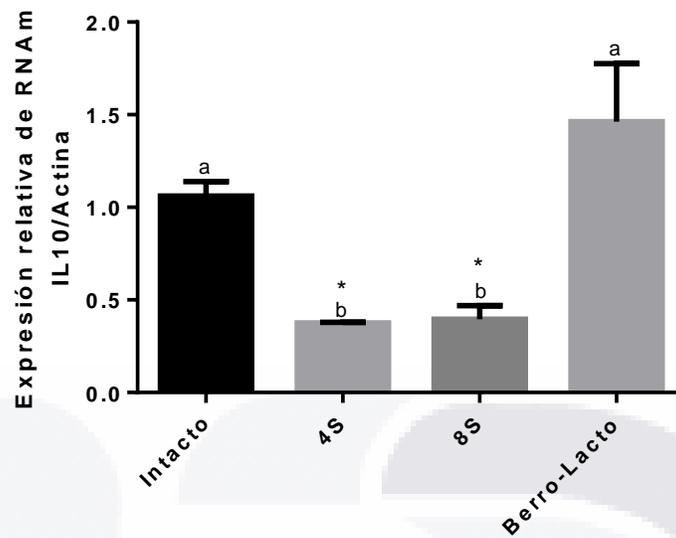


Figura 67 Expresión de IL-10 en intestino para Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=11; Fischer-LSD, p<0.05); los valores son expresados con la media ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 para todos los tratamientos comparados con el intacto.

5.4.5 Pesos semanales de las ratas vivas (Berro-Lacto)

El comportamiento de los controles y del extracto de Berro-Lacto se observa en la tabla 46:

Tabla 31 Pesos semanales de las ratas control y tratamiento de Berro-Lacto

GRUPO	PESO PROMEDIO (g)							
	SEMANA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Intacto	135.5 ± 0.0	174.3 ± 4.85	201.7 ± 7.67	228.6 ± 8.56	248.9 ± 12.05	261.9 ± 13.67	275.4 ± 14.76	291.8 ± 14.56
n	3	3	3	3	3	3	3	3
Control positivo 4S	189.7 ± 6.183	228 ± 4.80	242.5 ± 1.60	390.5 ± 1.86	-	-	-	-
n	4	3	3	3	-	-	-	-
Control positivo 8S	123.3 ± 2.65	161.8 ± 1.93	188.0 ± 3.71	204.9 ± 4.91	220.8 ± 5.24	233.0 ± 7.05	241.5 ± 10.78	252.1 ± 13.01
n	5	5	4	4	5	4	3	3
Berro-Lacto	192.2 ± 3.92	216.7 ± 4.58	224.0 ± 6.67	236.9 ± 7.90	223.2 ± 18.57	245.6 ± 17.40	248.5 ± 13.35	261.1 ± 12.50
n	3	3	3	3	3	2	2	2
TODOS	157.2 ± 8.65	190.4 ± 8.01	212.0 ± 6.53	260.6 ± 21.02	229.1 ± 6.82	245.4 ± 7.22	256.0 ± 8.70	269.2 ± 9.58
N	15	14	13	13	11	9	8	8

Expresados con la media ± SEM

Para la semana 1 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 68.

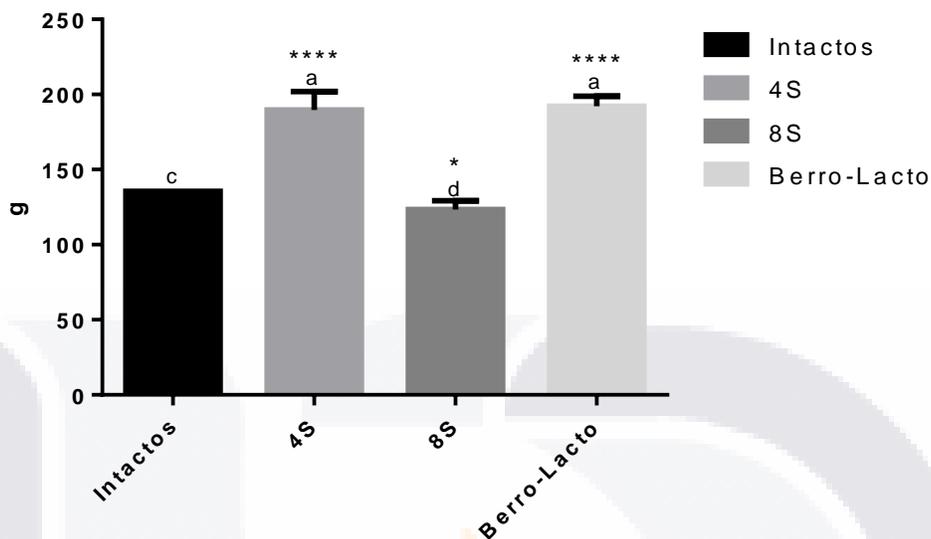


Figura 68 Pesos de la semana 1 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 2 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 69.

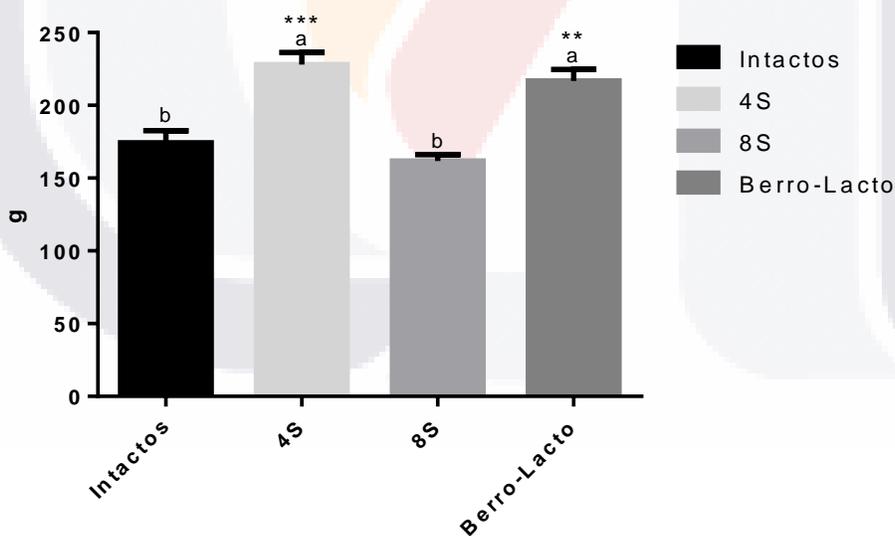


Figura 69 Pesos de la semana 2 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 3 se observa diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 70.

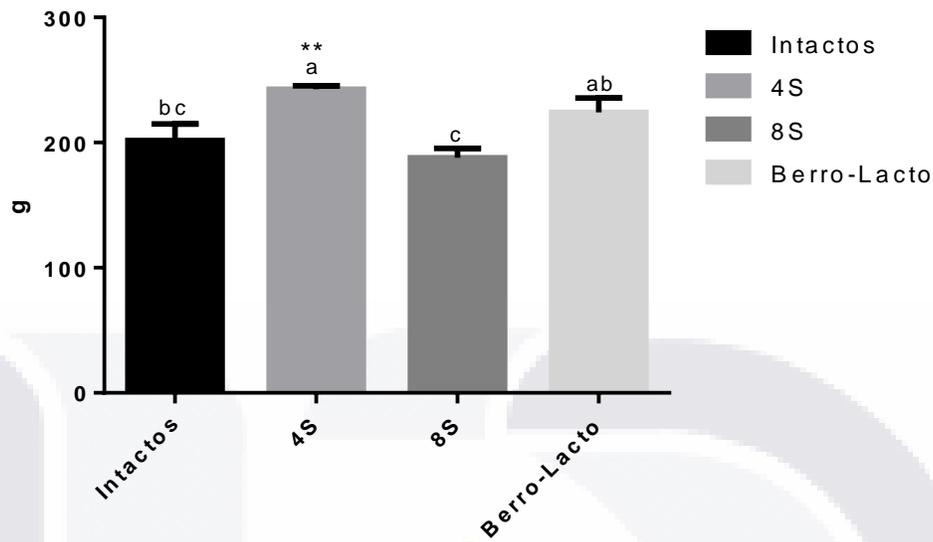


Figura 70 Pesos de la semana 3 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 4 se observa que no hay diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 71.

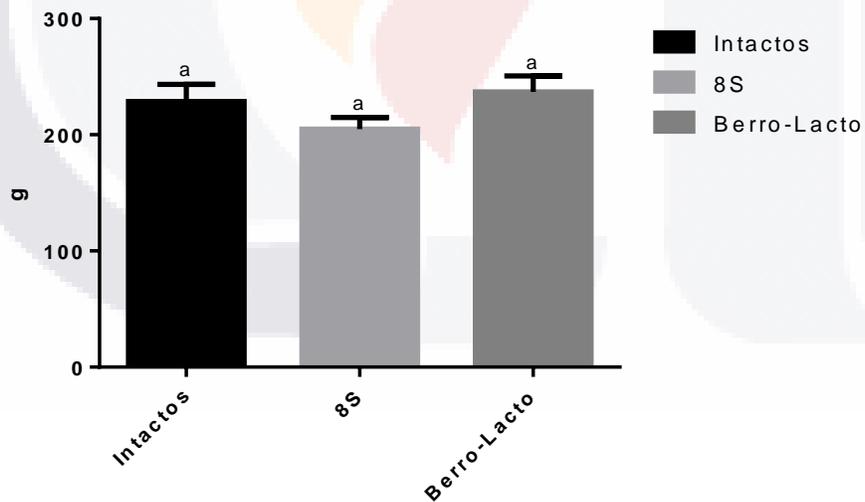


Figura 71 Pesos de la semana 4 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 5 se observa que no hay diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 72.

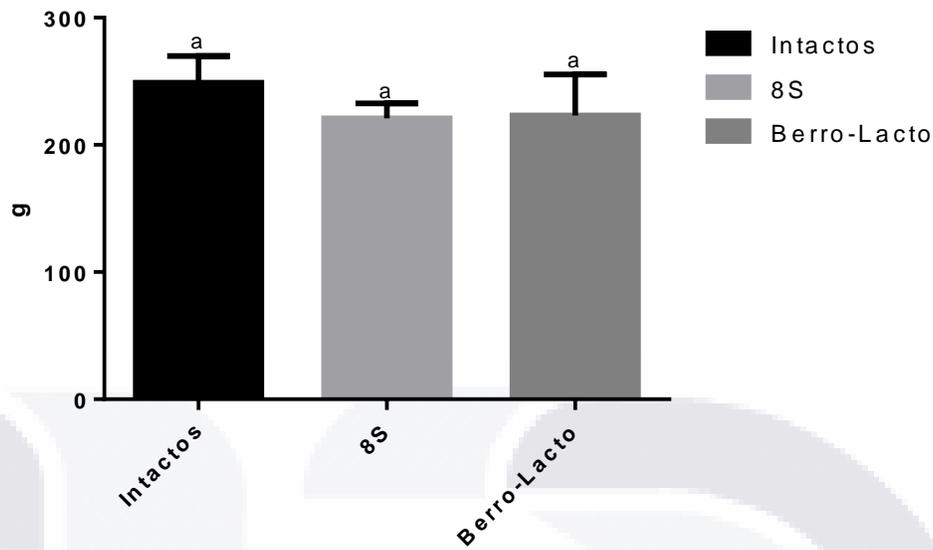


Figura 72 Pesos de la semana 5 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 6 se observa que no hay diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 73.

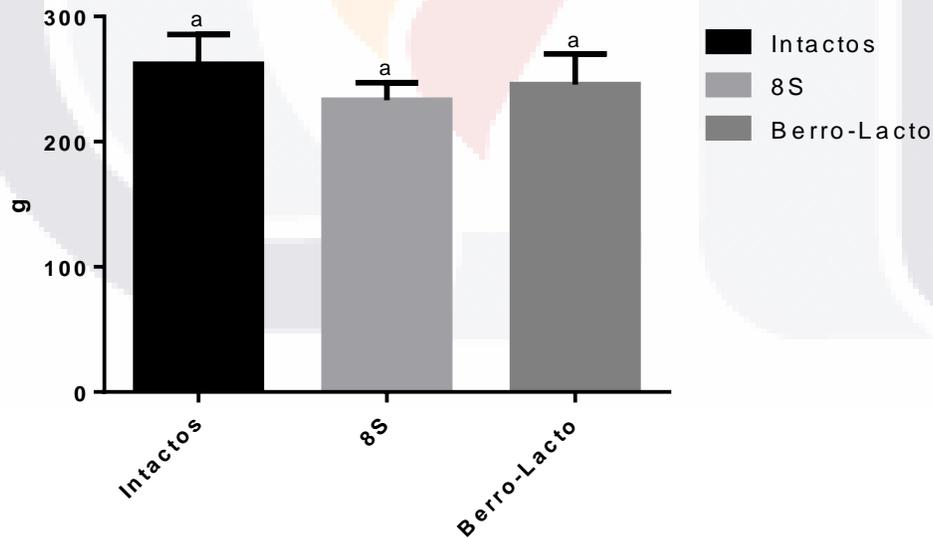


Figura 73 Pesos de la semana 6 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 7 se observa no hay diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 74

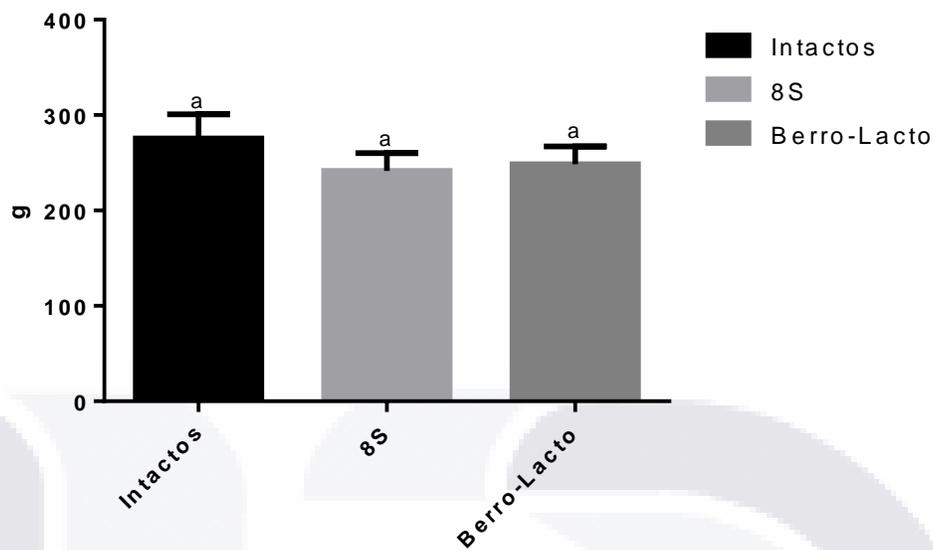


Figura 74 Pesos de la semana 7 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

Para la semana 8 se observa que no hay diferencia entre los grupos, como lo muestra la figura 75.

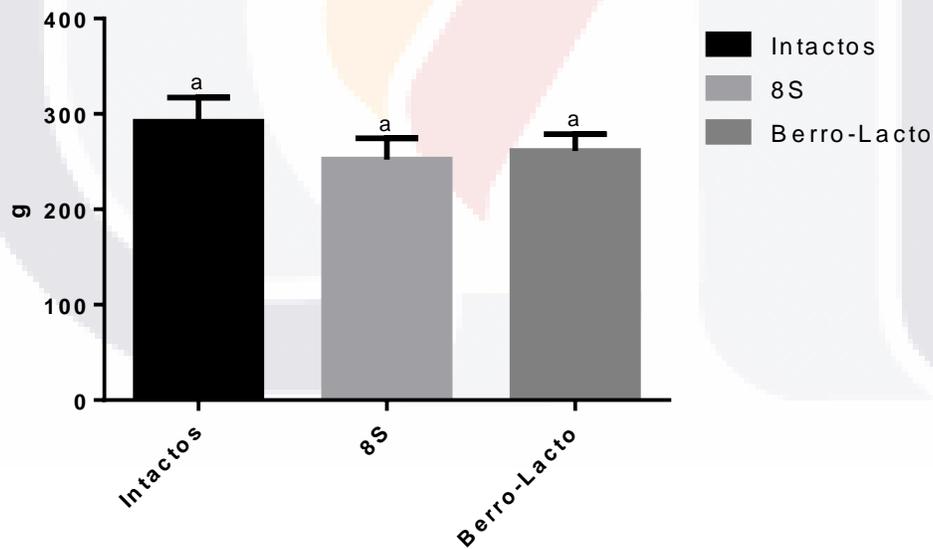


Figura 75 Pesos de la semana 8 Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (n=16; Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

A continuación, se muestran en la figura 76 los gráficos de todas las semanas en una sola vista:

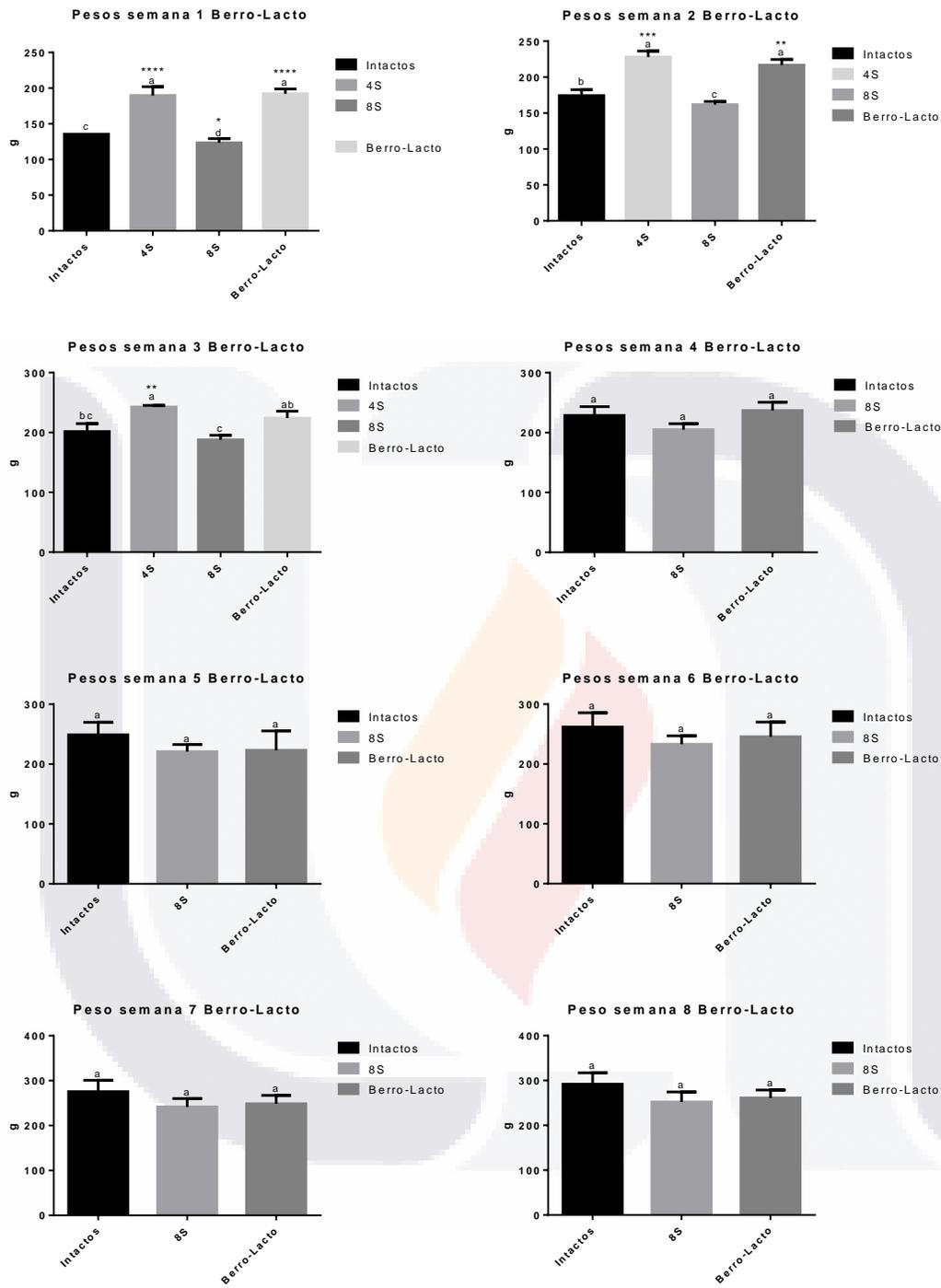


Figura 76 Pesos de las 8 semanas Berro-Lacto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Fischer-LSD, $p < 0.05$); los valores son expresados con la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto.

6. DISCUSIONES

6.1 Comportamiento de las ratas durante las 8 semanas

6.1.1 Distribución de grupos

Se conformaron seis grupos, cada uno con alrededor de cuatro ratas Wistar macho; en total, 26 ratas. Al finalizar las ocho semanas de experimentación, debido al modelo fibrótico utilizado el número de ratas que sobrevivieron al experimento fueron 21.

El modelo utilizado es mediante la inducción de fibrosis a través de CCl_4 . Con la dosis utilizada de CCl_4 en este experimento (0.8 mL/kg) se logró obtener fibrosis hepática a partir de la cuarta semana del experimento, debido a que el CCl_4 activa a las células de Kupffer y generan respuesta inflamatoria, liberando citocinas que a su vez activan a las células estelares hepáticas y generan fibrosis hepática (Yanguas et al., 2016). A partir de la cuarta semana se administraron los tratamientos correspondientes, una vez asegurando que había iniciado el proceso de fibrosis hepática.

La dosis utilizada en este experimento (0.8mL/kg) está pensada para generar fibrosis, no cirrosis, y está muy lejos de las dosis letales reportadas para el tetracloruro de Carbono (4.7–14.7 mL/kg de peso del animal), dependiendo de las condiciones nutricionales y los suplementos administrados (Scholten et al., 2015), o 5mL/kg de peso (McLean, McLean, y Sutton, 1969), que entra dentro del rango de Scholten y colaboradores.

La dosis utilizada concuerda con las estrategias de rutina utilizadas para la inducción de fibrosis, en las que se inyecta vía intraperitoneal de 2 a 3 veces por semana durante 4 a 12 semanas dosis en el rango de 0.3-2 mL/kg de peso de la rata (Chang, 2005; Lee et al., 2005; Mayuren, Reddy, Priya, y Anusha, 2010; Scholten et al., 2015; Starkel y Leclercq, 2011; Yanguas et al., 2016).

En principio, el CCl_4 puede administrarse mediante la inyección IP, inhalación y la sonda gástrica. Se optó por la vía intraperitoneal, ya que es más rápida, tiene buenos rangos de supervivencia, facilidad de operación y seguridad (Scholten et al., 2015; Yanguas et al., 2016).

El CCl_4 actúa a través de la CYP2E1 y genera mediante biotransformación reacciones con radicales libres y procesos de peroxidación lipídica y es muy útil debido que tiene alta reproducibilidad y sus resultados pueden utilizarse para los humanos por lo que son altamente relevantes (Favari et al., 2013a; Liedtke et al., 2013; Weber, Boll, y Stampfl, 2003; Yanguas et al., 2016).

6.1.2 Supervivencia

La mortalidad de las ratas fue evaluada para todos los grupos. Al finalizar el experimento con duración de ocho semanas (56 días), cuatro semanas (28 días) para el control 4S, sobrevivieron 21 de las 26 ratas. Se obtuvo un 81% de supervivencia, con una mortalidad del 19%.

De los seis grupos, no hubo mortalidad en dos de ellos, el grupo intacto y el del tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus*. En los grupos de control positivo, donde únicamente se aplicó CCl₄, hubo tres muertes, dos para el control positivo de las ocho semanas y una para el control positivo de las cuatro semanas. Las otras dos muertes de las ratas fueron sacrificios realizados debido a su condición, estaban sufriendo y parecían tener dislocada la cadera y con el hueso frágil (como flojo, disuelto) al tacto. Estos sacrificios se realizaron en ratas que estaban bajo algún tratamiento con Berro, una en el grupo de Berro y la otra en la de Berro-Lacto, pero antes de que se le aplicara el lactobacilo.

La tasa de mortalidad obtenido en este trabajo es de 19%, que es bajo comparado con el estudio de (Chang, 2005; Dashit, et al., 1989). Chang, 2005, dice que al experimentar con CCl₄ en ratones tuvo una mortalidad del 40-100%, siendo su estudio de seis meses y utilizando 260 ratones del tipo FVB/N, a los que sometía a evaluación de fibrosis cada cuatro semanas. Dashit et al., 1989 tuvieron 27% de mortalidad en un estudio realizado durante 16 semanas, con 11 ratas Wistar macho (170-200g), con administración intragástrica una vez por semana de CCl₄, habiéndoles administrado fenobarbital (350mg/L durante 14 días) previamente. Fortea et al., 2018 tuvieron un rango de mortalidad de 18.42%, similar al obtenido en el presente estudio; ellos experimentaron con 38 ratas Sprague-Dawley, teniendo tres grupos, el grupo 1: control, al cual no se le suministró CCl₄ (n=11 ratas), grupo 2: ratas con CCl₄ una vez a la semana (n=12 ratas) y grupo 3: ratas con CCl₄ dos veces a la semana (n=15 ratas). En el grupo control no murió ninguna rata. Del grupo 2 murió un 17%, es decir, dos ratas, en la semana 13. Del grupo 3 murió el 33%, 5 ratas. Por todo ello, en su experimento se tuvo una supervivencia del 81.58% y una mortalidad del 18.42%.

Desde 1969, McLean et al., propusieron un método que consiste en ajustar cuidadosamente las primeras seis dosis para obtener 80% de supervivencia. Ellos afirman que la dosis de tetracloruro de Carbono es muy importante en cuanto a supervivencia se refiere, ya que a bajas dosis aumenta la supervivencia, aunque reduce la severidad de la cirrosis, y viceversa, utilizar dosis altas reduce el número de supervivientes por un aumento en la severidad de cirrosis (McLean et al., 1969).

En el presente estudio, la intención no fue provocar cirrosis, sino únicamente fibrosis, por lo que la dosis elegida fue intermedia de 0.8mL/kg, en el rango de dosis utilizadas generalmente (0.3 - 2.0 mL/kg) y concuerda con la tasa de supervivencia descrita por McLean et al., 1969.

Es importante considerar la duración a la que se exponen al CCl₄ los animales, pues (Muriel, Moreno, Hernandez, Chavez, y Alcantar, 2005) en su experimento, encontraron que tras la aplicación de CCl₄ (0.4 g/kg vía i.p., 3 veces por semana), durante un mes, no tuvieron mortalidad y al haber transcurrido dos meses comenzó la mortalidad con un 5.55%, seguida de un 26.6% a los tres meses y llegando a 55.5% al cuarto mes. En ese punto se dejó de administrar CCl₄ por dos meses y aún así continuó aumentando la mortalidad, hasta llegar al 97.5%.

6.1.3 Análisis macroscópico del hígado

Los hígados del grupo intacto, control negativo, es decir, aquel que no recibió ni inducción a fibrosis ni tratamiento, presentan aspecto normal, con característico color rojizo pardo sin alteración visible de la superficie hepática; lo cual demuestra que el hígado recibió un aporte de sangre correcto, con buen flujo sanguíneo y funcionamiento normal (Sibulesky, 2013), ya que no hubo alteraciones en su estructura ni color, con respecto a los controles positivos.

La fibrosis puede adoptar diferentes patrones morfológicos: parcheada, bandas perilobulares finas o gruesas y/o manguitos perivasculares, así como esteatosis irregular frecuentemente observada en pacientes con cirrosis de etiología alcohólica que continúan bebiendo (Raichholz, Giménez, Froullet, de Köning, y Sañudo, 2016).

Los hígados del grupo control positivo de las ocho semanas (8S) presentan una superficie rugosa debido a la gran cantidad de pequeños gránulos que se forman por los muy marcados nódulos de regeneración al formarse las bandas de colágeno en el parénquima subyacente, resalta la presencia de un color rojo más pálido respecto a los hígados intactos.

Los hígados del grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), muestran superficie rugosa y granular, coloración pálida, con excepción de uno de ellos que muestra el color característico del hígado sano, sin embargo, tiene presencia de nódulos indicando formación de bandas de colágeno en el parénquima.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Aunque la mayoría de hígados dañados muestran márgenes nodulares, existe un número menor de hígados cirróticos que presentan un parénquima heterogéneo (Raichholz et al., 2016), como sucedió con el hígado del grupo control positivo de las cuatro semanas.

Los márgenes de la glándula heoática deben ser lisos, como se observa en el control negativo, grupo intacto, pero en la cirrosis suelen tornarse nodulares debido a la presencia de innumerables nódulos de regeneración (Raichholz et al., 2016), en este caso debido a que es un modelo de fibrosis y no de cirrosis, se encuentran presentes dichos nódulos pero en menor cantidad.

Los hígados de los controles positivos muestran cambios de coloración y alteraciones en su estructura, característicos de la degeneración y cicatrización del parénquima, y se observa la formación de nódulos regenerativos debido a la fibrosis circundante en el parénquima característicos de daño hepático. El color del hígado sano es rojo oscuro, color marrón, el cual se ve alterado en los controles positivos, los cuales presentan ya un color parduzco, debido a que comienza a haber resistencia al flujo; en una cirrosis, que es la etapa siguiente a la fibrosis, se desarrolla hipertensión portal, hay rigidez en el hígado y aumenta la resistencia al flujo y, en consecuencia, la sangre se desvía por fuera del hígado y se van formando nuevos vasos dilatados que derivan la sangre de la circulación portal a la sistémica (Sibulesky, 2013). Aquí vemos que este modelo es de fibrosis, la cual se evidencia desde la inspección y análisis del hígado, por sus alteraciones y cambios morfológicos.

Los hígados tratados con Berro muestran una ligera formación de gránulos en su superficie y presentan color rojo pálido.

Los hígados tratados con *Lactobacillus rhamnosus* muestran en su mayoría una superficie lisa con color rojo característico del hígado sano, sólo dos hígados (L2 y NL1) muestran una superficie ligeramente rugosa y pálida, además el hígado NL1, es el único que presenta depósitos de grasa superficiales.

Los hígados tratados con Berro-Lacto muestran en la superficie hepática depósitos de grasa y aspecto liso, con coloración rojo pálido.

Los hígados tratados sólo con Berro, sólo con *Lactobacillus rhamnosus* y con Berro-Lacto están más parecidos a las características histopatológicas mostradas por el grupo intacto que a lo que muestran los dos controles positivos, a pesar de que mantuvieron por el mismo periodo y la misma dosis de CCl₄ que se le aplicó al control positivo de las ocho semanas. A su vez, el control positivo de

las cuatro semanas (4S), nos muestra la apariencia que tenían todos los hígados de los grupos con inducción fibrótica (es decir, todos con excepción del intacto). Así que la mejora observada por parte de los grupos tratados con respecto a los controles positivos indican que los tratamientos están funcionando y evitan el deterioro natural (observado en el control positivo 8S) que debería proseguir a la continua aplicación del CCl₄.

6.1.4 Análisis histopatológico

Domitrović, Jakovac, Marchesi, y Blažeković, 2013 , encontraron que al haber intoxicación por CCl₄ y su subsecuente estrés oxidativo, hay pérdida del peso corporal, daño hepatocelular, y liberación de aminotransferasas y ALP al torrente sanguíneo.

El edema celular, también llamado cambio balonizante o degeneración balonizante, es el aumento del volumen celular y ocurre como respuesta al estrés oxidativo generando un evento fisiológico que afecta de manera importante el metabolismo celular como respuesta al estrés oxidativo, así como también puede ser una respuesta al daño celular por depleción de ATP, alteración de la membrana celular con disrupción de la malla de filamentos intermedios citoplasmáticos (López Panqueva, 2017).

La esteatosis es la acumulación de glóbulos de grasa en el citoplasma de los hepatocitos; reflejan una falta de balance entre la síntesis y la secreción de lípidos (López Panqueva, 2017; Roy et al., 2018). La esteatosis juega un papel importante en la progresión de la enfermedad. La mayoría de los estudios muestran que existe una correlación entre la presencia y severidad de la etapa de fibrosis; además, la esteatosis puede contribuir a la progresión del daño hepático mediante la regulación de mediadores de apoptosis en hepatocitos. Cabe mencionar que la esteatosis influye de manera negativa en la respuesta que se tiene ante tratamientos antivirales cuando se quiere tratar por casos de virus de hepatitis C (Dancygier, 2010a). La presencia de esteatosis muchas de las veces viene acompañada de inflamación, edema en el hepatocito y fibrosis y eventualmente cirrosis (Roy et al., 2018).

Infiltrado inflamatorio. El infiltrado inflamatorio está asociado con la fibrosis, ya que al existir inflamación crónica se activa el proceso fibrogénico; hay citocinas proinflamatorias que pueden contribuir inicialmente a la regulación de factores angiogénicos en el hígado, pero tras una extensa fibrosis, como resultado de condiciones hipóxicas, existe una sobreexpresión significativa en los factores angiogénicos en todo el órgano, ahora cirrótico, que mantiene la inflamación crónica y el proceso fibrogénico (Ginès, Kamath, y Arroyo, 2011b). Existe relación entre la inflamación y la

angiógenesis, que puede comprenderse considerando que muchos mediadores inflamatorios, que en el caso de las enfermedades crónicas hepáticas son liberadas por los leucocitos y hepatocitos dañados (por ejemplo: factor de necrosis tumoral alfa, interleucinas: IL-1, IL-6, IL-8, prostaglandinas), tienen actividad angiogénica directa, y a su vez estimulan a otras células a producir factores angiogénicos potentes. La angiogénesis contribuye a continuar y amplificar el estado inflamatorio debido a que expresa moléculas de adhesión y citocinas que promueven el reclutamiento de células inflamatorias (Ginès et al., 2011b). En daño hepático alcohólico y NAFLD, la inflamación es mediada principalmente por los macrófagos, mientras que las células de Kupffer exhiben un fenotipo (M2) antiinflamatorio. Los neutrófilos son rápidamente reclutados hacia los sitios de inflamación aguda (Koyama y Brenner, 2017).

El control negativo (grupo intacto), mostró una morfología normal en hígado, es decir, hepatocitos bien definidos, sanos, sin presencia de edema, sin esteatosis y sin infiltrado inflamatorio. También mostró una morfología normal en intestino grueso, con sus capas de epitelio, mucosa, submucosa y muscular bien definidas y sanas; no hubo desprendimiento epitelial ni infiltrado inflamatorio.

El control positivo de la cuarta semana (4S), mostró un acentuado daño en hígado, presentando esteatosis multivesicular (macro y microvesicular), gran cantidad de edema y casos de infiltrado inflamatorio (desde leve hasta predominante), parénquima hepático dañado, así como fibrosis incipiente y ligera. El intestino también se observa dañado, con desprendimiento epitelial, en algunos casos con infiltrado inflamatorio y hasta presencia de necrosis epitelial.

El resultado anterior coincide con los estudios en los que encontraron asociaciones significativas entre la actividad inflamatoria y la fibrosis así como la esteatosis y la fibrosis (Kielland et al., 2014). El daño en hígado es severo, pues se habla de casos severos cuando hay esteatosis extendida más allá de la zona 3 y se extiende hacia las triadas portales (Butler, 1974). La esteatosis macro vesicular se ha visto en un amplio rango de insultos hacia el hígado, que incluyen alcohol, diabetes mellitus, síndrome metabólico, obesidad, malnutrición, desórdenes metabólicos, hepatitis viral, fármacos y toxinas (López Panqueva, 2017; Milroy, 2018), consistente con el uso del tóxico CCl₄. La esteatosis macro y microvesicular observada, se encuentra diseminada a lo largo de todo el parénquima, por lo tanto, es indicativa de que es un caso con daño severo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Este control positivo 4S en el que se observa tanto daño e incluso se ve la presencia de fibrosis, es un buen control positivo, ya que asegura que, a la cuarta semana, todas las ratas se encontraban con esa cantidad de daño en el hígado y los tratamientos aplicados iban dirigidos contra fibrosis y no fueron aplicados a ratas con hígado sano, y dado que es consistente con el daño encontrado en el intestino, se hace claro que el daño ya estaba avanzado en ambos órganos.

El control positivo de la octava semana (8S) mostró estasis vascular, presencia de fibrosis y edema hepatocitario, núcleo agrandado en hepatocitos. Estas características evidencian el daño hepático. En el intestino se puede observar daño, hay presencia de infiltrado inflamatorio, así como desprendimiento epitelial y edema de la mucosa. La presencia de esteatosis hepática es asociada a un incremento en apoptosis del hepatocito y a daño hepático (Chakraborty, Oakley, y Walsh, 2012; Wang, Wei, y Pagliassotti, 2006). Dicha apoptosis de los hepatocitos dañados estimula acciones fibrogénicas de los HSC, y debido a que no se retiró el CCl₄, la fibrosis no se resuelve (Bataller y Brenner, 2005). Ambos controles positivos, de ratas tratadas con C Cl₄ muestran esteatosis, lo cual concuerda con otros investigadores (Butler, 1974; Feng et al., 2010; Kielland et al., 2014; López Panqueva, 2017; Milroy, 2018) .

La apoptosis de los hepatocitos dañados en los controles positivos estimula acciones fibrogénicas de los miofibroblastos del hígado. Las células inflamatorias, ya sean linfocitos o células polimorfonucleares, activan HSC para que secreten colágeno. Las HSC activadas secretan citosinas inflamatorias, expresan moléculas celulares de adhesión, y modulan la activación de linfocitos. Por lo tanto, se vuelve un círculo vicioso en el que las células inflamatorias estimulan a las células fibrogénicas y viceversa (Bataller y Brenner, 2005).

Lo observado en el control positivo de las ocho semanas es muy útil ya que permite explicar el comportamiento que pareciera anómalo en cuanto a su perfil hepático, ya que no se ven elevadas en cantidades alarmantes sus enzimas marcadoras de daño hepático, pero su histopatología demuestra que se encuentra en apoptosis. La presencia de esteatosis hepática es asociada con un incremento en el estrés del retículo endoplásmico y a un subsecuente incremento en apoptosis hepatocitaria y a daño hepático (Chakraborty et al., 2012; Wang et al., 2006). La apoptosis puede ocurrir como respuesta a una infección viral, consumo excesivo de alcohol, mutaciones genéticas o a la exposición de cualquier clase de hepatocarcinógeno. Este modelo es de fibrosis hepática, que

es consecuencia de daño hepático crónico. Después de tener exposición a tóxicos los hepatocitos sufren apoptosis, y las células estelares hepáticas migran al sitio de daño para deglutir los cuerpos apoptóticos, lo cual promueve la activación de dichas células estelares hepáticas hacia miofibroblastos y en su estado activo estas células promueven la deposición de MEC y formación de cicatrices en el hígado (Chakraborty et al., 2012); hay inducción continua de apoptosis de hepatocitos y fibrogénesis (Wang et al., 2006).

Para el grupo de *Lactobacillus rhamnosus*, en hígado hay varios resultados, mientras que en algunos casos no se observan caminos de fibrosis ni estasis; para otros hay ligera esteatosis, fibrosis incipiente y ligero edema perinuclear e infiltrado inflamatorio y en todos los casos se observa que no hay lesión hepatocitaria. Sólo hay un caso de los seis (L6), en que se observa que hay presencia de tabiques de fibrosis formando nódulos. En cuanto al intestino, está normal, similar al intacto en la mayoría de los casos, sólo una rata presentó mucosa ligeramente desprendida (L6).

Para el grupo de berro, en hígado se observa que hay edema hepatocitario y estasis vascular ligera, sin fibrosis, y únicamente hubo un caso de fibrosis ligera en tabiques, y otro de escasa esteatosis. El intestino se observa sano, similar al intacto.

Para el grupo de berro-lacto, en hígado se observa que hay infiltrado inflamatorio, edema perinuclear, ligera esteatosis, y presencia de fibrosis, desde incipiente hasta formando nódulos. En cuanto a intestino se encuentra sano, sin embargo, un caso tiene ligero desprendimiento epitelial.

A diferencia del control positivo de las ocho semanas, en las que se muestra presencia de apoptosis, para el caso de los tratamientos con extracto de berro, *lactobacillus rhamnosus* y la combinación Berro-Lacto, hubo apoptosis de HSC activados y la regeneración de hepatocitos, degradando el colágeno debido a un incremento en la actividad de las MMP inducida por un decremento en la expresión de citosinas TIMP (Bataller y Brenner, 2005), es por esto que no se muestra tanto daño comparado con los controles positivos.

Los resultados de los estudios histológicos del grupo intacto y del grupo control positivo de las cuatro semanas concuerdan con la actividad enzimática medida en suero, similar a lo obtenido por Feng y colaboradores (2010).

6.2 Extracto de berro

6.2.1 Pesos de los hígados (Berro)

Los cambios en el peso del hígado pueden detectar y cuantificar los efectos producidos por hepatotoxinas, lo cual es de gran utilidad, pues su peso también puede verse alterado por neoplasias primarias o secundarias, es por esto que puede utilizarse como un parámetro informativo en estudios crónicos para detectar potencial carcinogénico (Cattley y Cullen, 2013).

Los pesos de los hígados (media \pm SEM) para los controles positivo, negativos y Berro van desde los 11.3 \pm 0.3g (grupo intacto) hasta los 12.8 \pm 0.6g (grupo control positivo de las 8S), sin embargo, todos los pesos de los hígados para los grupos son estadísticamente iguales.

Los pesos de los hígados no mostraron diferencias significativas, al igual que los experimentos realizados por Dutta y colaboradores (2018), ni por Uemitsu (1984) quienes no encontraron diferencia significativa de peso en los grupos a los que se les administró CCl₄ con respecto a los controles negativos (Dutta et al., 2018; Uemitsu, 1984). Además, aproximadamente el 25% de hígados cirróticos en su etapa final son normales en tamaño (Raichholz et al., 2016), por lo que no es raro encontrar que en estado fibrótico, los hígados no presenten diferencias significativas en peso con respecto a los controles negativos.

Esto difiere de algunos que han encontrado diferencias en el peso del hígado entre los controles positivos y el negativo, que han observado un incremento de peso en el hígado para los animales que recibieron CCl₄ (Al-Seení, El Rabey, Zamzami, y Alnefayee, 2016; Domitrović et al., 2013; Uemitsu, 1984) Domitrović y colaboradores (2013), observaron que el peso relativo del hígado (expresado en g de peso del hígado/100g de peso del animal) se vio incrementado en los ratones que fueron intoxicados con CCl₄, en comparación tanto con sus grupos controles como con los grupos en los que se observó regresión de fibrosis (Domitrović et al., 2013), explican que esto es debido a que la administración de CCl₄ causa en el hígado una rápida acumulación de triglicéridos debido a un bloqueo en la secreción de las lipoproteínas de baja densidad en los hepatocitos (Al-Seení et al., 2016). También difiere de algunos que reportan haber encontrado una baja de peso en los hígados dañados, debido generalmente a pérdida de masa funcional asociada con atrofia o un daño hepatocelular letal sin observar otros cambios, pero es mayormente observado en daños agudos (Cattley y Cullen, 2013), un estudio reportado por (Marhoume et al., 2017) encontró un decremento en el peso del hígado de las ratas tratadas con CCl₄ comparadas con el control negativo, esto se debió al desarrollo de necrosis en estos hígados.

El no haber encontrado diferencias significativas en los peso de los hígados de los controles y del grupo de berro, no es inusual como lo muestran otros estudios (Dutta et al., 2018; Raichholz et al., 2016; Uemitsu, 1984).

6.2.2 Perfil hepático (Berro)

Para conocer la función hepática, se analizaron los sueros de cada rata mediante la técnica de química seca para analizar los biomarcadores indirectos. Los cuales permiten realizar un perfil hepático para evaluar el estado del hígado en cuanto a su daño estructural e integridad funcional (Ebadollahi, Ghahremani, y Monsef, 2010).

Se analizan los biomarcadores séricos ya que han sido muy evaluados principalmente en referencia a su capacidad para determinar la etapa de fibrosis. Se han propuesto dos tipos: biomarcadores directos que reflejan el depósito o eliminación del MEC en el hígado; y los biomarcadores indirectos, que son los analizados en este apartado, los cuales incluyen moléculas soltadas a la sangre, inducidas por la inflamación, sintetizadas y reguladas o excretadas por el órgano como producto del proceso común alterado que es consecuencia del deterioro de la función hepática (Cequera y García de León, 2014).

6.2.2.1 ALT (Berro)

Las aminotransferasas no tienen función conocida en el suero, y tienen una relativamente corta vida-media en el orden de días. La elevación de ambas aminotransferasas (AST y ALT), significa un daño activo al hígado o a los otros órganos que las contienen; el nivel de elevación no se correlaciona con la severidad pero puede tener valor diagnóstico (Ginès et al., 2011b).

La alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima cuya función es catalizar la transferencia de grupos amino (alanino y aspartato) para producir ácido pirúvico y oxaloacetato. Se encuentra en abundancia en el citoplasma de los hepatocitos, donde su actividad es aproximadamente 3000 veces mayor que en suero. Cuando ocurre daño o muerte hepatocelular, existe la liberación de ALT hacia el torrente sanguíneo, incrementando sus niveles en suero lo cual es un reflejo de lesión o necrosis hepática. La ALT se considera una enzima que funciona como marcador específico del hígado, porque aquí es donde se encuentra principalmente, aunque también se encuentra en cantidades pequeñas en riñón, miocardio y músculo esquelético. Hay evidencias de que los niveles séricos elevados de ALT se asocian a mayor mortalidad por causa hepática. Por esto se ha sugerido que valores anormales de ALT podrían ser un buen marcador de riesgo hepático y metabólico (Tejos et al., 2013).

En el grupo control negativo (Intacto), los valores (media \pm SEM) de ALT fueron de 30 ± 1.16 U/L. Este promedio coincide con los valores normales de ratas Sprague-Dawley para ALT de 27 U/L, con un rango de (25-41 U/L) reportados en un experimento realizado durante 12 semanas por Fortea et al. (2018), también coincide con los valores reportados por (River, 1982) quien obtuvo un valor promedio de 32 U/L y un rango de (17-50 U/L).

El grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de ALT 822.0 ± 108.0 U/L. Y fue estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p < 0.0001$) con respecto al intacto. Esta liberación de ALT en el grupo indica que existe un daño o muerte hepatocelular, habiéndose incrementado los niveles de ALT 27.4 veces más que el grupo intacto, lo cual es un reflejo de lesión o necrosis hepática (Tejos et al., 2013). Esta elevación tan marcada es específica para necrosis hepática, debido a que la ALT se encuentra en hígado mientras que la AST puede encontrarse en diferentes órganos, y niveles tan elevados de ALT comparados con el grupo intacto ocurren en desórdenes asociados con lesiones hepatocelulares extensivas como hepatitis viral, daño isquémico hepático, y daño hepático inducido por medicamentos o toxinas. Estas condiciones son características por una pérdida extensa del parénquima hepático (Parmar et al., 2016). Consistente con el experimento, ya que este control positivo únicamente recibió CCl₄ sin ningún otro tratamiento antifibrótico. Estos resultados de elevación del ALT son similares a los encontrados por (Al-Seeni et al., 2016).

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S), tuvo niveles (media \pm SEM) de 52 ± 5.5 (U/L), este grupo es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las cuatro semanas, pero igual al grupo intacto y al de berro. Este grupo de las ocho semanas no recibió ningún tipo de tratamiento, fue inducción con CCl₄ durante las ocho semanas, y el control positivo 4S nos demuestra que sí tuvo daño significativo en el hígado a las cuatro semanas, por lo que, al continuar induciendo daño las células del parénquima hepático fueron aumentando el daño. La baja cantidad de ALT medida en sangre no se debe a que no hubiera daño hepático, se puede explicar sabiendo que cuando las células sufren gran cantidad de daño, y están en apoptosis, no hay elevaciones de ALT en suero (McGill, 2016), además se ha vuelto evidente en modelos hepáticos de apoptosis en hepatocitos que durante las fases iniciales de daño no hay elevaciones significativas de ALT en el suero (Bajt, 2000; Lawson, Fisher, Simmons, Farhood, y Jaeschke, 1998; Leist, Gantner, Bohlinger, Tiegs, y Germann, 1995; McGill, 2016), y este experimento es para inducir fibrosis y no cirrosis, es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

decir, la etapa inicial de daño, por lo que es consistente con encontrar niveles bajos de ALT. Estos resultados coinciden con los reportados por Fortea et al. (2018), que observaron en sus ratas inducidas una vez por semana con CCl₄, durante 12 semanas, niveles de ALT de 41 U/L con un rango de 28-61 U/L.

Se ha reportado que el CCl₄ produce radicales libres (Kumar, Sivaraj, Elumalai, y Kumar, 2009), Las enzimas ALT son proteínas, y cuando las células entran en estrés oxidativo, varios de sus puntos son oxidados lo que provoca que disminuya la actividad de muchas vías metabólicas, incluyendo la traslación, esto ocurre tanto en bacterias como en eucariontes. Parte de esta inhibición puede deberse a la inactivación oxidativa de varias enzimas involucradas en el metabolismo energético y en la síntesis de aminoácidos, ambas esenciales para la síntesis de proteína (Katz y Orellana, 2012).

Otra explicación para los niveles bajos encontrados en ALT puede ser que las células se están muriendo por apoptosis. Los niveles de ALT son inicialmente bajos cuando se usan tratamientos inductores de apoptosis hepática, esto debido a que la muerte celular por apoptosis se puede pensar como una implosión de la célula; un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular. Por el contrario, una necrosis oncótica, que pudiera pensarse como la explosión de la célula, puede ocurrir en algunas células de manera secundaria tras haberse inducido su apoptosis. De hecho, las características de la apoptosis son observadas claramente en modelos hepáticos de apoptosis en hepatocitos durante las fases iniciales de daño ya que no hay elevaciones significativas de ALT en el suero. La elevación de ALT se incrementa dramáticamente durante la última etapa, cuando ocurre necrosis secundaria, ya sea como resultado del daño directo al hepatocito o a inflamación (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

Los grupos de Intactos, control positivo de las ocho semanas (8S) y el grupo de Berro, fueron los que menores niveles de ALT presentaron, siendo estadísticamente iguales entre ellos ($p < 0.05$), comparados con el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), el cual muestra una diferencia significativa ($p < 0.0001$) con respecto al grupo intacto.

El grupo de intactos y el de berro se comportan de la misma manera, siendo los que expresan menores niveles de ALT debido a que no existe daño en el hígado (Ginès et al., 2011b; Tejos et al., 2013).

Los niveles presentados por el grupo control positivo de las cuatro semanas, que son 27.4 veces más a las presentadas por las ratas sanas del grupo intacto, demuestran daño en hígado, lo cual confirma

que todas las ratas (con excepción del intacto) a las cuatro semanas tuvieron daño o muerte hepatocelular, así como pérdida extensa del parénquima hepático (Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013).

Es por esto que, en el grupo de las cuatro semanas es lógico encontrar bastante daño en los hepatocitos, y es consistente con el daño celular tan elevado encontrado en el análisis histológico, así como esteatosis y edema. Además, se encontró que es el grupo en el que todas sus ratas tuvieron infiltrado inflamatorio en hígado y una en colon. De todos los grupos, éste fue el que tuvo los mayores niveles de ALT tanto de manera individual como en promedio. Lo que nos indica este alto promedio es que la fibrosis ya ha comenzado, y es consistente con la fibrosis observada. Este control de cuatro semanas fue realizado precisamente para demostrar que ya había daño hepático cuando se comenzaron a administrar los tratamientos, para poder evidenciar si eran efectivos contra la fibrosis y de esta manera, fuera válido comenzar a aplicar los tratamientos a la cuarta semana como lo indica el modelo. Y con esto queda confirmado que fue un buen momento para iniciar con los tratamientos.

6.2.2.2 AST (Berro)

Las aminotransferasas no tienen función conocida en el suero, y tienen una relativamente corta vida-media en el orden de días (Ginès et al., 2011b). Dentro de los marcadores de daño hepático, ALT y AST son los más comunes usados para diagnósticos clínicos así como para investigación que implique daño al hígado (McGill, 2016). Esto es debido a que la elevación de ambas aminotransferasas (AST y ALT), significa un daño activo al hígado o a los otros órganos que las contienen; sin embargo, el nivel de elevación no se correlaciona con la severidad pero puede tener valor diagnóstico (Ginès et al., 2011b).

La AST es una aminotransferasa que cataliza reacciones de transaminación. Existen dos formas de isoenzimas de la AST que genéticamente son distintas, la mitocondrial y la citoplasmática. La elevación en el torrente sanguíneo de la AST mitocondrial puede observarse en enfermedades crónicas hepáticas como degeneración del tejido hepático y necrosis. Sin embargo, se encuentra en mayores concentraciones en el corazón comparada con otros tejidos del organismo como: hígado, músculo esquelético y riñón; por lo que una elevada concentración de AST mitocondrial se observa en necrosis tisular extensiva durante el infarto al miocardio. Alrededor del 80% de la actividad AST proveniente del hígado es contribuida por la isoenzima mitocondrial, mientras que la mayor parte del AST circulante en personas sanas se deriva de la isoenzima citoplasmática. Las elevaciones de

AST predominan comúnmente en pacientes cirróticos e incluso con enfermedades hepáticas en las que típicamente tienen elevado su ALT (Gowda et al., 2009).

La liberación de enzimas mitocondriales del hígado es considerada por varios autores como una fuerte evidencia de que existe necrosis hepática, y también es asociada con enfermedades hepáticas específicas, en este caso, la AST se ha propuesto como un marcador de alcoholismo crónico (Contreras-Zentella y Hernández-Muñoz, 2016).

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de 131.3 ± 8.97 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 961.0 ± 73.80 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 214.3 ± 43.32 (U/L) y el tratamiento con Berro mostró valores de 46.33 ± 2.73 (U/L). Los niveles de AST para el grupo intacto y el de berro se comportan de manera similar.

En el grupo control negativo (Intacto), los valores (media \pm SEM) de AST fueron de 131.3 ± 8.97 U/L. Estos fueron de los más bajos y caen dentro de lo esperado según el rango de valores hematológicos específicos para AST ($65.8 - 266.2$ U/L), en ratas macho Sprague Dawley, reportado por Caridad, Diuris, y Amelia, (2011).

El grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de AST 961.0 ± 73.80 U/L. Y fue estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando diferencia estadística significativa ($p < 0.0001$) con respecto al intacto. Esta elevación de AST es indicativa de daño hepático (Al-Seeni et al., 2016; Contreras-Zentella y Hernández-Muñoz, 2016) y es consistente con que este mismo grupo es el que más altos niveles tiene de ALT.

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S), tuvo niveles (media \pm SEM) para AST de 214.3 ± 43.32 U/L, este grupo es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las cuatro semanas. Y aunque son estadísticamente iguales al grupo intacto y al grupo berro, su análisis histológico confirma que no haber encontrado elevaciones en sus niveles de AST se debe a que el hígado y sus hepatocitos se encuentran en apoptosis, lo cual genera la disminución en la actividad de muchas vías metabólicas, síntesis de aminoácidos y baja síntesis enzimática (Katz y Orellana, 2012). Además la apoptosis hepática encontrada en el análisis histopatológico explica los niveles bajos de AST, pues la apoptosis es muerte celular por implosión de la célula, un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016)

El grupo de berro tuvo valores (media \pm SEM) de AST de 269.0 ± 69.51 U/L, comportamiento similar al grupo intacto. Y es congruente con sus análisis histológicos, los cuales, muestran ausencia de fibrosis, ausencia de esteatosis e intestino sano, únicamente un caso muestra ligera fibrosis incipiente, que se explica porque de manera crónica tuvo inducción de daño con CCl_4 .

Los grupos de Intactos, control positivo de las ocho semanas (8S) y el grupo de Berro, fueron los que menores niveles de AST presentaron, siendo estadísticamente iguales entre ellos ($p < 0.05$), comparados con el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), el cual muestra una diferencia significativa ($p < 0.0001$) con respecto al grupo intacto. El grupo intacto y el de berro se comportan de manera similar tanto en sus niveles enzimáticos de AST como en su estado histológico.

El control positivo de las ocho semanas, a pesar de tener niveles de AST bajos y estadísticamente iguales al intacto y al berro, no es indicativo de que el hígado se encuentre sano, sino porque la célula implosiona en el proceso de apoptosis como se muestra en sus análisis histológicos y como consecuencia no hay liberación enzimática al torrente sanguíneo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

6.2.2.3 Urea (Berro)

El hígado tiene diversas formas de desintoxicación. El amonio (NH_4^+) se deriva principalmente de la flora bacteriana del colon mediante la degradación de proteínas y urea. Los iones amonio se desprotonan fácilmente al citotóxico y neurotóxico amoniaco (NH_3), y por lo tanto deben detoxificarse al máximo. El hígado produce y metaboliza el amonio a través del ciclo urea/ornitina. La desintoxicación de amonio en el hígado depende de dos sistemas: el ciclo urea/ornitina, que es el principal para la desintoxicación de amonio, y el ciclo del glutamato, que no es específico del hígado (Ginès et al., 2011b).



Ilustración 1 Ciclo de la urea (Jeremy, Tymoczko, y Stryer, 2008)

En el ciclo de la urea/ornitina, que es específico del hígado, amonio y bicarbonato se conjugan en la matriz mitocondrial mediante la ornitina transcarbamoilasa. La citrulina se metaboliza posteriormente en el citoplasma hasta convertirse en arginina para producir urea y dejando a la ornitina como un derivado. En cambio, el ciclo del glutamato conjuga el amonio con ácido α -cetoglutarico para producir glutamina, que representa la forma de transporte no tóxico para el amonio (Ginès et al., 2011b).

Podemos observar que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de urea de 38.00 ± 3.22 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 39.67 ± 3.18 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 45.00 ± 2.31 (mg/dL) y el grupo de berro de 46.33 ± 2.73 (mg/dL).

Todos los grupos muestran niveles de urea normales y estadísticamente iguales. Lo cual es consistente con Fortea et al. (2018), en donde tampoco hay variación en sus niveles de urea entre grupos.

Los niveles normales de urea para todos los grupos indican que el hígado está realizando de manera normal una de sus funciones que es el metabolismo proteico, en el cual, el amonio (NH_3) tóxico resultante de la desaminación (eliminar el amino NH_2) de los aminoácidos es convertido por el hígado en urea, para que pierda toxicidad y sea excretado en la orina (Tortora, 2013).

6.2.2.4 Albumina (Berro)

Los valores de albúmina en plasma representan el 75% para el mantenimiento de la presión oncótica y de manera cuantitativa es la proteína más importante del plasma. El promedio de albumina diaria producida por adulto humano es de 12-15g, cantidad que representa menos del 5% del total de albúmina de reserva en el cuerpo. Es producida exclusivamente por los hepatocitos. La larga vida-media (aprox. 20 días) de la albúmina, junto con el largo almacén reservado en el cuerpo, hacen de la albúmina un indicador poco confiable de la función de síntesis hepática en pacientes con daño hepático agudo. Por otro lado, en pacientes con enfermedad crónica hepática los niveles de albúmina sérica son un reflejo acertado de la función de síntesis hepática (Ginès et al., 2011b).

No hay diferencias significativas entre los grupos de control positivo, los controles negativos (tanto 4S y 8S) como el grupo de berro. Esto es consistente a los valores encontrados tanto en ratas sanas como en ratas expuestas a CCl₄ (Caridad et al., 2011; Fortea et al., 2018).

Los hepatocitos son los encargados de realizar el metabolismo proteico y además sintetizan la mayoría de las proteínas plasmáticas, como la albúmina, α y β -globulinas, protrombina y fibrinógeno (Tortora, 2013). La albúmina es un parámetro que puede ser utilizado para medir la capacidad sintética de los hepatocitos. Los niveles séricos disminuyen en fases avanzadas de la cirrosis (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008), en este caso se observan valores normales en todos los grupos, tal vez porque estamos bajo un modelo de fibrosis y no de cirrosis.

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de albumina de 2.73 ± 0.03 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 3.20 ± 0.21 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 2.93 ± 0.09 (mg/dL) y el grupo de berro de 2.73 ± 0.09 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de albumina estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

Para el grupo intacto y el grupo berro los valores de albúmina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas de todos los grupos continúan teniendo capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede ser similar en este aspecto para los grupos controles positivos, o puede ser que de acuerdo a las características histológicas de los grupos control positivo tanto de las cuatro semanas como de las ocho semanas, en las que se observa esteatosis, edema y estasis vascular, refleja un alto nivel de daño en hepatocitos, puede indicar apoptosis hepática y por ende una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular

(Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), consistente con los valores bajos encontrados en el control 8S para ALT y AST.

6.2.2.5 Fosfatasa alcalina (Berro)

Fosfatasa alcalina es un grupo de isoenzimas que hidrolizan varios ésteres de fosfato y, por tanto, generan fosfato inorgánico en pH alcalino, para su absorción por parte de los tejidos. Estas enzimas son dependientes de Zinc para su actividad. Están ampliamente distribuidas en el cuerpo, aunque las isoenzimas más importantes clínicamente se encuentran en hígado y hueso. Otras isoenzimas se encuentran en el intestino, placenta del primer trimestre y riñones (Ginès et al., 2011b).

La enzima se encuentra predominantemente en la membrana canalicular de los hepatocitos. La elevación de los sérica de los niveles de fosfatasa alcalina en enfermedades hepáticas parece ser resultado de la inducción de su síntesis por los ácidos biliares. El metabolismo de la fosfatasa alcalina no es mediada por el sistema hepático ni biliar (Ginès et al., 2011b).

El grupo de intacto tuvo valores (media \pm SEM) de fosfatasa alcalina de 249.7 ± 6.94 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 474.3 ± 54.67 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 314.7 ± 42.31 (U/L) y el grupo de berro de 280.7 ± 35.73 (U/L). Todos los grupos muestran niveles de fosfatasa alcalina estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

Los valores de todos los grupos para la Fosfatasa alcalina se encuentran por arriba de los valores normales reportados (River Charles, 1982; Thapa y Walia, 2007), sin embargo el rango de valores normales es sumamente amplio, va desde 39U/L hasta los 216 U/L aún, considerándose normales los extremos. Sin embargo, para el grupo intacto en el que también hay elevación de Fosfatasa alcalina sin muestra alguna de daño en hígado ni intestino como lo muestran sus análisis histológicos, puede deberse a que las ratas Wistar se encontraban en crecimiento, y esta es una razón por la que se ve incrementada la Fosfatasa alcalina. La Fosfatasa medida en el suero puede ser liberada no solamente por el hígado sino por los huesos, como sucede en los valores de fosfatasa alcalina en los niños, que se ve incrementada en las mismas proporciones que el crecimiento de sus huesos, debido a que están en etapa de crecimiento (Poupon, 2015; Sharma, Pal, y Prasad, 2014).

Para el grupo intacto y el grupo berro los valores (estadísticamente iguales) de Fosfatasa alcalina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas tienen sana su

capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede explicarse su elevación comparada con valores normales debido al crecimiento normal de las ratas (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014).

Para los controles positivos, se debe tener en cuenta que también se encontraban en la misma etapa de crecimiento, lo que de por sí reflejaría un aumento en la fosfatasa alcalina. Además los grupos control positivo tanto de las cuatro semanas como de las ocho semanas, en las que se observa esteatosis, edema y estasis vascular, refleja un alto nivel de daño en hepatocitos, puede indicar apoptosis hepática y por ende una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), consistente con los valores bajos encontrados en el control 8S para ALT, AST y urea. Y esa elevación puede ser tanto signo de que las ratas se encuentran en crecimiento como de que existe enfermedad hepática, ya que cuando los valores se ven por encima del rango 45-115 U/L, como sucede con todos los grupos positivos de este experimento indican enfermedad hepática (Thapa y Walia, 2007), consistente con sus análisis histológicos de hígado.

6.2.3 Análisis morfométrico (Berro)

El análisis morfométrico se realizó con las laminillas teñidas con Rojo Sirio. Las células estelares hepáticas (HSC), se activan mediante la estimulación de la síntesis y secreción de colágeno tipo I y tipo II y de fibronectina que promueve la formación de matriz extracelular (MEC) (Hasan, El-Desouky, Hozayen, y Abd el aziz, 2015).

La proteína más abundante de la MEC es la colágena, que determina la estabilidad mecánica del tejido conectivo. El colágeno tipo I es responsable de formar tejido maduro (Stumpf et al., 2001), mientras que el colágeno tipo III tiene menor fuerza mecánica y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Hrčkova, Velebný, y Solár, 2010; Stumpf et al., 2001).

El Rojo Sirio es un tipo de tinción específica de las proteínas MEC y pueden usarse para cuantificar el grado de fibrosis, y determinar el tipo de colágeno presente en la muestra (Bataller y Brenner, 2005), ya que la inflamación crónica del hígado se caracteriza por la acumulación de tejido conectivo fibroso (Poonkhum, Pradidarcheep, Nilbu-Nga, y Chaunchaiyakul, 2011). Su visualización es bajo luz polarizada y se observan en color rojo las fibras de colágena tipo I, y en color verde las fibras de colágena tipo III.

Tanto en condiciones normales como patológicas, el hígado consiste en componentes de la MEC, que incluye: colágenas intersticiales (tipo I y III) y colágena de la membrana basal (tipo IV) (Poonkhum et al., 2011), el hígado sano contiene cantidades aproximadamente iguales de colágeno tipo I y tipo III (Rojkind, 1979). Las fibras de colágena tipo I se encuentran formando tabiques cuando hay fibrosis (Hrčkova et al., 2010; Poonkhum et al., 2011). La colágena tipo I se encuentra en áreas más grandes en etapas avanzadas de fibrosis, y forma cápsulas y cicatrices en el hígado, mientras que la colágena tipo III, es menos abundante al haber más daño en hígado y se localiza principalmente en las lesiones fibrosas, lo que sugiere que cumplen una función específica de protección al huésped y en respuesta a un proceso de curación al tejido (Hrčkova et al., 2010).

El intestino sano consiste en colágena tipo I (68%), III (20%) y tipo V (12%) (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017). Durante los inicios de fibrosis en intestino, el rango de colágeno tipo III y colágeno tipo I se incrementa, en contraste con las últimas fases de la fibrosis en las que ese rango de colágena tipo III con tipo I disminuye (van Haaften et al., 2017). En la fibrosis de intestino, hay un incremento en ambos tipos de colágena (I y III), y la fibrosis se presenta para reparación de tejido o como respuesta a un estímulo patológico (Pantaroto, Lopes Filho, Pinto, y Antico Filho, 2015).

6.2.3.1 Porcentaje de colágena total (Berro)

El porcentaje de colágena total en hígado para el grupo intacto fue de 0.27 ± 0.05 % y para el intestino fue de 1.8 ± 1.6 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.98 ± 0.36 % en hígado y para el intestino fue de 4.33 ± 1.62 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 1.79 ± 0.67 % y para el intestino fue de 2.99 ± 1.52 %; para el grupo de berro en hígado fue de 1.05 ± 0.32 % y para el intestino fue de 2.38 ± 0.65 %.

Todos los grupos son estadísticamente iguales tanto para la colágena total en hígado como en intestino. A continuación, se compararán los tipos de colágena para cada grupo, para poder determinar si contienen el mismo porcentaje de colágena tipo I y colágena tipo III.

6.2.3.2 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino para Berro

El porcentaje de colágena tipo I (media \pm SEM) en hígado para el grupo intacto fue de 1.72 ± 0.99 % y para el intestino fue de 20.54 ± 8.57 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.59 ± 0.77 % en hígado y para el intestino fue de 19.21 ± 5.91 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 7.32 ± 1.72 % y para el intestino fue de 12.77 ± 5.49 %; para el grupo de berro en hígado fue de 3.81 ± 0.34 % y para el intestino fue de 14.23 ± 4.62 %.

Para la colágena tipo I en intestino todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), se ha observado que hay un incremento de colágena tipo I en el colon cuando existen tumores malignos, pero no en la enfermedad diverticular del colon (Pantaroto et al., 2015). En este caso, el daño fue dirigido al hígado, por fibrosis hepática inducida con CCl_4 , por lo que el daño no había llegado al intestino con tanta severidad. Además, en la fibrosis hay un incremento en ambos tipos de colágena (I y III), y la fibrosis se presenta para reparación de tejido o como respuesta a un estímulo patológico (Pantaroto et al., 2015). Por los análisis histológicos de colon se puede observar que, aunque si existe daño en los controles positivos, únicamente en uno del control positivo de la cuarta semana se observó necrosis, pero no en los restantes. Lo que concuerda con los resultados obtenidos del porcentaje de colágena tipo I encontrado en intestino.

En cambio, para la colágena tipo I en hígado, los grupos intacto, 4S y Berro son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) y el control positivo de las ocho semanas (8S) es el único estadísticamente diferente a los demás grupos ($p < 0.05$), y difiere del grupo intacto ($p < 0.01$).

El control positivo de las cuatro semanas contiene la misma cantidad de colágena tipo I en hígado que el grupo intacto, probablemente debido a que era una etapa inicial de la fibrosis, y la colágena tipo I no se encuentra tan presente en las etapas iniciales del daño hepático, se presenta en etapas más avanzadas (Hrčkova et al., 2010), sin embargo este control demuestra un severo daño hepático y presencia de fibrosis en sus análisis de perfil hepático y el de histología.

Para la colágena tipo I en hígado, el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) es el único estadísticamente diferente a los demás grupos ($p < 0.05$), y difiere del grupo intacto ($p < 0.01$), lo que concuerda con que fue el grupo que durante las ocho semanas recibió únicamente daño, sin ningún tratamiento. Esto demuestra que el tratamiento de Berro, que mantuvo la misma dosis de daño durante el mismo tiempo que el 8S, tiene una cantidad de colágena tipo I similar al intacto, y el tratamiento tiene una función antifibrótica. Ya que la colágena tipo I es la que se encuentra presente en lesiones hepáticas y es característica de la fibrosis hepática (Hrčkova et al., 2010; Poonkhum et al., 2011).

6.2.3.3 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino para Berro

La colágena tipo III, está más asociada a la protección del hospedero y como respuesta para participar en un proceso de curación al tejido (Hrčkova et al., 2010), que al daño hepático. Sin embargo, en estudios recientes se ha reportado que cuando ya hay mucho daño, en un modelo de cirrosis biliar hay incremento de colágeno tipo III en el hígado impulsado por el desarrollo de ascitis,

lo cual se muestra además en pacientes con cirrosis compensada los cuales muestran un incremento en la colágena tipo III (Praktiknjo et al., 2018).

El porcentaje de colágena tipo III está asociada más bien a la protección del hospedero y como herramienta para la curación de heridas que al daño hepático. Se observa que el porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo III en hígado para el grupo intacto fue de 2.46 ± 1.94 % y para el intestino fue de 22.18 ± 9.05 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.65 ± 0.60 % en hígado y para el intestino fue de 22.49 ± 4.37 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 3.70 ± 0.92 % y para el intestino fue de 13.41 ± 1.70 %; para el grupo de berro en hígado fue de 2.68 ± 0.422 % y para el intestino fue de 17.28 ± 3.11 %.

La colágena tipo III en hígado es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos. Esto coincide con lo que ya sabemos, que tanto en condiciones normales como patológicas, el hígado tiene colágena tipo III como componente de su matriz extracelular (Poonkhum et al., 2011). En cuanto a los hígados de los controles positivos, tampoco hay diferencia significativa debido a que el daño que presentan es por fibrosis, y no por cirrosis, en la cual se hubiera podido esperar un incremento de colágeno tipo III (Praktiknjo et al., 2018).

La colágena tipo III en intestino es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos. Esto coincide con un estudio realizado para intestinos sanos e intestinos con enfermedad inflamatoria que no mostraron diferencias significativas entre ellos (Graham et al., 1988), además se sabe que el 20% de colágeno es tipo III en intestino sano (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017). Este tipo de colágeno tiene menor fuerza mecánica que el tipo I y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Stumpf et al., 2001). Sin embargo, todos los grupos son estadísticamente iguales.

6.2.4 Análisis genético con qPCR

6.2.4.1 En hígado: IL-1, IL-10 y colágena para Berro

IL-1

La superfamilia de citocinas IL-1 es un grupo de proteínas (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36, IL-37 e IL-38) que a su vez se divide en sub-familias (Barbier et al., 2019). Existen once miembros de citocinas en la familia IL-1, y diez miembros de receptores de la familia IL-1 (Dinarello, 2018). La IL-1 es una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019). La IL-1 se refiere a dos citocinas similares que pueden unirse a los mismos receptores, uno de ellos siendo el más secretado (IL-1 β), y el otro manteniéndose de forma

intracelular (IL-1 α)(Meier et al., 2019). La IL-1 β es el mediador inflamatorio más importante cuando existe daño de tejido en enfermedades crónicas hepáticas, sin embargo aún no se sabe si la IL-1 β contribuye o es una consecuencia a la patogénesis de la fibrosis hepática (Meier et al., 2019).

Las citocinas y receptores de la familia IL-1 afectan a un amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda, Dinarello, y Mantovani, 2013). Más que cualquier otra familia de citocinas, los miembros de la familia de IL-1 son asociados al daño por inflamación. Son llamadas pirógenos endógenos” y tanto sus citocinas como sus receptores son responsables por la fiebre e implicadas en un amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018). De hecho, las terapias anti-IL-1 han tenido un impacto enorme en las enfermedades inflamatorias (Garlanda et al., 2013).

Sin embargo, los mismos miembros también funcionan incrementando una resistencia no específica a la infección y al desarrollo de la respuesta inmune ante antígenos foráneos. Estas propiedades de inflamación y defensa del huésped son llamadas “inmunidad innata”, mientras que el aumento a la respuesta contra antígenos se le llama “inmunidad adquirida”. Las respuestas de los miembros de la familia IL-1 son no-específicas, de esta manera aumentando el reconocimiento de antígenos y activando la función de linfocitos (Dinarello, 2018).

Se observa que la expresión de IL-1 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.821 ± 0.096 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 3.573 ± 0.198 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 12.53 ± 1.342 ; para el grupo de berro fue de 5.676 ± 0.33 . Todos los grupos son estadísticamente diferentes para la IL-1 en hígado. El grupo de mayor expresión de IL-1 fue el control positivo de las ocho semanas, seguido del tratamiento con berro, control positivo de las cuatro semanas, y el grupo intacto que fue el de menor expresión.

La expresión de IL-1 en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es el menor de todos los valores (0.821 ± 0.096), siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos (control positivo de las cuatro semanas, control positivo de las ocho semanas y grupo berro). Lo cual es de esperarse, ya que el grupo intacto es un grupo sano que no tenía por qué estar presentando inflamación hepática (Meier et al., 2019), y es por esto que es el grupo con menor expresión de la citocina proinflamatoria IL-1, ya que esta citocina se expresa como respuesta inmunológica e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013) y no ante condiciones sanas.

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (3.57 \pm 0.20), siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presentando diferencia significativa de ($p < 0.01$) contra el grupo intacto.

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (12.53 \pm 1.34), siendo el valor más elevado de IL-1, es diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presenta diferencia significativa de ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto. Este grupo es el más elevado ya que La IL-1 es una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), y este es un modelo en el que se le ha inducido daño de manera crónica, pues nunca se detuvo la inducción de fibrosis y tuvo una duración de ocho semanas. Su expresión tan elevada es consistente cuando existe daño en hígado en enfermedades crónicas, sin embargo aún no se sabe si la IL-1 β contribuye o es una consecuencia a la patogénesis de la fibrosis hepática (Meier et al., 2019). A pesar de que las citocinas proinflamatorias como la IL-1 son parte de la defensa del hospedero contra patógenos, un exceso de inflamación puede aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos, lo cual dañan al huésped (Iyer y Cheng, 2012).

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo de Berro, expresado en media \pm SEM es de (5.68 \pm 0.33), siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presentando diferencia significativa de ($p < 0.001$) contra el grupo intacto, es normal haber encontrado la expresión de IL-1 para este grupo ya que nos indica que el organismo está defendiéndose a través de su respuesta inmune innata y el hospedero se está defendiendo (Dinarello, 2018), sin embargo no es tan grave su respuesta inflamatoria como es el caso de las ocho semanas, significativamente diferente ($p < 0.0001$). Esta expresión de IL-1, puede funcionar ya que se ha visto que varias citocinas proinflamatorias, inducen inflamación de los hepatocitos, y de esta manera las células inmunes secretan una citocina profibrogénica (TGF- β) en el sitio de daño para que fagocite a los cuerpos apoptóticos, alimentándose también de las reacciones inflamatorias y fibrogénicas (Chakraborty et al., 2012).

Los grupos de control positivo, tanto el de cuatro semanas como el de ocho semanas, presentan mayores concentraciones de IL-1 en hígado comparadas con el intacto. Esto es de esperarse ya que están sufriendo inducción de daño con CCl₄ y, por lo tanto, hay respuesta inflamatoria inmune (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013). El control positivo de las ocho semanas, tiene las mayores expresiones de IL-1, esta respuesta inflamatoria excesiva conlleva a causar daños en el tejido y problemas en la homeostasis del hospedero (Iyer y Cheng, 2012). El grupo de berro

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

también muestra respuesta inflamatoria inmune, mayor a la del intacto pero mucho menor al control positivo de las ocho semanas, lo cual es normal ya que es la respuesta natural del organismo ante daños recibidos al hospedero, en este caso, daños causados por CCl₄ (Iyer y Cheng, 2012).

IL-10

La respuesta inmune contra patógenos requiere de una activación rápida de citocinas proinflamatorias, las cuales sirven para iniciar la defensa del hospedero contra invasiones microbianas. Sin embargo, un exceso de inflamación puede aumentar disturbios metabólicos y hemodinámicos, ambos dañinos para el huésped (Iyer y Cheng, 2012). Es por esto que existe un mecanismo paralelo antiinflamatorio que sirve para controlar y contrarrestar la producción de moléculas proinflamatorias, la IL-10 es una familia de citocinas que ayudan a la respuesta del tejido ante daño y enfermedad, para así limitar el daño a tejido, recuperar y mantener la homeostasis en el tejido epitelial y su integridad y participan en la respuesta inmunológica desarrollada en el hígado, mejorando la inmunidad innata epitelial y regulando el proceso de recuperación tras eventos de infección o inflamación. (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012).

En este sentido, se ha propuesto que la IL-10 suprime el sistema inmune del hospedero (Pestka et al., 2004). La IL-10 es una potente citocina antiinflamatoria que juega un papel crucial, previniendo patologías inflamatorias y autoinmunes, es el mediador ante la respuesta antiinflamatoria del huésped (Iyer y Cheng, 2012). La deficiencia en la expresión de IL-10 puede aumentar la respuesta inflamatoria ante microbios, pero también puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes, una respuesta inflamatoria exagerada, resultando en inmunopatología exacerbada y gran daño al tejido (Iyer y Cheng, 2012).

La IL-10 es una gran familia de citocinas, que comprende tres subfamilias: la IL-20, que incluye la IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, y IL-26; la IL-10, el grupo del tipo III IFN que incluye miembros de la IL-28A, IL-28B, y la IL-29 (Caparrós y Francés, 2018; Pestka et al., 2004). La IL-20 es parte de una subfamilia de la familia IL-10, esta citocina que por un lado tiene un papel protector ante la progresión de fibrosis, pero por otro lado puede causar susceptibilidad en el tejido hepático cuando se presenta carcinoma hepatocelular (Caparrós y Francés, 2018). Toda la familia de IL-10 tiene la función de comunicarse con leucocitos y células epiteliales en diferentes tejidos, como el hígado (Caparrós y Francés, 2018).

La IL-10 inicia una gran variedad de actividades al unirse a sus receptores. El mecanismo se cree que es la inhibición de la capacidad de presentación del antígeno de los macrófagos y de las células dendríticas. Además, bloquea la producción de citocinas, la expresión de moléculas coestimuladoras

(CD80, CD86 y CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de la clase II) y la secreción de quimiocinas (Iyer y Cheng, 2012; O'Garra, Barrat, Castro, Vicari, y Hawrylowicz, 2008; Pestka et al., 2004). Así, la IL-10 inhibe el daño al hospedero durante la respuesta inmune ante patógenos (O'Garra et al., 2008).

Son importantes en controlar la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov, Hanash, y van den Brink, 2015).

Se observa que la expresión de IL-10 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.87 ± 0.13 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.41 ± 0.07 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.98 ± 0.12 y para el grupo de berro fue de 24.87 ± 2.41 .

La expresión de IL-10 en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (0.87 ± 0.13), siendo igual ($p < 0.05$) a los grupos control positivo de las cuatro semanas y control positivo de las ocho semanas, los cuales presentan los valores más bajos de IL-10 y diferente al grupo de berro ($p < 0.0001$). Esto es así ya que el grupo intacto no está experimentando una respuesta inmune contra ninguna clase de daño o enfermedad en defensa del hospedero (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012).

La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (0.41 ± 0.07), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de intacto y al grupo control positivo de las ocho semanas, y diferente al grupo de berro. La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (0.98 ± 0.11), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de intacto y al grupo control positivo de las ocho semanas, y diferente al grupo de berro. Ambos controles positivos, tanto el 4s como el 8S, expresan IL-1, de hecho, el control positivo de las ocho semanas (8s) fue el que mayor expresión de IL-1 tuvo, esto significa que está expresándose una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), para ambos controles positivos, y no hay una contraparte, que contrarreste el exceso de inflamación que está generando daño y disturbios metanólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012), siendo incapaz de inhibir el daño al hospedero durante su respuesta inmune (O'Garra et al., 2008).

La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo de Berro, expresado en media \pm SEM, es el más elevado, de (24.87 ± 2.41) , siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presentando diferencia significativa de ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto. Esto demuestra que el grupo de Berro está protegiendo al hospedero, poniendo en marcha un mecanismo antiinflamatorio al causado por la respuesta inmune proinflamatoria activada contra el CCl_4 , y disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Además, de acuerdo a su análisis histopatológico, en el que se muestra que no hay tanto daño como el observado en los controles positivos, se demuestra que esta elevación en la expresión de IL-10 está controlando la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015). Sabemos que niveles muy altos o no regulados de IL-10 pueden resultar en infecciones crónicas (O'Garra et al., 2008), sin embargo este no es un caso de riesgo ya que está si expresó niveles de IL-1 y está contrarrestándolos.

Colágena

La expresión de colágena en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.05 ± 0.06 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 4.06 ± 0.31 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 3.70 ± 0.28 y para el grupo de berro fue de 1.36 ± 0.20 .

La expresión de colágena en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (1.05 ± 0.06) , siendo diferente ($p < 0.05$) a los grupos control positivo (de las cuatro semanas y de las ocho semanas), e igual al grupo de berro, siendo el berro y el intacto los grupos con los valores más bajos de colágena.

Los grupos control positivo presentaron los valores más elevados para colágena en hígado.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (4.06 ± 0.31) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas (8S) y diferente al grupo berro y diferente ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (3.70 ± 0.28) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas (8S) y diferente al grupo berro y diferente ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo de Berro, expresado en media \pm SEM es de (1.37 ± 0.20) , siendo diferente ($p < 0.05$) a los grupos control positivo de las cuatro y ocho semanas, e igual al grupo intacto.

El grupo intacto y el grupo de berro son los valores más bajos de colágena en hígado, el grupo intacto no recibió CCl_4 , es el grupo sano, y el grupo de berro se está comportando de la misma manera en cuanto a la expresión de colágeno en hígado, indicando que el berro está teniendo función antifibrótica, ya que la colágena es el componente más abundante de la MEC en fibrosis, y se incrementa hasta diez veces en cirrosis (Schuppan, 2015). En este caso el incremento es cuatro veces mayor, para ambos controles positivos, ya que es un modelo de fibrosis y no de cirrosis, los grupos controles positivos, tanto 4S como 8S, son los más elevados, y diferentes ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto, lo cual indica que existe una descontrolada reparación de tejido, caracterizada por el reemplazo de tejido funcional hepático con colágeno (Chen, Wu, y Wang, 2015b). Sus células hepáticas se han convertido en células fibrogénicas hepáticas, las cuales son altamente proliferativas y contráctiles, sus respuestas ante el daño, en este caso causado por el CCl_4 , son de depósito de colágeno para encapsular la herida; seguido de una respuesta crónica inflamatoria y neo-angiogénesis (Karimzadeh-Toosi, 2015).

6.2.4.2 En intestino: IL-10 para Berro

El microbiota es un factor importante en el desarrollo de la respuesta inmune. La interacción entre el tracto gastrointestinal y la microbiota que ahí reside está bien balanceada en individuos sanos, sin embargo, su decaimiento puede llevar a enfermedad, tanto intestinal como extraintestinal (Kamada y Núñez, 2014).

Se observa que la expresión de IL-10 en intestino (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.06 ± 0.08 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.38 ± 0.00 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.40 ± 0.07 y para el grupo de berro fue de 0.90 ± 0.09 .

La expresión de IL-10 en intestino, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (1.06 ± 0.08) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de berro y diferente a los grupos control positivo de las cuatro y de las ocho semanas. Es el valor más elevado de la IL-10 y es similar al grupo de berro. Esto es de esperarse ya que, en los roedores, la IL-10 es producida por macrófagos activados y otras células (Morhardt et al., 2019; Schreiber, 1997), el intestino contiene la más grande reserva de macrófagos

en el cuerpo, ellos producen la citocina antiinflamatoria IL-10, que es esencial para mantener la homeostasis de la mucosa (Kamada y Núñez, 2014; Morhardt et al., 2019).

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (0.38 ± 0.00) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas y diferente a los grupos intacto y berro. Este grupo es el que presenta menores cantidades de IL-10, estadísticamente igual al otro control positivo (8s), lo cual nos indica que el organismo no está previniendo patologías inflamatorias, no se activó una respuesta antiinflamatoria (Iyer y Cheng, 2012), ni está contrarrestando el daño producido por el CCl₄, sin limitar el daño hepático ni recuperando la homeostasis, hay ausencia de un proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Consistente con sus estudios histopatológicos, que muestran un severo daño, encontrando: necrosis epitelial, infiltrado inflamatorio y desprendimiento epitelial.

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (0.40 ± 0.07) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las cuatro semanas y al grupo de berro, y siendo diferente al intacto. Se observa para el 8S que hay expresión de IL-10 lo cual indica que está existiendo una respuesta ante la inflamación provocada por la IL-1, sin embargo, es bastante más baja a la expresión de la citocina proinflamatoria IL-1. No están siendo equilibradas y la deficiencia en la expresión de IL-10 puede aumentar la respuesta inflamatoria, como se observa en su histología, y generar una respuesta inflamatoria exagerada resultando en un gran daño al tejido (Iyer y Cheng, 2012), lo cual es consistente con sus análisis histopatológicos en los que se observa un daño severo al tejido, al encontrar: edema, desprendimiento epitelial e infiltrado inflamatorio,

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo de Berro, expresado en media \pm SEM es de (0.90 ± 0.09) , siendo diferente ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las cuatro semanas, pero igual al control positivo de las ocho semanas y al grupo intacto. La expresión de IL-10 nos indica que está ocurriendo reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015). La histología del intestino para el grupo de berro nos indica que no hay desprendimiento epitelial y se observan iguales al grupo intacto, por lo que sus valores de IL-10 son congruentes con que sean iguales al grupo intacto.

6.2.5 Pesos semanales de las ratas vivas

6.2.5.1 Pesos de las ratas vivas con Berro

Los pesos de las ratas se midieron una vez por semana durante las 8 semanas que duró el experimento.

Los pesos de las ratas son diferentes estadísticamente en la primera semana (153.8 ± 7.21 g) para todos los tratamientos, comparadas contra el intacto, la 4S es diferente ($p < 0.0001$), la 8S es diferente ($p < 0.05$) y el berro es diferente ($p < 0.0001$). En la segunda semana (184.1 ± 6.57 g), ya hay más semejanzas entre los grupos, pues el grupo intacto es similar tanto al grupo de berro como al control positivo de las ocho semanas, aunque entre los tratamientos 4S, 8S y berro, son todos diferentes entre sí. El grupo control positivo de la cuarta semana (4S), es diferente al intacto con ($p < 0.001$). En la tercera semana (208.3 ± 5.68 g) hay más homogeneidad, ahora los grupos intacto, 8S y berro son iguales, y el único que permanece diferente es el de la 4S, siendo diferente al intacto con ($p < 0.01$). En la cuarta semana (252.5 ± 20.3 g) los grupos son iguales entre todos, al igual que en la quinta (226.9 ± 5.99 g), sexta semana (241.7 ± 6.48 g) y séptima semana (252.0 ± 8.24 g), es decir que, de las 8 semanas, la mitad, las cuatro intermedias mantienen los pesos iguales entre todos los grupos. Ya en la octava y última semana (262.3 ± 9.58 g) vuelven a variar, siendo el grupo intacto el de mayor peso, y diferente ($p < 0.05$) a los grupos 8S y berro, los cuales fueron los de menor peso.

El peso de la primera semana fue menor al de Al-Seeni et al., 2016, y al utilizado por Xu et al., 2002, debido a que esas ratas eran de mayor edad (aproximadamente 10 semanas), mientras que las utilizadas en este experimento fueron de un mes de edad (aproximadamente 4 semanas).

Las ratas fueron aumentando de peso a medida que avanzaba el experimento, con excepción de la quinta semana en la que el promedio bajó de 228.5 a 220 y continuó incrementándose. Esto coincide con que ya no se encuentra el grupo control 4S, el cual podría haber incrementado el peso promedio de todas las ratas. Pues separados por tratamientos, se observa que las ratas van aumentando de peso a medida que aumenta el tiempo, similar a lo ocurrido con Troung et al. (2014) para sus ratones expuestos a dosis de CCl_4 de 0.8 mL/kg, los cuales ganaron peso durante las ocho semanas. Ellos también observaron a dosis de 1 mL/kg y 1.2 mL/kg de CCl_4 con aceite de oliva, las ratas bajaron de peso a partir de la cuarta semana de su experimento en todos sus grupos, con excepción del intacto, hasta la semana 8 (de 27.91 ± 2.2 hasta 23.90 ± 2.51 g) (Truong et al., 2014).

6.2.6 Discusiones generales del grupo de berro

Los **pesos de los hígados** para el berro y los controles positivo y negativos son estadísticamente iguales, al igual que lo sucedido con otros estudios (Dutta et al., 2018; Raichholz et al., 2016; Uemitsu, 1984).

En cuanto al **perfil hepático** para el tratamiento de Berro: El tratamiento de berro es estadísticamente igual al intacto, siendo éstos los que expresan menores niveles de **ALT** debido a que no existe daño en el hígado (Ginès et al., 2011b; Tejos et al., 2013). El tratamiento de berro es estadísticamente igual al intacto en sus niveles de **AST**. Todos los tratamientos (Intacto, berro, controles positivos 4S y 8S), muestran niveles de **urea** normales y estadísticamente iguales; lo cual es consistente con Fortea et al. (2018). Para el tratamiento de berro esto indica que el hígado está realizando de manera normal una de sus funciones que es el metabolismo proteico, en el cual, el amonio (NH_3) tóxico resultante de la desaminación (eliminar el amino NH_2) de los aminoácidos es convertido por el hígado en urea, para que pierda toxicidad y sea excretado en la orina (Tortora, 2013). Todos los tratamientos (Intacto, berro, controles positivos 4S y 8S), muestran niveles de **albúmina** normales y estadísticamente iguales; lo cual es consistente a los valores encontrados tanto en ratas sanas como en ratas expuestas a CCl_4 (Caridad et al., 2011; Fortea et al., 2018). Esto implica que en el tratamiento de berro, existe una correcta capacidad sintética de los hepatocitos; de lo contrario, los niveles séricos se verían disminuidos en fases avanzadas de la cirrosis (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Los valores de **Fosfatasa alcalina** para todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), y todos están por encima de los valores normales reportados (River Charles, 1982; Thapa y Walia, 2007). Para el grupo intacto y el grupo berro los valores (estadísticamente iguales) de Fosfatasa alcalina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas tienen sana su capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede explicarse su elevación comparada con valores normales debido a que las ratas Wistar se encontraban en crecimiento, y la fosfatasa alcalina es liberada por los huesos ya que están en etapa de crecimiento (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014).

En los niveles de ALT y AST, son iguales los tratamientos de berro, intacto y 8S. El control positivo de las ocho semanas (8S), a pesar de tener niveles de AST bajos y estadísticamente iguales al intacto y al berro, no es indicativo de que el hígado se encuentre sano, sino porque la célula implosiona en el proceso de apoptosis como se muestra en sus análisis histológicos y como consecuencia no hay liberación enzimática al torrente sanguíneo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

El análisis morfométrico para berro: El porcentaje de **colágena total en hígado e intestino**, es igual para todos los tratamientos (Intacto, berro, controles positivos 4S y 8S). Para la **colágena tipo I en intestino** todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), consistente con lo reportado por otros investigadores (Pantaroto et al., 2015). Para la **colágena tipo I en hígado**, los grupos intacto, 4S y berro son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) y son los niveles más bajos, que difieren ($p < 0.01$) del grupo 8S. La **colágena tipo III en hígado** es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos, ya que el hígado tiene colágena tipo III como componente de su matriz extracelular (Poonkhum et al., 2011). La **colágena tipo III en intestino** es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos, similar a lo reportado en intestino sano (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017), y de acuerdo a lo esperado, ya que este tipo de colágeno tiene menor fuerza mecánica que el tipo I y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Stumpf et al., 2001).

El **análisis genético** con qPCR para berro: La expresión de **IL-1 en hígado**, es diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos para el tratamiento de berro; esto nos indica que el organismo está defendiéndose a través de su respuesta inmune innata y el hospedero se está defendiendo (Dinarello, 2018), muestra respuesta inflamatoria inmune, mayor a la del intacto pero mucho menor al control positivo de las ocho semanas, lo cual es normal ya que es la respuesta natural del organismo ante daños recibidos al hospedero, en este caso, daños causados por CCl_4 (Iyer y Cheng, 2012). Esta expresión de IL-1, puede funcionarle ya que al inducir inflamación de los hepatocitos, las células inmunes secretan una citocina profibrogénica ($TGF-\beta$) en el sitio de daño para fagocitar a los cuerpos apoptóticos, y alimentarse de las reacciones inflamatorias y fibrogénicas (Chakraborty et al., 2012). La expresión de **IL-10 en hígado**, para el tratamiento de berro es la mayor de todas, siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos (que son estadísticamente iguales entre ellos). Esto demuestra que el grupo de Berro está protegiendo al hospedero, poniendo en marcha un mecanismo antiinflamatorio al causado por la respuesta inmune proinflamatoria (IL-1) activada contra el CCl_4 , y disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Además, de acuerdo a su análisis histopatológico, en el que se muestra que no hay tanto daño como el observado en los controles positivos, se demuestra que esta elevación en la expresión de IL-10 está controlando la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015). Sabemos que niveles muy altos o no regulados de IL-10 pueden resultar en infecciones crónicas (O'Garra et al., 2008), sin embargo este no es un caso

de riesgo ya que está si expresó niveles de IL-1 y está contrarrestándolos. La expresión de **colágena en hígado** es igual ($p < 0.05$) para el tratamiento de berro y para el intacto, siendo ambos los valores más bajos. Esto indica que el berro está teniendo función antifibrótica, ya que la colágena es el componente más abundante de la MEC en fibrosis (Schuppan, 2015), y es cuatro veces menor a la expresada por los controles positivos, en los cuales existe una descontrolada reparación de tejido, caracterizada por el reemplazo de tejido funcional hepático con colágeno (Chen et al., 2015b) y que sus células hepáticas se han convertido en células fibrogénicas hepáticas, generando el depósito de colágeno para encapsular la herida; seguido de una respuesta crónica inflamatoria y neoangiogénesis (Karimzadeh-Toosi, 2015). La expresión de **IL-10 en intestino** es igual ($p < 0.05$) para el tratamiento de berro, el intacto y el 8S. La expresión de IL-10 nos indica que está ocurriendo reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015). En los roedores, la IL-10 es producida por macrófagos activados (Morhardt et al., 2019; Schreiber, 1997), y ya que el intestino contiene la más grande reserva de macrófagos en el cuerpo, ellos producen IL-10 para mantener la homeostasis de la mucosa (Kamada y Núñez, 2014; Morhardt et al., 2019).

Estos resultados son congruentes con sus **análisis histológicos**, los cuales, muestran ausencia de fibrosis, ausencia de esteatosis e intestino sano, únicamente un caso muestra ligera fibrosis incipiente, que se explica porque de manera crónica tuvo inducción de daño con CCl_4 . La histología del intestino para el grupo de berro nos indica que no hay desprendimiento epitelial y se observan iguales al grupo intacto. Esto se debe a que la presencia de flavonoides, taninos, saponinas y terpenoides en *Nasturtium officinale* funcionan como agentes antioxidantes, inhibiendo los radicales libres generados por el daño, además se sabe de la actividad hepatoprotectora de ciertos flavonoides (Kumar et al., 2009).

Los **pesos de las ratas**, obtenidos semanalmente, muestran que los pesos comienzan siendo estadísticamente diferentes, pero se estabilizan durante la cuarta, quinta, sexta y séptima semana, siendo diferentes en la última semana. Separados por tratamientos, se observa que las ratas van aumentando de peso a medida que aumenta el tiempo, similar a lo ocurrido con Troung et al. (2014) para sus ratones expuestos a dosis de CCl_4 de 0.8 mL/kg (misma dosis que en este trabajo), los cuales ganaron peso durante las ocho semanas.

El berro está teniendo efecto antioxidante y antifibrótico. Esto a través de mecanismos antioxidantes que consumen a los radicales libres (Abdulaziz et al. 2013). El berro tiene mecanismos antiinflamatorios (Sadeghi et al., 2014), congruentes con sus variables analizadas.

6.3 *Lactobacillus rhamnosus silvestre*

6.3.1 Pesos de los hígados (Lactos)

Los cambios en el peso del hígado pueden detectar y cuantificar los efectos producidos por hepatotoxinas, lo cual es de gran utilidad, pues su peso también puede verse alterado por neoplasias primarias o secundarias, es por esto que puede utilizarse como un parámetro informativo en estudios crónicos para detectar potencial carcinogénico (Cattley y Cullen, 2013).

Se observa que los pesos de los hígados (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de $11.34 \pm 0.32g$; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de $12.44 \pm 0.65g$; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de $12.80 \pm 0.59g$ y para el grupo de berro fue de $10.50 \pm 0.50g$. Los pesos de los hígados para los controles positivos y negativo son estadísticamente iguales, mientras que el grupo de menor peso de hígado fue el de Lactos, siendo igual al grupo intacto ($p \leq 0.05$).

Los pesos de los hígados del grupo Intacto, 4S y 8S, no mostraron diferencias significativas, al igual que los experimentos realizados por Dutta y colaboradores (2018), ni por Uemitsu (1984) quienes no encontraron diferencia significativa de peso en los grupos a los que se les administró CCl_4 con respecto a los controles negativos (Dutta et al., 2018; Uemitsu, 1984). Aproximadamente el 25% de hígados cirróticos en su etapa final son normales en tamaño (Raichholz et al., 2016), por lo que no es raro encontrar que en estado fibrótico, los hígados no presenten diferencias significativas en peso con respecto a los controles negativos.

Esto difiere de algunos que han encontrado diferencias en el peso del hígado entre los controles positivos y el negativo, que han observado un incremento de peso en el hígado para los animales que recibieron CCl_4 (Al-Seeni et al., 2016; Domitrović et al., 2013; Uemitsu, 1984) Domitrović y colaboradores (2013), observaron que el peso relativo del hígado (expresado en g de peso del hígado/100g de peso del animal) se vio incrementado en los ratones que fueron intoxicados con CCl_4 , en comparación tanto con sus grupos controles como con los grupos en los que se observó regresión de fibrosis (Domitrović et al., 2013), explican que esto es debido a que la administración

de CCl₄ causa en el hígado una rápida acumulación de triglicéridos debido a un bloqueo en la secreción de las lipoproteínas de baja densidad en los hepatocitos (Al-Seeni et al., 2016).

También difiere de algunos que reportan haber encontrado una baja de peso en los hígados dañados, debido generalmente a pérdida de masa funcional asociada con atrofia o un daño hepatocelular letal sin observar otros cambios, pero es mayormente observado en daños agudos (Cattley y Cullen, 2013), un estudio reportado por (Marhoume et al., 2017) encontró un decremento en el peso del hígado de las ratas tratadas con CCl₄ comparadas con el control negativo, esto se debió al desarrollo de necrosis en estos hígados. Sin embargo, este no es el caso para los hígados del grupo de Lactos, ya que en su análisis histopatológicos no muestran ese daño, no hay ni atrofia o daño celular (Cattley y Cullen, 2013); la baja de peso del hígado de Lactos no es de enfermedad, pues su peso es estadísticamente igual al del grupo de intactos, pero es menor al de los controles positivos ($p \leq 0.05$) ya que el lacto es un probiótico y disminuye el peso del hígado, ya que por ser probiótico promueve la pérdida de peso debido a que modulan la microbiota que se ve reflejada en el peso de su hígado, el cual a pesar de ser los menores, es estadísticamente igual al grupo intacto, sin mostrar mayor disminución de peso porque no fue combinado con dieta hipocalórica como lo hicieron (Crovesy, Ostrowski, Ferreira, Rosado, y Soares-Mota, 2017).

El peso de los hígados fue estadísticamente diferente para el tratamiento del *Lactobacillus rhamnosus* comparado con ambos controles positivos, y es igual al control negativo, grupo intacto; lo que sugiere que hay una tendencia por ser probiótico a disminuir de peso, sin embargo, no a niveles patológicos, pues se está comportando igual al sano. El no haber encontrado diferencias entre los controles positivos y el intacto no es inusual como lo muestran otros estudios (Dutta et al., 2018; Raichholz et al., 2016; Uemitsu, 1984).

6.3.2 Perfil hepático (Lactos)

Para conocer la función hepática, se analizaron los sueros de cada rata mediante la técnica de química seca para analizar los biomarcadores indirectos. Los cuales permiten realizar un perfil hepático para evaluar el estado del hígado en cuanto a su daño estructural e integridad funcional (Ebadollahi et al., 2010).

Se analizan los biomarcadores séricos ya que han sido muy evaluados principalmente en referencia a su capacidad para determinar la etapa de fibrosis. Se han propuesto dos tipos: biomarcadores directos que reflejan el depósito o eliminación del MEC en el hígado; y los biomarcadores indirectos,

que son los analizados en este apartado, los cuales incluyen moléculas soltadas a la sangre, inducidas por la inflamación, sintetizadas y reguladas o excretadas por el órgano como producto del proceso común alterado que es consecuencia del deterioro de la función hepática (Cequera y García de León, 2014).

6.3.2.1 ALT para Lactos

Las aminotransferasas no tienen función conocida en el suero, y tienen una relativamente corta vida-media en el orden de días. La elevación de ambas aminotransferasas (AST y ALT), significa un daño activo al hígado o a los otros órganos que las contienen; el nivel de elevación no se correlaciona con la severidad pero puede tener valor diagnóstico (Ginès et al., 2011b).

La alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima cuya función es catalizar la transferencia de grupos amino (alanino y aspartato) para producir ácido pirúvico y oxaloacetato. Se encuentra en abundancia en el citoplasma de los hepatocitos, donde su actividad es aproximadamente 3000 veces mayor que en suero. Cuando ocurre daño o muerte hepatocelular, existe la liberación de ALT hacia el torrente sanguíneo, incrementando sus niveles en suero lo cual es un reflejo de lesión o necrosis hepática. La ALT se considera una enzima que funciona como marcador específico del hígado, porque aquí es donde se encuentra principalmente, aunque también se encuentra en cantidades pequeñas en riñón, miocardio y músculo esquelético. Hay evidencias de que los niveles séricos elevados de ALT se asocian a mayor mortalidad por causa hepática. Por esto se ha sugerido que valores anormales de ALT podrían ser un buen marcador de riesgo hepático y metabólico (Tejos et al., 2013).

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de 30 ± 1.16 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 822.0 ± 108.00 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 52 ± 5.51 (U/L) y el tratamiento con Lactos mostró valores de 117.9 ± 30.86 (U/L). Los niveles de ALT para el grupo intacto y el de Lactos se comportan de manera similar.

En el grupo control negativo (Intacto), los valores (media \pm SEM) de ALT fueron de 30 ± 1.16 U/L. Este promedio coincide con los valores normales de ratas Sprague-Dawley para ALT de 27 U/L, con un rango de (25-41 U/L) reportados en un experimento realizado durante 12 semanas por Fortea et

al. (2018), también coincide con los valores reportados por (River, 1982) quien obtuvo un valor promedio de 32 U/L y un rango de (17-50 U/L).

El grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de ALT 822.0 ± 108.0 U/L. Y fue estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p < 0.0001$) con respecto al intacto. Esta liberación de ALT en el grupo indica que existe un daño o muerte hepatocelular, habiéndose incrementado los niveles de ALT 27.4 veces más que el grupo intacto, lo cual es un reflejo de lesión o necrosis hepática (Tejos et al., 2013). Esta elevación tan marcada es específica para necrosis hepática, debido a que la ALT se encuentra en hígado mientras que la AST puede encontrarse en diferentes órganos, y niveles tan elevados de ALT comparados con el grupo intacto ocurren en desórdenes asociados con lesiones hepatocelulares extensivas como hepatitis viral, daño isquémico hepático, y daño hepático inducido por medicamentos o toxinas. Estas condiciones son características por una pérdida extensa del parénquima hepático (Parmar et al., 2016). Consistente con el experimento, ya que este control positivo únicamente recibió CCl₄ sin ningún otro tratamiento antifibrótico. Estos resultados de elevación del ALT son similares a los encontrados por (Al-Seeni et al., 2016).

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S), tuvo niveles (media \pm SEM) de 52 ± 5.5 (U/L), este grupo es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las cuatro semanas, pero igual al grupo intacto y al de berro. Este grupo de las ocho semanas no recibió ningún tipo de tratamiento, fue inducción con CCl₄ durante las ocho semanas, y el control positivo 4S nos demuestra que sí tuvo daño significativo en el hígado a las cuatro semanas, por lo que, al continuar induciendo daño las células del parénquima hepático fueron aumentando el daño. La baja cantidad de ALT medida en sangre no se debe a que no hubiera daño hepático, se puede explicar sabiendo que cuando las células sufren gran cantidad de daño, y están en apoptosis, no hay elevaciones de ALT en suero (McGill, 2016), además se ha vuelto evidente en modelos hepáticos de apoptosis en hepatocitos que durante las fases iniciales de daño no hay elevaciones significativas de ALT en el suero (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), y este experimento es para inducir fibrosis y no cirrosis, es decir, la etapa inicial de daño, por lo que es consistente con encontrar niveles bajos de ALT. Estos resultados coinciden con los reportados por Fortea et al. (2018), que observaron en sus ratas inducidas una vez por semana con CCl₄, durante 12 semanas, niveles de ALT de 41 U/L con un rango de 28-61 U/L.

Se ha reportado que el CCl₄ produce radicales libres (Kumar et al., 2009), Las enzimas ALT son proteínas, y cuando las células entran en estrés oxidativo, varios de sus puntos son oxidados lo que provoca que disminuya la actividad de muchas vías metabólicas, incluyendo la traslación, esto ocurre tanto en bacterias como en eucariontes. Parte de esta inhibición puede deberse a la inactivación oxidativa de varias enzimas involucradas en el metabolismo energético y en la síntesis de aminoácidos, ambas esenciales para la síntesis de proteína (Katz y Orellana, 2012).

Otra explicación para los niveles bajos encontrados en ALT puede ser que las células se están muriendo por apoptosis. Los niveles de ALT son inicialmente bajos cuando se usan tratamientos inductores de apoptosis hepática, esto debido a que la muerte celular por apoptosis se puede pensar como una implosión de la célula; un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular. Por el contrario, una necrosis oncótica, que pudiera pensarse como la explosión de la célula, puede ocurrir en algunas células de manera secundaria tras haberse inducido su apoptosis. De hecho, las características de la apoptosis son observadas claramente en modelos hepáticos de apoptosis en hepatocitos durante las fases iniciales de daño ya que no hay elevaciones significativas de ALT en el suero. La elevación de ALT se incrementa dramáticamente durante la última etapa, cuando ocurre necrosis secundaria, ya sea como resultado del daño directo al hepatocito o a inflamación (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

Los grupos de Intactos, control positivo de las ocho semanas (8S) y el grupo de Lactos, fueron los que menores niveles de ALT presentaron, siendo estadísticamente iguales entre ellos ($p < 0.05$), comparados con el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), el cual muestra una diferencia significativa ($p < 0.0001$) con respecto al grupo intacto.

El grupo de intactos y el de Lactos se comportan de la misma manera, siendo los que expresan menores niveles de ALT debido a que no existe daño en el hígado (Ginès et al., 2011b; Tejos et al., 2013).

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S) es igual al grupo intacto, sin embargo, esta igualdad no se debe a que el control positivo este sano, sino a que los hepatocitos se encuentran en apoptosis, lo cual hace que no haya elevaciones de ALT en sangre, debido a que hay mucho daño en el hepatocito generando la disminución en la actividad de muchas vías metabólicas, síntesis de

aminoácidos y baja síntesis enzimática (Katz y Orellana, 2012). Además la apoptosis hepática encontrada en el análisis histopatológico explica los niveles bajos de ALT, pues la apoptosis es muerte celular por implosión de la célula, un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

Los niveles presentados por el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), que son 27.4 veces más a las presentadas por las ratas sanas del grupo intacto, demuestran daño en hígado, lo cual confirma que todas las ratas (con excepción del intacto) a las cuatro semanas tuvieron daño o muerte hepatocelular, así como pérdida extensa del parénquima hepático (Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013).

Es por esto por lo que, en el grupo de las cuatro semanas es lógico encontrar bastante daño en los hepatocitos, y es consistente con el daño celular tan elevado encontrado en el análisis histológico, así como esteatosis y edema. Además, se encontró que es el grupo en el que todas sus ratas tuvieron infiltrado inflamatorio en hígado y una en colon. De todos los grupos, éste fue el que tuvo los mayores niveles de ALT tanto de manera individual como en promedio. Lo que nos indica este alto promedio es que la fibrosis ya ha comenzado, y es consistente con la fibrosis observada. Este control de cuatro semanas fue realizado precisamente para demostrar que ya había daño hepático cuando se comenzaron a administrar los tratamientos, para poder evidenciar si eran efectivos contra la fibrosis y de esta manera, fuera válido comenzar a aplicar los tratamientos a la cuarta semana como lo indica el modelo. Y con esto queda confirmado que fue un buen momento para iniciar con los tratamientos.

6.3.2.2 AST (*Lactos*)

Las aminotransferasas no tienen función conocida en el suero, y tienen una relativamente corta vida-media en el orden de días (Ginès et al., 2011b). Dentro de los marcadores de daño hepático, ALT y AST son los más comunes usados para diagnósticos clínicos así como para investigación que implique daño al hígado (McGill, 2016). Esto es debido a que la elevación de ambas aminotransferasas (AST y ALT), significa un daño activo al hígado o a los otros órganos que las contienen; sin embargo, el nivel de elevación no se correlaciona con la severidad pero puede tener valor diagnóstico (Ginès et al., 2011b).

La AST es una aminotransferasa que cataliza reacciones de transaminación. Existen dos formas de isoenzimas de la AST que genéticamente son distintas, la mitocondrial y la citoplasmática. La elevación en el torrente sanguíneo de la AST mitocondrial puede observarse en enfermedades crónicas hepáticas como degeneración del tejido hepático y necrosis. Sin embargo, se encuentra en mayores concentraciones en el corazón comparada con otros tejidos del organismo como: hígado, músculo esquelético y riñón; por lo que una elevada concentración de AST mitocondrial se observa en necrosis tisular extensiva durante el infarto al miocardio. Alrededor del 80% de la actividad AST proveniente del hígado es contribuida por la isoenzima mitocondrial, mientras que la mayor parte del AST circulante en personas sanas se deriva de la isoenzima citoplasmática. Las elevaciones de AST predominan comúnmente en pacientes cirróticos e incluso con enfermedades hepáticas en las que típicamente tienen elevado su ALT (Gowda et al., 2009).

La liberación de enzimas mitocondriales del hígado es considerada por varios autores como una fuerte evidencia de que existe necrosis hepática, y también es asociada con enfermedades hepáticas específicas, en particular, la AST se ha propuesto como un marcador de alcoholismo crónico (Contreras-Zentella y Hernández-Muñoz, 2016).

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de AST de 131.3 ± 8.97 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 961.0 ± 73.80 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 214.3 ± 43.32 (U/L) y el tratamiento con Lactos mostró valores de 353.7 ± 68.77 (U/L).

En el grupo control negativo (Intacto), los valores (media \pm SEM) de AST fueron de 131.3 ± 8.97 U/L. Estos fueron de los más bajos y caen dentro de lo esperado (Caridad et al., 2011) según el rango de valores hematológicos específicos para AST ($65.8 - 266.2$ U/L), en ratas macho Sprague Dawley, reportado por Caridad, Diuris, y Amelia, (2011).

El grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de AST 961.0 ± 73.80 U/L. Y fue estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando diferencia estadística significativa ($p < 0.0001$) con respecto al intacto. Esta elevación de AST es indicativa de daño hepático (Al-Seeni et al., 2016; Contreras-Zentella y Hernández-Muñoz, 2016) y es consistente con que este mismo grupo es el que más altos niveles tiene de ALT.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S), tuvo niveles (media \pm SEM) para AST de 214.3 ± 43.32 U/L, este grupo es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las cuatro semanas. Y aunque son estadísticamente iguales al grupo intacto y al grupo Lactos, su análisis histológico confirma que no haber encontrado elevaciones en sus niveles de AST se debe a que el hígado y sus hepatocitos se encuentran en apoptosis, lo cual genera la disminución en la actividad de muchas vías metabólicas, síntesis de aminoácidos y baja síntesis enzimática (Katz y Orellana, 2012). Además la apoptosis hepática encontrada en el análisis histopatológico explica los niveles bajos de AST, pues la apoptosis es muerte celular por implosión de la célula, un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

El control positivo de las ocho semanas, a pesar de tener niveles de AST bajos y estadísticamente iguales al intacto y al berro, no es indicativo de que el hígado se encuentre sano, sino porque la célula implosiona en el proceso de apoptosis como se muestra en sus análisis histológicos y como consecuencia no hay liberación enzimática al torrente sanguíneo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

El grupo de lactos tuvo valores (media \pm SEM) de AST de 353.7 ± 68.77 U/L, comportamiento similar al grupo control positivo de las ocho semanas (8s). Sin embargo, este control sabemos que no presenta liberación enzimática congruente con el daño al torrente sanguíneo debido al proceso apoptótico que está sufriendo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016). Y al comparar los valores con el control positivo de las cuatro semanas, vemos que el grupo lacto ha tenido una mejora impresionante. Y es congruente con sus análisis histológicos, los cuales, muestran: que a pesar de haber cierto daño causado por el CCl_4 , como ligera esteatosis (3), estasis (3), edema perinuclear ligero (3), fibrosis incipiente (3), nódulos fibróticos (1), las células, se están defendiendo, pues hay infiltrado inflamatorio en hígado (2), hay hígados sanos, con ausencia de estasis, ausencia de fibrosis y ausencia de lesión hepatocitaria. En general los intestinos se ven sanos (4), uno con infiltrado inflamatorio, y dos con desprendimiento epitelial ligero (2). Los daños se explican porque de manera crónica tuvo inducción de daño con CCl_4 . Sin embargo, no están cerca de estar tan dañados como los controles; esa regeneración, mejora observada y protección hepatocitaria, es congruente con los valores AST, 2.7 mayores al intacto, pero 2.7 menores al control positivo de la cuarta semana.

6.3.2.3 Urea (*Lactos*)

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de urea de 38.00 ± 3.22 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 39.67 ± 3.18 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 45.00 ± 2.31 (mg/dL) y el grupo de Lactos de 2.975 ± 0.12 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de urea normales y estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

Lo cual es consistente con Fortea et al. (2018), en donde tampoco hay variación en sus niveles de urea entre grupos. Esto implica que el hígado todavía es capaz de desintoxicarse del amonio mediante el ciclo urea/ornitina (Ginès et al., 2011b). Los niveles normales de urea para todos los grupos indican que el hígado está realizando de manera normal una de sus funciones que es el metabolismo proteico, en el cual, el amonio (NH_3) tóxico resultante de la desaminación (eliminar el amino NH_2) de los aminoácidos es convertido por el hígado en urea, para que pierda toxicidad y sea excretado en la orina (Tortora, 2013).

6.3.2.4 Albumina para *Lactos*

Los valores de albúmina en plasma representan el 75% para el mantenimiento de la presión oncótica y de manera cuantitativa es la proteína más importante del plasma. El promedio de albumina diaria producida por adulto humano es de 12-15g, cantidad que representa menos del 5% del total de albúmina de reserva en el cuerpo. Es producida exclusivamente por los hepatocitos. La larga vida-media (aprox. 20 días) de la albúmina, junto con el largo almacén reservado en el cuerpo, hacen de la albúmina un indicador poco confiable de la función de síntesis hepática en pacientes con daño hepático agudo. Por otro lado, en pacientes con enfermedad crónica hepática los niveles de albúmina sérica son un reflejo acertado de la función de síntesis hepática (Ginès et al., 2011b).

No hay diferencias significativas entre los grupos de control positivo, los controles negativos (tanto 4S y 8S) como el grupo de lacto. Esto es consistente a los valores encontrados tanto en ratas sanas como en ratas expuestas a CCl_4 (Caridad et al., 2011; Fortea et al., 2018).

Los hepatocitos son los encargados de realizar el metabolismo proteico y además sintetizan la mayoría de las proteínas plasmáticas, como la albúmina, α y β -globulinas, protrombina y fibrinógeno (Tortora, 2013). La albúmina es un parámetro que puede ser utilizado para medir la capacidad sintética de los hepatocitos. Los niveles séricos disminuyen en fases avanzadas de la cirrosis

(Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008), en este caso se observan valores normales en todos los grupos, tal vez porque estamos bajo un modelo de fibrosis y no de cirrosis.

Se observa que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de albumina de 2.73 ± 0.03 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 3.20 ± 0.21 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 2.93 ± 0.09 (mg/dL) y el grupo de Lactos de 2.98 ± 0.12 (mg/dL). Los valores de albúmina para todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

Para el grupo intacto y el grupo lacto los valores de albúmina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas de todos los grupos continúan teniendo capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede ser similar en este aspecto para los grupos controles positivos, o puede ser que de acuerdo a las características histológicas de los grupos control positivo tanto de las cuatro semanas como de las ocho semanas, en las que se observa esteatosis, edema y estasis vascular, refleja un alto nivel de daño en hepatocitos, puede indicar apoptosis hepática y por ende una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), consistente con los valores bajos encontrados en el control 8S para ALT y AST.

6.3.2.5 Fosfatasa alcalina para Lactos

Fosfatasa alcalina es un grupo de isoenzimas que hidrolizan varios ésteres de fosfato y, por tanto, generan fosfato inorgánico en pH alcalino, para su absorción por parte de los tejidos. Estas enzimas son dependientes de Zinc para su actividad. Están ampliamente distribuidas en el cuerpo, aunque las isoenzimas más importantes clínicamente se encuentran en hígado y hueso. Otras isoenzimas se encuentran en el intestino, placenta del primer trimestre y riñones (Ginès et al., 2011b).

La enzima se encuentra predominantemente en la membrana canalicular de los hepatocitos. La elevación de los sérica de los niveles de fosfatasa alcalina en enfermedades hepáticas parece ser resultado de la inducción de su síntesis por los ácidos biliares. El metabolismo de la fosfatasa alcalina no es mediada por el sistema hepático ni biliar (Ginès et al., 2011b).

Se puede observar que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de fosfatasa alcalina de 249.7 ± 6.94 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 474.3 ± 54.67 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de

314.7 ± 42.31 (U/L) y el grupo de Lactos de 460.4 ± 137.6 (U/L). Todos los grupos muestran niveles de fosfatasa alcalina estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

Los valores de todos los grupos para la Fosfatasa alcalina se encuentran por arriba de los valores normales reportados (River Charles, 1982; Thapa y Walia, 2007), sin embargo el rango de valores normales es sumamente amplio, va desde 39U/L hasta los 216 U/L aún, considerándose normales los extremos. Sin embargo, para el grupo intacto en el que también hay elevación de Fosfatasa alcalina sin muestra alguna de daño en hígado ni intestino como lo muestran sus análisis histológicos, puede deberse a que las ratas Wistar se encontraban en crecimiento, y esta es una razón por la que se ve incrementada la Fosfatasa alcalina. La Fosfatasa medida en el suero puede ser liberada no solamente por el hígado sino por los huesos, como sucede en los valores de fosfatasa alcalina en los niños, que se ve incrementada en las mismas proporciones que el crecimiento de sus huesos, debido a que están en etapa de crecimiento (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014).

Para el grupo intacto y el grupo lacto los valores (estadísticamente iguales) de Fosfatasa alcalina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas de todos los grupos tienen sana su capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede explicarse su elevación comparada con valores normales debido al crecimiento normal de las ratas (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014).

Para los controles positivos, se debe tener en cuenta que también se encontraban en la misma etapa de crecimiento, lo que de por sí reflejaría un aumento en la fosfatasa alcalina. Además los grupos control positivo tanto de las cuatro semanas como de las ocho semanas, en las que se observa esteatosis, edema y estasis vascular, refleja un alto nivel de daño en hepatocitos, puede indicar apoptosis hepática y por ende una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), consistente con los valores bajos encontrados en el control 8S para ALT, AST y urea. Y esa elevación puede ser tanto signo de que las ratas se encuentran en crecimiento como de que existe enfermedad hepática, ya que cuando los valores se ven por encima del rango 45-115 U/L, como sucede con todos los grupos positivos de este experimento indican enfermedad hepática (Thapa y Walia, 2007), consistente con sus análisis histológicos de hígado.

6.3.3 Análisis morfométrico (Lactos)

El análisis morfométrico se realizó con las laminillas teñidas con Rojo Sirio. Las células estelares hepáticas (HSC), se activan mediante la estimulación de la síntesis y secreción de colágeno tipo I y

tipo II y de fibronectina que promueve la formación de matriz extracelular (MEC) (Hasan et al., 2015c).

La proteína más abundante de la MEC es la colágena, que determina la estabilidad mecánica del tejido conectivo. El colágeno tipo I es responsable de formar tejido maduro (Stumpf et al., 2001), mientras que el colágeno tipo III tiene menor fuerza mecánica y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Hrčkova et al., 2010; Stumpf et al., 2001).

El Rojo Sirio es un tipo de tinción específica de las proteínas MEC y pueden usarse para cuantificar el grado de fibrosis, y determinar el tipo de colágeno presente en la muestra (Bataller y Brenner, 2005), ya que la inflamación crónica del hígado se caracteriza por la acumulación de tejido conectivo fibroso (Poonkhum et al., 2011). Su visualización es bajo luz polarizada y se observan en color rojo las fibras de colágena tipo I, y en color verde las fibras de colágena tipo III.

Tanto en condiciones normales como patológicas, el hígado consiste en componentes de la MEC, que incluye: colágenas intersticiales (tipo I y III) y colágena de la membrana basal (tipo IV) (Poonkhum et al., 2011), el hígado sano contiene cantidades aproximadamente iguales de colágeno tipo I y tipo III (Rojkind, 1979). Las fibras de colágena tipo I se encuentran formando tabiques cuando hay fibrosis (Hrčkova et al., 2010; Poonkhum et al., 2011). La colágena tipo I se encuentra en áreas más grandes en etapas avanzadas de fibrosis, y forma cápsulas y cicatrices en el hígado, mientras que la colágena tipo III, es menos abundante al haber más daño en hígado y se localiza principalmente en las lesiones fibrosas, lo que sugiere que cumplen una función específica de protección al huésped y en respuesta a un proceso de curación al tejido (Hrčkova et al., 2010).

El intestino sano consiste en colágena tipo I (68%), III (20%) y tipo V (12%) (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017). Durante los inicios de fibrosis en intestino, el rango de colágeno tipo III y colágeno tipo I se incrementa, en contraste con las últimas fases de la fibrosis en las que ese rango de colágena tipo III con tipo I disminuye (van Haaften et al., 2017). En la fibrosis de intestino, hay un incremento en ambos tipos de colágena (I y III), y la fibrosis se presenta para reparación de tejido o como respuesta a un estímulo patológico (Pantaroto et al., 2015).

6.3.3.1 Porcentaje de colágena total (Lactos)

El porcentaje de colágena total en hígado para el grupo intacto (media \pm SEM) fue de 0.27 ± 0.05 % y para el intestino fue de 1.8 ± 1.6 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.98 ± 0.36 % en hígado y para el intestino fue de 4.33 ± 1.62 %; mientras que en el grupo control

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 1.79 ± 0.67 % y para el intestino fue de 2.99 ± 1.52 %; para el grupo de Lactos en hígado fue de 1.78 ± 0.38 % y para el intestino fue de 2.69 ± 0.41 %. Todos los grupos son estadísticamente iguales

Todos los grupos son estadísticamente iguales tanto para la colágena total en hígado como en intestino. A continuación, se compararán los tipos de colágena para cada grupo, para poder determinar si contienen el mismo porcentaje de colágena tipo I y colágena tipo III.

6.3.3.2 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino (Lactos)

El porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo I en hígado para el grupo intacto fue de 1.72 ± 0.99 % y para el intestino fue de 20.54 ± 8.57 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.59 ± 0.77 % en hígado y para el intestino fue de 19.21 ± 5.91 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 7.32 ± 1.72 % y para el intestino fue de 12.77 ± 5.49 %; para el grupo de Lactos en hígado fue de 3.06 ± 0.72 % y para el intestino fue de 10.67 ± 3.04 %.

Para la colágena tipo I en intestino todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), se ha observado que hay un incremento de colágena tipo I en el colon cuando existen tumores malignos, pero no en la enfermedad diverticular del colon (Pantaroto et al., 2015). En este caso, el daño fue dirigido al hígado, por fibrosis hepática inducida con CCl_4 , por lo que el daño no había llegado al intestino con tanta severidad. Además, en la fibrosis hay un incremento en ambos tipos de colágena (I y III), y la fibrosis se presenta para reparación de tejido o como respuesta a un estímulo patológico (Pantaroto et al., 2015). Por los análisis histológicos de colon se puede observar que, aunque si existe daño en los controles positivos, únicamente en uno del control positivo de la cuarta semana se observó necrosis, pero no en los restantes. Lo que concuerda con los resultados obtenidos del porcentaje de colágena tipo I encontrado en intestino.

En cambio, para la colágena tipo I en hígado, los grupos intacto, 4S y berro son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) y el control positivo de las ocho semanas (8S) es el único estadísticamente diferente a los demás grupos ($p < 0.05$), y difiere del grupo intacto ($p < 0.01$).

El control positivo de las cuatro semanas contiene la misma cantidad de colágena tipo I en hígado que el grupo intacto, probablemente debido a que era una etapa inicial de la fibrosis, y la colágena tipo I no se encuentra tan presente en las etapas iniciales del daño hepático, se presenta en etapas

más avanzadas (Hrčkova et al., 2010), sin embargo este control demuestra un severo daño hepático y presencia de fibrosis en sus análisis de perfil hepático y el de histología.

Para la colágena tipo I en hígado, el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) es el único estadísticamente diferente a los demás grupos ($p < 0.05$), y difiere del grupo intacto ($p < 0.01$), lo que concuerda con que fue el grupo que durante las ocho semanas recibió únicamente daño, sin ningún tratamiento. Esto demuestra que el tratamiento de lactos, que mantuvo la misma dosis de daño durante el mismo tiempo que el 8S, tiene una cantidad de colágena tipo I similar al intacto, y el tratamiento tiene una función antifibrótica. Ya que la colágena tipo I es la que se encuentra presente en lesiones hepáticas y es característica de la fibrosis hepática (Hrčkova et al., 2010; Poonkhum et al., 2011).

6.3.3.3 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino para Lactos

La colágena tipo III, está más asociada a la protección del hospedero y como respuesta para participar en un proceso de curación al tejido (Hrčkova et al., 2010), que al daño hepático. Sin embargo, en estudios recientes se ha reportado que cuando ya hay mucho daño, en un modelo de cirrosis biliar hay incremento de colágeno tipo III en el hígado impulsado por el desarrollo de ascitis, lo cual se muestra además en pacientes con cirrosis compensada los cuales muestran un incremento en la colágena tipo III (Praktiknjo et al., 2018).

El porcentaje de colágena tipo III está asociada más bien a la protección del hospedero y como herramienta para la curación de heridas que al daño hepático. Se observa que el porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo III en hígado para el grupo intacto fue de 2.46 ± 1.94 % y para el intestino fue de 22.18 ± 9.05 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.65 ± 0.60 % en hígado y para el intestino fue de 22.49 ± 4.37 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 3.70 ± 0.92 % y para el intestino fue de 13.41 ± 1.70 %; para el grupo de Lactos en hígado fue de 3.25 ± 0.73 % y para el intestino fue de 7.33 ± 3.34 %.

La colágena tipo III en hígado es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos. Esto coincide con lo que ya sabemos, que tanto en condiciones normales como patológicas, el hígado tiene colágena tipo III como componente de su matriz extracelular (Poonkhum et al., 2011). En cuanto a los hígados de los controles positivos, tampoco hay diferencia significativa debido a que el daño que presentan es por fibrosis, y no por cirrosis, en la cual se hubiera podido esperar un incremento de colágeno tipo III (Praktiknjo et al., 2018).

La colágena tipo III en intestino es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos. Esto coincide con un estudio realizado para intestinos sanos e intestinos con enfermedad inflamatoria que no mostraron diferencias significativas entre ellos (Graham et al., 1988), además se sabe que el 20% de colágeno es tipo III en intestino sano (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017). Este tipo de colágeno tiene menor fuerza mecánica que el tipo I y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Stumpf et al., 2001). Sin embargo, todos los grupos son estadísticamente iguales.

6.3.4 Análisis genético con qPCR

6.3.4.1 En hígado: IL-1, IL-10 y colágena para Lactos

IL-1

La superfamilia de citocinas IL-1 es un grupo de proteínas (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36, IL-37 e IL-38) que a su vez se divide en sub-familias (Barbier et al., 2019). Existen once miembros de citocinas en la familia IL-1, y diez miembros de receptores de la familia IL-1 (Dinarello, 2018). La IL-1 es una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019). La IL-1 se refiere a dos citocinas similares que pueden unirse a los mismos receptores, uno de ellos siendo el más secretado (IL-1 β), y el otro manteniéndose de forma intracelular (IL-1 α) (Meier et al., 2019). La IL-1 β es el mediador inflamatorio más importante cuando existe daño de tejido en enfermedades crónicas hepáticas, sin embargo aún no se sabe si la IL-1 β contribuye o es una consecuencia a la patogénesis de la fibrosis hepática (Meier et al., 2019).

Las citocinas y receptores de la familia IL-1 afectan a un amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013). Más que cualquier otra familia de citocinas, los miembros de la familia de IL-1 son asociados al daño por inflamación. Son llamadas "pirógenos endógenos" y tanto sus citocinas como sus receptores son responsables por la fiebre e implicadas en un amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018). De hecho, las terapias anti-IL-1 han tenido un impacto enorme en las enfermedades inflamatorias (Garlanda et al., 2013).

Sin embargo, los mismos miembros también funcionan incrementando una resistencia no específica a la infección y al desarrollo de la respuesta inmune ante antígenos foráneos. Estas propiedades de inflamación y defensa del huésped son llamadas "inmunidad innata", mientras que el aumento a la respuesta contra antígenos se le llama "inmunidad adquirida". Las respuestas de los miembros de la familia IL-1 son no-específicas, de esta manera aumentando el reconocimiento de antígenos y activando la función de linfocitos (Dinarello, 2018).

Se observa que la expresión de IL-1 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.821 ± 0.096 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 3.573 ± 0.198 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 12.53 ± 1.342 ; para el grupo de Lactos fue de 1.386 ± 0.378 .

La expresión de IL-1 en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es el menor de todos los valores (0.821 ± 0.096), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de Lactos, y diferente al control positivo de la cuarta semana ($p < 0.01$) y al control positivo de las ocho semanas ($p < 0.001$). Lo cual es de esperarse, ya que el grupo intacto es un grupo sano que no tenía por qué estar presentando inflamación hepática (Meier et al., 2019), y es por esto que es el grupo con menor expresión de la citocina proinflamatoria IL-1, ya que esta citocina se expresa como respuesta inmunológica e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013) y no ante condiciones sanas.

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (3.57 ± 0.20), siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presentando diferencia significativa de ($p < 0.01$) contra el grupo intacto.

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (12.53 ± 1.34), siendo el valor más elevado de IL-1, es diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presenta diferencia significativa de ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto. Este grupo es el más elevado ya que La IL-1 es una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), y este es un modelo en el que se le ha inducido daño de manera crónica, pues nunca se detuvo la inducción de fibrosis y tuvo una duración de ocho semanas. Su expresión tan elevada es consistente cuando existe daño en hígado en enfermedades crónicas, sin embargo aún no se sabe si la IL-1 β contribuye o es una consecuencia a la patogénesis de la fibrosis hepática (Meier et al., 2019). A pesar de que las citocinas proinflamatorias como la IL-1 son parte de la defensa del hospedero contra patógenos, un exceso de inflamación puede aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos, lo cual dañan al huésped (Iyer y Cheng, 2012), como lo confirman sus análisis histopatológicos.

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo de Lactos, expresado en media \pm SEM es de (1.39 ± 0.38), siendo diferente ($p < 0.05$) a los grupos controles positivos, pero es igual ($p < 0.05$) al grupo intacto. Lo cual indica que el organismo se está defendiendo de no tener demasiadas citocinas proinflamatorias que pudieran causarle daño al hospedero, por un exceso de inflamación que puede

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012). Y en cambio se observa consistentemente con este resultado que hay una elevación muy grande en la IL-10 como veremos a continuación.

Los grupos de control positivo, tanto el de cuatro semanas como el de ocho semanas, presentan mayores concentraciones de IL-1 en hígado comparadas con el intacto. Esto es de esperarse ya que están sufriendo inducción de daño con CCl₄ y, por lo tanto, hay respuesta inflamatoria inmune (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013). El control positivo de las ocho semanas, tiene las mayores expresiones de IL-1, esta respuesta inflamatoria excesiva conlleva a causar daños en el tejido y problemas en la homeostasis del hospedero (Iyer y Cheng, 2012). El grupo de lactos se está comportando igual al grupo intacto.

IL-10

La respuesta inmune contra patógenos requiere de una activación rápida de citocinas proinflamatorias, las cuales sirven para iniciar la defensa del hospedero contra invasiones microbianas. Sin embargo, un exceso de inflamación puede aumentar disturbios metabólicos y hemodinámicos, ambos dañinos para el huésped (Iyer y Cheng, 2012). Es por esto que existe un mecanismo paralelo antiinflamatorio que sirve para controlar y contrarrestar la producción de moléculas proinflamatorias, la IL-10 es una familia de citocinas que ayudan a la respuesta del tejido ante daño y enfermedad, para así limitar el daño a tejido, recuperar y mantener la homeostasis en el tejido epitelial y su integridad y participan en la respuesta inmunológica desarrollada en el hígado, mejorando la inmunidad innata epitelial y regulando el proceso de recuperación tras eventos de infección o inflamación. (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012).

En este sentido, se ha propuesto que la IL-10 suprime el sistema inmune del hospedero (Pestka et al., 2004). La IL-10 es una potente citocina antiinflamatoria que juega un papel crucial, previniendo patologías inflamatorias y autoinmunes, es el mediador ante la respuesta antiinflamatoria del huésped (Iyer y Cheng, 2012). La deficiencia en la expresión de IL-10 puede aumentar la respuesta inflamatoria ante microbios, pero también puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes, una respuesta inflamatoria exagerada, resultando en inmunopatología exacerbada y gran daño al tejido (Iyer y Cheng, 2012).

La IL-10 es una gran familia de citocinas, que comprende tres subfamilias: la IL-20, que incluye la IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, y IL-26; la IL-10, el grupo del tipo III IFN que incluye miembros de la IL-28A, IL-28B, y la IL-29 (Caparrós y Francés, 2018; Pestka et al., 2004). La IL-20 es parte de una subfamilia de

la familia IL-10, esta citocina que por un lado tiene un papel protector ante la progresión de fibrosis, pero por otro lado puede causar susceptibilidad en el tejido hepático cuando se presenta carcinoma hepatocelular (Caparrós y Francés, 2018). Toda la familia de IL-10 tiene la función de comunicarse con leucocitos y células epiteliales en diferentes tejidos, como el hígado (Caparrós y Francés, 2018).

La IL-10 inicia una gran variedad de actividades al unirse a sus receptores. El mecanismo se cree que es la inhibición de la capacidad de presentación del antígeno de los macrófagos y de las células dendríticas. Además, bloquea la producción de citocinas, la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de la clase II) y la secreción de quimiocinas (Iyer y Cheng, 2012; O'Garra et al., 2008; Pestka et al., 2004). Así, la IL-10 inhibe el daño al hospedero durante la respuesta inmune ante patógenos (O'Garra et al., 2008).

Son importantes en controlar la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015).

La expresión de IL-10 en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (0.87 ± 0.13) , siendo igual ($p < 0.05$) a los grupos control positivo de las cuatro semanas y control positivo de las ocho semanas, los cuales presentan los valores más bajos de IL-10 y diferente al grupo de lactos ($p < 0.0001$). Esto es así ya que el grupo intacto no está experimentando una respuesta inmune contra ninguna clase de daño o enfermedad en defensa del hospedero (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012).

La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (0.41 ± 0.07) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de intacto y al grupo control positivo de las ocho semanas, y diferente al grupo de berro. La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (0.98 ± 0.11) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de intacto y al grupo control positivo de las ocho semanas, y diferente al grupo de lactos. Ambos controles positivos, tanto el 4s como el 8S, expresan IL-1, de hecho, el control positivo de las ocho semanas (8s) fue el que mayor expresión de IL-1 tuvo, esto significa que está expresándose una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), para ambos controles positivos, y no hay una contraparte, que contrarreste el exceso de inflamación que está generando daño y disturbios metanólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012), siendo incapaz de inhibir el daño al hospedero durante su respuesta inmune (O'Garra et al., 2008).

Se observa que la expresión de IL-10 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.87 ± 0.13 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.41 ± 0.07 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.98 ± 0.12 y para el grupo de Lactos fue de 9.01 ± 1.57 .

La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo de Lactos, expresado en media \pm SEM, es el más elevado, de (9.01 ± 1.57), siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presentando diferencia significativa de ($p < 0.001$) contra el grupo intacto. Esto demuestra que el grupo de Lactos está protegiendo al hospedero, poniendo en marcha un mecanismo antiinflamatorio al causado por la respuesta inmune proinflamatoria activada contra el CCl_4 , y disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Además, de acuerdo a su análisis histopatológico, en el que se muestra que no hay tanto daño como el observado en los controles positivos, se demuestra que esta elevación en la expresión de IL-10 está controlando la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015).

Colágena

Se observa que la expresión de colágena en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.05 ± 0.06 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 4.06 ± 0.31 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 3.70 ± 0.28 y para el grupo de Lactos fue de 3.17 ± 0.25 .

Los grupos control positivo presentaron los valores más elevados para colágena en hígado.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (4.06 ± 0.31), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas (8S) y diferente ($p < 0.05$) al grupo de Lactos y diferente ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (3.70 ± 0.28), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas (8S) y al grupo de Lactos y diferente ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo de Lactos, expresado en media \pm SEM es de (3.17 \pm 0.25), siendo diferente ($p < 0.05$) a los grupos control positivo de las cuatro semanas y al grupo intacto ($p < 0.0001$).

El grupo intacto es el que presenta menores valores de colágena en hígado, el grupo intacto no recibió CCl_4 , es el grupo sano; el grupo de Lactos contiene las mismas cantidades de colágena que el grupo control positivo de las ocho semanas, consistente con su análisis histopatológico en el que hay presencia de fibrosis incipiente; esto está indicando que el grupo de Lactos no está teniendo acción antifibrótica, sin embargo hay estabilidad en las enzimas hepáticas y en su análisis histológico se observa que se está preservando y protegiendo a los hepatocitos. A pesar de que los controles positivos y el grupo de Lactos presenten altos niveles de colágena, siendo el de la cuarta semana el más elevado, al que le sigue el grupo de Lactos, se observa que si hay fibrosis, ya que la colágena es el componente más abundante de la MEC en fibrosis, pero no llega a ser cirrosis ya que los valores están elevados cuatro veces más que el intacto para el control positivo de la cuarta semana (el más elevado de todos), que en caso de ser cirrosis, este incremento sería hasta diez veces más en cirrosis (Schuppan, 2015). En este caso el incremento es cuatro veces mayor, para ambos controles positivos, y tres veces mayor en el grupo de Lactos, lo cual indica, para los controles positivos que existe una descontrolada reparación de tejido, caracterizada por el reemplazo de tejido funcional hepático con colágeno (Chen et al., 2015b). Sus células hepáticas se han convertido en células fibrogénicas hepáticas, las cuales son altamente proliferativas y contráctiles, sus respuestas ante el daño, en este caso causado por el CCl_4 , son de depósito de colágeno para encapsular la herida; seguido de una respuesta crónica inflamatoria y neo-angiogénesis (Karimzadeh-Toosi, 2015). En cambio para el grupo de Lactos, existe presencia de fibrosis incipiente, sin embargo no hay respuesta inflamatoria, ya que hay más elevación de la IL-10, y su histología muestra que no hay daño hepático, está existiendo una protección al hígado, a pesar de que sí se está alcanzando a desarrollar fibrosis, esta protección es consistente además de con su histología, con los valores de ALT, el cual es un marcador específico del hígado (Tejos et al., 2013), y es idéntico al grupo intacto, lo cual demuestra esa protección.

6.3.4.2 En intestino: IL-10 para Lactos

La expresión de IL-10 en intestino (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.06 ± 0.08 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.38 ± 0.00 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) fue de 0.40 ± 0.07 y para el grupo de Lactos fue de 1.45 ± 0.32 .

La expresión de IL-10 en intestino, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (1.06 ± 0.08), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de berro y diferente a los grupos control positivo de las cuatro y de las ocho semanas.

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (0.38 ± 0.00), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas y diferente a los grupos intacto y Lactos.

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo de Lactos, expresado en media \pm SEM es de (0.9 ± 0.09), siendo diferente ($p < 0.05$) a los controles positivo de las cuatro y ocho semanas, pero igual al grupo intacto.

En el grupo intacto demuestra que, de manera natural, en organismos sanos, es donde se encuentra la mayor cantidad de IL-10 en intestino, y este comportamiento es similar en el grupo de Lactos, el cual es igual al grupo intacto. Esto se ha demostrado en ratones a los que se les suprime genéticamente la función de la IL-10 y desarrollan inflamación del colon en presencia de una flora normal (O'Garra et al., 2008). En este caso el grupo de Lactos está actuando sobre el microbiota intestinal reforzándolo, ya que el Lactobacillus juega un papel importante en la microbiota generando mejor absorción, almacenamiento y gasto de la energía obtenida de la dieta (Cerdó, García-Santos, G. Bermúdez, y Campoy, 2019). Esta alta expresión de IL-10 en el grupo de Lactos, es consistente con el uso que se les está dando a los probióticos como inmunomoduladores, usando cepas de probióticos para inducir la producción de IL-10, entre ellas usando cepas con Lactobacillus (Cerdó et al., 2019; Hart, 2004).

6.3.5 Pesos semanales de las ratas vivas

6.3.5.1 Pesos de las ratas vivas con Lactos

Los pesos de las ratas se midieron una vez por semana durante las 8 semanas que duró el experimento.

Los pesos de las ratas son diferentes estadísticamente en la primera semana (150.3 ± 6.86 g) para todos los tratamientos, comparadas contra el intacto, la 4S es diferente ($p < 0.0001$), la 8S es

diferente ($p < 0.05$) y Lacto ($p < 0.01$) es diferente. En la segunda semana (184.9 ± 6.31 g), ya hay más semejanzas entre los grupos, pues el grupo intacto es similar tanto al grupo de Lactos como al control positivo de las ocho semanas, aunque entre los tratamientos 4S, 8S y Lactos, son todos diferentes entre sí. El grupo control positivo de la cuarta semana (4S), es diferente al intacto con ($p < 0.001$). En la tercera semana (203.7 ± 5.97 g) hay más homogeneidad, ahora los grupos intacto, 8S y Lacto son iguales, y el único que permanece diferente es el de la 4S, siendo diferente al intacto con ($p < 0.01$). En la cuarta semana (241.4 ± 17.9 g) todos los grupos son iguales ($p < 0.05$), al igual que en la quinta (220.3 ± 5.99 g) y sexta semana (232.4 ± 6.64 g). Ya para la séptima semana (240.0 ± 8.21 g) comienzan a haber diferencias entre los grupos, siendo el mayor grupo el de intactos, y el menor grupo el de Lactos ($p < 0.01$), y el grupo control positivo de las ocho semanas permanece intermedio, siendo estadísticamente igual tanto al intacto como al de Lactos; en la octava semana (246.1 ± 10.42 g) se comportan igual que en la séptima semana.

El peso de la primera semana fue menor al de Al-Seeni et al., 2016, y al utilizado por Xu et al., 2002, debido a que esas ratas eran de mayor edad (aproximadamente 10 semanas), mientras que las utilizadas en este experimento fueron de un mes de edad (aproximadamente 4 semanas).

Las ratas fueron aumentando de peso a medida que avanzaba el experimento, con excepción de la quinta semana en la que el promedio bajó de 241.4 a 220.3 y continuó incrementándose. Esto coincide con que ya no se encuentra el grupo control 4S, el cual podría haber incrementado el peso promedio de todas las ratas. Pues separados por tratamientos, se observa que las ratas van aumentando de peso a medida que aumenta el tiempo, similar a lo ocurrido con Troung et al. (2014) para sus ratones expuestos a dosis de CCl_4 de 0.8 mL/kg, los cuales ganaron peso durante las ocho semanas. Ellos también observaron a dosis de 1mL/kg y 1.2mL/kg de CCl_4 con aceite de oliva, las ratas bajaron de peso a partir de la cuarta semana de su experimento en todos sus grupos, con excepción del intacto, hasta la semana 8 (de 27.91 ± 2.2 hasta 23.90 ± 2.51 g) (Truong et al., 2014).

6.3.6 Discusiones generales del grupo de Lactos

Los **pesos de los hígados** para el tratamiento de Lactos, fueron los más bajos de peso, siendo estadísticamente iguales ($p < 0.05$) al intacto, pero diferente a ambos controles negativos. La baja de peso del hígado de Lactos no es patológico, y se debe a que por ser probiótico promueve la pérdida de peso debido a que modulan la microbiota que se ve reflejada en el peso de su hígado, sin embargo no muestra mayor disminución de peso (que el intacto), porque no fue combinado con dieta hipocalórica como lo hicieron en otros estudios (Crovesy et al., 2017).

En cuanto al **perfil hepático** para el tratamiento de Lactos: Para **ALT**: el tratamiento de Lactos es estadísticamente igual al intacto, y al control positivo de las ocho semanas (8S). El grupo de intactos y el de Lactos se comportan de la misma manera, siendo los que expresan menores niveles de ALT debido a que no existe daño en el hígado (Ginès et al., 2011b; Tejos et al., 2013). Para **AST**, el tratamiento de Lactos es estadísticamente igual al control positivo 8S, pero diferente al control positivo de las cuatro semanas. Comparado con el 4S, vemos que el grupo lacto ha tenido una mejora impresionante, en cuanto al 8S, sabemos que no presenta liberación enzimática congruente con el daño al torrente sanguíneo debido al proceso apoptótico que está sufriendo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016). Los daños se explican porque de manera crónica tuvo inducción de daño con CCl₄. Sin embargo, no están cerca de estar tan dañados como los controles, los cuales son 2.7 mayores en AST que el grupo Lactos. Todos los grupos muestran niveles de **urea** normales y estadísticamente iguales; lo cual es consistente con Fortea et al. (2018). Para el tratamiento de Lactos, esto indica que el hígado está realizando de manera normal una de sus funciones que es el metabolismo proteico, en el cual, el amonio (NH₃) tóxico resultante de la desaminación (eliminar el amino NH₂) de los aminoácidos es convertido por el hígado en urea, para que pierda toxicidad y sea excretado en la orina (Tortora, 2013). Todos los tratamientos (Intacto, Lactos, controles positivos 4S y 8S), muestran niveles de **albúmina** normales y estadísticamente iguales; lo cual es consistente a los valores encontrados tanto en ratas sanas como en ratas expuestas a CCl₄ (Caridad et al., 2011; Fortea et al., 2018). Esto implica que en el tratamiento de Lactos, existe una correcta capacidad sintética de los hepatocitos; de lo contrario, los niveles séricos se verían disminuidos en fases avanzadas de la cirrosis (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Los valores de **Fosfatasa alcalina** para todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), y todos están por encima de los valores normales reportados (River Charles, 1982; Thapa y Walia, 2007). Para el grupo intacto y el grupo lactos los valores (estadísticamente iguales) de Fosfatasa alcalina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas tienen sana su capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede explicarse su elevación comparada con valores normales debido a que las ratas Wistar se encontraban en crecimiento, y la fosfatasa alcalina es liberada por los huesos ya que están en etapa de crecimiento (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014).

El análisis morfométrico para Lactos: El porcentaje de **colágena total en hígado e intestino**, es igual para todos los tratamientos (Intacto, Lactos, controles positivos 4S y 8S).

Para la **colágena tipo I en intestino** todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), consistente con lo reportado por otros investigadores (Pantaroto et al., 2015). Para la **colágena tipo I en hígado**, los grupos intacto, 4S y Lactos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) y son los niveles más bajos, que difieren ($p < 0.01$) del grupo 8S. La **colágena tipo III en hígado** es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos, ya que el hígado tiene colágena tipo III como componente de su matriz extracelular (Poonkhum et al., 2011). La **colágena tipo III en intestino** es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos, similar a lo reportado en intestino sano (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017), y de acuerdo a lo esperado, ya que este tipo de colágeno tiene menor fuerza mecánica que el tipo I y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Stumpf et al., 2001).

El **análisis genético** con qPCR para Lactos: La expresión de **IL-1 en hígado**, es igual ($p < 0.05$) al grupo intacto y diferente a los controles positivos; esto nos indica que el organismo está cuidándose de no tener demasiadas citocinas proinflamatorias que pudieran causarle daño al hospedero, por un exceso de inflamación que puede aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012). Y en cambio se observa consistentemente con este resultado que hay una elevación muy grande en la expresión de **IL-10 en hígado**, siendo la más elevada y diferente a los demás grupos, lo cual significa que el tratamiento con Lactos está protegiendo al hospedero, poniendo en marcha un mecanismo antiinflamatorio al causado por la respuesta inmune proinflamatoria (IL-1) activada contra el CCl_4 , y disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Además, de acuerdo a su análisis histopatológico, en el que se muestra que no hay tanto daño como el observado en los controles positivos, se demuestra que esta elevación en la expresión de IL-10 está controlando la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015). La expresión de **colágena en hígado** es igual ($p < 0.05$) para el tratamiento de Lactos y al control positivo 8S; esto está indicando que el grupo de Lactos no está teniendo acción antifibrótica, sin embargo, hay estabilidad en las enzimas hepáticas y en su análisis histológico se observa que se está preservando y protegiendo a los hepatocitos. El incremento es cuatro veces mayor, para ambos controles positivos, y tres veces mayor en el grupo de Lactos, esta diferencia, es muy importante ya que a diferencia de los controles positivos, existe presencia de fibrosis incipiente, sin embargo no hay respuesta inflamatoria, ya que hay más elevación de la IL-10, y su histología

muestra que no hay daño hepático, está existiendo una protección al hígado, a pesar de que sí se está alcanzando a desarrollar fibrosis, esta protección es consistente además de con su histología, con los valores de ALT, el cual es un marcador específico del hígado (Tejos et al., 2013), y es idéntico al grupo intacto, lo cual demuestra esa protección. La expresión de **IL-10 en intestino** es igual ($p < 0.05$) para el tratamiento de Lactos y el intacto. Esto confirma que, en estado sano, el intestino es donde se encuentra la mayor cantidad de IL-10. Congruente con lo que ya se ha demostrado en ratones a los que se les suprime genéticamente la función de la IL-10 y desarrollan inflamación del colon en presencia de una flora normal (O'Garra et al., 2008). En este caso el grupo de Lactos está actuando sobre el microbiota intestinal reforzándolo, ya que el Lactobacillus juega un papel importante en la microbiota generando mejor absorción, almacenamiento y gasto de la energía obtenida de la dieta (Cerdó et al., 2019). Esta alta expresión de IL-10 en el grupo de Lactos, es consistente con el uso que se les está dando a los probióticos (incluidos los Lactobacillus) como inmunomoduladores, usando cepas de probióticos para inducir la producción de IL-10 (Cerdó et al., 2019; Hart, 2004).

Los **análisis histológicos** para el grupo de Lactos, muestran que: a pesar de haber cierto daño causado por el CCl_4 , como ligera esteatosis (3), estasis (3), edema perinuclear ligero (3), fibrosis incipiente (3), nódulos fibróticos (1), las células, se están defendiendo, pues hay infiltrado inflamatorio en hígado (2), hay hígados sanos, con ausencia de estasis, ausencia de fibrosis y ausencia de lesión hepatocitaria. En general los intestinos se ven sanos (4), uno con infiltrado inflamatorio, y dos con desprendimiento epitelial ligero (2). Los daños se explican porque de manera crónica tuvo inducción de daño con CCl_4 . Sin embargo, no están cerca de estar tan dañados como los controles; esa regeneración, mejora observada y protección hepatocitaria, es congruente con los valores del perfil hepático. El grupo de Lactos que tuvo la misma intoxicación con CCl_4 que los controles positivos, presenta consistentemente con este daño fibrosis incipiente, sin embargo también se esperaba observar daño hepatocelular (Domitrović et al., 2013), el cual no hubo, una elevación en sus niveles de ALT (Domitrović et al., 2013; Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013), el cual no hubo, pues se comportó igual al grupo intacto, y una elevación de Fosfatasa alcalina en el torrente sanguíneo (Domitrović et al., 2013; Ginès et al., 2011b), el cual tampoco fue diferente al grupo intacto. Y presentan mucho menos daño histopatológico que el encontrado en ambos controles positivos.

Los **pesos de las ratas**, obtenidos semanalmente, muestran que los pesos comienzan siendo estadísticamente diferentes, pero se estabilizan durante la cuarta, quinta y sexta. A partir de la séptima y en la octava semana, el grupo Lactos es el que muestra menor peso diferente al del grupo intacto ($p < 0.01$), pero similar al 8S ($p < 0.05$). Separados por tratamientos, se observa que las ratas van aumentando de peso a medida que aumenta el tiempo, similar a lo ocurrido con Troung et al. (2014) para sus ratones expuestos a dosis de CCl_4 de 0.8 mL/kg (misma dosis que en este trabajo), los cuales ganaron peso durante las ocho semanas.

6.4 Extracto de berro y de *Lactobacillus rhamnosus silvestres*

6.4.1 Pesos de los hígados para Berro-Lacto

Los cambios en el peso del hígado pueden detectar y cuantificar los efectos producidos por hepatotoxinas, lo cual es de gran utilidad, pues su peso también puede verse alterado por neoplasias primarias o secundarias, es por esto que puede utilizarse como un parámetro informativo en estudios crónicos para detectar potencial carcinogénico (Cattley y Cullen, 2013).

Se observa que el peso de los hígados (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 11.35 ± 0.56 g; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 12.44 ± 1.13 g; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) fue de 12.80 ± 1.02 y para el grupo de Berro-Lacto fue de 13.25 ± 0.73 g, sin embargo, todos los pesos de los hígados para los grupos son estadísticamente iguales.

Los pesos de los hígados (media \pm SEM) para los controles positivo, negativos y Berro-Lacto van desde los 11.3 ± 0.3 g (grupo intacto) hasta los 13.2 ± 0.7 g (grupo Berro-Lacto), sin embargo, todos los pesos de los hígados para los grupos son estadísticamente iguales.

Los pesos de los hígados no mostraron diferencias significativas, al igual que los experimentos realizados por Dutta y colaboradores (2018), ni por Uemitsu (1984) quienes no encontraron diferencia significativa de peso en los grupos a los que se les administró CCl_4 con respecto a los controles negativos (Dutta et al., 2018; Uemitsu, 1984). Además, aproximadamente el 25% de hígados cirróticos en su etapa final son normales en tamaño (Raichholz et al., 2016), por lo que no es raro encontrar que en estado fibrótico, los hígados no presenten diferencias significativas en peso con respecto a los controles negativos.

Esto difiere de algunos que han encontrado diferencias en el peso del hígado entre los controles positivos y el negativo, que han observado un incremento de peso en el hígado para los animales que recibieron CCl₄ (Al-Seeni et al., 2016; Domitrović et al., 2013; Uemitsu, 1984) Domitrović y colaboradores (2013), observaron que el peso relativo del hígado (expresado en g de peso del hígado/100g de peso del animal) se vio incrementado en los ratones que fueron intoxicados con CCl₄, en comparación tanto con sus grupos controles como con los grupos en los que se observó regresión de fibrosis (Domitrović et al., 2013), explican que esto es debido a que la administración de CCl₄ causa en el hígado una rápida acumulación de triglicéridos debido a un bloqueo en la secreción de las lipoproteínas de baja densidad en los hepatocitos (Al-Seeni et al., 2016). También difiere de algunos que reportan haber encontrado una baja de peso en los hígados dañados, debido generalmente a pérdida de masa funcional asociada con atrofia o un daño hepatocelular letal sin observar otros cambios, pero es mayormente observado en daños agudos (Cattley y Cullen, 2013), un estudio reportado por (Marhoume et al., 2017) encontró un decremento en el peso del hígado de las ratas tratadas con CCl₄ comparadas con el control negativo, esto se debió al desarrollo de necrosis en estos hígados.

El no haber encontrado diferencias significativas en los peso de los hígados de los controles y del grupo de berro-lacto, no es inusual como lo muestran otros estudios (Dutta et al., 2018; Raichholz et al., 2016; Uemitsu, 1984).

6.4.2 Perfil hepático para Berro-Lacto

Para conocer la función hepática, se analizaron los sueros de cada rata mediante la técnica de química seca para analizar los biomarcadores indirectos. Los cuales permiten realizar un perfil hepático para evaluar el estado del hígado en cuanto a su daño estructural e integridad funcional (Ebadollahi et al., 2010).

Se analizan los biomarcadores séricos ya que han sido muy evaluados principalmente en referencia a su capacidad para determinar la etapa de fibrosis. Se han propuesto dos tipos: biomarcadores directos que reflejan el depósito o eliminación del MEC en el hígado; y los biomarcadores indirectos, que son los analizados en este apartado, los cuales incluyen moléculas soltadas a la sangre, inducidas por la inflamación, sintetizadas y reguladas o excretadas por el órgano como producto del proceso común alterado que es consecuencia del deterioro de la función hepática (Cequera y García de León, 2014).

6.4.2.1 ALT para Berro-Lacto

Las aminotransferasas no tienen función conocida en el suero, y tienen una relativamente corta vida-media en el orden de días. La elevación de ambas aminotransferasas (AST y ALT), significa un daño activo al hígado o a los otros órganos que las contienen; el nivel de elevación no se correlaciona con la severidad pero puede tener valor diagnóstico (Ginès et al., 2011b).

La alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima cuya función es catalizar la transferencia de grupos amino (alanino y aspartato) para producir ácido pirúvico y oxaloacetato. Se encuentra en abundancia en el citoplasma de los hepatocitos, donde su actividad es aproximadamente 3000 veces mayor que en suero. Cuando ocurre daño o muerte hepatocelular, existe la liberación de ALT hacia el torrente sanguíneo, incrementando sus niveles en suero lo cual es un reflejo de lesión o necrosis hepática. La ALT se considera una enzima que funciona como marcador específico del hígado, porque aquí es donde se encuentra principalmente, aunque también se encuentra en cantidades pequeñas en riñón, miocardio y músculo esquelético. Hay evidencias de que los niveles séricos elevados de ALT se asocian a mayor mortalidad por causa hepática. Por esto se ha sugerido que valores anormales de ALT podrían ser un buen marcador de riesgo hepático y metabólico (Tejos et al., 2013).

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de 30 ± 1.16 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 822.0 ± 108.00 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 52 ± 5.51 (U/L) y el tratamiento con Berro-Lacto mostró valores de 117.9 ± 30.86 (U/L).

En el grupo control negativo (Intacto), los valores (media \pm SEM) de ALT fueron de 30 ± 1.16 U/L. Este promedio coincide con los valores normales de ratas Sprague-Dawley para ALT de 27 U/L, con un rango de (25-41 U/L) reportados en un experimento realizado durante 12 semanas por Fortea et al. (2018), también coincide con los valores reportados por (River, 1982) quien obtuvo un valor promedio de 32 U/L y un rango de (17-50 U/L).

El grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de ALT 822.0 ± 108.0 U/L. Y fue estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando una diferencia ($p < 0.0001$) con respecto al intacto. Esta liberación de ALT en el grupo indica que existe un daño o muerte hepatocelular, habiéndose incrementado los niveles de ALT 27.4 veces más que el grupo intacto, lo cual es un reflejo de lesión o necrosis hepática (Tejos et al., 2013).

Esta elevación tan marcada es específica para necrosis hepática, debido a que la ALT se encuentra en hígado mientras que la AST puede encontrarse en diferentes órganos, y niveles tan elevados de ALT comparados con el grupo intacto ocurren en desórdenes asociados con lesiones hepatocelulares extensivas como hepatitis viral, daño isquémico hepático, y daño hepático inducido por medicamentos o toxinas. Estas condiciones son características por una pérdida extensa del parénquima hepático (Parmar et al., 2016). Consistente con el experimento, ya que este control positivo únicamente recibió CCl₄ sin ningún otro tratamiento antifibrótico. Estos resultados de elevación del ALT son similares a los encontrados por (Al-Seeni et al., 2016).

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S), tuvo niveles (media \pm SEM) de 52 ± 5.5 (U/L), este grupo es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las cuatro semanas, pero igual al grupo intacto y al de berro. Este grupo de las ocho semanas no recibió ningún tipo de tratamiento, fue inducción con CCl₄ durante las ocho semanas, y el control positivo 4S nos demuestra que sí tuvo daño significativo en el hígado a las cuatro semanas, por lo que, al continuar induciendo daño las células del parénquima hepático fueron aumentando el daño. La baja cantidad de ALT medida en sangre no se debe a que no hubiera daño hepático, se puede explicar sabiendo que cuando las células sufren gran cantidad de daño, y están en apoptosis, no hay elevaciones de ALT en suero (McGill, 2016), además se ha vuelto evidente en modelos hepáticos de apoptosis en hepatocitos que durante las fases iniciales de daño no hay elevaciones significativas de ALT en el suero (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), y este experimento es para inducir fibrosis y no cirrosis, es decir, la etapa inicial de daño, por lo que es consistente con encontrar niveles bajos de ALT. Estos resultados coinciden con los reportados por Fortea et al. (2018), que observaron en sus ratas inducidas una vez por semana con CCl₄, durante 12 semanas, niveles de ALT de 41 U/L con un rango de 28-61 U/L.

Se ha reportado que el CCl₄ produce radicales libres (Kumar et al., 2009), Las enzimas ALT son proteínas, y cuando las células entran en estrés oxidativo, varios de sus puntos son oxidados lo que provoca que disminuya la actividad de muchas vías metabólicas, incluyendo la traslación, esto ocurre tanto en bacterias como en eucariontes. Parte de esta inhibición puede deberse a la inactivación oxidativa de varias enzimas involucradas en el metabolismo energético y en la síntesis de aminoácidos, ambas esenciales para la síntesis de proteína (Katz y Orellana, 2012).

Otra explicación para los niveles bajos encontrados en ALT puede ser que las células se están muriendo por apoptosis. Los niveles de ALT son inicialmente bajos cuando se usan tratamientos

inductores de apoptosis hepática, esto debido a que la muerte celular por apoptosis se puede pensar como una implosión de la célula; un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular. Por el contrario, una necrosis oncótica, que pudiera pensarse como la explosión de la célula, puede ocurrir en algunas células de manera secundaria tras haberse inducido su apoptosis. De hecho, las características de la apoptosis son observadas claramente en modelos hepáticos de apoptosis en hepatocitos durante las fases iniciales de daño ya que no hay elevaciones significativas de ALT en el suero. La elevación de ALT se incrementa dramáticamente durante la última etapa, cuando ocurre necrosis secundaria, ya sea como resultado del daño directo al hepatocito o a inflamación (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

Los grupos de Intactos y control positivo de las ocho semanas (8S) son iguales ($p < 0.05$) y fueron los que menores niveles de ALT presentaron.

El grupo de Berro-Lacto se comporta diferente al intacto ($p < 0.05$), pero es igual al control positivo de las ocho semanas. Aunque muy alejado del control positivo de las cuatro semanas (4S). Esto sugiere que existe daño hepático y pérdida del parénquima hepático (Ginès et al., 2011b; Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013), y se confirma al revisar su histopatología, la cual en hígado, se observa que hay infiltrado inflamatorio, edema perinuclear, ligera esteatosis, y presencia de fibrosis, desde incipiente hasta formando nódulos. En cuanto a intestino se encuentra sano, sin embargo, un caso tiene ligero desprendimiento epitelial.

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S) es igual al grupo intacto, sin embargo, esta igualdad no se debe a que el control positivo este sano, sino a que los hepatocitos se encuentran en apoptosis, lo cual hace que no haya elevaciones de ALT en sangre, debido a que hay mucho daño en el hepatocito generando la disminución en la actividad de muchas vías metabólicas, síntesis de aminoácidos y baja síntesis enzimática (Katz y Orellana, 2012). Además la apoptosis hepática encontrada en el análisis histopatológico explica los niveles bajos de ALT, pues la apoptosis es muerte celular por implosión de la célula, un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

Los niveles presentados por el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), que son 27.4 veces más a las presentadas por las ratas sanas del grupo intacto, demuestran daño en hígado, lo cual confirma que todas las ratas (con excepción del intacto) a las cuatro semanas tuvieron daño o muerte hepatocelular, así como pérdida extensa del parénquima hepático (Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013).

Es por esto por lo que, en el grupo de las cuatro semanas es lógico encontrar bastante daño en los hepatocitos, y es consistente con el daño celular tan elevado encontrado en el análisis histológico, así como esteatosis y edema. Además, se encontró que es el grupo en el que todas sus ratas tuvieron infiltrado inflamatorio en hígado y una en colon. De todos los grupos, éste fue el que tuvo los mayores niveles de ALT tanto de manera individual como en promedio. Lo que nos indica este alto promedio es que la fibrosis ya ha comenzado, y es consistente con la fibrosis observada. Este control de cuatro semanas fue realizado precisamente para demostrar que ya había daño hepático cuando se comenzaron a administrar los tratamientos, para poder evidenciar si eran efectivos contra la fibrosis y de esta manera, fuera válido comenzar a aplicar los tratamientos a la cuarta semana como lo indica el modelo. Y con esto queda confirmado que fue un buen momento para iniciar con los tratamientos.

6.4.2.2 AST (Berro-Lacto)

Las aminotransferasas no tienen función conocida en el suero, y tienen una relativamente corta vida-media en el orden de días (Ginès et al., 2011b). Dentro de los marcadores de daño hepático, ALT y AST son los más comunes usados para diagnósticos clínicos así como para investigación que implique daño al hígado (McGill, 2016). Esto es debido a que la elevación de ambas aminotransferasas (AST y ALT), significa un daño activo al hígado o a los otros órganos que las contienen; sin embargo, el nivel de elevación no se correlaciona con la severidad pero puede tener valor diagnóstico (Ginès et al., 2011b).

La AST es una aminotransferasa que cataliza reacciones de transaminación. Existen dos formas de isoenzimas de la AST que genéticamente son distintas, la mitocondrial y la citoplasmática. La elevación en el torrente sanguíneo de la AST mitocondrial puede observarse en enfermedades crónicas hepáticas como degeneración del tejido hepático y necrosis. Sin embargo, se encuentra en mayores concentraciones en el corazón comparada con otros tejidos del organismo como: hígado, músculo esquelético y riñón; por lo que una elevada concentración de AST mitocondrial se observa en necrosis tisular extensiva durante el infarto al miocardio. Alrededor del 80% de la actividad AST proveniente del hígado es contribuida por la isoenzima mitocondrial, mientras que la mayor parte del AST circulante en personas sanas se deriva de la isoenzima citoplasmática. Las elevaciones de AST predominan comúnmente en pacientes cirróticos e incluso con enfermedades hepáticas en las que típicamente tienen elevado su ALT (Gowda et al., 2009).

La liberación de enzimas mitocondriales del hígado es considerada por varios autores como una fuerte evidencia de que existe necrosis hepática, y también es asociada con enfermedades hepáticas específicas, en particular, la AST se ha propuesto como un marcador de alcoholismo crónico (Contreras-Zentella y Hernández-Muñoz, 2016).

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de AST de 131.3 ± 8.97 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 961.0 ± 73.80 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 214.3 ± 43.32 (U/L) y el tratamiento con Berro-Lacto mostró valores de 460.0 ± 85.00 (U/L).

En el grupo control negativo (Intacto), los valores (media \pm SEM) de AST fueron de 131.3 ± 8.97 U/L. Estos fueron de los más bajos y caen dentro de lo esperado (Caridad et al., 2011) según el rango de valores hematológicos específicos para AST ($65.8 - 266.2$ U/L), en ratas macho Sprague Dawley, reportado por Caridad, Diuris, y Amelia, (2011).

El grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), fue el que tuvo los niveles (media \pm SEM) más elevados de AST 961.0 ± 73.80 U/L. Y fue estadísticamente diferente a los demás grupos, presentando diferencia estadística significativa ($p < 0.0001$) con respecto al intacto. Esta elevación de AST es indicativa de daño hepático (Al-Seeni et al., 2016; Contreras-Zentella y Hernández-Muñoz, 2016) y es consistente con que este mismo grupo es el que más altos niveles tiene de ALT.

El grupo control positivo de las ocho semanas (8S), tuvo niveles (media \pm SEM) para AST de 214.3 ± 43.32 U/L, este grupo es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las cuatro semanas. Y aunque son estadísticamente iguales al grupo intacto y al grupo Berro-Lacto, su análisis histológico confirma que no haber encontrado elevaciones en sus niveles de AST se debe a que el hígado y sus hepatocitos se encuentran en apoptosis, lo cual genera la disminución en la actividad de muchas vías metabólicas, síntesis de aminoácidos y baja síntesis enzimática (Katz y Orellana, 2012). Además la apoptosis hepática encontrada en el análisis histopatológico explica los niveles bajos de AST, pues la apoptosis es muerte celular por implosión de la célula, un proceso controlado que genera una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

El control positivo de las ocho semanas, a pesar de tener niveles de AST bajos y estadísticamente iguales al intacto y al Berro-Lacto, no es indicativo de que el hígado se encuentre sano, sino porque la célula implosiona en el proceso de apoptosis como se muestra en sus análisis histológicos y como

consecuencia no hay liberación enzimática al torrente sanguíneo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

El grupo de Berro-Lacto tuvo valores (media \pm SEM) de AST de 460 ± 85 U/L, siendo diferente ($p < 0.05$) al intacto y al control positivo de las cuatro semanas, pero similar al grupo control positivo de las ocho semanas (8s). Sin embargo, este control 8S sabemos que no presenta liberación enzimática congruente con el daño al torrente sanguíneo debido al proceso apoptótico que está sufriendo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016). Y al comparar los valores con el control positivo de las cuatro semanas, vemos que el grupo Berro-Lacto ha tenido mejora. Y es congruente con sus análisis histológicos, los cuales, muestran que, a pesar de tener daño en los hepatocitos, no es tanto como el presentado por los controles positivos de la cuarta semana y de la octava semana. El daño crónico con CCl_4 no tuvo tanta mejora como sus tratamientos por separado, el del grupo de berro, y el del grupo de lactos. Los valores de AST son 3.5 mayores al intacto, y 2.08 menores al control positivo de la cuarta semana.

6.4.2.3 Urea (Berro-Lacto)

El grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de urea de 38.00 ± 3.22 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 39.67 ± 3.18 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 45.00 ± 2.31 (mg/dL) y el grupo de Berro-Lacto de 41.00 ± 3.00 (mg/dL).

Todos los grupos muestran niveles de urea normales y estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Lo cual es consistente con Fortea et al. (2018), en donde tampoco hay variación en sus niveles de urea entre grupos. Esto implica que el hígado todavía es capaz de desintoxicarse del amonio mediante el ciclo urea/ornitina (Ginès et al., 2011b). Los niveles normales de urea para todos los grupos indican que el hígado está realizando de manera normal una de sus funciones que es el metabolismo proteico, en el cual, el amonio (NH_3) tóxico resultante de la desaminación (eliminar el amino NH_2) de los aminoácidos es convertido por el hígado en urea, para que pierda toxicidad y sea excretado en la orina (Tortora, 2013).

6.4.2.4 Albumina (Berro-Lacto)

Los valores de albúmina en plasma representan el 75% para el mantenimiento de la presión oncótica y de manera cuantitativa es la proteína más importante del plasma. El promedio de albumina diaria producida por adulto humano es de 12-15g, cantidad que representa menos del 5% del total de albúmina de reserva en el cuerpo. Es producida exclusivamente por los hepatocitos. La larga vida-

media (aprox. 20 días) de la albúmina, junto con el largo almacén reservado en el cuerpo, hacen de la albúmina un indicador poco confiable de la función de síntesis hepática en pacientes con daño hepático agudo. Por otro lado, en pacientes con enfermedad crónica hepática los niveles de albúmina sérica son un reflejo acertado de la función de síntesis hepática (Ginès et al., 2011b).

Se observa que el grupo intacto tuvo valores (media \pm SEM) de albumina de 2.73 ± 0.03 (mg/dL), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 3.20 ± 0.21 (mg/dL), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 2.93 ± 0.09 (mg/dL) y el grupo de Berro-Lacto de 2.80 ± 0.20 (mg/dL). Todos los grupos muestran niveles de albumina estadísticamente iguales. Esta ausencia de diferencias significativas es consistente a los valores encontrados tanto en ratas sanas como en ratas expuestas a CCl_4 (Caridad et al., 2011; Fortea et al., 2018).

Los hepatocitos son los encargados de realizar el metabolismo proteico y además sintetizan la mayoría de las proteínas plasmáticas, como la albúmina, α y β -globulinas, protrombina y fibrinógeno (Tortora, 2013). La albúmina es un parámetro que puede ser utilizado para medir la capacidad sintética de los hepatocitos. Los niveles séricos disminuyen en fases avanzadas de la cirrosis (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008), en este caso se observan valores normales en todos los grupos, tal vez porque estamos bajo un modelo de fibrosis y no de cirrosis.

Para el grupo intacto y el grupo Berro-lacto los valores de albúmina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas de todos los grupos continúan teniendo capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede ser similar en este aspecto para los grupos controles positivos, o puede ser que de acuerdo a las características histológicas de los grupos control positivo tanto de las cuatro semanas como de las ocho semanas, en las que se observa esteatosis, edema y estasis vascular, refleja un alto nivel de daño en hepatocitos, puede indicar apoptosis hepática y por ende una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), consistente con los valores bajos encontrados en el control 8S para ALT y AST.

6.4.2.5 Fosfatasa alcalina para Berro-Lacto

Fosfatasa alcalina es un grupo de isoenzimas que hidrolizan varios ésteres de fosfato y, por tanto, generan fosfato inorgánico en pH alcalino, para su absorción por parte de los tejidos. Estas enzimas son dependientes de Zinc para su actividad. Están ampliamente distribuidas en el cuerpo, aunque

las isoenzimas más importantes clínicamente se encuentran en hígado y hueso. Otras isoenzimas se encuentran en el intestino, placenta del primer trimestre y riñones (Ginès et al., 2011b).

La enzima se encuentra predominantemente en la membrana canalicular de los hepatocitos. La elevación de los sérica de los niveles de fosfatasa alcalina en enfermedades hepáticas parece ser resultado de la inducción de su síntesis por los ácidos biliares. El metabolismo de la fosfatasa alcalina no es mediada por el sistema hepático ni biliar (Ginès et al., 2011b).

El grupo de intacto tuvo valores (media \pm SEM) de fosfatasa alcalina de 249.7 ± 6.94 (U/L), mientras que el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S) tuvo valores de 474.3 ± 54.67 (U/L), el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) tuvo valores de 314.7 ± 42.31 (U/L) y el grupo de Berro-Lacto de 355.0 ± 14.0 (U/L). Todos los grupos muestran niveles de fosfatasa alcalina estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

Los valores de todos los grupos para la Fosfatasa alcalina se encuentran por arriba de los valores normales reportados (River Charles, 1982; Thapa y Walia, 2007), sin embargo el rango de valores normales es sumamente amplio, va desde 39U/L hasta los 216 U/L aún, considerándose normales los extremos. Sin embargo, para el grupo intacto en el que también hay elevación de Fosfatasa alcalina sin muestra alguna de daño en hígado ni intestino como lo muestran sus análisis histológicos, puede deberse a que las ratas Wistar se encontraban en crecimiento, y esta es una razón por la que se ve incrementada la Fosfatasa alcalina. La Fosfatasa medida en el suero puede ser liberada no solamente por el hígado sino por los huesos, como sucede en los valores de fosfatasa alcalina en los niños, que se ve incrementada en las mismas proporciones que el crecimiento de sus huesos, debido a que están en etapa de crecimiento (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014).

Para el grupo intacto y el grupo Berro-Lacto los valores (estadísticamente iguales) de Fosfatasa alcalina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas de todos los grupos tienen sana su capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede explicarse su elevación comparada con valores normales debido al crecimiento normal de las ratas (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014). También hay que considerar que el grupo Berro-Lacto tiene daño hepático, observado en su análisis histopatológico y consistente con sus valores elevados de ALT y AST con respecto al intacto, sin embargo, su análisis histopatológico, a pesar de mostrarse más dañado que el grupo intacto, se muestra que efectivamente tuvo regeneración hepática, con respecto a ambos controles positivos.

Para los controles positivos, se debe tener en cuenta que también se encontraban en la misma etapa de crecimiento, lo que de por sí reflejaría un aumento en la fosfatasa alcalina. Además los grupos control positivo tanto de las cuatro semanas como de las ocho semanas, en las que se observa esteatosis, edema y estasis vascular, refleja un alto nivel de daño en hepatocitos, puede indicar apoptosis hepática y por ende una liberación mínima de proteínas al espacio extracelular (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016), consistente con los valores bajos encontrados en el control 8S para ALT, AST y urea. Y esa elevación puede ser tanto signo de que las ratas se encuentran en crecimiento como de que existe enfermedad hepática, ya que cuando los valores se ven por encima del rango 45-115 U/L, como sucede con todos los grupos positivos de este experimento indican enfermedad hepática (Thapa y Walia, 2007), consistente con sus análisis histológicos de hígado.

6.4.3 Análisis morfométrico para Berro-Lacto

El análisis morfométrico se realizó con las laminillas teñidas con Rojo Sirio. Las células estelares hepáticas (HSC), se activan mediante la estimulación de la síntesis y secreción de colágeno tipo I y tipo II y de fibronectina que promueve la formación de matriz extracelular (MEC) (Hasan et al., 2015c).

La proteína más abundante de la MEC es la colágena, que determina la estabilidad mecánica del tejido conectivo. El colágeno tipo I es responsable de formar tejido maduro (Stumpf et al., 2001), mientras que el colágeno tipo III tiene menor fuerza mecánica y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Hrčkova et al., 2010; Stumpf et al., 2001).

El Rojo Sirio es un tipo de tinción específica de las proteínas MEC y pueden usarse para cuantificar el grado de fibrosis, y determinar el tipo de colágeno presente en la muestra (Bataller y Brenner, 2005), ya que la inflamación crónica del hígado se caracteriza por la acumulación de tejido conectivo fibroso (Poonkhum et al., 2011). Su visualización es bajo luz polarizada y se observan en color rojo las fibras de colágeno tipo I, y en color verde las fibras de colágeno tipo III.

Tanto en condiciones normales como patológicas, el hígado consiste en componentes de la MEC, que incluye: colágenas intersticiales (tipo I y III) y colágena de la membrana basal (tipo IV) (Poonkhum et al., 2011), el hígado sano contiene cantidades aproximadamente iguales de colágeno tipo I y tipo III (Rojkind, 1979). Las fibras de colágeno tipo I se encuentran formando tabiques cuando hay fibrosis (Hrčkova et al., 2010; Poonkhum et al., 2011). La colágena tipo I se encuentra en áreas más grandes en etapas avanzadas de fibrosis, y forma cápsulas y cicatrices en el hígado, mientras

que la colágena tipo III, es menos abundante al haber más daño en hígado y se localiza principalmente en las lesiones fibrosas, lo que sugiere que cumplen una función específica de protección al huésped y en respuesta a proceso de curación al tejido (Hrčkova et al., 2010).

El intestino sano consiste en colágena tipo I (68%), III (20%) y tipo V (12%) (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017). Durante los inicios de fibrosis en intestino, el rango de colágeno tipo III y colágeno tipo I se incrementa, en contraste con las últimas fases de la fibrosis en las que ese rango de colágena tipo III con tipo I disminuye (van Haaften et al., 2017). En la fibrosis de intestino, hay un incremento en ambos tipos de colágena (I y III), y la fibrosis se presenta para reparación de tejido o como respuesta a un estímulo patológico (Pantaroto et al., 2015).

6.4.3.1 Porcentaje de colágena total para Berro-Lacto

El porcentaje de colágena total en hígado para el grupo intacto (media \pm SEM) fue de 0.27 ± 0.05 % y para el intestino fue de 1.8 ± 1.6 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.98 ± 0.36 % en hígado y para el intestino fue de 4.33 ± 1.62 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 1.79 ± 0.67 % y para el intestino fue de 2.99 ± 1.52 %; para el grupo de Berro-Lacto en hígado fue de 2.06 ± 0.91 % y para el intestino fue de 2.82 ± 1.44 %.

Todos los grupos son estadísticamente iguales tanto para la colágena total en hígado como en intestino. A continuación, se compararán los tipos de colágena para cada grupo, para poder determinar si contienen el mismo porcentaje de colágena tipo I y colágena tipo III.

6.4.3.2 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino (Berro-Lacto)

El porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo I en hígado para el grupo intacto fue de 1.72 ± 0.99 % y para el intestino fue de 20.54 ± 8.57 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.59 ± 0.77 % en hígado y para el intestino fue de 19.21 ± 5.91 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 7.32 ± 1.72 % y para el intestino fue de 12.77 ± 5.49 %; para el grupo de Berro-Lacto en hígado fue de 5.70 ± 1.04 % y para el intestino fue de 16.54 ± 11.99 %. Todos los grupos son estadísticamente iguales para la colágena tipo I en intestino como se muestra en la figura 61, en cambio, para la colágena tipo I en hígado, los grupos intacto, 4S y Berro-Lacto son estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

Se ha observado que hay un incremento de colágena tipo I en el colon cuando existen tumores malignos, pero no en la enfermedad diverticular del colon (Pantaroto et al., 2015). En este caso, el daño fue dirigido al hígado, por fibrosis hepática inducida con CCl_4 , por lo que el daño no había

llegado al intestino con tanta severidad. Además, en la fibrosis hay un incremento en ambos tipos de colágena (I y III), y la fibrosis se presenta para reparación de tejido o como respuesta a un estímulo patológico (Pantaroto et al., 2015). Por los análisis histológicos de colon se puede observar que, aunque si existe daño en los controles positivos, únicamente en uno del control positivo de la cuarta semana se observó necrosis, pero no en los restantes. Lo que concuerda con los resultados obtenidos del porcentaje de colágena tipo I encontrado en intestino.

En cambio, para la colágena tipo I en hígado, los grupos intacto, 4S y Berro-Lacto son estadísticamente iguales ($p < 0.05$) y el control positivo de las ocho semanas (8S) es igual al grupo Berro-Lacto, pero diferente del control positivo de las cuatro semanas ($p < 0.05$), y difiere del grupo intacto ($p < 0.01$).

El control positivo de las cuatro semanas contiene la misma cantidad de colágena tipo I en hígado que el grupo intacto, probablemente debido a que era una etapa inicial de la fibrosis, y la colágena tipo I no se encuentra tan presente en las etapas iniciales del daño hepático, se presenta en etapas más avanzadas (Hrčkova et al., 2010), sin embargo este control demuestra un severo daño hepático y presencia de fibrosis en sus análisis de perfil hepático y el de histología.

Para la colágena tipo I en hígado, el grupo control positivo de las ocho semanas (8S) es igual al grupo de Berro-Lacto, lo que indica que sí existe daño hepático, pues son los que más altas cantidades de colágeno tipo I, es decir, el que forma tejido menos elástico, maduro (Stumpf et al., 2001), con mayor fuerza mecánica (Hrčkova et al., 2010; Stumpf et al., 2001) y que es el encargado de la acumulación de tejido conectivo fibroso (Poonkhum et al., 2011). Esto sugiere que el tratamiento de Berro-Lacto, tiene daño, al ser similar a los controles positivos y tiene generación de fibrosis, con generación de tejido conectivo fibroso (Poonkhum et al., 2011), aunque su daño no es tan grave como los controles positivos, ya que también es igual al intacto y así lo sugieren sus estudios séricos de perfil hepático al compararlos con el control positivo de la cuarta semana.

6.4.3.3 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino para Berro-Lacto

La colágena tipo III, está más asociada a la protección del hospedero y como respuesta para participar en un proceso de curación al tejido (Hrčkova et al., 2010), que al daño hepático. Sin embargo, en estudios recientes se ha reportado que cuando ya hay mucho daño, en un modelo de cirrosis biliar hay incremento de colágeno tipo III en el hígado impulsado por el desarrollo de ascitis, lo cual se muestra además en pacientes con cirrosis compensada los cuales muestran un incremento en la colágena tipo III (Praktiknjo et al., 2018).

La colágena tipo III en hígado es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos. Esto coincide con lo que ya sabemos, que tanto en condiciones normales como patológicas, el hígado tiene colágena tipo III como componente de su matriz extracelular (Poonkhum et al., 2011). En cuanto a los hígados de los controles positivos, tampoco hay diferencia significativa debido a que el daño que presentan es por fibrosis, y no por cirrosis, en la cual se hubiera podido esperar un incremento de colágeno tipo III (Praktiknjo et al., 2018).

El porcentaje de colágena tipo III está asociada más bien a la protección del hospedero y como herramienta para la curación de heridas que al daño hepático. Se observa que el porcentaje (media \pm SEM) de colágena tipo III en hígado para el grupo intacto fue de 2.46 ± 1.94 % y para el intestino fue de 22.18 ± 9.05 %; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 2.65 ± 0.60 % en hígado y para el intestino fue de 22.49 ± 4.37 %; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en hígado fue de 3.70 ± 0.92 % y para el intestino fue de 13.41 ± 1.70 %; para el grupo de Berro-Lacto en hígado fue de 7.18 ± 2.54 % y para el intestino fue de 11.87 ± 5.09 %.

La colágena tipo III en intestino es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos. Esto coincide con un estudio realizado para intestinos sanos e intestinos con enfermedad inflamatoria que no mostraron diferencias significativas entre ellos (Graham et al., 1988), además se sabe que el 20% de colágeno es tipo III en intestino sano (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017). Este tipo de colágeno tiene menor fuerza mecánica que el tipo I y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Stumpf et al., 2001). Sin embargo, todos los grupos son estadísticamente iguales.

6.4.4 Análisis genético con qPCR

6.4.4.1 En hígado: IL-1, IL-10 y colágena para La Berro-Lacto

IL-1

La superfamilia de citocinas IL-1 es un grupo de proteínas (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36, IL-37 e IL-38) que a su vez se divide en sub-familias (Barbier et al., 2019). Existen once miembros de citocinas en la familia IL-1, y diez miembros de receptores de la familia IL-1 (Dinarello, 2018). La IL-1 es una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019). La IL-1 se refiere a dos citocinas similares que pueden unirse a los mismos receptores, uno de ellos siendo el más secretado (IL-1 β), y el otro manteniéndose de forma intracelular (IL-1 α) (Meier et al., 2019). La IL-1 β es el mediador inflamatorio más importante cuando existe daño de tejido en enfermedades crónicas hepáticas, sin embargo aún no se sabe si la IL-1 β contribuye o es una consecuencia a la patogénesis de la fibrosis hepática (Meier et al., 2019).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las citocinas y receptores de la familia IL-1 afectan a un amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013). Más que cualquier otra familia de citocinas, los miembros de la familia de IL-1 son asociados al daño por inflamación. Son llamadas pirógenos endógenos” y tanto sus citocinas como sus receptores son responsables por la fiebre e implicadas en un amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018). De hecho, las terapias anti-IL-1 han tenido un impacto enorme en las enfermedades inflamatorias (Garlanda et al., 2013).

Sin embargo, los mismos miembros también funcionan incrementando una resistencia no específica a la infección y al desarrollo de la respuesta inmune ante antígenos foráneos. Estas propiedades de inflamación y defensa del huésped son llamadas “inmunidad innata”, mientras que el aumento a la respuesta contra antígenos se le llama “inmunidad adquirida”. Las respuestas de los miembros de la familia IL-1 son no-específicas, de esta manera aumentando el reconocimiento de antígenos y activando la función de linfocitos (Dinarello, 2018).

La expresión de IL-1 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.821 ± 0.096 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 3.573 ± 0.198 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 12.53 ± 1.342 ; para el grupo de Berro-Lacto fue de 2.823 ± 0.165 .

La expresión de IL-1 en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es el menor de todos los valores (0.821 ± 0.096), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de Berro-Lacto, y diferente al control positivo de la cuarta semana ($p < 0.01$) y al control positivo de las ocho semanas ($p < 0.001$). Lo cual es de esperarse, ya que el grupo intacto es un grupo sano que no tenía por qué estar presentando inflamación hepática (Meier et al., 2019), y es por esto que es el grupo con menor expresión de la citocina proinflamatoria IL-1, ya que esta citocina se expresa como respuesta inmunológica e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013) y no ante condiciones sanas.

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (3.57 ± 0.20), siendo diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las ocho semanas (8s) y al grupo intacto ($p < 0.01$), pero es igual al tratamiento de Berro-Lacto.

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (12.53 ± 1.34), siendo el valor más elevado de IL-1, es diferente ($p < 0.05$) a

los demás grupos, y presenta diferencia significativa de ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto. Este grupo es el más elevado ya que La IL-1 es una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), y este es un modelo en el que se le ha inducido daño de manera crónica, pues nunca se detuvo la inducción de fibrosis y tuvo una duración de ocho semanas. Su expresión tan elevada es consistente cuando existe daño en hígado en enfermedades crónicas, sin embargo aún no se sabe si la IL-1 β contribuye o es una consecuencia a la patogénesis de la fibrosis hepática (Meier et al., 2019). A pesar de que las citocinas proinflamatorias como la IL-1 son parte de la defensa del hospedero contra patógenos, un exceso de inflamación puede aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos, lo cual dañan al huésped (Iyer y Cheng, 2012), como lo confirman sus análisis histopatológicos. Lo que está ocurriendo es que Los hepatocitos y células biliares dañadas liberan citosinas inflamatorias y factores solubles que activan las células de Kupffer y estimulan el reclutamiento de células T activadas. Este medio inflamatorio estimula la activación de HSC residentes a miofibroblastos fibrogénicos. Las HSC activas también liberan citosinas que mantienen su estado activo. Si persiste el daño hepático, como en este caso, ocurre la acumulación de HSC activadas y los miofibroblastos portales, con lo cual se sintetizan grandes cantidades de proteínas MEC y llevan a fibrosis tisular (Bataller y Brenner, 2005).

La expresión de IL-1 en hígado, para el grupo de Berro-Lacto, expresado en media \pm SEM es de (2.82 \pm 0.17), siendo diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las ocho semanas, pero es igual ($p < 0.05$) al grupo intacto y al control positivo de las cuatro semanas. Lo cual indica que el tratamiento con Berro-Lacto sí está induciendo citocinas proinflamatorias, las cuales tienen un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), como el de este experimento. Sin embargo, este medidor inflamatorio que se presenta cuando existe daño en enfermedad crónica hepática (Meier et al., 2019) no implica que esté dañando al hospedero por un exceso de inflamación que puede aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012), ni debido a su amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018), pues hay una contraparte de defensa del Berro-Lacto al producir bastante IL-10, como lo veremos a continuación. En cuanto a la IL-1, el tratamiento de Berro-Lacto se encuentra en un estado intermedio entre el grupo intacto y el control de las cuatro semanas, es decir, que pudiera pensarse que el daño continuó, con ligera mejora en los hepatocitos, ya que no muestran tanto daño en su histología como los controles, pero a pesar de continuar con daño, no llegó a ser tan

grave como los del control positivo de las ocho semanas; es decir, que el organismo se está defendiendo, hay inflamación y hay una respuesta al CCl₄, sin caer en un exceso de inflamación.

Los grupos de control positivo, tanto el de cuatro semanas como el de ocho semanas, presentan mayores concentraciones de IL-1 en hígado comparadas con el intacto. Esto es de esperarse ya que están sufriendo inducción de daño con CCl₄ y, por lo tanto, hay respuesta inflamatoria inmune (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018; Garlanda et al., 2013). El control positivo de las ocho semanas, tiene las mayores expresiones de IL-1, esta respuesta inflamatoria excesiva conlleva a causar daños en el tejido y problemas en la homeostasis del hospedero (Iyer y Cheng, 2012). El grupo de Berro-Lactos se está comportando igual al grupo intacto y al control positivo de las cuatro semanas.

IL-10

La respuesta inmune contra patógenos requiere de una activación rápida de citocinas proinflamatorias, las cuales sirven para iniciar la defensa del hospedero contra invasiones microbianas. Sin embargo, un exceso de inflamación puede aumentar disturbios metabólicos y hemodinámicos, ambos dañinos para el huésped (Iyer y Cheng, 2012). Es por esto que existe un mecanismo paralelo antiinflamatorio que sirve para controlar y contrarrestar la producción de moléculas proinflamatorias, la IL-10 es una familia de citocinas que ayudan a la respuesta del tejido ante daño y enfermedad, para así limitar el daño a tejido, recuperar y mantener la homeostasis en el tejido epitelial y su integridad y participan en la respuesta inmunológica desarrollada en el hígado, mejorando la inmunidad innata epitelial y regulando el proceso de recuperación tras eventos de infección o inflamación. (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012).

En este sentido, se ha propuesto que la IL-10 suprime el sistema inmune del hospedero (Pestka et al., 2004). La IL-10 es una potente citocina antiinflamatoria que juega un papel crucial, previniendo patologías inflamatorias y autoinmunes, es el mediador ante la respuesta antiinflamatoria del huésped (Iyer y Cheng, 2012). La deficiencia en la expresión de IL-10 puede aumentar la respuesta inflamatoria ante microbios, pero también puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes, una respuesta inflamatoria exagerada, resultando en inmunopatología exacerbada y gran daño al tejido (Iyer y Cheng, 2012).

La IL-10 es una gran familia de citocinas, que comprende tres subfamilias: la IL-20, que incluye la IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, y IL-26; la IL-10, el grupo del tipo III IFN que incluye miembros de la IL-28A, IL-

28B, y la IL-29 (Caparrós y Francés, 2018; Pestka et al., 2004). La IL-20 es parte de una subfamilia de la familia IL-10, esta citocina que por un lado tiene un papel protector ante la progresión de fibrosis, pero por otro lado puede causar susceptibilidad en el tejido hepático cuando se presenta carcinoma hepatocelular (Caparrós y Francés, 2018). Toda la familia de IL-10 tiene la función de comunicarse con leucocitos y células epiteliales en diferentes tejidos, como el hígado (Caparrós y Francés, 2018).

La IL-10 inicia una gran variedad de actividades al unirse a sus receptores. El mecanismo se cree que es la inhibición de la capacidad de presentación del antígeno de los macrófagos y de las células dendríticas. Además, bloquea la producción de citocinas, la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de la clase II) y la secreción de quimiocinas (Iyer y Cheng, 2012; O'Garra et al., 2008; Pestka et al., 2004). Así, la IL-10 inhibe el daño al hospedero durante la respuesta inmune ante patógenos (O'Garra et al., 2008).

Son importantes en controlar la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015).

Se observa que la expresión de IL-10 en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 0.87 ± 0.13 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 0.41 ± 0.07 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 0.98 ± 0.12 y para el grupo de Berro-Lacto fue de 11.49 ± 0.854 .

La expresión de IL-10 en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (0.87 ± 0.13), siendo igual ($p < 0.05$) a los grupos control positivo de las cuatro semanas y control positivo de las ocho semanas, los cuales presentan los valores más bajos de IL-10 y diferente al grupo de Berro-Lacto ($p < 0.001$). Esto es así ya que el grupo intacto no está experimentando una respuesta inmune contra ninguna clase de daño o enfermedad en defensa del hospedero (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012).

La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (0.41 ± 0.07), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de intacto y al grupo control positivo de las ocho semanas, y diferente al grupo de Berro-Lacto. La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de ($0.98 \pm$

0.11), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de intacto y al grupo control positivo de las ocho semanas, y diferente al grupo de Berro-Lacto. Ambos controles positivos, tanto el 4s como el 8S, expresan IL-1, siendo, el control positivo de las ocho semanas (8s) el que mayor expresión de IL-1 tuvo, esto significa que está expresándose una citocina proinflamatoria que tiene un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), para ambos controles positivos, y no hay una contraparte, que contrarreste el exceso de inflamación que está generando daño y disturbios metanólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012), siendo incapaz de inhibir el daño al hospedero durante su respuesta inmune (O'Garra et al., 2008).

La expresión de IL-10 en hígado, para el grupo de Berro-Lacto, expresado en media \pm SEM, es el más elevado, de (11.49 ± 0.85) , siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presentando diferencia significativa de ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto. Esto demuestra que el grupo de Berro-Lacto está protegiendo al hospedero, poniendo en marcha un mecanismo antiinflamatorio al causado por la respuesta inmune proinflamatoria activada contra el CCl_4 , y disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Además, de acuerdo a su análisis histopatológico, en el que se muestra que no hay tanto daño como el observado en los controles positivos, se demuestra que esta elevación en la expresión de IL-10 está controlando la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015).

Colágena

La expresión de colágena en hígado, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (1.05 ± 0.06) , siendo diferente ($p < 0.0001$) a los demás grupos: a los grupos control positivo (de las cuatro semanas y de las ocho semanas) y al grupo de Berro-Lacto.

Se observa que la expresión de colágena en hígado (media \pm SEM) para el grupo intacto fue de 1.05 ± 0.06 ; para el grupo control positivo de la cuarta semana (4S) fue de 4.06 ± 0.31 ; mientras que en el grupo control positivo de la octava semana (8S) en fue de 3.70 ± 0.28 y para el grupo de Berro- Lacto fue de 6.74 ± 0.21 .

La expresión de colágena en hígado, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (4.06 ± 0.31) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas (8S) y diferente ($p < 0.05$) al grupo de Berro-Lacto y ($p < 0.0001$) al grupo intacto.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (3.70 ± 0.28) , siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas (8S) y al grupo de Berro-Lacto y diferente ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto.

El tratamiento de Berro-Lacto fue el que tuvo los valores más elevados para colágena en hígado.

La expresión de colágena en hígado, para el grupo de Berro-Lacto, expresado en media \pm SEM es de (6.74 ± 0.21) , siendo diferente ($p < 0.05$) a los grupos control positivo de las cuatro semanas y al grupo intacto ($p < 0.0001$).

El grupo intacto es el que presenta menores valores de colágena en hígado, el grupo intacto no recibió CCl_4 , es el grupo sano; seguido de los grupos controles positivos, los cuales son diferentes al intacto y diferentes al grupo Berro-Lacto ($p < 0.05$), el grupo de Berro-Lacto expresa los valores más elevados de colágena, consistente con su análisis histopatológico en el que hay presencia de fibrosis; esto está indicando que el grupo de Berro-Lacto no está teniendo acción antifibrótica, y está habiendo daño hepático, pues se ven elevadas sus enzimas hepáticas; lo cual es consistente con su análisis histológico en el que se observa tanto fibrosis como daño a los hepatocitos. A pesar de ser el más elevado en colágena hepática, sus niveles son 6.7 veces mayores que el grupo intacto, esto indica que si hay fibrosis, ya que la colágena es el componente más abundante de la MEC en fibrosis, pero no llega a ser cirrosis ya que el incremento en los valores sería hasta diez veces más en cirrosis (Schuppan, 2015). En este caso el incremento es 6.7 veces mayor, para el Berro-Lacto y 4 veces mayor para ambos controles positivos, lo cual indica, que existe una descontrolada reparación de tejido, caracterizada por el reemplazo de tejido funcional hepático con colágeno (Chen et al., 2015b), y las células hepáticas se han convertido en células fibrogénicas hepáticas, las cuales son altamente proliferativas y contráctiles, sus respuestas ante el daño, en este caso causado por el CCl_4 , son de depósito de colágeno para encapsular la herida; seguido de una respuesta crónica inflamatoria y neo-angiogénesis (Karimzadeh-Toosi, 2015).

6.4.4.2 En intestino: IL-10 para Berro-Lacto

La expresión de IL-10 en intestino, expresado en media \pm SEM, para el grupo Intacto es de (1.06 \pm 0.08), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo de berro y diferente a los grupos control positivo de las cuatro y de las ocho semanas.

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo control positivo de las cuatro semanas (4S), expresado en media \pm SEM es de (0.38 \pm 0.00), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas y diferente a los grupos intacto y berro.

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo control positivo de las ocho semanas (8S), expresado en media \pm SEM es de (0.40 \pm 0.07), siendo igual ($p < 0.05$) al grupo control positivo de las ocho semanas y al grupo de berro, y siendo diferente al intacto.

La expresión de IL-10 en intestino, para el grupo de Berro-Lacto, expresado en media \pm SEM es de (1.46 \pm 0.31), siendo diferente ($p < 0.05$) a los grupos control positivos, tanto de las cuatro semanas, como de las ocho semanas y es estadísticamente igual al grupo intacto.

En el grupo intacto demuestra que, de manera natural, en organismos sanos, es donde se encuentra la mayor cantidad de IL-10 en intestino, y este comportamiento es similar en el grupo de Berro-Lacto, el cual es igual al grupo intacto. Esto fue similar a lo ocurrido con el tratamiento de Lactos, a diferencia del tratamiento del de Berro. Es decir, que en este sentido el tratamiento Berro-Lacto, tomó la característica del grupo de Lactos, es decir que si hubo cambio en su microbiota intestinal reforzándolo, ya que el Lactobacillus juega un papel importante en la microbiota generando mejor absorción, almacenamiento y gasto de la energía obtenida de la dieta (Cerdó et al., 2019). Esta alta expresión de IL-10 en el grupo de Berro-Lacto, es consistente con el uso que se les está dando a los probióticos como inmunomoduladores, usando cepas de probióticos para inducir la producción de IL-10, entre ellas usando cepas con Lactobacillus (Cerdó et al., 2019; Hart, 2004)

6.4.5 Pesos semanales de las ratas vivas

6.4.5.1 Pesos de las ratas vivas con Berro-Lacto

Los pesos de las ratas se midieron una vez por semana durante las 8 semanas que duró el experimento.

Los pesos de las ratas en la primera semana (157.2 \pm 8.65 g) son iguales para el grupo control de la cuarta semana y para el grupo de Berro-Lacto, sin embargo, son diferentes al control positivo de las ocho semanas, y todas son diferentes al intacto: 4S y Berro-Lacto difieren en un 99.999%, y el control

4S difiere al intacto en un 95%. En la segunda semana (190.4 ± 8.01 g), el grupo control de la cuarta semana y el grupo de Berro-Lacto, son iguales ($p < 0.05$), el grupo control positivo de las ocho semanas y el grupo intacto, son iguales ($p < 0.05$), y el grupo 4S es diferente al intacto ($p < 0.001$), así como el Berro-Lacto ($p < 0.01$) difiere al intacto. En la tercera semana (212.0 ± 6.53 g) hay más homogeneidad, ahora los grupos intacto, 8S y Berro-Lacto son iguales, y el de la 4S es diferente al intacto con ($p < 0.01$). Además, el control positivo 8S es diferente al Berro-Lacto ($p < 0.05$). En la cuarta semana (260.6 ± 21.02 g) todos los grupos son iguales ($p < 0.05$), quinta semana (229.1 ± 6.82 g), sexta semana (245.4 ± 7.22 g), séptima semana (256.0 ± 8.70 g) y octava y última semana (269.2 ± 9.58 g) todos los grupos permanecen estadísticamente iguales.

El peso de la primera semana fue menor al de Al-Seeni et al., 2016, y al utilizado por Xu et al., 2002, debido a que esas ratas eran de mayor edad (aproximadamente 10 semanas), mientras que las utilizadas en este experimento fueron de un mes de edad (aproximadamente 4 semanas).

Las ratas fueron aumentando de peso a medida que avanzaba el experimento, con excepción de la quinta semana en la que el promedio bajó de 241.4 a 220.3 y continuó incrementándose. Esto coincide con que ya no se encuentra el grupo control 4S, el cual podría haber incrementado el peso promedio de todas las ratas. Pues separados por tratamientos, se observa que las ratas van aumentando de peso a medida que aumenta el tiempo, similar a lo ocurrido con Troung et al. (2014) para sus ratones expuestos a dosis de CCl_4 de 0.8 mL/kg, los cuales ganaron peso durante las ocho semanas. Ellos también observaron a dosis de 1mL/kg y 1.2mL/kg de CCl_4 con aceite de oliva, las ratas bajaron de peso a partir de la cuarta semana de su experimento en todos sus grupos, con excepción del intacto, hasta la semana 8 (de 27.91 ± 2.2 hasta 23.90 ± 2.51 g) (Truong et al., 2014).

6.4.6 Discusiones generales del grupo de Berro-Lacto

Los **pesos de los hígados** para el berro y los controles positivo y negativos son estadísticamente iguales, al igual que lo sucedido con otros estudios (Dutta et al., 2018; Raichholz et al., 2016; Uemitsu, 1984).

En cuanto al **perfil hepático** para el tratamiento de Berro-Lacto: El grupo de Berro-Lacto tiene niveles de **ALT y AST** diferentes al intacto y al control positivo 4S ($p < 0.05$), pero es igual al control positivo de las ocho semanas. Esto sugiere que existe daño hepático y pérdida del parénquima hepático (Ginès et al., 2011b; Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013). Y al comparar los valores con el control positivo de las cuatro semanas, vemos que el grupo Berro-Lacto ha tenido mejora. Y es congruente con sus análisis histológicos, los cuales, muestran que, a pesar de tener daño en los

hepatocitos, no es tanto como el presentado por los controles positivos de la cuarta semana y de la octava semana. El daño crónico con CCl_4 no tuvo tanta mejora como sus tratamientos por separado, el del grupo de berro, y el del grupo de lactos. Los valores de AST son 3.5 mayores al intacto, y 2.08 menores al control positivo de la cuarta semana. Todos los grupos muestran niveles de **urea** normales y estadísticamente iguales; lo cual es consistente con Fortea et al. (2018). Para el tratamiento de Berro-Lactos, esto indica que el hígado está realizando de manera normal una de sus funciones que es el metabolismo proteico, en el cual, el amonio (NH_3) tóxico resultante de la desaminación (eliminar el amino NH_2) de los aminoácidos es convertido por el hígado en urea, para que pierda toxicidad y sea excretado en la orina (Tortora, 2013). Todos los tratamientos (Intacto, Berro-Lacto, controles positivos 4S y 8S), muestran niveles de **albúmina** normales y estadísticamente iguales; lo cual es consistente a los valores encontrados tanto en ratas sanas como en ratas expuestas a CCl_4 (Caridad et al., 2011; Fortea et al., 2018). Esto implica que en el tratamiento de Berro-Lacto, existe una correcta capacidad sintética de los hepatocitos; de lo contrario, los niveles séricos se verían disminuidos en fases avanzadas de la cirrosis (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Los valores de **Fosfatasa alcalina** para todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), y todos están por encima de los valores normales reportados (River Charles, 1982; Thapa y Walia, 2007). Para el grupo intacto y el grupo Berro-Lacto, los valores (estadísticamente iguales) de Fosfatasa alcalina, junto con su análisis histológico son indicativos de que los hepatocitos de las ratas conservan sana su capacidad sintética (Dancygier, 2010; Mesejo y Serrano, 2008). Y puede explicarse su elevación comparada con valores normales debido a que las ratas Wistar se encontraban en crecimiento, y la fosfatasa alcalina es liberada por los huesos ya que están en etapa de crecimiento (Poupon, 2015; Sharma et al., 2014).

El análisis morfométrico (Berro-Lacto): El porcentaje de **colágena total en hígado e intestino**, es igual para todos los tratamientos (Intacto, Lactos, controles positivos 4S y 8S). Para la **colágena tipo I en intestino** todos los grupos son estadísticamente iguales ($p < 0.05$), consistente con lo reportado por otros investigadores (Pantaroto et al., 2015). Para la **colágena tipo I en hígado**, el grupo Berro-Lacto es estadísticamente igual ($p < 0.05$) a los demás grupos. Esto sugiere que el tratamiento de Berro-Lacto, tiene daño, por ser similar a los controles positivos y tiene generación de fibrosis, con generación de tejido conectivo fibroso (Poonkhum et al., 2011), aunque su daño no es tan grave como los controles positivos, ya que también es igual al intacto y así lo demuestran sus estudios séricos de perfil hepático al compararlos con el control positivo de la cuarta semana. La **colágena tipo III en hígado** es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos, ya que el hígado tiene

colágena tipo III como componente de su matriz extracelular (Poonkhum et al., 2011). La **colágena tipo III en intestino** es estadísticamente igual ($p < 0.05$) para todos los grupos, similar a lo reportado en intestino sano (Graham et al., 1988; van Haaften et al., 2017), y de acuerdo a lo esperado, ya que este tipo de colágeno tiene menor fuerza mecánica que el tipo I y es encontrado en las etapas tempranas de curación de heridas (Stumpf et al., 2001).

El **análisis genético** con qPCR (Berro-Lacto): La expresión de **IL-1 en hígado**, es diferente ($p < 0.05$) al control positivo de las ocho semanas (8s), pero es igual al intacto y al control positivo de las cuatro semanas (4s). Lo cual indica que el tratamiento con Berro-Lacto sí está induciendo citocinas proinflamatorias, las cuales tienen un papel muy importante en la inflamación crónica y aguda (Meier et al., 2019), sin embargo, no implica que esté dañando al hospedero por un exceso de inflamación que puede aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012), ni debido a su amplio espectro de respuestas inmunológicas e inflamatorias (Barbier et al., 2019; Dinarello, 2018), pues hay una contraparte de defensa del Berro-Lacto al producir bastante IL-10. En cuanto a la IL-1, el tratamiento de Berro-Lacto se encuentra en un estado intermedio entre el grupo intacto y el control de las cuatro semanas, es decir, que pudiera pensarse que el daño continuó, con ligera mejora en los hepatocitos, ya que no muestran tanto daño en su histología como los controles, pero a pesar de continuar con daño, no llegó a ser tan grave como los del control positivo de las ocho semanas; es decir, que el organismo se está defendiendo, hay inflamación y hay una respuesta al CCl_4 , sin caer en un exceso de inflamación. La expresión de **IL-10 en hígado**, para el tratamiento de Berro-Lacto, es la más elevada, siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos, y presentando diferencia significativa de ($p < 0.0001$) contra el grupo intacto (que son estadísticamente iguales entre ellos). Esto demuestra que el grupo de Berro-Lacto está protegiendo al hospedero, poniendo en marcha un mecanismo antiinflamatorio al causado por la respuesta inmune proinflamatoria (IL-1) activada contra el CCl_4 , y disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Además, de acuerdo a su análisis histopatológico, en el que se muestra que no hay tanto daño como el observado en los controles positivos, se demuestra que esta elevación en la expresión de IL-10 está controlando la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015).

La expresión de **colágena en hígado** es la más alta en el tratamiento de Berro-Lacto, siendo diferente ($p < 0.05$) a los demás tratamientos; consistente con su análisis histopatológico en el que hay presencia de fibrosis; esto está indicando que el grupo de Berro-Lacto no está teniendo acción antifibrótica, y está habiendo daño hepático, consistente con la elevación de sus enzimas hepáticas; sus niveles de colágena hepática son 6.7 veces mayores que el grupo intacto, lo cual descarta que sea cirrosis (porque para ello deberían de ser diez veces mayores) (Schuppan, 2015), pero si hay fibrosis, lo cual indica, que existe una descontrolada reparación de tejido, caracterizada por el reemplazo de tejido funcional hepático con colágeno (Chen et al., 2015b), y las células hepáticas se han convertido en células fibrogénicas hepáticas, las cuales son altamente proliferativas y contráctiles, sus respuestas ante el daño, en este caso causado por el CCl_4 , son de depósito de colágeno para encapsular la herida; seguido de una respuesta crónica inflamatoria y neo-angiogénesis (Karimzadeh-Toosi, 2015).

La expresión de **IL-10 en intestino** es igual ($p < 0.05$) para el tratamiento de Berro-Lacto y el intacto. Esto confirma que, en estado sano, el intestino es donde se encuentra la mayor cantidad de IL-10. Congruente con lo que ya se ha demostrado en ratones a los que se les suprime genéticamente la función de la IL-10 y desarrollan inflamación del colon en presencia de una flora normal (O'Garra et al., 2008). En este caso el grupo de Lactos está actuando sobre el microbiota intestinal reforzándolo, ya que el Lactobacillus juega un papel importante en la microbiota generando mejor absorción, almacenamiento y gasto de la energía obtenida de la dieta (Cerdó et al., 2019). Esta alta expresión de IL-10 en el grupo de Lactos, es consistente con el uso que se les está dando a los probióticos (incluidos los Lactobacillus) como inmunomoduladores, usando cepas de probióticos para inducir la producción de IL-10 (Cerdó et al., 2019; Hart, 2004).

Los **análisis histológicos** (Berro-Lacto): en hígado, se observa que hay infiltrado inflamatorio, edema perinuclear, ligera esteatosis, y presencia de fibrosis, desde incipiente hasta formando nódulos. En cuanto a intestino se encuentra sano, sin embargo, un caso tiene ligero desprendimiento epitelial.

Los **pesos de las ratas**, obtenidos semanalmente, muestran que comienzan siendo estadísticamente diferentes, pero se estabilizan a partir de la cuarta semana y se mantienen iguales estadísticamente hasta el final de la octava semana ($p < 0.05$). Separados por tratamientos, se observa que las ratas van aumentando de peso a medida que aumenta el tiempo, similar a lo ocurrido con Troung et al. (2014) para sus ratones expuestos a dosis de CCl_4 de 0.8 mL/kg (misma dosis que en este trabajo), los cuales ganaron peso durante las ocho semanas.

7. CONCLUSIONES

- El tratamiento con extracto de berro (*Nasturtium officinale*) tiene efecto de reversión sobre la fibrosis hepática en rata Wistar.

Esto se aprecia al haber igualdad con el grupo intacto en el peso del hígado, ALT, AST, urea, albúmina, fosfatasa alcalina, en los niveles totales y de tipo I y tipo III de colágena, tanto en hígado como en intestino, así como la expresión de colágena en hígado y de IL-10 en intestino, se demuestra que el tratamiento de berro induce la expresión de IL-1 en hígado, indicando que el hospedero se está defendiendo (Dinarelo, 2018; Iyer y Cheng, 2012) y está activando la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Chakraborty et al., 2012). Además, esta elevación en IL-1 está siendo balanceada con el mecanismo antiinflamatorio al expresar IL-10, y disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012).

Estos resultados son congruentes con sus análisis histológicos, los cuales, muestran ausencia de fibrosis, ausencia de esteatosis e intestino sano, únicamente un caso muestra ligera fibrosis incipiente, que se explica porque de manera crónica tuvo inducción de daño con CCl₄. La histología del intestino indica que no hay desprendimiento epitelial y se observan iguales a las del grupo intacto. Esto se debe a que la presencia de flavonoides, taninos, saponinas y terpenoides en *Nasturtium officinale* funcionan como agentes antioxidantes, inhibiendo los radicales libres generados por el daño, además se sabe de la actividad hepatoprotectora de ciertos flavonoides (Kumar et al., 2009).

- El tratamiento con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* tiene efecto de reversión sobre la fibrosis hepática en rata Wistar y tiene actividad de hepatoprotección.

Esto se aprecia al haber igualdad con el grupo intacto en el peso del hígado, ALT, urea, albúmina, fosfatasa alcalina, en los niveles totales y de tipo I y tipo III de colágena tanto en hígado como en intestino, así como la expresión de colágena en hígado y la IL-10 en intestino. Su análisis genético demuestra que la IL-1 es igual al grupo intacto, indicando que el organismo se cuida de no tener demasiadas citocinas proinflamatorias que pudieran causarle daño al hospedero, por un exceso de inflamación que puede aumentar los disturbios sistémicos metabólicos y hemodinámicos (Iyer y Cheng, 2012). En cambio se observa consistentemente con este

resultado que hay una elevación muy grande en la IL-10, controlando la reparación del tejido hepático tras haber sufrido daño, promoviendo su sobrevivencia al inducir su proliferación, así como inhibiendo la apoptosis de células epiteliales (Caparrós y Francés, 2018; Dudakov et al., 2015). Tiene mayor expresión de colágeno en hígado que el intacto, sin embargo, esta expresión es menor que los controles positivos, consistente con su análisis histopatológico en el que, a pesar de haber ligera fibrosis incipiente, mucho menor a los controles positivos, existe hepatoprotección. Existe regeneración hepatocitaria al comparar la histología con los controles positivos. Con el uso del CCl₄ se esperaba observar: daño hepatocelular (Domitrović et al., 2013), elevación en sus niveles de ALT (Domitrović et al., 2013; Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013), y de Fosfatasa alcalina (Domitrović et al., 2013; Ginès et al., 2011b), sin embargo se comportó idéntico al intacto y comparado con los controles positivos, presentan mucho menos daño histopatológico.

- El tratamiento combinado de extracto de berro (*Nasturtium officinale*) y *Lactobacillus rhamnosus* (Berro-Lacto) tiene efecto de reversión sobre la fibrosis hepática en rata Wistar.

Esto se aprecia al haber igualdad con el grupo intacto en el peso del hígado, urea, albúmina, fosfatasa alcalina, en los niveles totales y de tipo I y tipo III de colágena tanto en hígado como en intestino, así como la expresión de colágena en hígado y de IL-10 en intestino. Sus niveles de ALT, AST y análisis genético de colágena son mayores que el intacto, pero menores al control positivo 4S. Esto sugiere que existe daño hepático y pérdida del parénquima hepático (Ginès et al., 2011b; Parmar et al., 2016; Tejos et al., 2013). Al comparar los valores con el control positivo de las cuatro semanas, vemos que el grupo Berro-Lacto ha tenido mejora. El tratamiento Berro-Lacto está defendiendo al hospedero (Dinarello, 2018; Iyer y Cheng, 2012), ya que induce la expresión de IL-1 en hígado, aunque similar al intacto, y se observa elevación de la expresión de IL-10, disminuyendo de esta manera el daño al hígado, recuperando la homeostasis del tejido epitelial hepático, regulando de esta manera el proceso de recuperación (Caparrós y Francés, 2018; Iyer y Cheng, 2012). Sus análisis histológicos, muestran en hígado que hay infiltrado inflamatorio, edema perinuclear, ligera esteatosis, y presencia de fibrosis, desde incipiente hasta formando nódulos. En cuanto a intestino se encuentra sano, sin embargo, un caso tiene ligero desprendimiento epitelial. Esto señala que no tuvo tanta mejora como los tratamientos por separado (berro y lacto), sin embargo, a pesar de tener daño en los

hepatocitos, no es tanto como el presentado por los controles positivos, tanto el de la cuarta semana como el de la octava. El hospedero sí está mostrando defensa contra el daño producido por CCl₄.

En todos los tratamientos, los pesos de las ratas, obtenidos semanalmente, comienzan siendo estadísticamente diferentes, pero se estabilizan a partir de la cuarta semana. Hay aumento de peso a medida que avanza el tiempo, similar a lo ocurrido con Troung et al. (2014) cuando usaron las mismas dosis que en este trabajo.

El control negativo (intacto), muestra valores congruentes con la ausencia de daño hepático mientras que el control positivo de las cuatro semanas (4S) muestra valores congruentes con un elevado daño hepático y presencia de fibrosis.

Se observa que para el control positivo de las ocho semanas (8S) su análisis histológico es congruente con el daño elevado en hígado, sin embargo, los niveles del perfil hepático a pesar de ser similares al intacto, no se deben a que el hígado se encuentre sano, sino a que la célula implosiona en el proceso de apoptosis, como se muestra en sus análisis histológicos y como consecuencia, no hay liberación enzimática al torrente sanguíneo (Bajt, 2000; Lawson et al., 1998; Leist et al., 1995; McGill, 2016).

Conclusiones generales

Es importante mencionar que se lograron resultados positivos, a pesar de que los tratamientos clínicos son muy difíciles de diseñar e implementar debido a la lenta progresión a fibrosis, además de que no es un proceso lineal y al trabajar con organismos vivos el grado de progresión de fibrosis varía entre pacientes individuales (Muriel, 2017).

Ordenando los tratamientos de mayor a menor efecto en la reversión de fibrosis hepática y actividad de hepatoprotección, se tiene: extracto de berro (*Nasturtium officinale*), *Lactobacillus rhamnosus* y la combinación de ambos.

Estos resultados deben ser interpretados cuidadosamente ya que el número total de unidades experimentales fue pequeño.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdulaziz Bardi, D., Halabi, M. F., Abdullah, N. A., Rouhollahi, E., Hajrezaie, M., y Abdulla, M. A.

(2013). *In Vivo* Evaluation of Ethanolic Extract of *Zingiber officinale* Rhizomes for Its Protective Effect against Liver Cirrhosis. *BioMed Research International*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/918460>

Adams, L. A. (2005). Hepascore: An Accurate Validated Predictor of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Infection. *Clinical Chemistry*, 51(10), 1867–1873. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.048389>

Akir, A. C., Mavi, A., Kazaz, C., y Yildirim, A. (2006). *Antioxidant Activities of the Extracts and Components of Teucrium orientale L. var. Orientale*. 30, 483–494.

Al-Seeni, M. N., El Rabey, H. A., Zamzami, M. A., y Alnefayee, A. M. (2016). The hepatoprotective activity of olive oil and Nigella sativa oil against CCl₄ induced hepatotoxicity in male rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1422-4>

Armendariz-Borunda, J., Islas-Carbajal, M. C., Meza-Garcia, E., Rincon, A. R., Lucano, S., Sandoval, A. S., ... Garcia, L. (2006). A pilot study in patients with established advanced liver fibrosis using pirfenidone. *Gut*, 55(11), 1663–1665. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.107136>

Bajt, M. L. (2000). Protection against Fas Receptor-Mediated Apoptosis in Hepatocytes and Nonparenchymal Cells by a Caspase-8 Inhibitor in Vivo: Evidence for a Postmitochondrial Processing of Caspase-8. *Toxicological Sciences*, 58(1), 109–117. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.1.109>

Balta, C., Ciceu, A., Herman, H., Rosu, M., Boldura, O. M., y Hermenean, A. (2018). Dose-Dependent Antifibrotic Effect of Chrysin on Regression of Liver Fibrosis: The Role in

Extracellular Matrix Remodeling. *Dose-Response*, 16(3), 155932581878983.

<https://doi.org/10.1177/1559325818789835>

Barbier, L., Ferhat, M., Salamé, E., Robin, A., Herbelin, A., Gombert, J.-M., ... Barbarin, A. (2019).

Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Frontiers in*

Immunology, 10, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02014>

Barrera, N. L., y Bautista, B. S. (2008). Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de

Cestrum nocturnum L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.)

Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26, 27–31.

Bataller, R., y Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209–218.

<https://doi.org/10.1172/JCI200524282>

Bernal, V., y Bosch, J. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food*

and Drug Analysis, 26(3), 867–892. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>

Butler, W. F. (1974). Comparison of the effects of early and late fixation on Alcian Blue staining in

dog skin using two different fixatives. *The Histochemical Journal*, 6(4), 463–465.

<https://doi.org/10.1007/BF01012437>

Caparrós, E., y Francés, R. (2018). The Interleukin-20 Cytokine Family in Liver Disease. *Frontiers in*

Immunology, 9, 1155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01155>

Caridad, L. G. A., Diuris, B., y Amelia, P. (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas

Sprague Dawley producidas en CENPALAB, *Cenp: SPRD*. 12(11), 10.

Carrión, J. A. (2009). Utilidad del Fibroscan® para evaluar la fibrosis hepática. *Gastroenterología y*

Hepatología, 32(6), 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.01.178>

Cattley, R. C., y Cullen, J. M. (2013). Liver and Gall Bladder. En *Haschek and Rousseaux's Handbook*

of Toxicologic Pathology (pp. 1509–1566). [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00045-5)

0.00045-5

- Cequera, A., y García de León Méndez, M. C. (2014). Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(3), 187–199.
<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.05.003>
- Cerdó, T., García-Santos, J., G. Bermúdez, M., y Campoy, C. (2019). The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients*, 11(3), 635.
<https://doi.org/10.3390/nu11030635>
- Chakraborty, J. B., Oakley, F., y Walsh, M. J. (2012). Mechanisms and Biomarkers of Apoptosis in Liver Disease and Fibrosis. *International Journal of Hepatology*, 2012, 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2012/648915>
- Chang, M.-L. (2005). Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World Journal of Gastroenterology*, 11(27), 4167. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i27.4167>
- Chen, R.-J., Wu, H.-H., y Wang, Y.-J. (2015a). Strategies to prevent and reverse liver fibrosis in humans and laboratory animals. *Archives of Toxicology*, 89(10), 1727–1750.
<https://doi.org/10.1007/s00204-015-1525-6>
- Chen, R.-J., Wu, H.-H., y Wang, Y.-J. (2015b). Strategies to prevent and reverse liver fibrosis in humans and laboratory animals. *Archives of Toxicology*, 89(10), 1727–1750.
<https://doi.org/10.1007/s00204-015-1525-6>
- CONABIO. (2018). *Brassicaceae = Cruciferae Rorippa nasturtium-aquaticum (L.) Schinz y Thell. (= Nasturtium officinale R. Br.) Berro de agua*. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/brassicaceae/rorippa-nasturtium-aquaticum/fichas/ficha.htm>
- Consejo de Salubridad General. (2009). *Diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia hepática crónica* [Guía práctica clínica]. México: Secretaria de Salud.

- Contreras-Zentella, M. L., y Hernández-Muñoz, R. (2016). Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/3529149>
- Croteau, R., Kutchan, M., y Lewis, G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250–1318.
- Crovesy, L., Ostrowski, M., Ferreira, D. M. T. P., Rosado, E. L., y Soares-Mota, M. (2017). Effect of Lactobacillus on body weight and body fat in overweight subjects: A systematic review of randomized controlled clinical trials. *International Journal of Obesity*, 41(11), 1607–1614. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.161>
- Dancygier, H. (2010a). *Clinical hepatology: Principles and practice of hepatobiliary diseases*. (Vol. 2). Heidelberg, Neckar: Springer Berlin.
- Dancygier, H. (2010b). *Clinical hepatology: Principles and practice of hepatobiliary diseases*. (Vol. 2). Heidelberg, Neckar: Springer Berlin.
- Dashit, H., Jeppsson, B., Hägerstrand, I., Hultberg, B., Srinivas, U., Abdulla, M., y Bengmark, S. (1989). Thioacetamide- and Carbon Tetrachloride-Induced Liver Cirrhosis. *Dashti, H., Jeppsson, B., Hägerstrand, I., Hultberg, B., Srinivas, U., Abdulla, M., y Bengmark, S. (1989). Thioacetamide- and Carbon Tetrachloride-Induced Liver Cirrhosis. European Surgical Research*, 21(2), 83–91. [doi:10.1159/000129007](https://doi.org/10.1159/000129007), 2(21), 83–91. <https://doi.org/10.1159/000129007>
- David, S., y Hamilton, J. P. (2011). *Drug-induced Liver Injury*. 21.
- Dinareello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>
- Domitrović, R., Jakovac, H., Marchesi, V. V., y Blažeković, B. (2013). Resolution of Liver Fibrosis by Isoquinoline Alkaloid Berberine in CCl₄-Intoxicated Mice Is Mediated by Suppression of

Oxidative Stress and Upregulation of MMP-2 Expression. *Journal of Medicinal Food*, 16(6), 518–528. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0175>

Domitrović, R., Jakovac, H., Romić, Ž., Rahelić, D., y Tadić, Ž. (2010a). Antifibrotic activity of Taraxacum officinale root in carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.046>

Domitrović, R., Jakovac, H., Romić, Ž., Rahelić, D., y Tadić, Ž. (2010b). Antifibrotic activity of Taraxacum officinale root in carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.046>

Drögemüller, M., Jagannathan, V., Welle, M. M., Graubner, C., Straub, R., Gerber, V., ... Leeb, T. (2014). Congenital Hepatic Fibrosis in the Franches-Montagnes Horse Is Associated with the Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1 (PKHD1) Gene. *PLoS ONE*, 9(10), e110125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110125>

Dudakov, J. A., Hanash, A. M., y van den Brink, M. R. M. (2015). Interleukin-22: Immunobiology and Pathology. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 747–785. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112123>

Dutta, S., Chakraborty, A. K., Dey, P., Kar, P., Guha, P., Sen, S., ... Chaudhuri, T. K. (2018). Amelioration of CCl4 induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of Croton bonplandianus Baill. *PLOS ONE*, 13(4), e0196411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196411>

Ebadollahi, A. R., Ghahremani, M. H., y Monsef, H. R. (2010). Evaluation of Antihepatotoxic Effect of Watercress Extract and its Fractions in Rats. *International Journal of Pharmacology*, 6(6), 896–902.

Faghfoori, Z., Gargari, B. P., Saber, A., Seyyedi, M., y Khosroushahi, Y. (2017). *The Investigation of the Diversity of Lactobacilli Spp. And Assessment Their Some Probiotic Properties in Traditional Dairy Products in East Azerbaijan Province in Iran*. 8.

Favari, L., Arce-Díaz, C., Ortíz-Martínez, J., Pablo-Pérez, S., Soto, C., y Meléndez-Camargo, M. E. (2013a). Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Rev Mex Cienc Farm*, 44(4), 53–61.

Favari, L., Arce-Díaz, C., Ortíz-Martínez, J., Pablo-Pérez, S., Soto, C., y Meléndez-Camargo, M. E. (2013b). Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Rev Mex Cienc Farm*, 10.

Feng, Y., Siu, K.-Y., Ye, X., Wang, N., Yuen, M.-F., Leung, C.-H., ... Kobayashi, S. (2010). Hepatoprotective effects of berberine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Chinese Medicine*, 5(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-5-33>

Forns, X. (2002). Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*, 36(4), 986–992. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36128>

Fortea, J. I., Fernández-Mena, C., Puerto, M., Ripoll, C., Almagro, J., Bañares, J., ... Vaquero, J. (2018). Comparison of Two Protocols of Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis in Rats – Improving Yield and Reproducibility. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27427-9>

Garlanda, C., Dinarello, C. A., y Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*, 39(6), 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>

George, E. S., Forsyth, A., Itsiopoulos, C., Nicoll, A. J., Ryan, M., Sood, S., ... Tierney, A. C. (2018). Practical Dietary Recommendations for the Prevention and Management of Nonalcoholic

Fatty Liver Disease in Adults. *Advances in Nutrition*, 9(1), 30–40.

<https://doi.org/10.1093/advances/nmx007>

Gill, C. I., Haldar, S., Boyd, L. A., Bennett, R., Whiteford, J., Butler, M., ... Rowland, I. R. (2007a).

Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 504–510. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.504>

Gill, C. I., Haldar, S., Boyd, L. A., Bennett, R., Whiteford, J., Butler, M., ... Rowland, I. R. (2007b).

Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 504–510. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.504>

Ginès, P., Kamath, P. S., y Arroyo, V. (2011a). *Chronic liver failure: Mechanisms and management*.

Recuperado de <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=645407>

Ginès, P., Kamath, P. S., y Arroyo, V. (2011b). *Chronic liver failure mechanisms and management*.

New York: Humana Press.

Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V., Math, A. A. K., y Kulkarni, S. S. (2009). *A review on laboratory liver function tests*. 3:17, 11.

Graham, M. F., Diegelmann, R. F., Elson, C. O., Lindblad, W. J., Gotschalk, N., Gay, S., y Gay, R.

(1988). Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease.

Gastroenterology, 94(2), 257–265. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(88\)90411-8](https://doi.org/10.1016/0016-5085(88)90411-8)

Grattagliano, I. (2011). Management of liver cirrhosis between primary care and specialists. *World*

Journal of Gastroenterology, 17(18), 2273. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i18.2273>

Guyton A. C., y Hall J.E. (2006). *Tratado de fisiología médica* (11a ed.). España: S.A. Elsevier.

Guzelbulut, F., Akkan Cetinkaya, Z., Sezikli, M., Yasar, B., Ozkara, S., y Kurdas Ovunc, A. O. (2011).

AST-platelet ratio index, Forns index and FIB-4 in the prediction of significant fibrosis and

cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 22(3), 279–285. <https://doi.org/10.4318/tjg.2011.0213>

Hammes, T. O., Leke, R., Escobar, T. D. C., Fracasso, L. B., Meyer, F. S., Andrades, M. É., y Silveira, T. R. da. (2017). Lactobacillus rhamnosusGG reduces hepatic fibrosis in a model of chronic liver disease in rats. *Nutrición Hospitalaria*, 34(3), 702. <https://doi.org/10.20960/nh.626>

Harman, D. J., Ryder, S. D., James, M. W., Jelpke, M., Ottey, D. S., Wilkes, E. A., ... Guha, I. N.

(2015). Direct targeting of risk factors significantly increases the detection of liver cirrhosis in primary care: A cross-sectional diagnostic study utilising transient elastography. *BMJ Open*, 5(4), e007516–e007516. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-007516>

Haro G, Iksen I, Rumanti R.M., Marbun N., Sari R.P, y Gultom R.P.J. (2018). EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND MINERALS VALUE FROM WATERCRESS (*Nasturtium officinale* R.Br.) . *Rasayan Journal of Chemistry*, 11(1), 232–237. <https://doi.org/10.7324/RJC.2018.1112011>

Hart, A. L. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53(11), 1602–1609. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037325>

Hasan, I. H., El-Desouky, M. A., Hozayen, W. G., y Abd el aziz, G. M. (2015a). Protective Effect of Zingiber Officinale against CCl4-Induced Liver Fibrosis Is Mediated through Downregulating the TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B/ly κ B Pathways. *Pharmacology*, 97(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000441229>

Hasan, I. H., El-Desouky, M. A., Hozayen, W. G., y Abd el aziz, G. M. (2015b). Protective Effect of Zingiber Officinale against CCl4-Induced Liver Fibrosis Is Mediated through Downregulating the TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B/ly κ B Pathways. *Pharmacology*, 97(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000441229>

Hasan, I. H., El-Desouky, M. A., Hozayen, W. G., y Abd el aziz, G. M. (2015c). Protective Effect of Zingiber Officinale against CCl4-Induced Liver Fibrosis Is Mediated through Downregulating the TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B/IL-6 Pathways. *Pharmacology*, 97(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000441229>

Hernández, L. A. N., Baustista, B. S., y Velázquez, V. M. G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en Poscosecha. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 119–12.

Hernández-Marín, D. A., Guevara-Lara, F., Rivas-Morales, C., Verduzco-Martínez, J. A., Galindo-Rodríguez, S. A., y Sánchez-García, E. (2018). *Biological activity of Nothoscordum bivalve (L.) Britton and Parthenium incanum Kunth extracts*. 17(4), 8.

Hernández-Marín David, A., Muñoz-Ortega Martín, H., Guevara-Lara, F., Gúzman-Lucio Marco, A., y Sánchez-García, E. (2018). Inhibition of *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation by Methanolic Extract of *Nothoscordum bivalve*. *Advances in Microbiology*, 08(05), 422–438. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.85028>

Hrčkova, G., Velebný, S., y Solár, P. (2010). Dynamics of hepatic stellate cells, collagen types I and III synthesis and gene expression of selected cytokines during hepatic fibrogenesis following *Mesocestoides vogae* (Cestoda) infection in mice. *International Journal for Parasitology*, 40(2), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.008>

Inagaki, Y., Higashiyama, R., y Higashi, K. (2012). Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: Molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy: Novel anti-fibrotic therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27, 85–88. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07006.x>

Iyer, S. S., y Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32(1), 23–63.

<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i1.30>

Jadon, R., y Dixit, S. (2014). *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2(3), 7.

Jeremy, M. B., Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. (Sexta). España: Reverté.

Kamada, N., y Núñez, G. (2014). Regulation of the Immune System by the Resident Intestinal Bacteria. *Gastroenterology*, 146(6), 1477–1488.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.060>

Karimzadeh-Toosi, A. E. (2015). Liver Fibrosis: Causes and Methods of Assessment, A Review. *Romanian Journal Of Internal Medicine*, 53(4), 304–314. <https://doi.org/10.1515/rjim-2015-0039>

Katz, A., y Orellana, O. (2012). Protein Synthesis and the Stress Response. En M. Biyani (Ed.), *Cell-Free Protein Synthesis*. <https://doi.org/10.5772/50311>

Kelly, W. N. (1993). *Medicina Interna* (2a ed., Vol. 1). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Kielland, K. B., Delaveris, G. J. M., Rogde, S., Eide, T. J., Amundsen, E. J., y Dalgard, O. (2014). Liver fibrosis progression at autopsy in injecting drug users infected by hepatitis C: A longitudinal long-term cohort study. *Journal of Hepatology*, 60(2), 260–266.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.09.022>

Kobyliak, N., Falalyeyeva, T., Mykhalchyshyn, G., Kyriienko, D., y Komissarenko, I. (2018). Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: Randomized clinical trial. *Diabetes y Metabolic Syndrome: Clinical Research y Reviews*, 12(5), 617–624.

<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.04.015>

Koyama, Y., y Brenner, D. A. (2017). Liver inflammation and fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 55–64. <https://doi.org/10.1172/JCI88881>

Kumar, P. V., Sivaraj, A., Elumalai, E., y Kumar, B. S. (2009). *CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED HEPATOTOXICITY IN RATS - PROTECTIVE ROLE OF AQUEOUS LEAF EXTRACTS OF COCCINIA GRANDIS*. 4.

Lawson, J. A., Fisher, M. A., Simmons, C. A., Farhood, A., y Jaeschke, H. (1998). Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and fas-antibody-induced liver injury. *Hepatology*, 28(3), 761–767. <https://doi.org/10.1002/hep.510280324>

Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Perea Velez, M., Vanderleyden, J., y De Keersmaecker, S. C. J. (2007). Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6768–6775. <https://doi.org/10.1128/AEM.01393-07>

Lee, G.-P., Jeong, W.-I., Jeong, D.-H., Do, S.-H., Kim, T.-H., y Jeong, K.-S. (2005). Diagnostic Evaluation of Carbon Tetrachloride-induced Rat Hepatic Cirrhosis Model. *ANTICANCER RESEARCH*, 10.

Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., y Germann, P. G. (1995). *Tumor Necrosis Factor-Induced Hepatocyte Apoptosis Precedes Liver Failure in Experimental Murine Shock Models*. 146(5), 15.

Leslie P. Gartner, y James K. Hiatt. (2004). *Texto atlas de Histología* (Segunda edición). Mc Graw Hill.

Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., ... Weiskirchen, R. (2013). Experimental liver fibrosis research: Update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis y Tissue Repair*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-19>

- Liu, H., Liu, J., Zhang, Y., Liao, J., Tong, Q., Gao, F., ... Wang, W. (2016a). Contrast-enhanced ultrasound and computerized tomography perfusion imaging of a liver fibrosis-early cirrhosis in dogs: Liver fibrosis diagnosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(9), 1604–1610. <https://doi.org/10.1111/jgh.13320>
- Liu, H., Liu, J., Zhang, Y., Liao, J., Tong, Q., Gao, F., ... Wang, W. (2016b). Contrast-enhanced ultrasound and computerized tomography perfusion imaging of a liver fibrosis-early cirrhosis in dogs: Liver fibrosis diagnosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(9), 1604–1610. <https://doi.org/10.1111/jgh.13320>
- Liu, H., Liu, J., Zhang, Y., Liao, J., Tong, Q., Gao, F., ... Wang, W. (2016c). Contrast-enhanced ultrasound and computerized tomography perfusion imaging of a liver fibrosis-early cirrhosis in dogs: Liver fibrosis diagnosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(9), 1604–1610. <https://doi.org/10.1111/jgh.13320>
- Lo, R. S., Austin, A. S., y Freeman, J. G. (2014). Is There a Role for Probiotics in Liver Disease? *The Scientific World Journal*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/874768>
- López Panqueva, R. del P. (2017). Algoritmos útiles para el diagnóstico histopatológico de la enfermedad hepática con base en los patrones de daño hepático. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 31(4), 443. <https://doi.org/10.22516/25007440.121>
- Lozano, R., Gómez-Dantés, H., Garrido-Latorre, F., Jiménez-Corona, A., Campuzano-Rincón, J. C., Franco-Marina, F., ... JL Murray, C. (2013). La carga de enfermedad, lesiones, factores de riesgo y desafíos para el sistema de salud en México. *Salud Pública de México*, 55(6), 580. <https://doi.org/10.21149/spm.v55i6.7304>
- Macpherson, C. N. L., y Bidaisee, S. (2015). Role of society and culture in the epidemiology and control of foodborne parasites. En *Foodborne Parasites in the Food Supply Web* (pp. 49–73). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-332-4.00004-7>

Madhan, K., y Raju, S. (2014). Comparative Histology of Human and Cow, Goat and Sheep Liver.

Journal of Surgical Academia, 1(4), 1612–1614.

Mantegazza, C., Molinari, P., D’Auria, E., Sonnino, M., Morelli, L., y Zuccotti, G. V. (2018). Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacological Research*, 128, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.001>

Mantilla, N. G., Assef, J. A. C., Pérez, L. R., Martínez, A., Morgado, M. R., y Cao, N. P. (2016).

Factores clínicos y bioquímicos predictores de supervivencia al año en pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática. 22(3), 13.

Marhoume, F., Zaid, Y., Boufous, H., Errafiy, N., Laaradia, M., Laadraoui, J., ... Chait, A. (2017).

Hepatoprotective Activity of *Rubia tinctorum*’s Extract against CCl₄ Induced Hepatic Injury in Rats. *European Journal of Medicinal Plants*, 20(4), 1–10.

<https://doi.org/10.9734/EJMP/2017/35441>

Mayuren, C., Reddy, V., Priya, S., y Anusha, V. (2010). Protective effect of Livactine against CCl₄

and paracetamol induced hepatotoxicity in adult Wistar rats. *North American Journal of Medical Sciences*, 491–495. <https://doi.org/10.4297/najms.2010.2491>

McClemens, J., Kim, J., Wang, Mao, Y.-K., Collins, M., Kunze, W., ... Khana, W. I. (2014).

Lactobacillus rhamnosus Ingestion Promotes Innate Host Defense in an Enteric Parasitic Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 100, 818–826.

<https://doi.org/10.1159/000360057>

McGill, M. R. (2016). THE PAST AND PRESENT OF SERUM AMINOTRANSFERASES AND THE FUTURE OF LIVER INJURY BIOMARKERS. *EXCLI Journal*, 12.

McLean, E. K., McLean, A. E. M., y Sutton, P. M. (1969). *INSTANT CIRRHOSIS AN IMPROVED METHOD FOR PRODUCING CIRRHOSIS OF THE LIVER IN RATS BY SIMULTANEOUS ADMINISTRATION OF CARBON TETRACHLORIDE AND PHENOBARBITONE*. 50, 502–506.

Meier, R., Meyer, J., Montanari, E., Lacotte, S., Balaphas, A., Muller, Y., ... Buhler, L. (2019). Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates Liver Inflammation and Fibrosis in Mice in a Model-Dependent Manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1295.

<https://doi.org/10.3390/ijms20061295>

Méndez-Sánchez, N., Villa, A. R., Chávez-Tapia, N. C., Ponciano-Rodríguez, G., Almeda-Valdés, P., González, D., y Uribe, M. (2005). Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Annals of Hepatology*, 4(1), 52–55.

Mesejo, A., y Serrano, A. (2008). Cirrosis y encefalopatía hepáticas: Consecuencias clínico-metabólicas y soporte nutricional. *Nutr Hosp.*, 23, 8–18.

Milijana, K., D., G., V., K., Dj., K., Milan, J., Tatjana, B., y Sanja, A.-K. (2009). Expression of α -SMA, desmin and vimentin in canine liver with fibrosis. *Acta Veterinaria*, 59(4), 361–370.

<https://doi.org/10.2298/AVB0904361K>

Milroy, C. M. (2018). Fatty Liver and the Forensic Pathologist. *Academic Forensic Pathology*, 8(2), 296–310. <https://doi.org/10.1177/1925362118782061>

Monsalve, C., y Cano, A. (2005). Avances en el conocimiento de la diversidad de la familia Brassicaceae en Ancash. *Rev. peru. biol.*, 12(1), 107–124.

Moran, S., Gallardo-Wong, I., Rodríguez-Leal, G., Mccollough, P., Mendez, J., Castañeda, B., ... Dehesa, M. (2009). L-[1-13C]phenylalanine breath test in patients with chronic liver disease of different etiologies. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 45(3), 192–197. <https://doi.org/10.1080/10256010903083995>

- Morhardt, T. L., Hayashi, A., Ochi, T., Quirós, M., Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., ... Kamada, N. (2019). IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Scientific Reports*, 9(1), 1223. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38125-x>
- Muir, A. J. (2015). Understanding the Complexities of Cirrhosis. *Clinical Therapeutics*, 37(8), 1822–1836. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.05.507>
- Muriel, P. (Ed.). (2017). *Liver pathophysiology: Therapies and antioxidants*. London, United Kingdom: Academica Press, an imprint of Elsevier.
- Muriel, P., Moreno, M. G., Hernandez, M. del C., Chavez, E., y Alcantar, L. K. (2005). Resolution of Liver Fibrosis in Chronic CCl4 Administration in the Rat after Discontinuation of Treatment: Effect of Silymarin, Silibinin, Colchicine and Trimethylcolchicinic Acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96(5), 375–380. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_06.x
- Musialik, J., Jonderko, K., Jonderko, A.-K., y Buschhaus, M. (2015). 13 CO 2 breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Gastroenterology Review*, 1, 1–6. <https://doi.org/10.5114/pg.2014.47501>
- Nykonenko, A., Vávra, P., y Zonča, P. (2017). Anatomic Peculiarities of Pig and Human Liver. *Experimental and Clinical Transplantation*, 6.
- Ochoa, C., Granda, C., Chapoñan, M., Borja, R., Borjas, P., Ortiz, J., ... Pucutay, M. (2008). Efecto Protector de *Peumus Boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por Paracetamol. 7.
- O'Garra, A., Barrat, F. J., Castro, A. G., Vicari, A., y Hawrylowicz, C. (2008). Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Reviews*, 223(1), 114–131. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00635.x>

Okafor, O., y Ojo, S. (2004). *A comparative analysis of six current histological classification schemes and scoring systems used in chronic hepatitis reporting*. 37(3), 269–277.

Ortega-Alonso, A., y Andrade, R. J. (2018). Chronic liver injury induced by drugs and toxins: Drugs- and toxins-induced liver injury. *Journal of Digestive Diseases*, 19(9), 514–521.

<https://doi.org/10.1111/1751-2980.12612>

Ortiz-Olvera, N. X., Herrera-Chi, B. A., Méndez-Navarro, J., Morán-Villota, S., y Dehesa-Violante, M.

(2010). Evaluación de índices no invasivos de fibrosis en pacientes mexicanos con hepatitis crónica por virus C. *Revista de Gastroenterología de México*, 75(4), 389–395.

Osna, N. A., Terrence, M. D., y Kharbanda, K. K. (2017). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Research: Current Reviews*, 38(2), 147–161.

Pantaroto, M., Lopes Filho, G. de J., Pinto, C. A. L., y Antico Filho, A. (2015). Comparative study of collagen deposition in the colon wall of patients operated for sigmoid diverticular disease.

Acta Cirurgica Brasileira, 30(10), 715–719. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150100000010>

Parmar, K., Singh, G., Gupta, G., Pathak, T., y Nayak, S. (2016). Evaluation of De Ritis ratio in liver-associated diseases. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 5(9), 1783.

<https://doi.org/10.5455/ijmsph.2016.24122015322>

Patiño, A., y Rangel, A. (2009). Cirrosis. *Foro Nacional de Investigación y Clínica Médica*, 4–9.

Pérez Carreón, J. I. (2017). Científicos hallan la causa genética de tumores hepáticos. *Revista*

Milenio. (Disponible en: www.milenio.com/ciencia-y-salud/cientificos-hallan-causa-genetica-tumores-hepaticos).

Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., y Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 929–979.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622>

- Poonkhum, R., Pradidarcheep, W., Nilbu-Nga, S., y Chaunchaiyakul, S. (2011). Distribution of Hepatic Myofibroblasts and Type I and III Collagen in Rat Liver Cirrhosis Induced by Thioacetamide. *International Journal of Morphology*, 29(2), 501–508.
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022011000200033>
- Poupon, R. (2015). Liver alkaline phosphatase: A missing link between cholestasis and biliary inflammation. *Hepatology*, 61(6), 2080–2090. <https://doi.org/10.1002/hep.27715>
- Praktiknjo, M., Lehmann, J., Nielsen, M. J., Schierwagen, R., Uschner, F. E., Meyer, C., ... Trebicka, J. (2018). Acute decompensation boosts hepatic collagen type III deposition and deteriorates experimental and human cirrhosis. *Hepatology Communications*, 2(2), 211–222.
<https://doi.org/10.1002/hep4.1135>
- Puigserver, E. M. (2000). Encefalopatía hepática. *Medicina Integral*, 35(10), 469–473.
- Raichholz, G., Giménez, S., Froullet, C., de Köning, H. B., y Sañudo, J. L. (2016). *Alteraciones morfológicas hepáticas en la cirrosis: Hallazgos en imágenes*. 5, 7.
- Ramírez, M. G., Ramirez, D., y Jacobo, O. L. (2007). *Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba*. 6, 8.
- Randazzo, C. L., Pitino, I., Licciardello, F., Muratore, G., y Caggia, C. (2013). Survival of Lactobacillus rhamnosus probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(4), 652–659. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400009>
- Riaz Rajoka, M. S., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., ... Shi, J. (2017). Identification, characterization, and probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus isolated from human milk. *LWT*, 84, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.055>
- Riet-Correa, F., Carvalho, K. S., Riet-Correa, G., Barros, S. S., Simões, S. V. D., Soares, M. P., y Medeiros, R. M. T. (2013). Periacinar liver fibrosis caused by Tephrosia cinerea in sheep.

Research in Veterinary Science, 95(1), 200–203.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.03.008>

River Charles. (1982). *Hematología basal y valores de hematología clínica de ratas Wistar (CRL:(W)BR) en función de sexo y edad*. 1(2), 2.

Rojkind, M. (1979). *Collagen Types in Normal and Cirrhotic Liver*. 76, 10.

Roth, J. A., Chrobak, C., Schädelin, S., y Hug, B. L. (2017). MELD score as a predictor of mortality, length of hospital stay, and disease burden: A single-center retrospective study in 39,323 inpatients. *Medicine*, 96(24), e7155. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007155>

Roy, M., Wang, F., Teodoro, G., Vos, M. B., Farris, A. B., y Kong, J. (2018). Segmentation of Overlapped Steatosis in Whole-Slide Liver Histopathology Microscopy Images. *2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 810–813. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2018.8512289>

Rungsri, P., Akkarachaneeyakorn, N., Wongsuwanlert, M., Piwat, S., Nantarakchaikul, P., y Teanpaisan, R. (2017). Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7780–7787. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12961>

Sadeghi, H., Mostafazadeh, M., Sadeghi, H., Naderian, M., Barmak, M. J., Talebianpoor, M. S., y Mehraban, F. (2014). In vivo anti-inflammatory properties of aerial parts of *Nasturtium officinale*. *Pharmaceutical Biology*, 52(2), 169–174.

<https://doi.org/10.3109/13880209.2013.821138>

Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., y Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Laboratory Animals*, 49(1_suppl), 4–11. <https://doi.org/10.1177/0023677215571192>

Schreiber, S. (1997). Interleukin-10 in the intestine. *Gut*, 41(2), 274–275.

<https://doi.org/10.1136/gut.41.2.274>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Schuppan, D. (2015). Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 39, S51–S59.

<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.05.005>

Secretaría de Salud. (2015). *Informe sobre la salud de los mexicanos 2015*. 200.

Segers, M. E., y Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>

Serna-Salas, S. A., Navarro-González, Y. D., Martínez-Hernández, S. L., Barba-Gallardo, L. F., Sánchez-Alemán, E., Aldaba-Muruato, L. R., ... Muñoz-Ortega, M. H. (2018). Doxazosin and Carvedilol Treatment Improves Hepatic Regeneration in a Hamster Model of Cirrhosis. *BioMed Research International*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/4706976>

Shahani, S., Behzadfar, F., Jahani, D., Ghasemi, M., y Shaki, F. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Nasturtium officinale* involved in attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(2), 107–114. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1258748>

Sharma, U., Pal, D., y Prasad, R. (2014). Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269–278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>

Sibulesky, L. (2013). Anatomía normal del hígado: Clinical Liver Disease, Vol. 2, No. S1, March 2013 *Recurso de enseñanza oficial de la AASLD. Clinical Liver Disease*, 2(S4), S61Š-S63Š. <https://doi.org/10.1002/cld.275>

Silva, L. C., Castro, R. S., Figueiredo, M. M., Michalick, M. S. M., Tafuri, W. L., y Tafuri, W. L. (2013). Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 94(2), 133–143. <https://doi.org/10.1111/iep.12010>

Stanger, B. Z. (2015). Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 179–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170255>

Starkel, P., y Leclercq, I. A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Practice y Research Clinical Gastroenterology*, 25(2), 319–333.

<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.004>

Stefanovic, E., Fitzgerald, G., y McAuliffe, O. (2017). Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiology*, 61, 33–49.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>

Stumpf, M., Cao, W., Klinge, U., Klosterhalfen, B., Kasperk, R., y Schumpelick, V. (2001). Increased distribution of collagen type III and reduced expression of matrix metalloproteinase 1 in patients with diverticular disease. *International Journal of Colorectal Disease*, 16(5), 271–275. <https://doi.org/10.1007/s003840100310>

Tejos, R., Padilla, O., Pizarro, M., Solís, N., Arab, J. P., Margozzini, P., ... Arrese, M. (2013). Niveles séricos de alanino-aminotransferasa en población chilena: Análisis de los resultados de la encuesta nacional de salud 2009-2010. *Revista médica de Chile*, 141(7), 909–916.

<https://doi.org/10.4067/S0034-98872013000700011>

Thapa, B. R., y Walia, A. (2007). Liver function tests and their interpretation. *The Indian Journal of Pediatrics*, 74(7), 663–671. <https://doi.org/10.1007/s12098-007-0118-7>

Tortora. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología* (13a ed.). México: Editorial médica Panamericana.

Trinder, M., McDowell, T. W., Daisley, B. A., Ali, S. N., Leong, H. S., Sumarah, M. W., y Reid, G.

(2016). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Reduces Organophosphate Pesticide Absorption and Toxicity to *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(20), 6204–6213. <https://doi.org/10.1128/AEM.01510-16>

- Troncoso, L., y Guija, E. (2013). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *Anales de la Facultad de Medicina*, 68(4), 333. <https://doi.org/10.15381/anales.v68i4.1199>
- Truong, H. N., Nguyen, H. N., Nguyen, T. K. N., Le, M. H., Tran, H. G., Huynh, N., y Van Nguyen, T. (2014). Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research. *Biomedical Research and Therapy*, 1(2). <https://doi.org/10.7603/s40730-014-0009-2>
- Tuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., Ai, L., Zhang, Y., Han, X., y Yi, H. (2013). Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe*, 21, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.007>
- Uemitsu, N. (1984). Evaluation of liver weight changes following a single oral administration of carbon tetrachloride in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 75(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90069-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90069-3)
- Vajro, P., Mandato, C., Licenziati, M. R., Franzese, A., Vitale, D. F., Lenta, S., ... Meli, R. (2011). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG in Pediatric Obesity-related Liver Disease: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 52(6), 740–743. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31821f9b85>
- van Haaften, W. T., Mortensen, J. H., Karsdal, M. A., Bay-Jensen, A. C., Dijkstra, G., y Olinga, P. (2017). Misbalance in type III collagen formation/degradation as a novel serological biomarker for penetrating (Montreal B3) Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology y Therapeutics*, 46(1), 26–39. <https://doi.org/10.1111/apt.14092>
- Vilei, M. T., Granato, A., Ferraresso, C., Neri, D., Carraro, P., Gerunda, G., y Muraca, M. (2001). Comparison of Pig, Human and Rat Hepatocytes as a Source of Liver Specific Metabolic Functions in Culture Systems—Implications for Use in Bioartificial Liver Devices. *The*

International Journal of Artificial Organs, 24(6), 392–396.

<https://doi.org/10.1177/039139880102400609>

Vinjamuri, S., Shanker, D., Ramesh, R. S., y Nagarajan, S. (2015). IN VITRO EVALUATION OF HEMOLYTIC ACTIVITY AND CELL VIABILITY ASSAY OF HEXANOIC EXTRACTS OF BRIDELIA FERRUGINEA BENTH. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(07), 6.

Voutsina, N., Payne, A. C., Hancock, R. D., Clarkson, G. J. J., Rothwell, S. D., Chapman, M. A., y

Taylor, G. (2016). Characterization of the watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.; Brassicaceae) transcriptome using RNASeq and identification of candidate genes for important phytonutrient traits linked to human health. *BMC Genomics*, 17(1).

<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2704-4>

Wang, D., Wei, Y., y Pagliassotti, M. J. (2006). Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. *Endocrinology*, 147(2), 943–951. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0570>

Weber, L. W. D., Boll, M., y Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), 105–136. <https://doi.org/10.1080/713611034>

Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., y Tacke, F. (2018). Recent advances in understanding liver fibrosis: Bridging basic science and individualized treatment concepts. *F1000Research*, 7, 921. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14841.1>

Xu, J.-W., Gong, J., Chang, X.-M., Luo, J.-Y., Dong, L., Hao, Z.-M., ... Xu, G.-P. (2002). *Estrogen reduces CCL4- induced liver fibrosis in rats*. 8(5), 5.

Yambay, P. F. C. (2013). ELABORACIÒN Y CONTROL DE CALIDAD DE UNA CREMA A BASE DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÒLICOS DE BERRO (*Nasturtium officinale*) Y LLANTÈN (*Plantago major*) Y COMPROBACIÒN DE SU ACTIVIDAD CICATRIZANTE EN HERIDAS INDUCIDAS EN

RATONES. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, RIOBAMBA – ECUADOR.

Yanguas, S., Cogliati, B., Willebrords, J., Maes, M., Colle, I., van den Bossche, B., ... Vinken, M.

(2016). Experimental models of liver fibrosis. *Archives of Toxicology*, 90(5), 1025–1048.

<https://doi.org/10.1007/s00204-015-1543-4>

Yazdanparast, R., Bahramikia, S., y Ardestani, A. (2008). Nasturtium officinale reduces oxidative

stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chemico-*

Biological Interactions, 172(3), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.01.006>

Zandi, M., Adib-Hajbagheri, M., Memarian, R., Nejhad, A., y Alavian, S. (2005). Effects of a self-care

program on quality of life of cirrhotic patients referring to Tehran Hepatitis Center. *Health*

and Quality of Life Outcomes, 3(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-3-35>

9. APÉNDICE

Anexos de la sección de metodología

9.1 Preparación y dosis de CCl₄

9.1.1 Preparación

La solución debe ser 0.8mL/Kg de CCl₄ y petrolato (1:1)

La densidad del CCl₄ es 1.59g/mL, por lo tanto, se necesitan 1.272g/kg para una concentración de 0.8mL.

A continuación, se muestran los cálculos realizados para la cantidad que se debe de preparar para 4 semanas. Para que no se contaminara el CCl₄ se realizaron dos preparaciones:

Dado que se administró dos veces por semana, se necesitan 2.544g/kg por semana, ya que $(1.272\text{g/kg})(2) = 2.544\text{g/kg}$.

Entonces, para cuatro semanas son 10.176g/kg, ya que $2.544\text{g/kg} (4\text{semanas}) = 10.176\text{g/kg}$

Se realizó la suposición de que las ratas llegarían a pesar 200g, con 23 ratas. Se necesitarían $200\text{g}(23\text{ratas}) = 4600\text{g} = 4.6\text{Kg}$

Dado que 10.176g son para 1 kg, entonces para 4.6kg se prepararon 46.8096g para las cuatro semanas

Como el CCl₄ es líquido, se convierten los gramos a mililitros.

1.59g	-	1mL
46.8096g	-	X= 29.44mL

Por lo tanto, se utilizaron 29.44mL de CCl₄ y como es una solución 1:1 de CCl₄ y petrolato, se utilizaron 29.44mL de petrolato.

Dicha solución se almacenó en cuarto frío (cuarto-refrigerador) a -21°C y cada vez que se utilizó se llevó al bioterio y al terminar se regresaba al cuarto frío a -21°C.

9.1.2 Dosis

El volumen obtenido necesario de Tetracloruro de Carbono se inyectó vía intraperitoneal, dos veces por semana (martes y viernes), a la misma hora (8am), a todos los grupos de ratas excepto al Intacto (Control negativo).

La dosis administrada a las ratas para la inducción de fibrosis fue de 0.8 mL/kg de la mezcla 1:1 v/v de CCl₄ y petrolato.

La dosis de Tetracloruro de Carbono para cada rata (X) se calculó mediante una regla de tres, de la siguiente manera: cada rata recibió la dosis adecuada a su peso.

$$\begin{array}{rcl} 0.8\text{mL} & - & 1000\text{g} \\ X & - & \text{peso de las ratas (g)} \end{array}$$

Donde X (mL) = (peso de la rata (g)*0.8mL/1000g)



9.2 Dosis de extracto metanólico de berro

La dosis 600mg/Kg de extracto de berro para cada rata (del grupo de Berro y Berro-Lacto), se calculó dependiendo de su peso con la siguiente fórmula: $(\text{Peso de la rata (g)}) \cdot (600\text{mg}) / 1000\text{g}$

Una vez obtenida esta cantidad, se hizo la conversión a gramos.

Teniendo dichos gramos se disolvieron en 0.5mL de agua purificada para ser suministrada vía oral mediante cánula a la rata.

Al momento de cargar la jeringa con cánula, se aspiró y se soltó la misma solución dentro del frasco varias veces, para asegurar que estuviera perfectamente disuelta.



9.3 Preparación del extracto metanólico de Berro

Se obtuvo muestra fresca de Berro (10 kg) en el centro comercial Agropecuario de Aguascalientes. Se separaron tallo y hoja de la parte aérea. Las cuales se desecaron en horno con aire recirculado a 50°C durante 18 horas. El total de muestra seca pesó 105g, se compararon el tallo y la hoja para saber si se podían mezclar en el mismo extracto o no.

Se realizó una cromatografía en capa fina, utilizando en una columna 0.5g de tallo de berro y en otra 0.5g de hoja de berro, ambos se maceraron por separado con 5mL de metanol absoluto por 10 min con varillas de vidrio. Posteriormente, se colocaron en Cromatofolios de Aluminio con Silica gel G60 (Merck) 20 μ L de las muestras eluídas con una mezcla Cloroformo:Metanol 9:1. Tras ser eluídas las placas se revelaron con Cloruro de Cobalto y se calentaron a 80 °C por 10 min (como se muestra en la imagen de la columna izquierda), se realizó un análisis cromatográfico después del revelado con una lámpara UV a 365 nm (Imagen de la columna derecha).

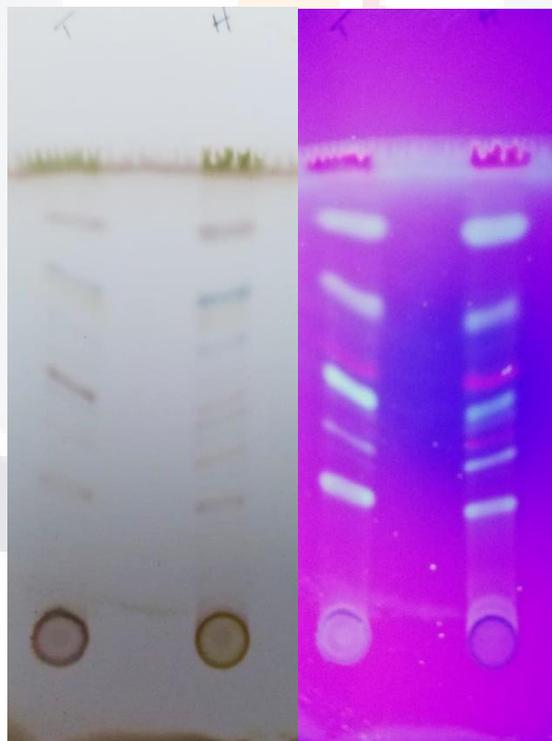
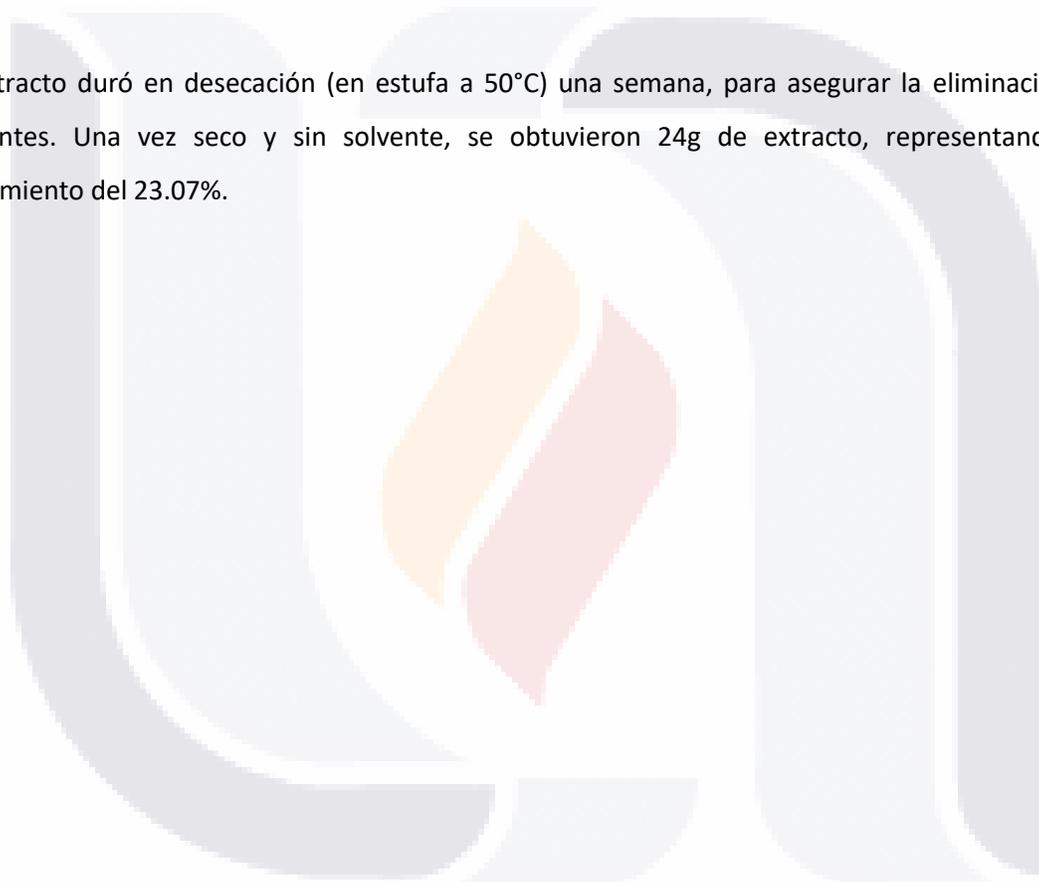


Imagen 9 Cromatografía en capa fina del tallo de berro (columna izquierda) y de la hoja (columna derecha) en ambas imágenes

Debido a que no observaron diferencias significativas entre las muestras, se realizó el extracto metanólico de berro a partir de la combinación de sus tallos y hojas.

Tallo y hoja se metieron a licuadora hasta hacerla polvo, 104g de polvo se maceraron con 1000mL de metanol absoluto, en oscuridad sin agitación, durante 48h. Transcurrido el tiempo, el metanol (de la extracción) fue filtrado con papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se llevó a desecación con un rotaevaporador Yamato BM 100 donde se recuperó el solvente utilizado y se concentró el extracto obtenido. El extracto recuperado se colocó en un vaso de precipitado de 100mL y se llevó a sequedad a 50°C en estufa. El solvente recuperado se utilizó para volver a hacer el proceso de extracción, desde dejarlo 48h en oscuridad y sin agitación hasta la concentración del nuevo extracto obtenido, esta recuperación y reutilización de metanol se realizó en 3 repeticiones.

El extracto duró en desecación (en estufa a 50°C) una semana, para asegurar la eliminación de solventes. Una vez seco y sin solvente, se obtuvieron 24g de extracto, representando un rendimiento del 23.07%.



9.4 Metabolitos secundarios del *extracto metanólico de berro*

Se realizaron una serie de exámenes fitoquímicos, basados en color para determinar los grupos funcionales de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de berro. Se suspendieron 5mg del extracto de berro en 1mL de metanol en todas las pruebas, excepto en la de saponinas, en la que se utilizó agua destilada en lugar de metanol (Hernández-Marín et al., 2018).

Se utilizaron los siguientes reactivos para cada examen: Dragendorff para alcaloides, Shinoda para flavonoides, NaOH para cumarinas, H₂SO₄ concentrado para quinonas, 5% de cloruro férrico para taninos, Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos, Baljet para sesquiterpenlactonas, Antrona para carbohidratos, KMNO₄ para la presencia de dobles enlaces, 2-4 DNFH para grupos carbonilo y se requirió una vigorosa agitación para la observación de formación de espuma para las saponinas (Hernández-Marín et al., 2018).

A continuación, se muestra una tabla con el nombre de la prueba química y entre paréntesis se detalla el grupo funcional que detecta dicha prueba, y en la columna de la derecha se muestra si dicho análisis resultó positivo o negativo.

Tabla 32 Detección de metabolitos en extracto de berro

Prueba Química	<i>Nasturtium officinale</i>
KMNO ₄ (Dobles enlaces)	+
2-4 DNFH (Carbonilo)	+
Liebermann-Burchard (Esteroides y Triterpenos)	+
NaOH (Cumarinas)	+
Dragendorff (Alcaloides)	-
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	+
H ₂ SO ₄ (Quinonas)	+
NaHCO ₃ (Grupo Carboxilo)	+
FeCl ₃ (Taninos)	+
Espuma (Saponinas)	-
Antrona (Carbohidratos)	+
Shinoda (Flavonoides)	+

9.5 Capacidad antioxidante del extracto de berro por las técnicas de DPPH y ABTS

Se evaluó la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés: Trolox equivalent antioxidant capacity), utilizando los reactivos DPPH y ABTS.

Estos procedimientos se llevaron a cabo en luz tenue; las soluciones estándar se prepararon conteniendo entre 0-35 nmol de Trolox en 100 μ L. (Hernández-Marín et al., 2018)

Para el **ensayo con DPPH** cada solución estándar se dejó reaccionar con 600 μ L de 0.13mM de reactivo DPPH (volumen total de reacción= 700 μ L). Además, se evaluaron alícuotas de 100 μ L de extracto de berro con el reactivo DPPH. Las reacciones se mantuvieron en oscuridad durante 20min a temperatura ambiente. Posteriormente se leyeron los tubos a 515nm (Hernández-Marín et al., 2018).

Para el **ensayo con ABTS** se usaron 100 μ L de las diferentes concentraciones de Trolox (0-35nmol) y se dejaron reaccionar con 1400 μ L de reactivo ABTS (preparado utilizando 7.4mM ABTS y 2.5mM de persulfato de potasio) para un volumen total de reacción de 1500 μ L. Igualmente, se utilizaron alícuotas de 100 μ L del extracto de berro para su evaluación. Las reacciones se mantuvieron en oscuridad durante 30min a temperatura ambiente. Posteriormente se leyeron los tubos a 734nm (Hernández-Marín et al., 2018).

En este caso, el extracto de berro mostró 60.4 ± 0.4 μ mol equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco para el ensayo con DPPH. Y 162.6 ± 0.5 μ mol equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco para el ensayo con ABTS.

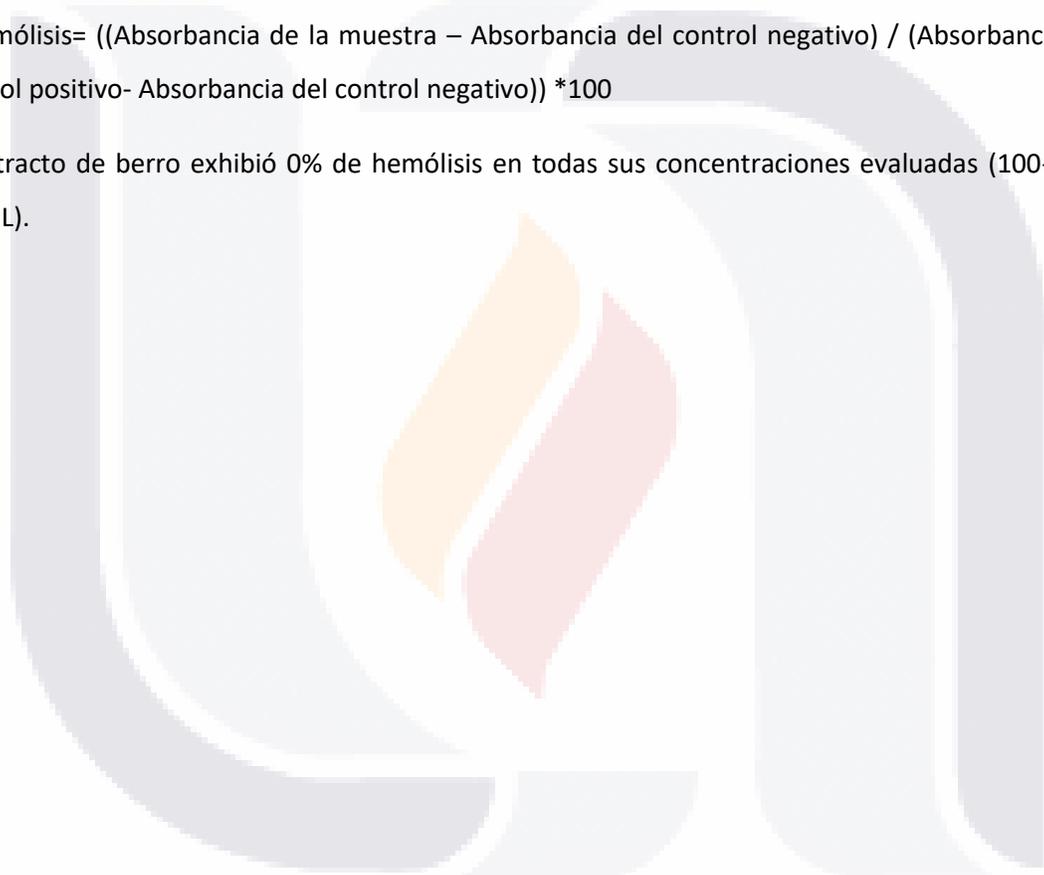
Se considera alta capacidad antioxidante (>200 μ mol TE/g) cuando los extractos muestran capacidades antioxidantes equivalentes de Trolox (TEAC) (Hasan et al., 2015c).

9.6 Citotoxicidad (% hemólisis) del extracto de berro

Se utilizó la metodología de (Vinjamuri et al., 2015) modificada. Se preparó una suspensión de 5% de eritrocitos humanos con buffer PBS, el extracto de berro fue evaluado a concentraciones de 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; como controles positivo y negativo se utilizaron agua destilada y buffer PBS respectivamente. El volumen de la reacción final se ajustó a 1.25mL: 250 μL de suspensión de eritrocitos, 980 μL PBS, y 20 μL del concentrado de extracto de berro. La mezcla de reacción fue incubada durante 30min a $37\pm 0.5^\circ\text{C}$, se centrifugó y se leyó el sobrenadante a 540nm (Hernández-Marín et al., 2018). El porcentaje de hemólisis se calculó con la siguiente ecuación:

$\% \text{Hemólisis} = ((\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia del control negativo}) / (\text{Absorbancia del control positivo} - \text{Absorbancia del control negativo})) * 100$

El extracto de berro exhibió 0% de hemólisis en todas sus concentraciones evaluadas (100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



9.7 Siembra y resiembra de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus*

Siembra

La siembra se realizó únicamente una vez, cuando se vertieron los probióticos comprados de *Lactobacillus rhamnosus* GG que venían en un vial, dentro de un matraz Erlenmeyer de 150mL con 35mL de medio MRS (Anexo 9.8). Todo esto se realizó dentro de la campana de flujo laminar (Anexo 9.10.3), al terminar y cerrar el matraz Erlenmeyer se retira de la campana de flujo laminar y se deja en agitación (85 rpm) dentro de una incubadora (Incubator Imperial III) a 37°C.

A partir de esa siembra, es que se obtendrán los probióticos para realizar los tratamientos y de ahí saldrán las resiembras sucesivas.

Resiembra

La resiembra de la cepa se realiza cada 24h.

Cada día, el frasco con las bacterias se retiró de la agitación y se colocó dentro de la campana de flujo laminar junto con un matraz Erlenmeyer, en el que se tiene el medio de cultivo estéril, y se prendió la campana, dejándola 15 minutos bajo luz UV, después 15 minutos con aire corriente.

Dentro de la campana y cerca del mechero, se tomó con la micropipeta 1000 microlitros (1mL) del frasco con bacterias, tras ladearlo varias veces para darle una ligera agitación, se colocó dentro del frasco con el medio de cultivo estéril, sin tocar las paredes del matraz con la pipeta. Se cerró con su tapón de algodón, se cubrió con su papel aluminio y se colocó como última capa el papel estraza, material que ya traía el frasco tras su esterilización (Anexo 9.10.1).

Se retiró de la campana de flujo laminar y se dejó de nuevo en agitación (85 rpm) dentro de la incubadora a 37°C hasta su próxima resiembra.

La resiembra se realizó cada 24h y debido a que los tratamientos se aplicaron de lunes a viernes, cada que se realizaba resiembra se realizó también la preparación del tratamiento (Anexo 9.9).

9.8 Medio de cultivo para *Lactobacillus rhamnosus silvestre*

Se prepararon con anticipación varios matraces Erlenmeyer de 50 y 150mL con medio de cultivo MRS, se esterilizaron en olla de presión (anexo 9.10.2), se pasó a los matraces dentro de la campana de flujo laminar y se dejaron en refrigeración hasta su uso.

El caldo de cultivo MRS es específico para lactobacilos.

Viene en polvo, cuya fórmula aproximada para diluir por litro de agua es la siguiente:

Tabla 33 Fórmula del medio de cultivo MRS

Contenido	Cantidad
Peptona de proteosa No.3	10g
Extracto de res	10g
Extracto de levadura	5g
Dextrosa	20g
Polisorbato 80	1g
Citrato de amonio	2g
Acetato de Sodio	5g
Sulfato de Magnesio	0.1g
Sulfato de Manganeso	0.05g
Fosfato dipotásico	2g

Para su preparación se disolvieron 55g de polvo en 1 L de agua tridestilada. Se mezcló bien. Se dejó calentando con agitación frecuente y se dejó hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Posteriormente se metió a esterilizar en olla de presión.

Los matraces preparados se dejaron en refrigeración hasta su utilización.

Cabe destacar que antes de colocar la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* en este medio, se dejó el matraz en la campana de flujo laminar para evitar el contraste en la temperatura para las bacterias.

9.9 Preparación del tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus*

Se debe prender el espectrofotómetro (Biobase BK-UV1600) 20 minutos antes de realizar el procedimiento. De preferencia al mismo tiempo que se inicia con la esterilización de la campana de flujo laminar.

Se ajustó la lectura del espectro a 600nm.

Dentro de la campana de flujo laminar, con el mechero y el flujo de aire encendido, se agregaron 900µL de medio de cultivo estéril de MRS a una celda de cuarzo de 1mL. Esta celda se sacó de la campana de flujo laminar y se llevó al espectrofotómetro donde se le indicó que tomara dicha lectura como zero. Una vez en ceros, se regresó la misma celda a la campana y se completó su volumen agregando 100µL del medio con cultivo de *Lactobacillus rhamnosus*, previamente agitado. Una vez en la celda de cuarzo, se bombeó con la micropipeta para dejar una mezcla homogénea, la cual se leyó en el espectrofotómetro.

Al obtener la densidad óptica del medio con bacteria *Lactobacillus rhamnosus*, se hicieron los cálculos para determinar el volumen de medio con cultivo de bacteria necesaria para obtener una concentración de 1×10^{10} células por mililitro.

Sabiendo que:

1 densidad óptica (OD_{600}) equivale a 8×10^8 células por mL, entonces la densidad óptica obtenida se multiplicó por 10 (ya que la teníamos en dilución 900 µL de medio limpio y 100 µL de bacteria) y se estimó el número de células por mililitro contenidas en todo el frasco. Posteriormente y con este dato, se calculó la cantidad de mililitros necesaria para contener por cada 0.5mL una concentración de 1×10^{10} células.

Una vez conocido el volumen necesario se volvió a la campana de flujo laminar y se extrajo del cultivo esa cantidad de mililitros en un tubo Falcon estéril de 15mL. Dicho tubo se centrifugó a una velocidad de 5,000rpm durante 5 minutos a una temperatura de 30°C. Al finalizar, se desechó el medio dejando al fondo el botón de bacterias. Dichas bacterias se mezclaron, agregando los mililitros de agua purificada necesarios, dependiendo del número de ratas y considerando que le tocan 0.5mL a cada rata. Una vez homogeneizada la solución, quedaba listo el tratamiento.

Al momento de cargar la jeringa con cánula, se aspiró y se soltó la misma solución dentro del frasco varias veces para asegurar la disolución de la bacteria en el agua.

9.10 Preparación de material para el medio de cultivo de *L. rhamnosus*

9.10.1 Esterilización

Los matraces del medio de cultivo se prepararon colocándoles un tapón en la boca del matraz, dicho tapón está hecho de algodón cubierto con gasa. Posteriormente se colocó aluminio y la última capa es de papel estraza. Y una liga de hule alrededor que fije dichos tapones.

A todo lo que se esterilizó se le colocó en su superficie un pedazo de cinta testigo.

9.10.2 Olla de presión

Se utilizó la olla de presión para la esterilización, ya que es el mecanismo que permite eliminar en su totalidad todos los microbios presentes en un determinado material, mediante el uso de vapor de agua a alta presión y temperatura.

Dentro de la olla hay una parrilla al fondo. Se llenó previamente la olla con agua corriente hasta cubrir la parte inferior de la olla antes de tocar la parrilla. Posteriormente se colocaron los frascos a esterilizar (en este caso el frasco con medio de cultivo y varios matraces Erlenmeyer, así como una bureta de 50mL previamente preparados). Es importante colocarlos de tal forma que el vapor de aire pueda circular entre ellos, es decir que no estén amontonados. Tras lo cual, se cerró la tapa hasta asegurar que se encontrara herméticamente cerrada. Se colocó un mechero encendido por debajo de la olla y se dejó calentar hasta que la presión alcanzara los 15 Pascales en el manómetro. Una vez llegados al 15, se dejó en esta presión durante 15 minutos, regulando mediante la puesta y quitada del mechero (a mayor temperatura, mayor presión, y viceversa). Tras los 15 minutos de esterilización se apagó el mechero y se dejó enfriar hasta que la presión marcara 0. Se abrió cuidadosamente la tapa, ya que expulsa vapor muy caliente y se dejó abierta hasta que alcanzara una menor temperatura. Tras lo cual se podían sacar los materiales ya estériles.

9.10.3 Campana de flujo laminar

Se preparaba previamente el material que se utilizaría en la campana. Una vez con el material a la mano se le rociaba con atomizador alcohol en su superficie. Se metían a la campana los materiales y se cerraba con cortina oscura. Se dejaba con luz UV durante 15 minutos, posteriormente se dejaban otros 15 minutos con la corriente de aire prendida. Una vez terminados esos 30 minutos y sin apagar el aire se prendía la luz de la campana y se cerraba la puerta del cuarto. Una vez cerrada, se abre la ventana a la altura mínima posible donde se pudiera meter las manos teniendo buena movilidad. Antes de meter las manos debían estar previamente lavadas con agua, con jabón y atomizadas con alcohol al 95%. Ya dentro de la campana se colocaron los guantes y se prendió el

mechero. Todos los movimientos debían ser cuidadosos y cercanos al mechero para aumentar el grado de esterilidad. Se trabajó con los materiales a una distancia mínima de 15cm de la ventana dentro de la campana.



9.11 Cirugía a las ratas

1) Se aseguró que la rata estuviera anestesiada (al apretarle la cola y no recibir un movimiento de reacción).

2) Se sujetó a la rata en posición decúbito supino.

3) Se introdujo la aguja de una jeringa de 5mL justo por debajo del esternón, hasta llegar al corazón y se extrajo toda la sangre. Se colocó la sangre extraída en frascos Falcon de 15mL previamente etiquetados.

4) Se realizó un corte con bisturí a nivel del vértice del esternón. Se seccionó la piel, el músculo diafragma y el borde costal lateral derecho e izquierdo. Se pinzó el vértice del esternón y levantó la pared anterior del tórax.

5) Durante el sacrificio de los grupos experimentales, se tomaron muestras de: 1) Hígado; 2) intestino grueso (ciego) y 3) Sangre (extraída en el punto 3).

6) Se retiró quirúrgicamente el hígado y se colocó en placa de vidrio.

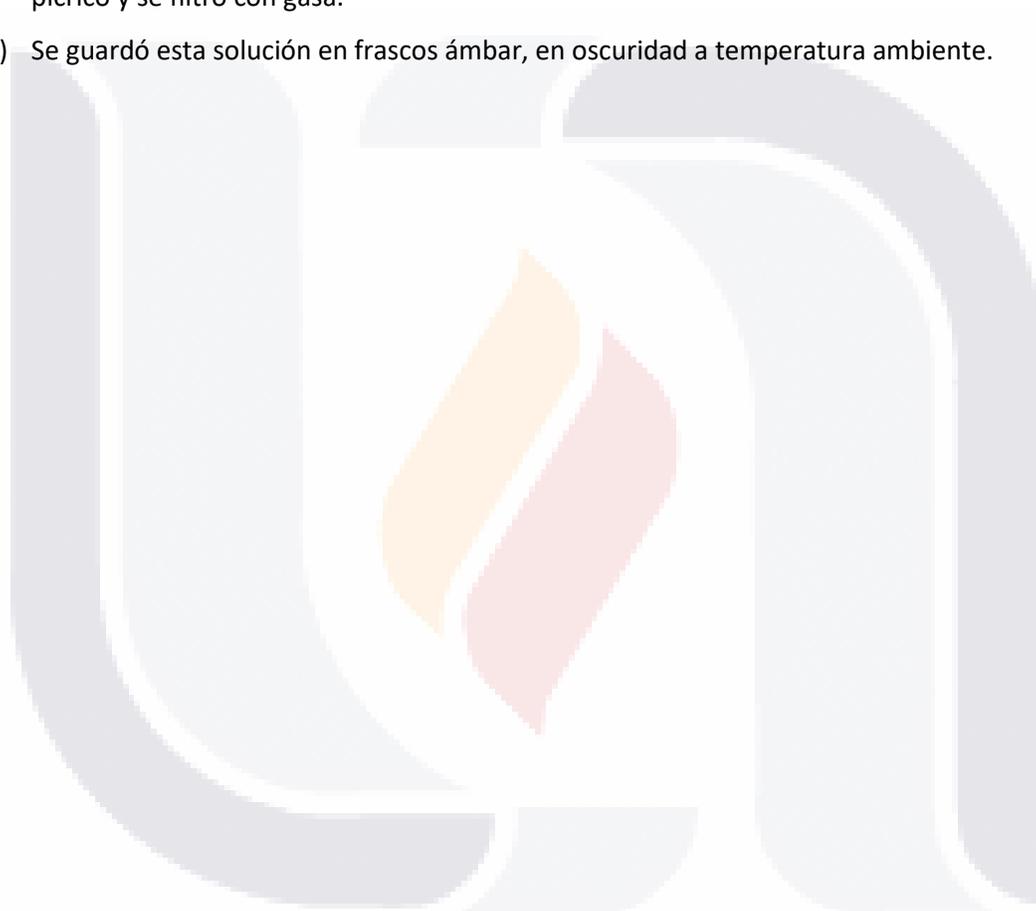
7) Se pesó el hígado extraído y anotó el peso en bitácora.

8) Se diseccionó el hígado para obtener las diferentes muestras

9) Se retiró quirúrgicamente el intestino grueso (colon) y se colocó en placa de vidrio para su disección y obtención de muestras

9.12 Preparación de Rojo Sirio

- 1) Se realizó una solución acuosa saturada de ácido pícrico (Sigma P6744-1GA): (300mL) + 0.3g de Rojo directo (Sigma-Aldrich 365548)
- 2) La solución acuosa saturada de ácido pícrico (Bouin) se preparó añadiendo ácido pícrico a 300mL de agua destilada, se dejó disolver 1 día o 2 días hasta que se disolviera la mayoría, pero sin que llegase a disolverse completamente.
- 3) Se disolvieron 0.3g de rojo directo en los 300mL de la solución acuosa saturada de ácido pícrico y se filtró con gasa.
- 4) Se guardó esta solución en frascos ámbar, en oscuridad a temperatura ambiente.



9.13 Preparación de Hematoxilina de Harris

Se mezclaron los siguientes reactivos:

Cristales de Hematoxilina	5g
Alcohol 100%	50mL
Aluminio de Potasio y amonio	100g
Agua destilada	1000mL
Óxido de Mercurio (rojo)	2.5g



9.14 Técnica para portaobjetos adhesivo

Para 1 L:

- 1) Se añadieron 1000mL de agua destilada en un vaso de precipitados y se calentó a 60°C. Se agitó con agitador magnético.
- 2) Se añadieron 5g de gelatina y se dejó disolver.
- 3) Se añadieron 0.5g de Alumbre de Cromo y Potasio que se realizó con: 0.25 g de Dicromato de potasio y 0.25g de Fosfato dibásico de sodio.
- 4) Se vertió la solución en una cubeta de vidrio previamente calentada a 60°C
- 5) Siempre se utilizaron guantes: se sumergieron los portaobjetos de 3-5 veces durante 5-10 segundos cada vez en la solución.
- 6) Se sacaron los portaobjetos y se les dieron unos golpecitos sobre un papel filtro para retirar el exceso de solución y que no quedaran abultamientos en la laminilla.
- 7) Se colocaron las laminillas en portalaminillas metálicos o de vidrio y se colocaron en una estufa (RIOSSA) a 37°C durante toda la noche para su secado (puede dejarse de 12-24 horas).
- 8) Se guardaron los portaobjetos ya secos en una caja de cartón especial para laminillas, seca y libre de polvo hasta su uso.

Nota: La preparación de soluciones se realizaba en campana de extracción (no requiere estar esterilizada).

9.15 Morfometría

El software de AxioVision es el que trae el microscopio invertido y el que se utilizó. Se aseguró que en el menú RS Microscope se encontraba activo el modo transmisión, tanto para las muestras teñidas con HE como con las de Rojo Sirio. Una vez colocada la muestra con el cubreobjetos boca abajo, se dió clic en: 1) Exposure 2) White Balance 3) Properties y en el submenú Display se colocó la línea invertida lo más horizontal posible 4) White balance; se seleccionó el submenú properties y adjust, para hacer ajuste de blancos, una vez seleccionada esta opción se dio clic en interactive y se dio un clic en la parte blanca de la imagen obtenida en el microscopio, esto ajustó a ese tono de blanco toda la imagen y se pudo obtener una calidad muy buena en las imágenes del microscopio.



9.16 Análisis por qPCR

9.16.1 Extracción de ARN

1. Se colocó el tejido en 350µL de TRI-Reagent (Sigma) y se homogeneizó manteniendo la muestra siempre en hielo. No se utilizaron más de 30mg de tejido.
2. Se centrifugó el tejido lisado a 14,000 rpm a 4°C durante 10min.
3. Se agregó un volumen (350 µL) de etanol absoluto
4. Se agitó en vortex durante 30 segundos
5. Se transfirieron 700 µL de la muestra, incluido algún precipitado, a una columna RNasy Mini. Se cerró la tapa y se centrifugó por 30seg a 8000 rpm. Se descargaron los desechos.
6. Se añadieron 700 µL del Buffer RW1 a la columna RNasy Mini. Se cerró la tapa y se centrifugó por 30segundos a 8000 rpm. Se descargaron los desechos.
7. Se añadieron 500µL del Buffer RPE a la columna RNasy Mini. Se cerró la tapa y se centrifugó por 30segundos a 8000 rpm. Se descargaron los desechos.
8. Se añadieron 500µL del RPE a la columna RNasy Mini. Se cerró la tapa y se centrifugó por 2 minutos a 8000 rpm. Se descargaron los desechos.
9. Se aseguró que en la columna no se percibiera olor a etanol. De ser así, se dejaba la tapa abierta durante 1min.
10. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 2mL. Se añadieron 50µL de RNasa-free water para eluir. Se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm.
11. Se alicuotó la elución en dos tubos Eppendorf de 600 µL, colocando 20 µL en cada uno. Inmediatamente se colocaba en hielo.
12. Una alícuota se almacenó a -82°C, mientras que otra se mantuvo en hielo para continuar con el protocolo.

9.16.2 Cuantificación de ARN

1. Se encendió el equipo BioDrop
2. Del menú principal, se seleccionó “ciencias de la vida”, “Ácidos nucleicos”, “ARN”
3. Se modificaron las unidades de µg/mL a ng/mL. Se presionó dos veces siguiente (->).
4. Se colocó en el lector del equipo 1 µL del eluyente en el cual se encontraba la muestra y se seleccionó el ícono azul. Siendo éste nuestro blanco (agua libre de nucleasas).
5. Se limpió el lector.
6. Se colocaron en el lector del equipo 1 µL de la muestra y se seleccionó el ícono rojo (muestra). Se limpió el lector

7. Al terminar con la lectura se colocó 1 μL del blanco.

9.16.3 Retro transcripción

1. Con base en la concentración obtenida de ARN, se calculó el volumen necesario a pipetear para tener una concentración de 1000ng/ μL (Para que todas las actinas estuvieran a la misma concentración)
2. Ejemplo: si se tuviesen 1116ng

$$1116\text{ng} - 1 \mu\text{L}$$

$$1000\text{ng} - \mathbf{0.89 \mu\text{L}}$$

Por lo tanto, se redondea y se agregan .9 μL de RNA + .9 μL de agua libre de nucleasas

3. Se añadieron a un tubo de PCR el volumen calculado en el paso anterior. Posteriormente se agregó 1 μL del Primer Oligo dT
4. Se añadió el agua necesaria para ajustar a un volumen total de 2.5 μL
5. Se colocó el tubo en el termociclador a 70°C durante 5 minutos (programa 15). Inmediatamente se transfirió a hielo y se mantuvo así durante 5 min.
6. Se centrifugó 10 segundos en la microcentrífuga. Se mantuvo en hielo hasta agregar el Mix de reacción de retro transcripción
7. Preparación del Mix de reacción:

Tabla 34 Preparación del Mix de reacción

Reactivo	Volumen
GoScript 5x Reaction Buffer	2 μL
MgCl ₂ (final concentration 1.5-5mM)	1.5 μL
PCR Nucleotide Mix final concentration 0.5mM each dNTP)	0.5 μL
Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor	0.25 μL
GoScript Reverse Transcriptase	0.5 μL
Nucleasa-free water	2.75 μL
Volumen Final	7.5 μL

8. Se añadieron 7.5 μL del Mix de reacción de retro transcripción al tubo de PCR de la primera mezcla.
9. Se colocó el tubo de la reacción en el termociclador a 25°C durante 5 minutos
10. Se mantuvo a 42°C máximo por una hora en el termociclador.
11. Se aumentó la temperatura a 70°C por 15 minutos
12. El paso 8,9 y 10 pertenecen al programa 16

13. Al terminar la reacción se almacenó la muestra a -20°C

9.16.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

1. El cDNA obtenido se utilizó para cuantificar la expresión relativa del ARNm para IL-10 y IL-1 y colágena. Las muestras fueron diluidas 1:10 para obtener una concentración de 50ng de cDNA. Se realizaron mezclas en placas de 48 pocillos para qPCR (Applied Biosystems MicroAmp N80105060), qPCR SybrGreen con UNG (Thermo Scientific) y los oligos correspondientes (IBT 2018 Integrated DNA Technologies, Inc.) en dilución 1:20 (10ng) como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 35 Oligonucleótidos de cada gen

Gen	Oligonucleótidos
IL-1	5'-CTGTGACTCGTGGGATGATG-3'
IL-10	5'-TGGCTCAGCACTGCTATGTT-3'
β -Actina	5'- GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'

2. Se colocaron: 5 μ L de SybrGreen + 5 μ L de la mezcla: (1 μ L Forward + 1 μ L Reverse diluidos 1:20 (10ng) + 1 μ L cDNA diluido 1:10 (50ng) + 2 μ L agua libre de nucleasas).
3. La sensibilidad del método es de 10ng
4. Las placas se centrifugaron en microcentrífuga (MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner-Labnet International) y se procesaron en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System para su análisis. Las condiciones de la PCR se describen a continuación: 50°C durante 2min y 95°C durante 3minutos (para abrir la cadena en lugar de utilizar helicasas), posteriormente se sometieron a 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: alineamiento 95°C por 30 segundos, 60°C durante 40 segundos. Curva melt: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1minutos, 95°C durante 15 segundos.
5. Los niveles de expresión relativa se normalizaron contra β -Actina como un gen interno y las diferencias se determinaron usando el método relativo de $\Delta\Delta C_t$.

9.17 Procesamiento de las muestras (deshidratación, aclaramiento, inclusión en parafina y corte en microtomo)

Se tomaron las muestras que estaban ya fijadas en los tubos Falcon de 15mL con formalina neutra al 4%.

1. Se tomaron los pedazos de muestra, y se colocaron en pequeñas rejillas de plástico, se etiquetaron en un pedazo de papel que se colocaba al interior de la rejilla de plástico y con lápiz (si se utiliza algo diferente de lápiz se borra debido que se utilizan solventes durante el proceso).
2. Se colocaron las rejillas de plástico bien cerradas con los tejidos dentro de la canastilla, se colocó la tapa/pesa encima para que los mantuviera en la parte inferior de la canasta y se pusieron en la primera cuba (agua destilada) del aparato "Histoquinet" (Microm STP 120, marca Leica de Thermo Scientific TM) que es un procesador de tejidos.
3. Se programó el aparato para que terminara a la hora deseada, sabiendo que tarda 14 horas el proceso.
4. Se le dio clic en "start". Lo que hacía la programación es ir pasando los tejidos por las diversas cubas, girando para generar movimiento entre el líquido y la muestra, las muestras duraron aproximadamente 1h por cuba, posteriormente salían y se escurrían girando durante un minuto antes de pasar a la siguiente cuba
5. Las cubas y su orden es el siguiente: 1) Agua destilada, 2) Alcohol etílico al 80%, 3) Alcohol etílico al 96%, 4) Alcohol etílico al 96%, 5) Alcohol etílico al 100%, 6) Alcohol etílico al 100%, 7) Alcohol etílico 100% + Xilol (50:50), 8) Alcohol etílico 100% + Xilol (50:50), 9) Xilol, 10) Xilol, 11) Parafina, 12) Parafina
6. Las primeras cubas fueron alcoholes de concentración ascendente para deshidratar los tejidos.
7. El penúltimo paso fue aclaramiento del tejido, utilizando Xilol
8. Las últimas 2 cubas fueron de parafina, éstas estaban calientes a temperatura constante de 65°C, ya que la parafina utilizada tiene un punto de fusión de 57°C
9. Se retiraron las muestras del Histoquinet al finalizar el programa, y se pasaron al centro de inclusión en parafina (Microm EC 350-1), el cual se precalentó 1 hora antes de utilizarse.
10. Para saber que ya se puede trabajar en el centro de inclusión, se verificaba que la parafina ya estuviera líquida.
11. En el centro de inclusión se dejaron las muestras recién salidas, dentro de una de las cajas laterales para que todo el tiempo estuvieran cubiertas de parafina.
12. Se formó con ayuda de escuadras metálicas un cubo del tamaño deseado, posteriormente se le agregó poca parafina (aproximadamente 0.5cm) aquí se tomó el tejido de su caja plástica y se colocó al fondo del cubo, aplastando ligeramente el tejido para que quedara bien pegado al fondo y con cuidado de colocarlo en la manera en que se quisiera que salieran los cortes.

13. Inmediatamente después, se rellenó con parafina líquida hasta el borde (es importante rellenar el cubo en una sola descarga, pues si se hiciera con pausas, el bloque quedaba disparejo y frágil).
14. Con la parafina hasta el borde, se colocó encima la tapa plástica, en la que estuvo encerrada la muestra, dejándola como lo que sería la base del cubo de parafina, encima y sin esperar a que seque se rellenó con parafina líquida.
15. Antes de que solidificara la parafina, se colocó la etiqueta de la muestra (la escrita a lápiz que viene en las cajas de plástico) por encima de la parafina y procurando tocar dos de los lados de la tapa plástica para que no se hundiera la etiqueta.
16. Se dejaron los cubos de parafina en el área fría del centro de inclusión y se esperó a que enfriaran y solidificaran.
17. Obtención del bloque: Se retiraron las escuadras metálicas, dejando el bloque de parafina con su base plástica.
18. Los bloques se guardaron a temperatura ambiente, en un lugar oscuro. Treinta minutos antes de hacer cortes en el microtomo de rotación (Marca Leica, RM2125) se fueron metiendo al congelador para que no estuvieran blandos a la hora de cortar.
19. Se colocó el cubo de parafina con la base plástica al fondo del micrófono rotatorio y se aseguraba, apretándolo con el tornillo, pero sin apretar demasiado para que no se cuarteara o rompiera.
20. Se realizaron los cortes con espesor de $5\mu\text{m}$ y se pasaron a un portaobjetos limpio.
21. Una vez en el portaobjetos limpio, se les colocó por debajo del tejido (dejando escurrir) alcohol al 50%, asegurando que cubriera la totalidad del tejido.
22. El tejido húmedo con el alcohol se pasó al baño de flotación histológica donde había agua a una temperatura de entre $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$.
23. El tejido se vertió en el baño metiendo la laminilla a un ángulo aproximado de 45° , el tejido flotaba en el baño caliente.
24. Se esperaba lo necesario (aprox. 1-2min) a que el tejido se viera liso (bien extendido), sin arrugas. No se debía esperar más tiempo ya que podía lisarse por expandirse demasiado.
25. Se recogía el tejido en laminillas xilanizadas o con tratamiento adhesivo (Anexo 9.14).
26. Se rotuló la laminilla con lápiz en su parte esmerilada y si no tenía la parte esmerilada, se rotulaba con la pluma metálica en el vidrio.
27. Las laminillas se dejaron en porta laminillas metálicos y se metieron en estufa por 24h para desparafinizar el tejido.

28. Una vez listas las laminillas podían pasarse a una caja plástica porta laminillas en la que se quedaron guardadas a temperatura ambiente hasta proceder a su tinción.



9.18 Tinción Hematoxilina-Eosina (HE)

1. Las laminillas con tejido se colocaron en un porta-laminillas de vidrio que tuviera el tamaño adecuado para caber dentro de las cubas con las diferentes soluciones puestas en el tren de tinción.
2. Se desparafinizaron los tejidos pasándolos por 2 cubas de xilol, 7 min en cada una.

Se hidrató con alcohol en concentraciones decrecientes hasta llegar a agua destilada.

3. Se realizaron 2 cambios de 3min en alcohol al 100% (2 cubas distintas)
4. Se ejecutaron 2 cambios en alcohol al 96% (2 cubas distintas) durante 3 min
5. Se ejecutaron 2 cambios en alcohol al 70% (2 cubas distintas) durante 3 min
6. Se pasaron los tejidos a agua destilada durante 3 min
7. Hematoxilina de Harris (Anexo 9.13) 1min (debe de estar previamente filtrada)
8. Se lavaron con agua de la llave, colocando en una cuba metálica los porta laminillas con las laminillas y dejando que el goteo ocurriera en la esquina de la cuba metálica sin caer directamente sobre la laminilla, pero si generando un fluido constante de agua, esto se dejó a goteo durante 10 minutos.
9. Eosina durante 30 segundos.
10. Se deshidrató con concentraciones crecientes de alcohol etílico
11. Alcohol al 80% durante 2 min
12. Alcohol al 96% durante 2 min
13. Alcohol al 100% durante 5 min
14. Alcohol al 100% durante 5 min
15. Aclarar con xilol durante 5 minutos
16. Xilol 5 minutos mínimo, pero se podían dejar los tejidos en esta cuba de xilol hasta su montaje para evitar que se secan.
17. Montaje de la preparación: se colocó una gota de entellan (1.07961-0500 Merck) en la laminilla y sobre de ella desde un lateral se colocó el cubreobjetos y una vez que se escurriera sobre él la gota de entellan se dejó caer sobre el tejido, suavemente evitando la generación de burbujas.

Los resultados con Tinción HE se observan: Núcleos: Morados (basófilos). Citoplasma y colágena: Rosada (acidófilos)

9.19 Tinción Rojo Sirio

1. Las laminillas con tejido se colocaron en un porta-laminillas de vidrio que tuviera el tamaño adecuado para caber dentro de las cubas con las diferentes soluciones puestas en el tren de tinción.
2. Se desparafinizaron los tejidos pasándolos por 2 cubas de xilol, 7 min en cada una.

Se hidrataron con alcohol en concentraciones decrecientes hasta llegar a agua destilada.

3. Se realizaron 2 cambios de 3min en alcohol etílico al 100% (2 cubas distintas)
4. Se ejecutaron 2 cambios en alcohol etílico al 96% (2 cubas distintas) durante 3 min
5. Se ejecutaron 2 cambios en alcohol etílico al 70% (2 cubas distintas) durante 3 min
6. Se pasaron los tejidos a agua destilada durante 3 min
7. Se sacaron las laminillas del portaobjetos y se colocaron en la cámara húmeda: charola metálica con divisiones (podían ser tubos de vidrio colocados de manera paralela y que estuvieran a la misma altura), sobre estas divisiones se colocaron las laminillas dejando el tejido hacia arriba.
8. Se colocaron con pipeta de plástico gotas de Hematoxilina de Weigerts, las necesarias para cubrir por completo el tejido de la laminilla y se dejaron actuar durante 8 minutos.
9. Se ladearon las laminillas una por una en una sanita para retirar los restos de colorante
10. Se lavaron en cajas Coplin con agua destilada haciendo baños hasta retirar el exceso de colorante.
11. Se pasaron a caja Coplin con solución de PBS 1x durante 5 minutos
12. Se sacaron las laminillas del portaobjetos y colocarlas en la cámara húmeda: charola metálica con divisiones, sobre las que se colocaron las laminillas dejando el tejido hacia arriba.
13. Se colocaron con pipeta de plástico gotas de Rojo Sirio (Anexo 9.12), las necesarias para cubrir por completo el tejido de la laminilla y se dejó actuar durante 60 minutos.
14. Se hicieron lavados muy rápidos (2 segundos) en agua acidificada colocada en cajas Coplin
15. Inmediatamente después del agua acidificada se colocaron las laminillas en cajas Coplin con agua destilada, y se dejaron ahí hasta acabar con las laminillas restantes. Esto fue para frenar la reacción del agua acidificada que decolora el rojo
16. Se pasaron las laminillas al porta laminillas y se pasaron a la cuba de Alcohol etílico al 96%, 4 lavados

17. Alcohol etílico al 96%, 4 lavados
18. Alcohol etílico al 100% durante 5 min
19. Alcohol etílico al 100% durante 5 min
20. Aclarar con xilol durante 5 minutos
21. Xilol 5 minutos mínimo, pero se podín dejar los tejidos en esta cuba de xilol hasta su montaje para evitar que se secan.
22. Montaje de la preparación: se colocó una gota de entellan en la laminilla y sobre de ella desde un lateral se colocó el cubreobjetos y ya que se escurría sobre él la gota de entellan se dejaba caer sobre el tejido, suavemente evitando la generación de burbujas.



9.20 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con un índice de significancia de 0.05 aplicando el programa estadístico R para los análisis y GraphPad Prism 6.07 para las gráficas.

Lo primero que se realizó fue asegurar para cada prueba que el grupo de ratas de Lacto y Nuevo Lacto pertenecieran al mismo grupo.

1.- Se planteó la hipótesis de que hay igualdad de medias para ambos tratamientos ($H_0: \mu_{(Lacto)} = \mu_{(Nuevo Lacto)}$; $H_1: \mu_{(Lacto)} \neq \mu_{(Nuevo Lacto)}$)

2.- Se verificó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (H_0 : los valores siguen una distribución normal. H_1 : los valores no siguen una distribución normal).

3.- Se verificó si hay homocedasticidad mediante la prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)

4.- Se realizó el t-test para concluir la hipótesis (H_0 : igualdad de medias. H_1 : Un tratamiento tiene media diferente)

Una vez conociendo si se tomarían el grupo de lacto y nuevo lacto juntos, se unen en un grupo llamado Lactos, de lo contrario se retiró el grupo de NL dejando únicamente el grupo Lacto.

5.- Se planteó la hipótesis (H_0 : los valores siguen una distribución normal. H_1 : los valores no siguen una distribución normal).

6.- Se verificaron los supuestos de normalidad (mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov) y de homocedasticidad (Levene's test). El supuesto de independencia no se verificó debido a que todas las mediciones del procedimiento se realizaron de manera independiente.

7.- Se realizó la tabla ANOVA y se procedió a su interpretación ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H_1 : al menos hay un grupo diferente).

8.- Si hubiera alguno diferente, se utiliza el método de Fischer-LSD para conocer cuáles son los grupos estadísticamente iguales y cuáles son diferentes.

Anexos de la sección de resultados

9.21 Comparación de sacrificios

Debido a que se realizaron dos experimentos para el grupo de Lacto y Nuevo Lacto, donde se mantuvo todo igual (modelo experimental, rata, cepa, etc.), con excepción del momento en el que

se realizaron. Se debe hacer análisis estadísticos para comparar ambos grupos y poder concluir si pertenecen o no al mismo grupo. (ya que ambos tuvieron el mismo tratamiento de *Lactobacillus rhamnosus* silvestre)

9.21.1 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 1

Tabla 36 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 1

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.9156	0.9965	<p>$p(0.9156/0.9965) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones	0.2266		<p>$p(0.2266) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		T test	0.001639		<p>$p(0.001639) < \alpha (0.05)$, rechazo H0.</p> <p>Se rechaza la hipótesis nula, las medias de ambos tratamientos son diferentes con una confianza del 95%.</p>

Por lo tanto, NO se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente)

9.21.2 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 2

Tabla 37 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 2

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.9731	0.9706	<p>$p(0.9731/0.9706) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.4626		<p>$P(0.4626) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.09421		<p>$p(0.09421) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0. Hay igualdad de medias para ambos tratamientos con una confianza del 95%.</p>

Por lo tanto, Sí se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos

9.21.3 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 3

Tabla 38 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 3

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.9094	0.6654	P (0.9094/0.6654) > α (0.05), no rechazo H0. Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$ H1: Un tratamiento tiene varianza diferente		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)	0.2225		p (0.2225) > α (0.05), no rechazo H0. Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.
H0: igualdad de medias H1: Un tratamiento tiene media diferente		t-test	0.3028		p(0.3028) > α (0.05), no rechazo H0. Hay igualdad de medias para ambos tratamientos con una confianza del 95%.

Por lo tanto, Sí se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos

9.21.4 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 4

Tabla 39 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 4

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.9384	0.8243	<p>P (0.9384/0.8243) > α (0.05), no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones	0.1482		<p>p(0.1482) > α (0.05), no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>

H0: igualdad de medias H1: Un tratamiento tiene media diferente	T test	0.2784	$p(0.2784) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0. Hay igualdad de medias para ambos tratamientos con una confianza del 95%.
Por lo tanto, Sí se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos			

9.21.5 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 5

Tabla 40 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 5

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal. H1: los valores no siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.7738	0.815	$P (0.7738/0.815) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0. Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal
	Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.				
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$ H1: Un tratamiento tiene varianza diferente		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones	0.2136		$p(0.2136) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0. Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.

H0: igualdad de medias H1: Un tratamiento tiene media diferente	T test	0.905	p(0.905) > α (0.05), no rechazo H0. Hay igualdad de medias para ambos tratamientos con una confianza del 95%.
Por lo tanto, Sí se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos			

9.21.6 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 6

Tabla 41 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 6

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal. H1: los valores no siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.5415	0.9551	P (0.5415/0.9551) > α (0.05), no rechazo H0. Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					

<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>	<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones</p>	<p>0.2087</p>	<p>$P(0.2087) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>	<p>T test</p>	<p>0.8909</p>	<p>$p(0.8909) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0. Hay igualdad de medias para ambos tratamientos con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, Sí se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos</p>			

9.21.7 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 7

Tabla 42 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 7

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
	<p>H0: los valores siguen una distribución normal.</p> <p>H1: los valores no siguen una distribución normal.</p>	Kolmogorov-Smirnov	0.5299	0.8138	<p>$p(0.5299/0.8138) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal.</p>
<p>Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.</p>					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones	0.6945		<p>$p(0.6945) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		T test	0.8665		<p>$p(0.8665) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0. Hay igualdad de medias para ambos tratamientos con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, Sí se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos</p>					

9.21.8 Comparación de sacrificios para los pesos de la semana 8

Tabla 43 Comparación entre Lacto-NL para pesos de la semana 8

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.6328	0.989	<p>$p(0.6328/0.989) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
<p>Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.</p>					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.6093		<p>$p(0.6093) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		T test	0.3788		<p>$p(0.3788) > \alpha(0.05)$, no rechazo H0. Hay igualdad de medias para ambos tratamientos con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, Sí se pueden usar los datos del sacrificio 1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos</p>					

9.21.9 Comparación de sacrificios para los pesos de los hígados

Tabla 44 Comparación entre Lacto-NL para pesos de los hígados

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
	<p>H0: los valores siguen una distribución normal.</p> <p>H1: los valores no siguen una distribución normal.</p>	Kolmogorov-Smirnov	0.787	0.9995	<p>$p(0.787/0.9995) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones	0.1043		<p>$p(0.1043) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		T test	0.7716		<p>$p(0.7716) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>No se rechaza la hipótesis nula, las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente) en un nuevo grupo llamado Lactos.					

9.21.10 Comparación de sacrificios para ALT

Tabla 45 Comparación entre Lacto-NL para ALT

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
	<p>H0: los valores siguen una distribución normal.</p> <p>H1: los valores no siguen una distribución normal.</p>	Kolmogorov-Smirnov	0.6633	0.8282	<p>$p(0.6633/ 0.8282) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
<p>Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.</p>					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.8914		<p>$p(0.8914) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.5245		<p>$p(0.5245) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.</p>					

9.21.11 Comparación de sacrificios para AST

Tabla 46 Comparación entre Lacto-NL para AST

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.9747	0.9995	<p>$p(0.9747/ 0.9995) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.2964		<p>$p(0.2964) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.5309		<p>$p(0.5309) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.</p>					

9.21.12 Comparación de sacrificios para urea

Tabla 47 Comparación entre Lacto-NL para Urea

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
	<p>H0: los valores siguen una distribución normal.</p> <p>H1: los valores no siguen una distribución normal.</p>	Kolmogorov-Smirnov	0.9587	0.9374	<p>$p(0.9587/ 0.9374) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
<p>Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.</p>					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.5816		<p>$p(0.5816) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.9017		<p>$p(0.9017) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.</p>					

9.21.13 Comparación de sacrificios para Albúmina

Tabla 48 Comparación entre Lacto-NL para Albúmina

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.9315	0.9691	<p>$p(0.9315/ 0.9691) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)	0.6167		<p>$p(0.6167) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.003128		<p>$p(0.003128) < \alpha (0.05)$, se rechaza H0.</p> <p>Los tratamientos tienen medias diferentes con una confianza del 95%.</p>
Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.					

9.21.14 Comparación de sacrificios para Fosfatasa alcalina

Tabla 49 Comparación entre Lacto-NL para Fosfatasa alcalina

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.9181	0.8705	<p>$p(0.9181/ 0.8705) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.01059		<p>$p(0.01059) < \alpha (0.05)$, rechazo H0.</p> <p>Los tratamientos tienen varianzas diferentes, con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.2894		<p>$p(0.2894) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos</p>					

9.21.15 Comparación de sacrificios para colágena total en hígado

Tabla 50 Comparación entre Lacto-NL para colágena total en hígado

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
	<p>H0: los valores siguen una distribución normal.</p> <p>H1: los valores no siguen una distribución normal.</p>	Kolmogorov-Smirnov	0.6137	0.6659	<p>$p(0.6137/0.6659) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
<p>Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.</p>					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.9635		<p>$p(0.9635) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.1312		<p>$p(0.1312) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>No se rechaza la hipótesis nula, las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.</p>					

9.21.16 Comparación de sacrificios para colágena total en intestino

Tabla 51 Comparación entre Lacto-NL para colágena total en intestino

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.6449	0.8324	<p>$p(0.6449/0.8324) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
<p>Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.</p>					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		<p>Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)</p>	0.2059		<p>$p(0.2059) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Los tratamientos tienen varianzas iguales, con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.04389		<p>$p(0.04389) < \alpha (0.05)$, rechazo H0.</p> <p>Las medias de ambos tratamientos son diferentes con una confianza del 95%.</p>
<p>Por lo tanto, NO se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), se utilizará el de Lacto.</p>					

9.21.17 Comparación de sacrificios para Colágena tipo I en hígado

Tabla 52 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo I en hígado

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
	H0: los valores siguen una distribución normal. H1: los valores no siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.745	0.9997	p(0.745/0.9997) > α (0.05), no rechazo H0. Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$ H1: Un tratamiento tiene varianza diferente		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)	0.1746		p(0.1746) > α (0.05), no rechazo H0. Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.
H0: igualdad de medias H1: Un tratamiento tiene media diferente		T test	0.3296		p(0.3296) > α (0.05), no rechazo H0. No se rechaza la hipótesis nula, las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.
Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio 1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos					

9.21.18 Comparación de sacrificios para colágena tipo I en intestino

Tabla 53 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo I en intestino

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
	H0: los valores siguen una distribución normal. H1: los valores no siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.4489	0.9163	p(0.4489/0.9163) > α (0.05), no rechazo H0. Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$ H1: Un tratamiento tiene varianza diferente		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)	0.3039		p(0.3039) > α (0.05), no rechazo H0. Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.
H0: igualdad de medias H1: Un tratamiento tiene media diferente		t-test	0.899		p(0.899) > α (0.05), no rechazo H0. No se rechaza la hipótesis nula, las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.
Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.					

9.21.19 Comparación de sacrificios para Colágena tipo III en hígado

Tabla 54 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo III en hígado

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.8638	0.9997	<p>$p(0.8638/0.9997) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)	0.2412		<p>$p(0.2412) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.5819		<p>$p(0.5819) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>No se rechaza la hipótesis nula, las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.					

9.21.20 Comparación de sacrificios para Colágena tipo III en intestino

Tabla 55 Comparación entre Lacto-NL para colágena tipo III en intestino

Supuesto	Hipótesis	Prueba	Lacto	NL	Conclusiones
			Valor p		
Normalidad	H0: los valores siguen una distribución normal.	Kolmogorov-Smirnov	0.4406	0.6871	<p>$p(0.4406/0.6871) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Con una confianza del 95%, los valores siguen una distribución normal</p>
	H1: los valores no siguen una distribución normal.				
Habiendo comprobado normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, se procede a hacer el t-test verificando si hay homocedasticidad.					
Hipótesis		Prueba	Valor p		Conclusiones
<p>H0: igualdad de varianzas $\sigma^2 = \sigma^2$</p> <p>H1: Un tratamiento tiene varianza diferente</p>		Prueba de hipótesis para la varianza de dos poblaciones (F)	0.2353		<p>$p(0.2353) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula, las varianzas del peso de las ratas son iguales. Sí se cumple el supuesto de homocedasticidad con una confianza del 95%.</p>
<p>H0: igualdad de medias</p> <p>H1: Un tratamiento tiene media diferente</p>		t-test	0.8878		<p>$p(0.8878) > \alpha (0.05)$, no rechazo H0.</p> <p>No se rechaza la hipótesis nula, las medias de ambos tratamientos son iguales con una confianza del 95%.</p>
Por lo tanto, se pueden usar los datos del sacrificio 1 y del sacrificio 2 (Lacto y NL, respectivamente), en un nuevo grupo llamado Lactos.					

9.22 Análisis estadístico del peso semanal de las ratas

9.22.1 Tabla con los pesos semanales de las ratas

Tabla 56 Peso de las ratas semanalmente

GRUPO	PESO PROMEDIO (g)							
	SEMANA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Intacto								
Promedio	135.5	174.3	201.7	228.6	248.9	261.9	275.4	291.8
Desviación estándar	0.0	4.845	7.666	8.558	12.05	13.67	14.76	14.56
Ratas	3	3	3	3	3	3	3	3
1	135.5	183.8	200	223.5	273	248.6	258.4	282.2
2	135.5	168	215.7	245.3	237.2	247.8	263	272.8
3	135.5	171	189.3	217	236.5	289.2	304.8	320.4
Control + 4S								
Promedio	189.7	228	242.5	390.5	-	-	-	-
Desviación estándar	12.365	8.305	2.778	3.215	-	-	-	-
Ratas	4	3	3	3	0	0	0	0
1	195.1	218.5	239.3	388.2	0	0	0	0
2	180.6	233.7	244.3	394.2	0	0	0	0
3	178.4	231.9	243.9	389.2	0	0	0	0
4	204.5	-	-	-	0	0	0	0
Control + 8S								
Promedio	123.3	161.8	188.0	204.9	220.8	233.0	241.5	241.5
Desviación estándar	2.647	1.934	3.712	4.914	5.239	7.048	10.78	10.78
Ratas	5	5	4	4	5	4	3	3
1	126.1	166	195.6	210	214	213.8	246.6	262.8
2	127.1	155	185.8	214.6	204	247.5	220.8	226.2
3	123.8	161	191.8	192	229.2	237.1	257.1	267.3
4	113	165	178.6	203.1	232.5	233.6	-	-
5	126.7	162	-	-	224.4	-	-	-
Lacto + NL								
Promedio	175.5	187.4	197.0	203.8	207.8	219.4	224.1	223.9
Desviación estándar	10.02	8.737	8.915	9.989	7.839	7.738	8.409	10.70
Ratas	7	7	7	7	7	7	7	7
1	147	194.7	212.3	222.6	227.7	240.9	244	196.7
2	155.5	144.7	204.6	151.6	210.3	232.8	239	252.1
3	158.3	187	148.3	214	166	179.4	234	244
4	161.4	173	188.3	186.4	223.3	228.9	185.2	238.6
5	203.6	191.3	214	213.7	201.9	215.7	200.5	217

6	215.1	206.7	214.6	227.5	220	210	236.3	242.3
7	187.8	214.5	197	210.6	205.1	228.4	230	176.3
Berro								
Promedio	169.7	186.5	207.9	214.6	215.0	233.1	239.2	243.1
Desviación estándar	2.396	3.027	1.901	6.728	8.847	7.259	8.323	6.993
Ratas	4	4	4	4	3	3	3	3
1	164	192.3	208	202.6	232	227.9	255.8	257.1
2	167.4	190	212.7	232	202.2	247.4	231.4	236.8
3	173	178.6	207.6	205.5	210.9	223.9	230.3	235.5
4	174.2	185.2	203.4	218.3	-	-	-	-
Berro + Lacto								
Promedio	192.2	216.7	224.0	236.9	223.2	245.6	248.5	261.1
Desviación estándar	3.918	4.584	6.669	7.900	18.57	17.40	13.35	12.50
Ratas	3	3	3	3	3	2	2	2
1	194.6	207.5	237.3	229	227.5	228.2	235.1	273.6
2	197.4	221.4	216.2	229	253	263	261.8	248.6
3	184.5	221.1	218.6	252.7	189.1	-	-	-
Todos los grupos								
Promedio	161.0	182.6	200.6	228.5	220.0	233.9	240.8	245.5
Desviación estándar	28.5	29.1	26.5	61.5	22.6	22.7	25.9	32.2

ANOVA de los pesos semanales de las ratas

9.22.2. Semana 1

Identificar si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.1).

El análisis indica que NO pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se considera únicamente el grupo llamado Lacto.

9.22.2.1 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 1

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 57 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 1

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.3194 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.0912 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se cumplen para los pesos de la semana 1, por lo tanto, se puede proseguir a realizar la tabla ANOVA

9.22.2.2 Tabla ANOVA de los pesos de la semana 1

Analysis of Variance Table

Response: Peso

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	15573.8	3114.76	60.533	3.138e-10 ***
Residuals	17	874.7	51.46		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Imagen 10 ANOVA para los pesos de la semana 1

9.22.2.3 Interpretación de la tabla ANOVA de los pesos de la semana 1

Tabla 58 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 1

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	3.138×10^{-10}	Se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con peso diferente en la primera semana, con una confianza del 95%.

--	--	--

Como $3.138 \times 10^{-10} < 0.05$, se rechaza H_0 y existe al menos un tratamiento con peso diferente en la primera semana, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los pesos de las ratas en la primera semana no son constantes.

9.22.2.3.1 Método de Fisher-LSD para los pesos de la semana 1

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

```

$groups
      Peso groups
BerroLacto 192.1667  a
CuartaS    189.6500  a
Berro      169.6500  b
Lacto      155.5500  c
Intacto    135.5000  d
OchoS      123.3400  e
    
```

Imagen 11 Test Fisher-LSD pesos semana 1

Tabla 59 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 1

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{BL}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y 8S son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_L$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_L$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Lacto son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son diferentes
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son diferentes
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son diferentes
$H_0: \mu_L = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lacto y Berro son diferentes
$H_0: \mu_L = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lacto e intacto son diferentes
$H_0: \mu_L = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lacto y Control positivo 8 semanas son diferentes
$H_0: \mu_B = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Intacto son diferentes
$H_0: \mu_B = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Control positivo 8 semanas son diferentes
$H_0: \mu_{Int} = \mu_{8s}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son diferentes

Para los pesos de la primera semana, los tratamientos Berro-Lacto y 4S son los únicos estadísticamente iguales, con una confianza del 95%.

9.22.2.4 Gráfico de barras para los pesos de la semana 1

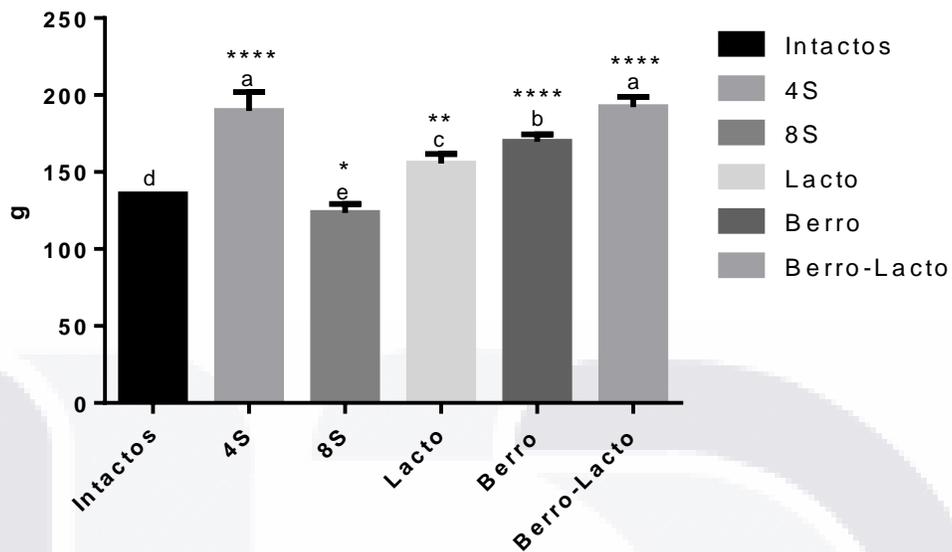


Figura 77 Pesos de la semana 1. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD y los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto (n=23)

9.22.3 Semana 2

Identificar si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.2).

El análisis indica que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unirán los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA Semana 2

9.22.3.1 Verificación de los supuestos para ANOVA de los pesos semanales para la semana 2

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 60 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 2

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.3194 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.2855 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

9.22.3.2 Tabla ANOVA Semana 2

```

Analysis of Variance Table

Response: Peso
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tx      5 11259.6  2251.92  11.272 3.715e-05 ***
Residuals 19  3795.9   199.78
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

Imagen 12 ANOVA para la semana 2

9.22.3.3 Interpretación ANOVA Semana 2

Tabla 61 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 2

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	3.715×10^{-10}	Se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con peso diferente en la segunda semana, con una confianza del 95%.

Como $3.715 \times 10^{-10} < 0.05$, se rechaza H_0 y existe al menos un tratamiento con peso diferente en la segunda semana, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los pesos de las ratas en la segunda semana no son constantes.

9.22.3.3.1 Método de Fisher-LSD

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

\$groups	Peso	groups
CuartaS	228.0333	a
BerroLacto	216.6667	a
Lactos	187.4143	b
Berro	186.5250	b
Intacto	174.2667	bc
OchoS	161.8000	c

Imagen 13 Test Fisher-LSD pesos semana 2

Tabla 62 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 2

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{BL}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y 8S son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_L$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_L$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Lacto son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son iguales.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son diferentes.
$H_0: \mu_L = \mu_B$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Lacto y Berro son iguales.
$H_0: \mu_L = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Lacto e intacto son iguales.
$H_0: \mu_L = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos y Control positivo 8 semanas son diferentes.
$H_0: \mu_B = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
$H_0: \mu_B = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Control positivo 8 semanas son diferentes
$H_0: \mu_{Int} = \mu_{8s}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son iguales.

Para los pesos de la segunda semana, los tratamientos Berro-Lacto y 4S son estadísticamente iguales; los tratamientos Lactos, Berro e Intacto son iguales; los tratamientos Intacto y control positivo de las 8 semanas son iguales, con una confianza del 95%.

9.22.3.4 Gráfico de barras semana 2

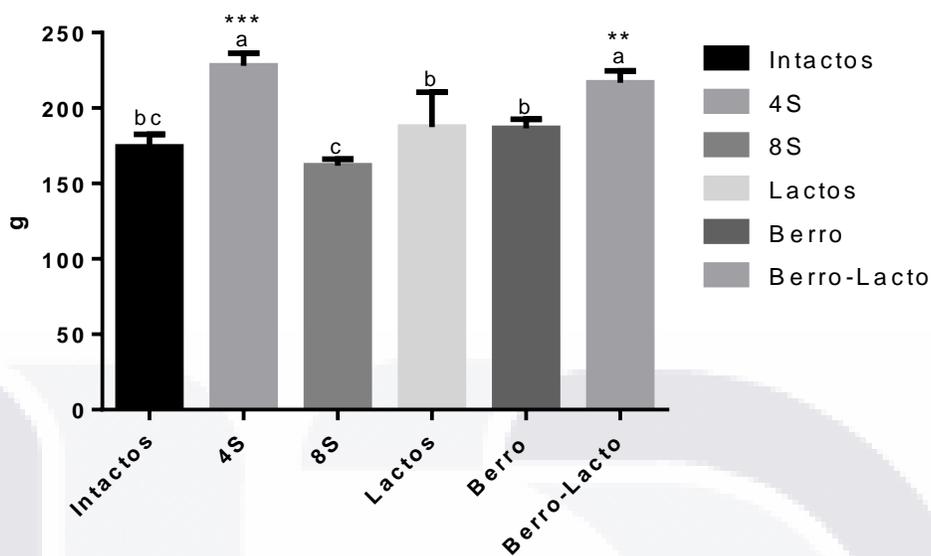


Figura 78 Pesos semana 2. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD y los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=25$)

9.22.4 Semana 3

Identificar si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo9.21.3).

El análisis indica que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unirán los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA Semana 3

9.22.4.1 Verificación de supuestos para ANOVA Semana 3

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.4707 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho por el método de Kolmogorov; los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.4851 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

Tabla 63 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 3

9.22.4.2 Tabla ANOVA Semana 3

```

Analysis of Variance Table

Response: Peso
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Tx       5 6889.5 1377.90   5.9311 0.002072 **
Residuals 18 4181.7  232.32
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

Imagen 14 ANOVA para los pesos de la semana 3

9.22.4.3 Interpretación ANOVA Semana 3

Tabla ANOVA para los pesos de la semana 3

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.002072	Se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con peso diferente en la tercera semana, con una confianza del 95%.

Tabla 64 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 3

Como $0.002072 < 0.05$, se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con peso diferente en la tercera semana, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los pesos de las ratas en la tercera semana no son constantes.

9.22.4.3.1 Método de Fisher-LSD

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

```

$groups
      Peso groups
CuartaS  242.5000    a
BerroLacto 224.0333  ab
Berro     207.9250  bc
Intacto   201.6667  bc
Lactos    197.0143   c
OchoS     187.9500   c
    
```

Imagen 15 Test Fisher-LSD pesos semana 3

Tabla 65 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 3

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H₀: $\mu_{4s}=\mu_{BL}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son iguales.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_{Int}$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_B$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_{8S}$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y 8S son diferentes.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_L$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_L$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Lacto son diferentes.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_B$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_{Int}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son iguales.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_{8S}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: $\mu_L=\mu_B$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lacto y Berro son iguales.
H₀: $\mu_L=\mu_{Int}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos e intacto son iguales.
H₀: $\mu_L=\mu_{8S}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos y Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: $\mu_B=\mu_{Int}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
H₀: $\mu_B=\mu_{8S}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro y Control positivo 8 semanas son iguales
H₀: $\mu_{Int}=\mu_{8s}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son iguales.

Los tratamientos Berro-Lacto y 4S son estadísticamente iguales; los tratamientos Berro-Lacto, Berro e Intacto son iguales; los tratamientos Berro, Intacto, Lactos y control positivo de las 8 semanas son iguales, con una confianza del 95%.

9.22.4.4 Gráfico de barras semana 3

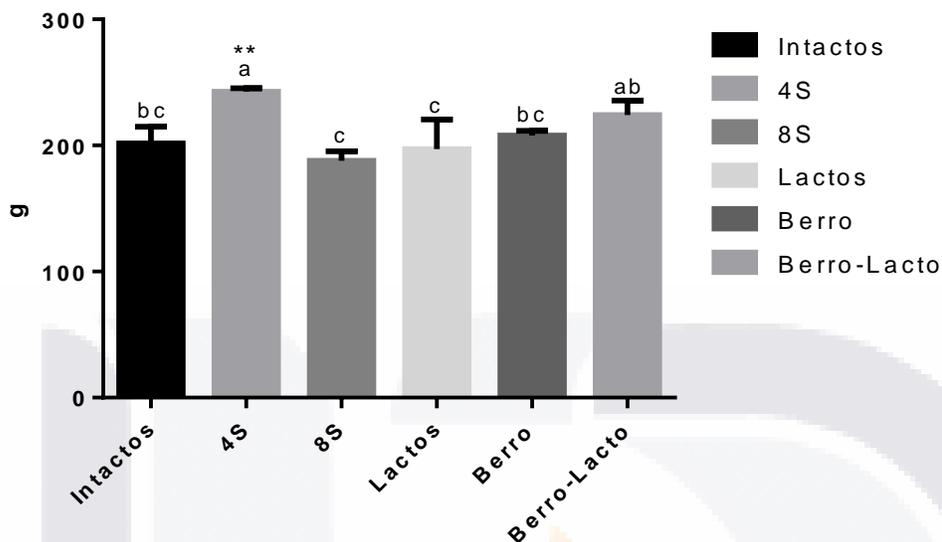


Figura 79 Pesos de la semana 3. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=24$)

9.22.5 Semana 4

Identificar si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.4).

El análisis indica que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unirán los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

En la cuarta semana ya no se considera al grupo de la 4s debido a que su sacrificio se efectuó iniciando la semana y los pesos se realizaron como de costumbre, hasta finales de esa semana.

ANOVA Semana 4

9.22.5.1 Verificación de supuestos para ANOVA Semana 4

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 66 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 4

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.8732 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho por el método de Kolmogorov; los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%

Homocedasticidad	<p>H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente</p>	0.8651 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%
------------------	---	---------------------------	--

9.22.5.2 Tabla ANOVA Semana 4

Analysis of Variance Table

Response: Peso

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	4	3273.6	818.40	2.243	0.11
Residuals	16	5837.9	364.87		

Imagen 16 ANOVA para los pesos de la semana 4

9.22.5.3 Interpretación ANOVA Semana 4

Tabla 67 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 4

Hipótesis	Valor p	Conclusión
<p>H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente</p>	0.11	No se rechaza H0 y los pesos de las ratas para todos los tratamientos son iguales en la cuarta semana, con una confianza del 95%.

Como $0.11 > 0.05$, no se rechaza H0 y los tratamientos tienen el mismo peso en la cuarta semana, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los pesos de las ratas en la cuarta semana son constantes.

9.22.5.4 Gráfico de barras semana 4

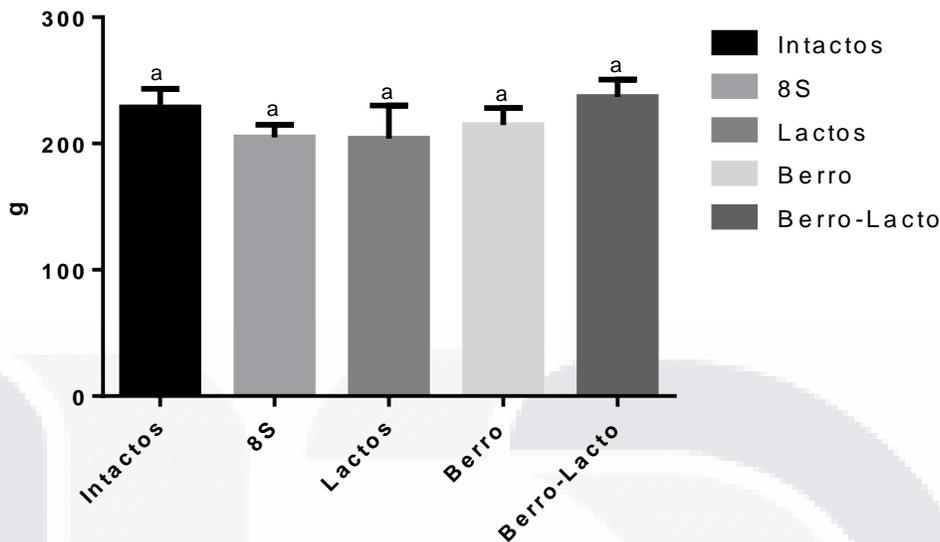


Figura 80 Pesos semana 4. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$)

9.22.6 Semana 5

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecían al mismo grupo (Anexo 9.21.5).

El análisis indicó que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA Semana 5

9.22.6.1 Verificación de supuestos para ANOVA Semana 5

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 68 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 5

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.9798 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho; los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.8029 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos,

			con una confianza del 95%
--	--	--	---------------------------

9.22.6.2 Tabla ANOVA Semana 5

Analysis of Variance Table

Response: Peso

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	4	3662.9	915.73	2.2403	0.1103
Residuals	16	6540.0	408.75		

Imagen 17 ANOVA para los pesos de la semana 5

9.22.6.3 Interpretación ANOVA Semana 5

Tabla 69 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 5

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.1103	No se rechaza H0 y los pesos de las ratas para todos los tratamientos son iguales en la quinta semana, con una confianza del 95%.

Como $0.1103 > 0.05$, no se rechaza H0 y los tratamientos tienen peso igual en la quinta semana, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los pesos de las ratas en la quinta semana son constantes.

9.22.6.4 Gráfico de barras semana 5

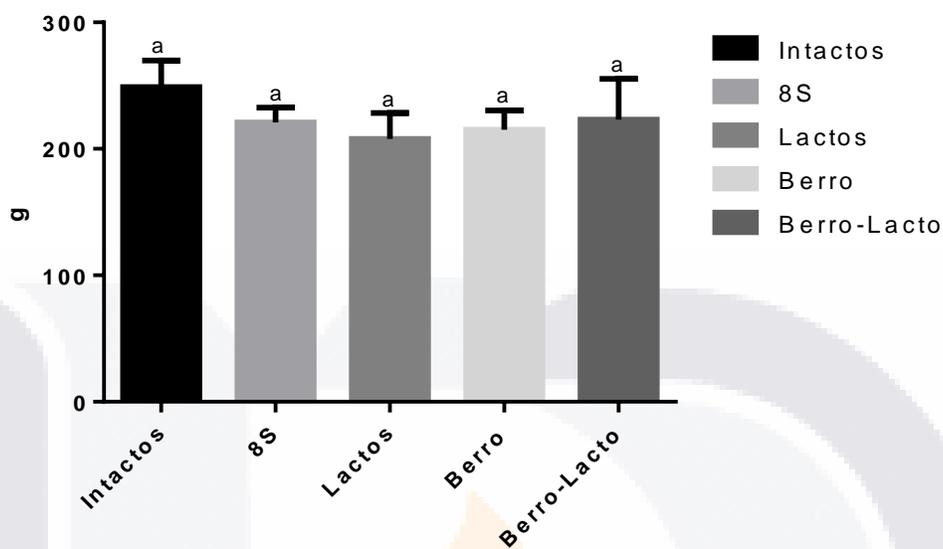


Figura 81 Pesos de la semana 5. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$)

9.22.7 Semana 6

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecían al mismo grupo (Anexo 9.21.6).

El análisis indicó que SÍ pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA Semana 6

9.22.7.1 Verificación de supuestos para ANOVA Semana 6

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 70 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 6

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.9041 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho; los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas	0.9425 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en

	$\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente		los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%
--	--	--	---

9.22.7.2 Tabla ANOVA Semana 6

Analysis of Variance Table

Response: Peso

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	4	4088.6	1022.14	2.7766	0.06868 .
Residuals	14	5153.8	368.13		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Imagen 18 ANOVA para los pesos de la semana 6

9.22.7.3 Interpretación ANOVA Semana 6

Tabla 71 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 6

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.06868	No se rechaza H0 y todos los pesos de las ratas para todos los tratamientos son iguales en la sexta semana, con una confianza del 95%.

Como $0.06868 > 0.05$, no se rechaza H0 y todos los pesos de la sexta semana son iguales, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los pesos de las ratas en la sexta semana son constantes.

9.22.7.4 Gráfico de barras semana 6

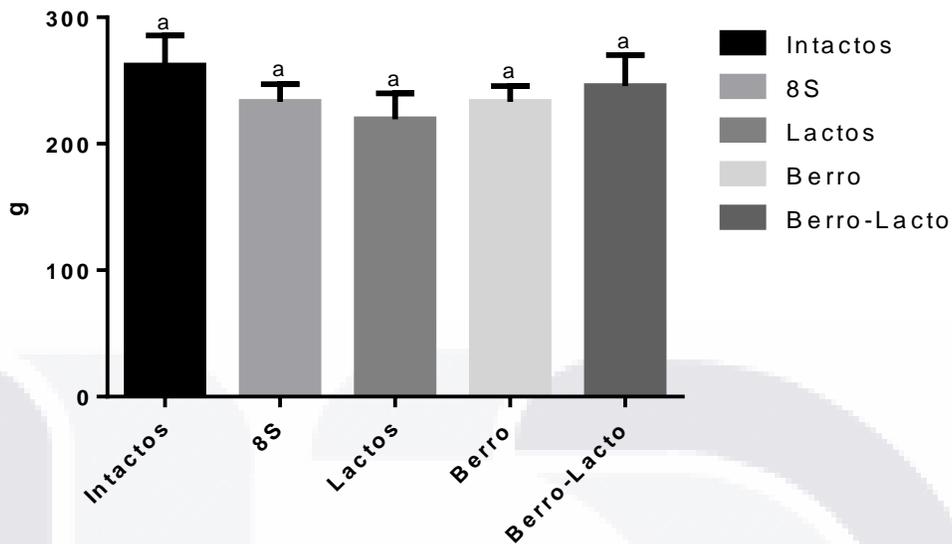


Figura 82 Pesos semana 6. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$)

9.22.8 Semana 7

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecían al mismo grupo (Anexo 9.21.7).

El análisis indicó que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA Semana 7

9.22.8.1 Verificación de supuestos para ANOVA Semana 7

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 72 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 7

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.6535 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho; los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$	0.9851 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los

	H1: Al menos una varianza diferente		tratamientos, con una confianza del 95%
--	-------------------------------------	--	---

9.22.8.2 Tabla ANOVA Semana 7

Analysis of Variance Table

Response: Peso

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	4	5660.2	1415.05	3.201	0.04904 *
Residuals	13	5746.9	442.07		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Imagen 19 Imagen 1 ANOVA para los pesos de la semana 7

9.22.8.3 Interpretación ANOVA Semana 7

Tabla 73 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 7

Hipótesis	Valor p	Conclusión
<p>H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$</p> <p>H1: al menos hay un grupo con peso diferente</p>	0.04904	Se rechaza H0 y al menos un peso de la séptima semana es diferente, con una confianza del 95%.

Como $0.04904 < 0.05$, se rechaza H0 y dentro de los pesos de la séptima semana, al menos un grupo es diferente, no son constantes, con una confianza del 95%.

9.22.8.3.1 Método de Fisher-LSD

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

\$groups	Peso groups	
Intacto	275.4000	a
BerroLacto	248.4500	ab
OchoS	241.5000	ab
Berro	239.1667	ab
Lactos	224.1429	b

Imagen 20 Test Fisher-LSD pesos semana 7

Tabla 74 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 7

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H₀: μ_{BL}=μ_L	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son iguales.
H₀: μ_{BL}=μ_B	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
H₀: μ_{BL}=μ_{Int}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son iguales.
H₀: μ_{BL}=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: μ_L=μ_B	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos y Berro son iguales.
H₀: μ_L=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos e intacto son diferentes.
H₀: μ_L=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos y Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: μ_B=μ_{Int}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
H₀: μ_B=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro y Control positivo 8 semanas son iguales
H₀: μ_{Int}=μ_{8s}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son iguales.

Todos los tratamientos son estadísticamente iguales, excepto por el Intacto y Lactos que son diferentes, con una confianza del 95%. Además, los pesos se comportan igual a los de la sexta semana.

9.22.8.4 Gráfico de barras semana 7

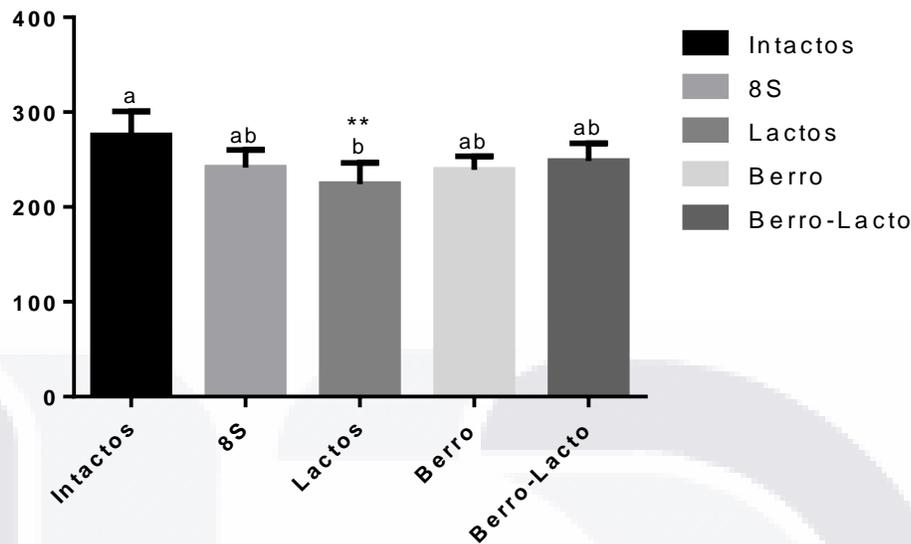


Figura 83 Pesos semana 7. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media ± DS. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 para todos los tratamientos comparados con el intacto (n=18)

9.22.9 Semana 8

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecían al mismo grupo (Anexo 9.21.8).

El análisis indicó que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA Semana 8

9.22.9.1 Verificación de supuestos para ANOVA Semana 8

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. (α=0.05).

Tabla 75 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de la semana 8

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.461 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho; los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$	0.8741 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los

	H1: Al menos una varianza diferente		tratamientos, con una confianza del 95%
--	-------------------------------------	--	---

9.22.9.2 Tabla ANOVA Semana 8

Analysis of Variance Table

```

Response: Peso
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tx         4 10289.7  2572.43   4.3428 0.01898 *
Residuals 13  7700.5   592.35
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

Imagen 21 ANOVA para los pesos de la semana 8

9.22.9.3 Interpretación ANOVA Semana 8

Tabla 76 Interpretación ANOVA para los pesos de la semana 8

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.01898	Se rechaza H0 y al menos un peso de la octava semana es diferente, con una confianza del 95%.

Como $0.01898 < 0.05$, se rechaza H0 y dentro de los pesos de la octava semana, al menos un grupo es diferente, no son constantes, con una confianza del 95%.

9.22.9.3.1 Método de Fisher-LSD

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

```

$groups
          Peso groups
Intacto   291.8000    a
BerroLacto 261.1000  ab
OchoS     252.1000  ab
Berro     243.1333    b
Lactos    223.8571    b
    
```

Imagen 22 Test Fisher-LSD pesos semana 8

Tabla 77 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos semana 8

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
$H_0: \mu_{BL}=\mu_L$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son iguales.
$H_0: \mu_{BL}=\mu_B$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
$H_0: \mu_{BL}=\mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son iguales.
$H_0: \mu_{BL}=\mu_{8S}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales.
$H_0: \mu_L=\mu_B$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos y Berro son iguales.
$H_0: \mu_L=\mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos e Intacto son diferentes.
$H_0: \mu_L=\mu_{8S}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos y Control positivo 8 semanas son iguales.
$H_0: \mu_B=\mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Intacto son diferentes.
$H_0: \mu_B=\mu_{8S}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro y Control positivo 8 semanas son iguales
$H_0: \mu_{Int}=\mu_{8s}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son iguales.

El tratamiento de intactos es igual al de berro-lacto y 8S, pero diferente a todos los demás. Los tratamientos de Berro-lacto, 8S, Berro y Lactos son iguales entre sí, con una confianza del 95%.

9.22.9.4 Gráfico de barras semana 8

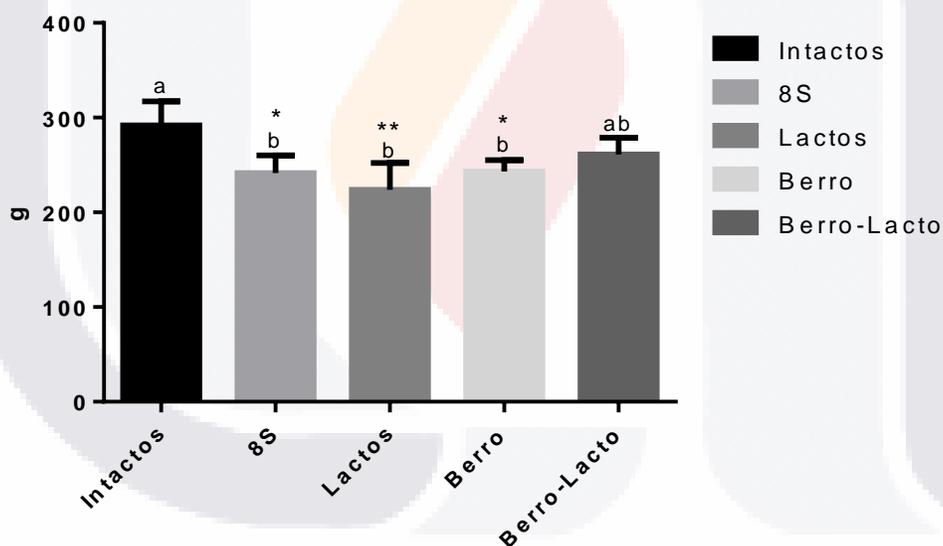


Figura 84 Pesos semana 8. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=18$).

9.22.10 Todas las semanas

De semana 1-3 se estabilizan, comienzan a homogeneizarse los pesos, ya todos son iguales en la cuarta, quinta y sexta, y partir de la séptima semana comienzan a separarse de nuevo, con un grupo diferente tanto en la séptima como en la octava semana. A partir de la quinta semana y hasta la octava, el grupo intacto fue el de mayor peso. El grupo de Lactos fue el de menor peso desde el inicio de su tratamiento, a partir de la cuarta a la octava semana. En la última semana, el tratamiento de mayor peso, seguido de los intactos fue el de Berro-Lacto.

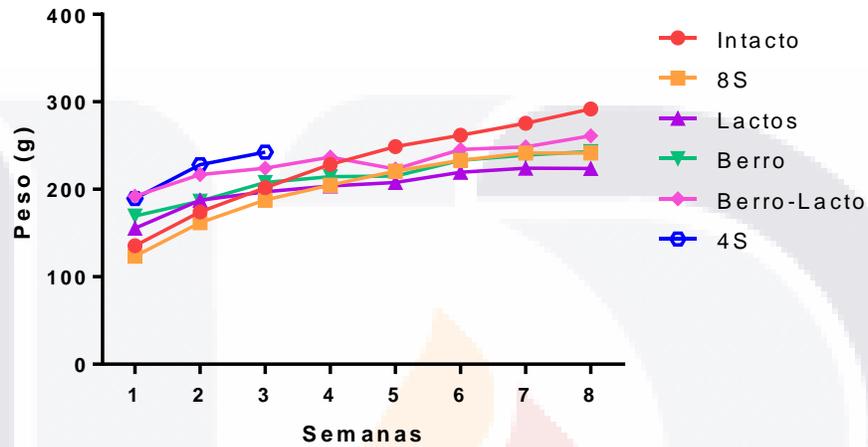


Figura 85 Cinética de los pesos de las ratas durante las 8 semanas

9.23 Análisis estadístico de los pesos de los hígados

9.23.1 Tabla de los valores con los pesos de los hígados

Tabla 78 Pesos de los hígados

GRUPO	Abreviación del grupo	Peso de hígado (g)	Promedio de peso de los hígados (g) ± desviación estándar
Intacto	I1	11.94445	11.335±0.555
	I2	11.20085	
	I3	10.85985	
Control positivo 4S	4S1	13.69235	12.437±1.126
	4S2	11.51625	
	4S3	12.10355	
Control positivo 8S	8S1	13.70765	12.803±1.019
	8S2	13.00265	
	8S3	11.69965	
Berro	B1	12.51575	12.172±0.414
	B2	11.71195	
	B3	12.28875	
Lactos	L1	10.07185	10.497±1.319
	L2	11.00745	
	L3	10.05035	
	L4	11.43085	
	L5	8.265	
	L6	10.19	
	L7	12.46	
Berro Lacto	BL 1	13.76	13.245±0.728
	BL 2	12.73	
Todos los grupos			11.724±1.375

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

9.23.2 Verificación de supuestos

Tabla 79 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de los pesos de los hígados

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.7336 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas	0.7661 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los

	$\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente		pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%
--	--	--	---

9.23.3 Tabla ANOVA para pesos de los hígados
 Analysis of Variance Table

```

Response: Liver
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tx      5  21.252   4.2504   3.8542 0.01908 *
Residuals 15  16.542   1.1028
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

Imagen 23 ANOVA para pesos de los hígados

9.23.4 Interpretación del ANOVA

Tabla 80 Interpretación ANOVA para los pesos de los hígados

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.01908	Se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con peso de hígado diferente, con una confianza del 95%.

Como $0.01908 < 0.05$, se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con peso de hígado diferente, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los pesos de los hígados de las ratas no son constantes.

9.23.5 Método de Fisher-LSD para pesos de los hígados

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

```

$groups
      Liver groups
BerroLacto 13.24500  a
OchoS      12.80332  a
CuartaS    12.43738  a
Berro      12.17215  a
Intacto    11.33505  ab
Lactos     10.49650  b
    
```

Imagen 24 Test Fisher-LSD pesos de los hígados

Tabla 81 Interpretación del método de Fisher-LSD para pesos de los hígados

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{BL}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S e Intacto son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_B$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{8S}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y 8S son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_L$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_L$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_B$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto e Intacto son iguales.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{8S}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales.
$H_0: \mu_L = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos y Berro son diferentes.
$H_0: \mu_L = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos e Intacto son iguales.
$H_0: \mu_L = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lacto y Control positivo 8 semanas son diferentes.
$H_0: \mu_B = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
$H_0: \mu_B = \mu_{8S}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Control positivo 8 semanas son iguales.
$H_0: \mu_{Int} = \mu_{8s}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son iguales.

El tratamiento de intactos es igual al de Lactos pero diferente a todos los demás. Los tratamientos Berro-Lacto, Berro, Lactos, Control de ocho semanas, cuarta semana, e intactos son iguales entre sí, con una confianza del 95%.

El hígado de menor peso fue el del tratamiento de los Lactos, seguido del grupo Intacto. Los demás hígados se encontraban por encima del peso de los intactos. BL, B, 4S, 8S son mayores que el de actos. lo cual puede indicar la inflamación presentada por el hígado en todos los grupos con excepción del grupo Lactos e Intacto, cuyo peso es el menor y estadísticamente diferente al de los demás tratamientos e igual al Intacto.

9.23.6 Gráficos de peso de los hígados

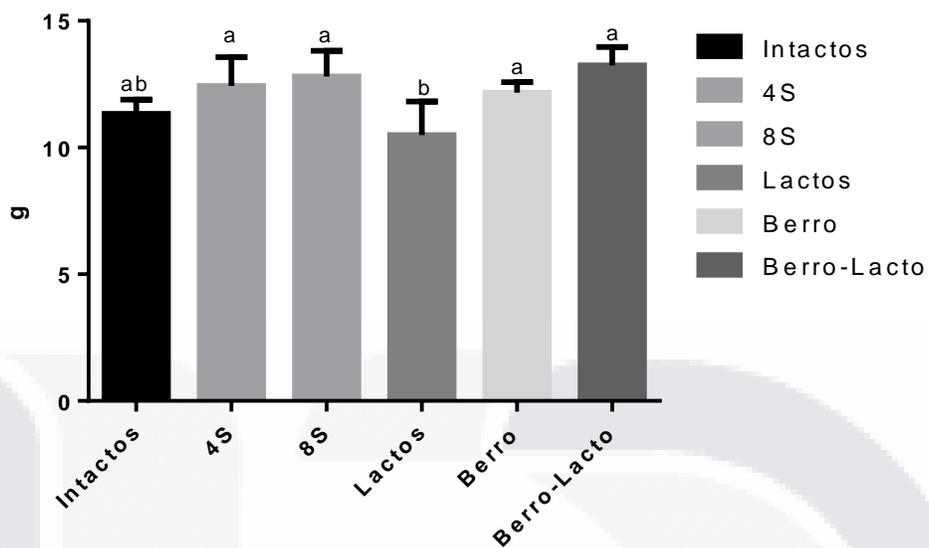


Figura 86 Pesos de los hígados de las ratas. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto (n=21)

9.24 Microfotografías para análisis histopatológico

Se muestran las imágenes tomadas al microscopio de cada grupo, y cada grupo a su vez se divide en sus respectivas ratas. Cada tabla contiene tres aumentos diferentes (5X, 10X y 20X) para los tejidos de hígado e intestino y sus dos tinciones respectivas, Hematoxilina-Eosina (HE) y Rojo Sirio (RS).

9.24.1 Intactas

Tabla 82 Imágenes al microscopio de Intacta 1

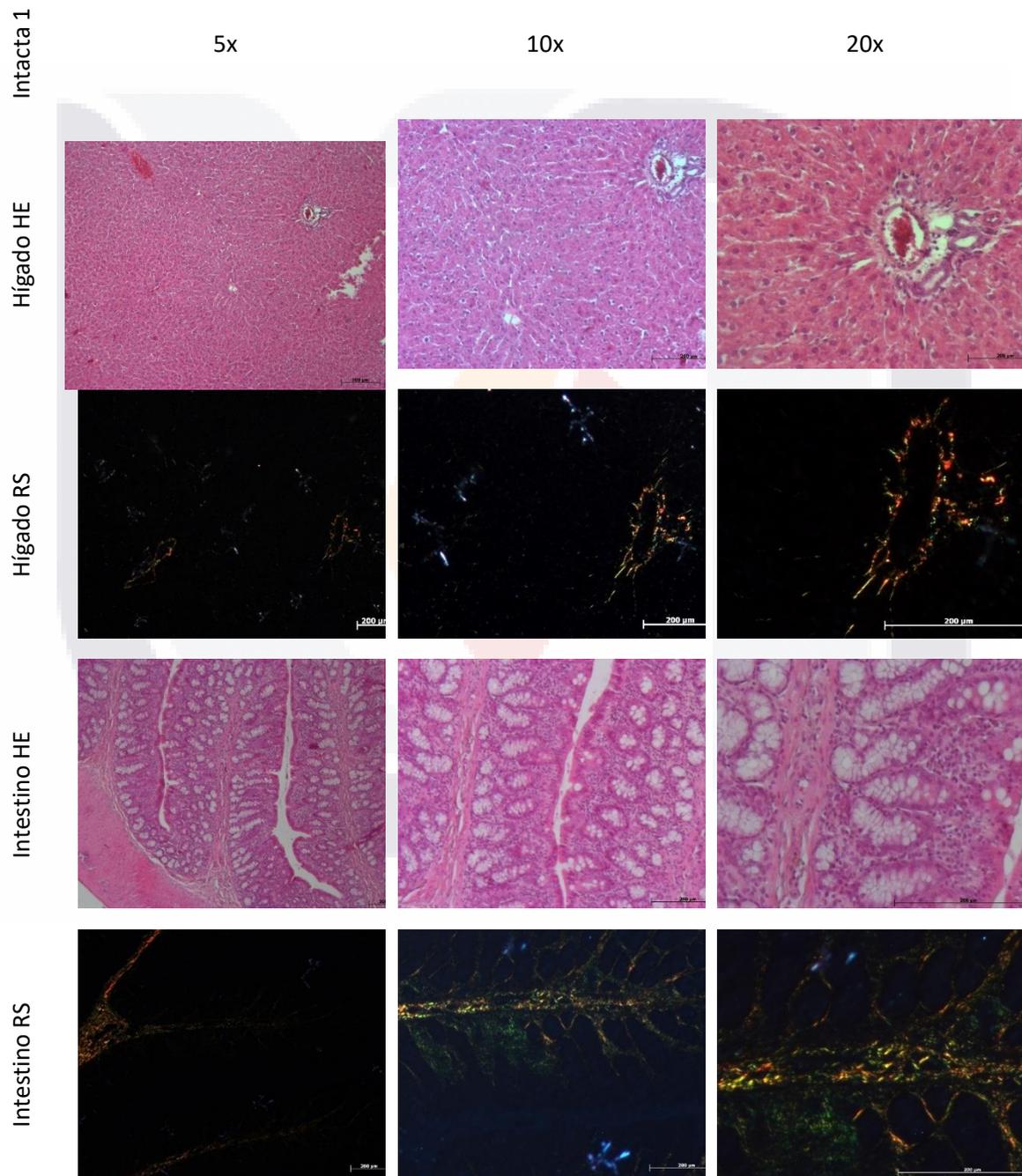


Tabla 83 Imágenes al microscopio de Intacta 2

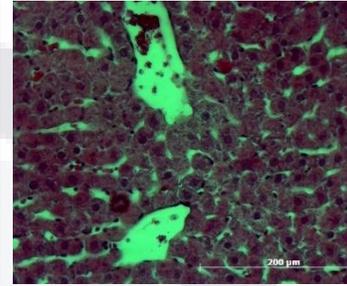
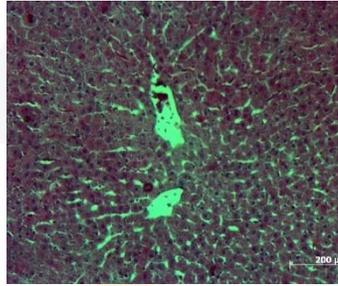
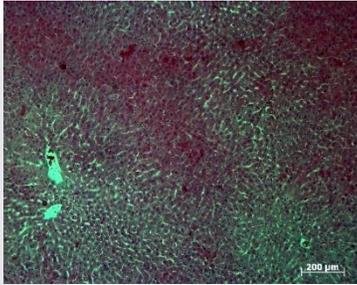
Intact
a 2

5x

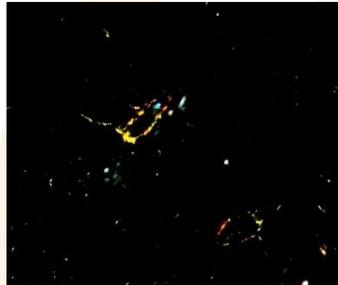
10x

20x

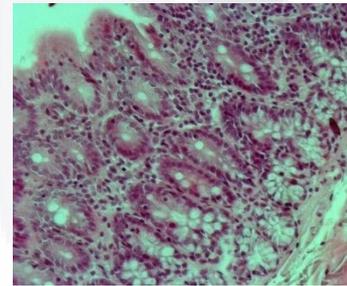
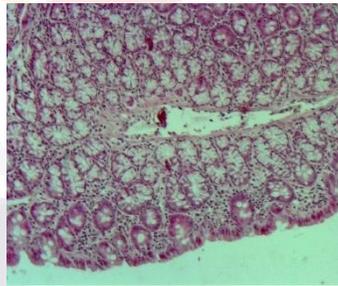
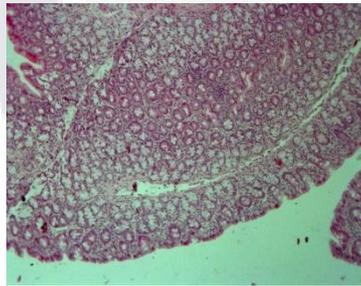
Hígado HE



Hígado RS



Intestino HE



Intestino RS

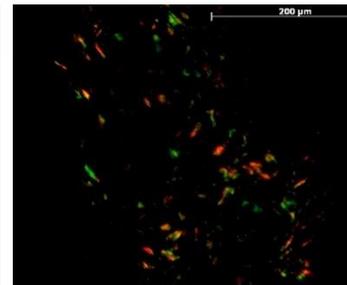
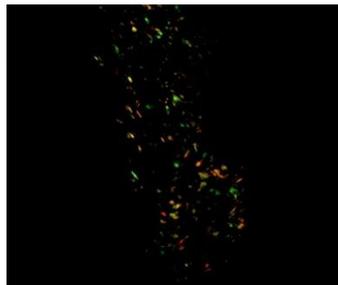
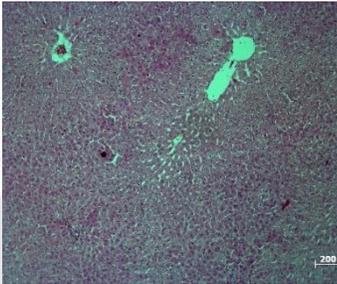
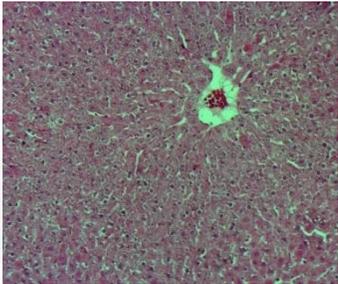
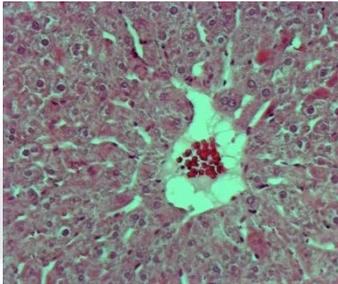
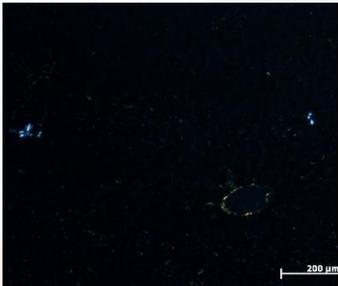
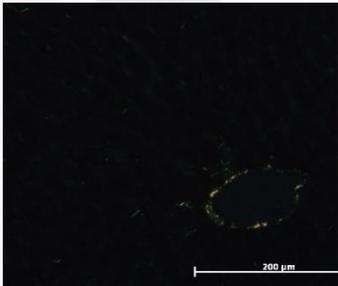
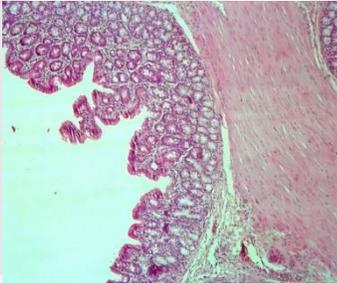
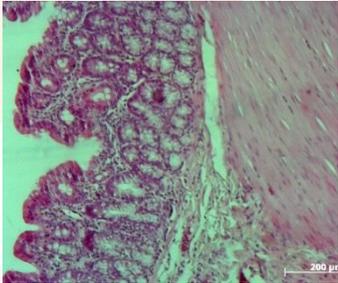
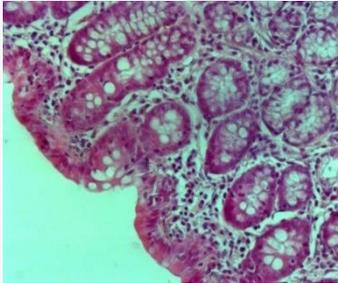
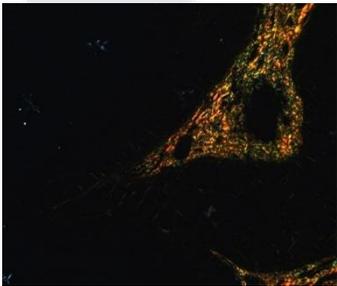
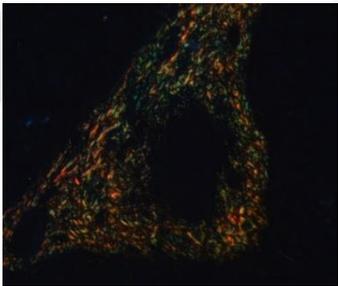
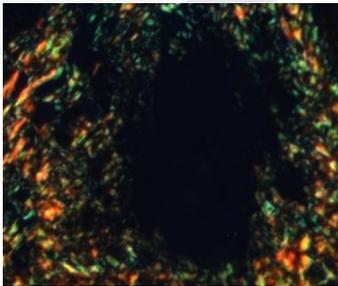


Tabla 84 Imágenes al microscopio de Intacta 3

	Intacta 3	5x	10x	20x
Hígado HE				
Hígado RS				
Intestino HE				
Intestino RS				

9.24.2 4S

Tabla 85 Imágenes al microscopio de 4S 1

	4S1	5x	10x	20x
Hígado HE				
Hígado RS				
Intestino HE				
Intestino RS				

Tabla 86 Imágenes al microscopio de 4S 2

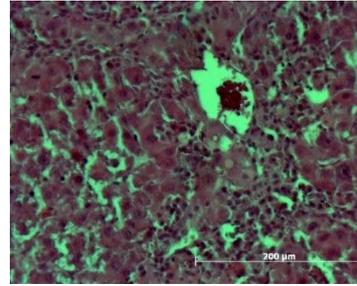
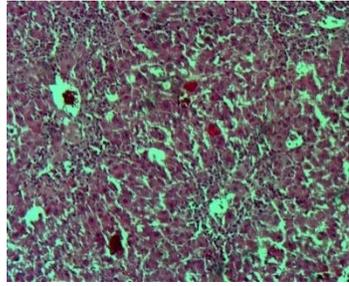
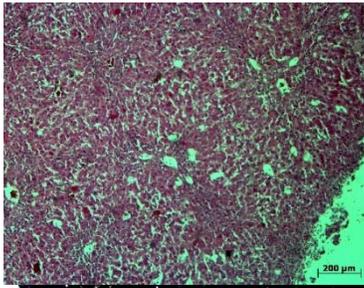
4S2

5x

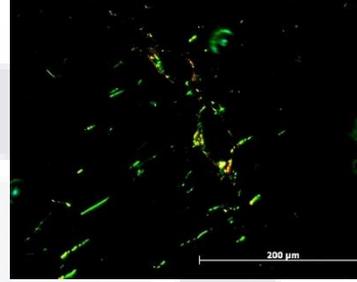
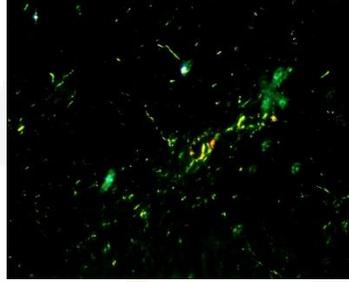
10x

20x

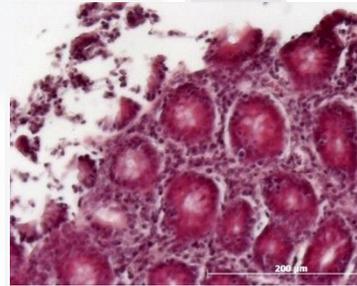
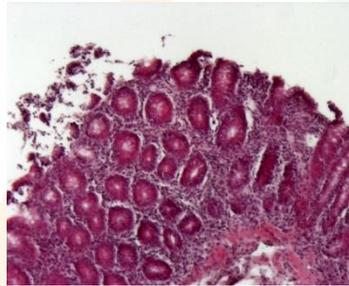
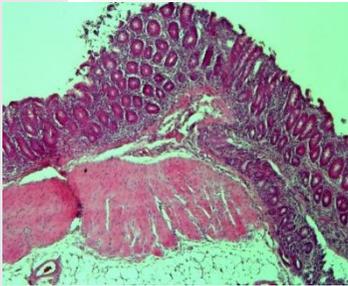
Hígado HE



Hígado RS



Intestino HE



Intestino RS

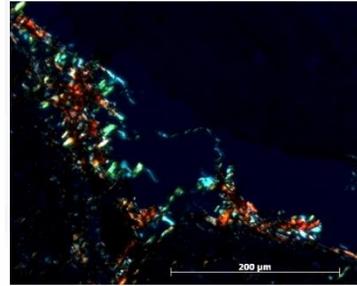
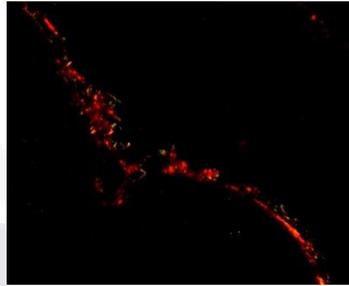
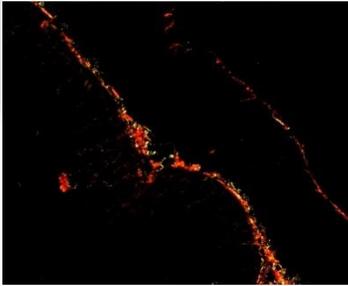
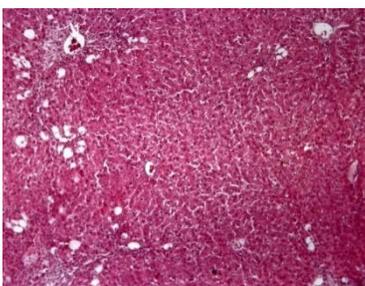
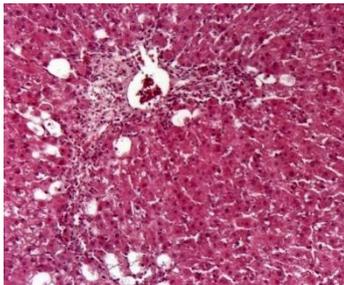
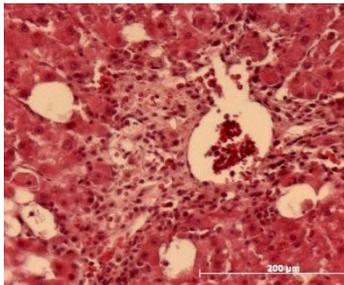
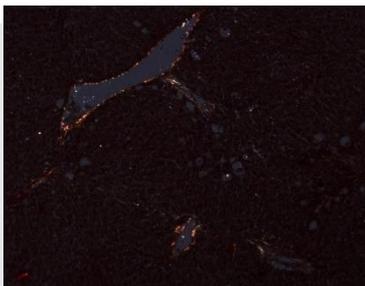
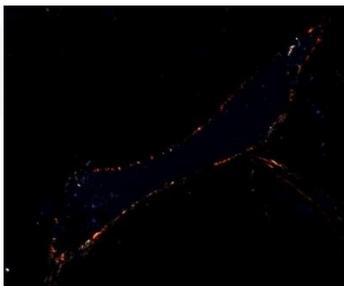
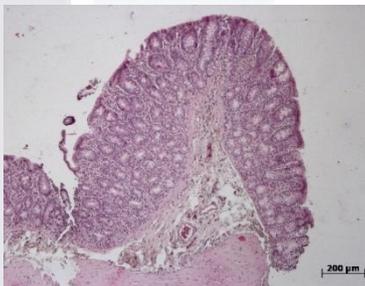
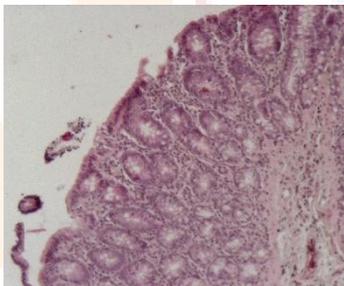
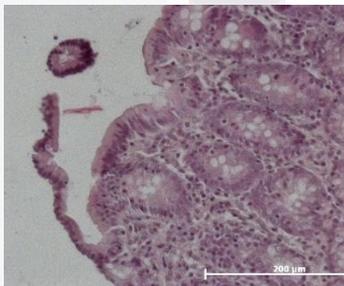
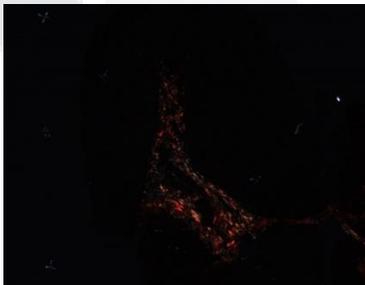
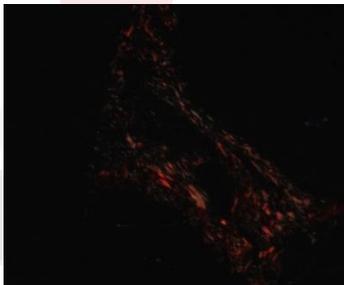
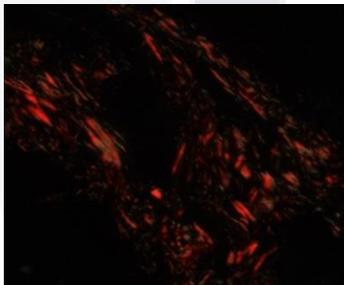


Tabla 87 Imágenes al microscopio de 4S 3

	4S3	5x	10x	20x
Hígado HE				
Hígado RS				
Intestino HE				
Intestino RS				

9.24.3 Control Positivo 8 Semanas

Tabla 88 Imágenes al microscopio de Control positivo 8S 1

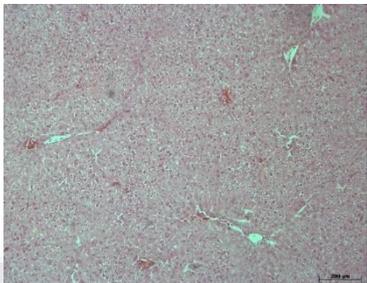
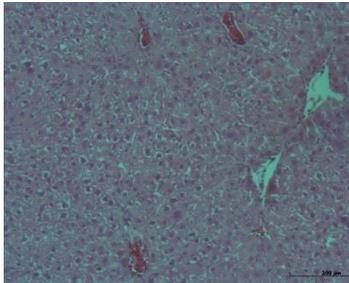
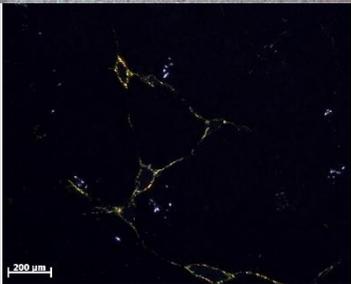
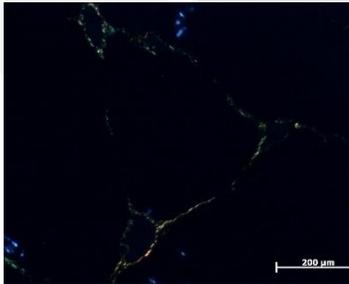
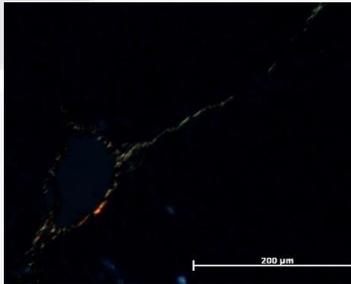
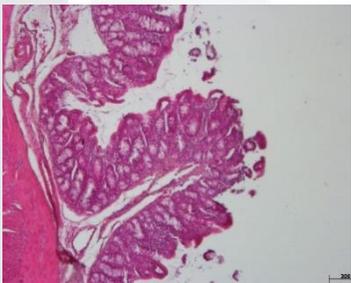
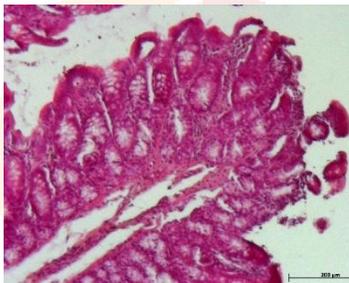
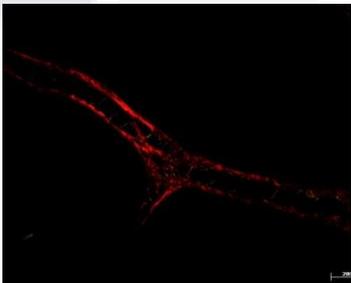
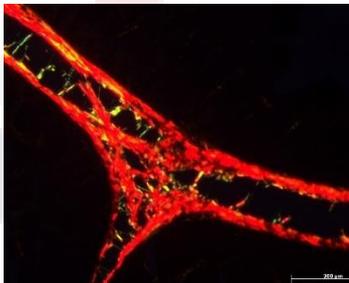
	8S 1	5x	10x	20x
Hígado HE				
Hígado RS				
Intestino HE				
Intestino RS				

Tabla 89 Imágenes al microscopio de Control positivo 8S 2

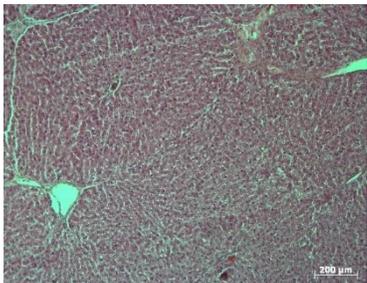
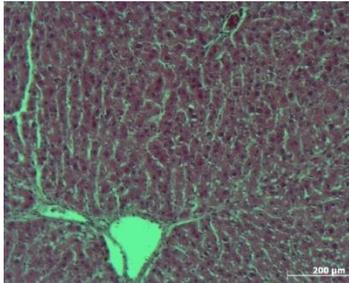
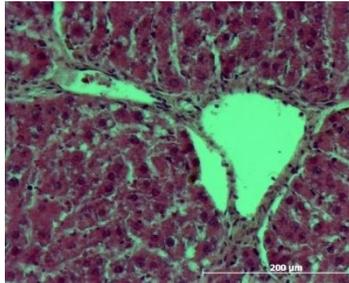
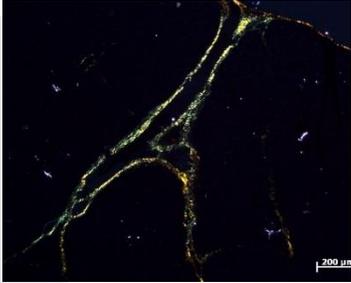
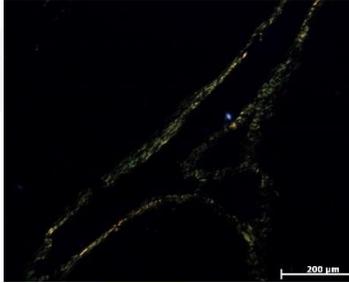
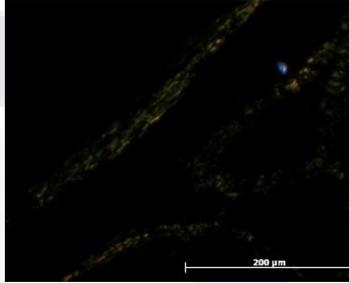
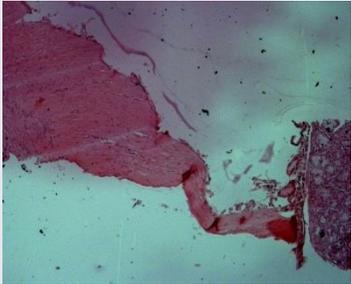
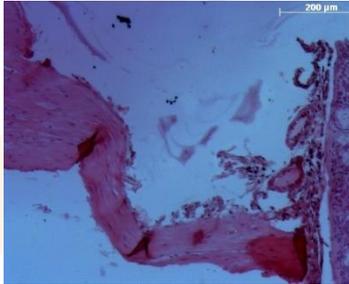
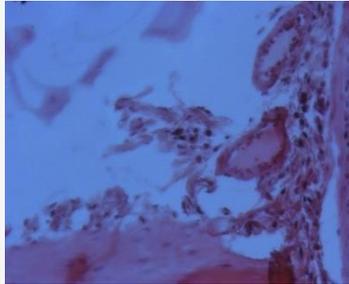
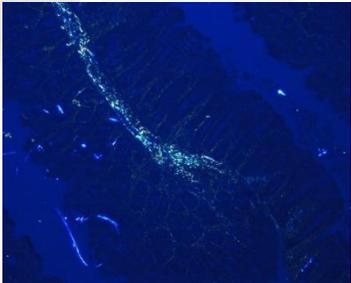
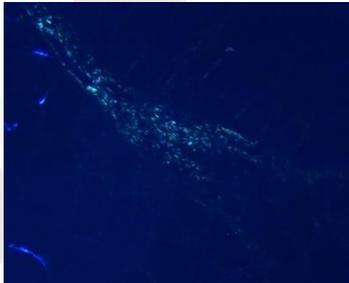
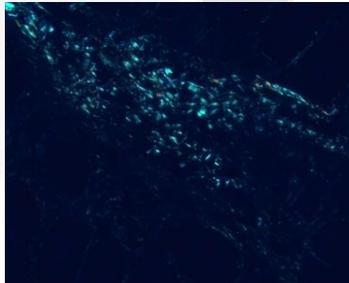
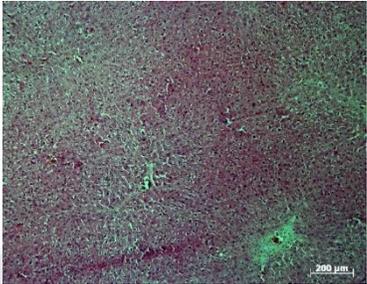
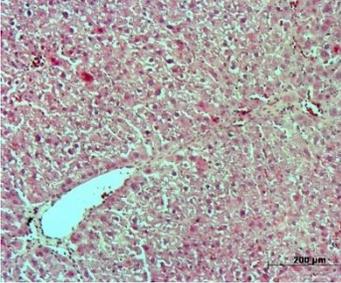
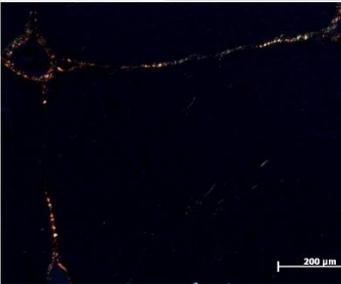
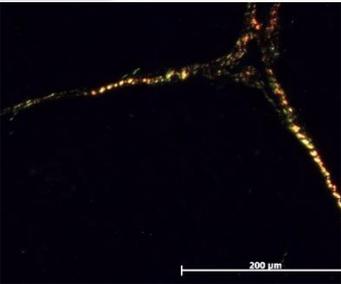
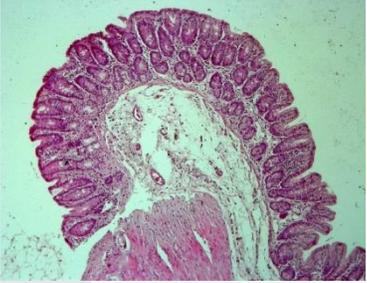
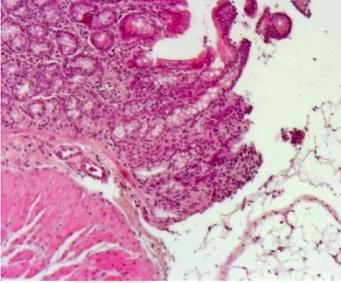
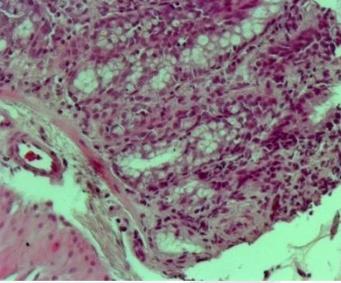
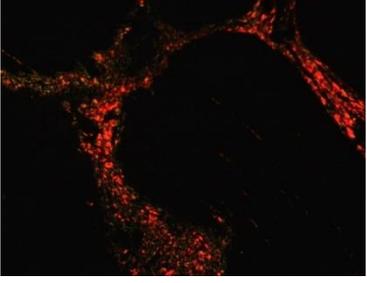
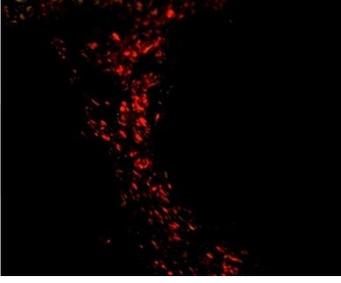
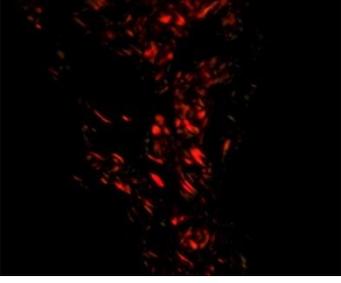
	8S 2	5x	10x	20x
Hígado HE				
Hígado RS				
Intestino HE				
Intestino RS				

Tabla 90 Imágenes al microscopio de Control positivo 8S 3

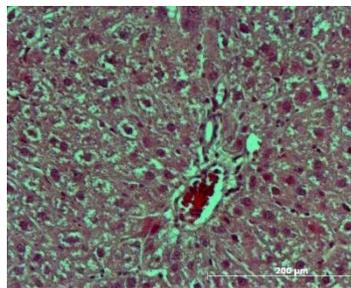
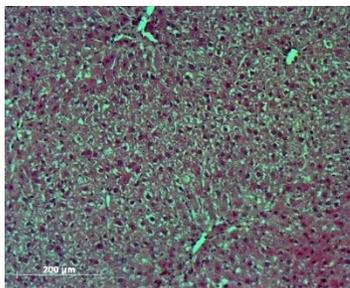
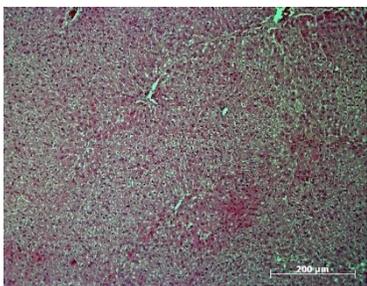
	8S 3	5x	10x	20x
Hígado HE				
Hígado RS				
Intestino HE				
Intestino RS				

9.24.4 Lacto

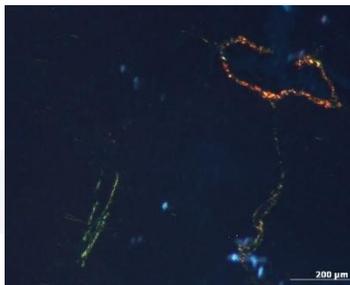
Tabla 91 Imágenes al microscopio de Lacto 1

L1	5x	10x	20x
----	----	-----	-----

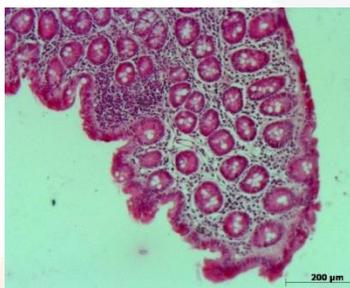
Hígado HE



Hígado RS



Intestino HE



Intestino RS

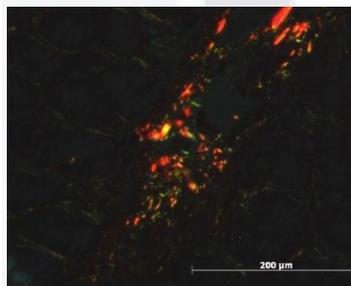
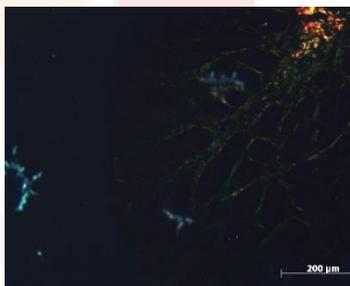
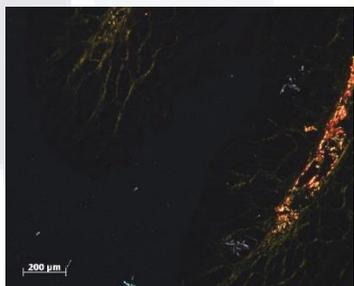


Tabla 92 Imágenes al microscopio de Lacto 2

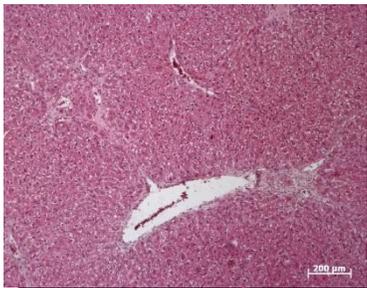
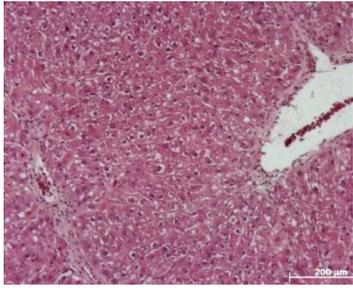
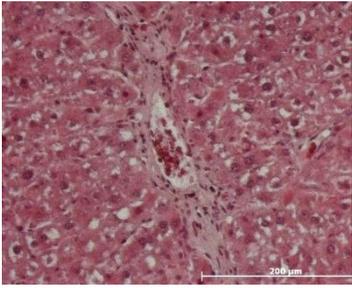
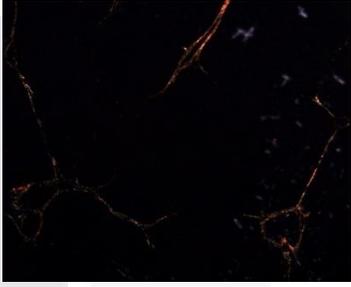
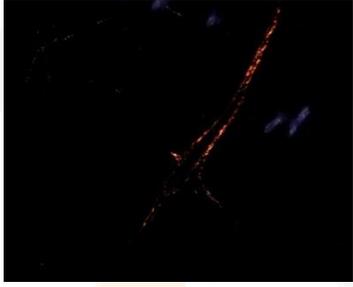
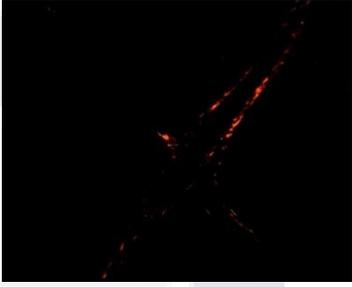
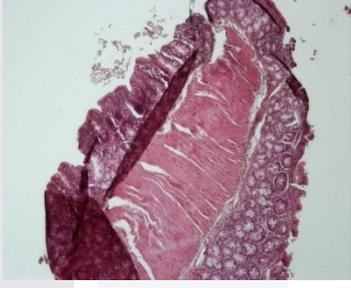
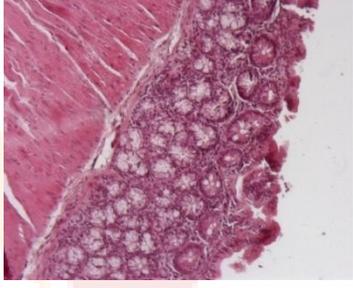
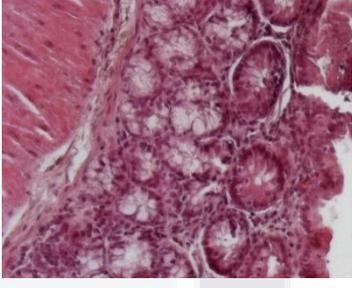
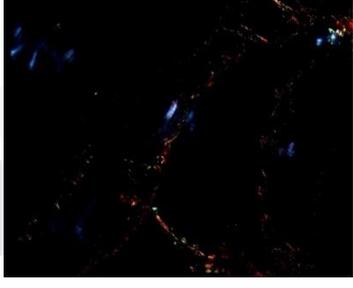
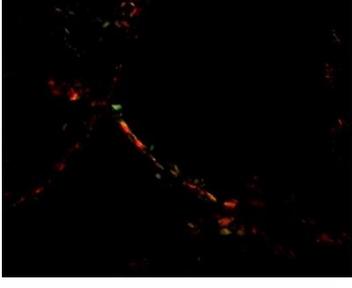
L2	5x	10x	20x
Hígado HE			
Hígado RS			
Intestino HE			
Intestino RS			

Tabla 93 Imágenes al microscopio de Lacto 3

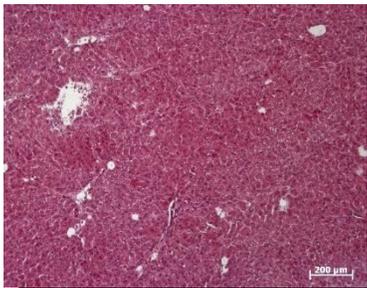
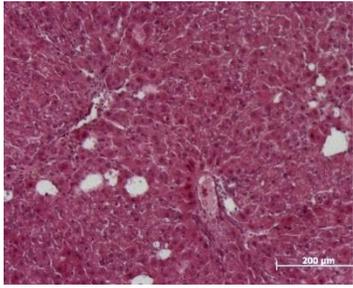
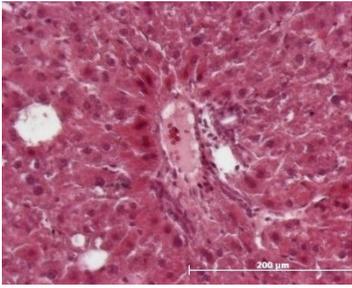
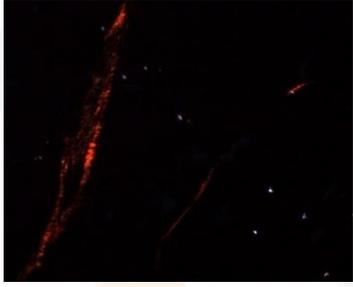
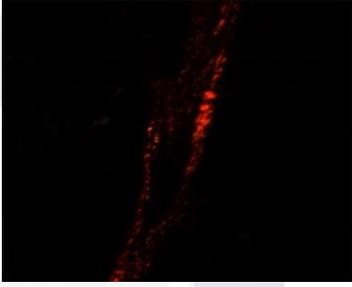
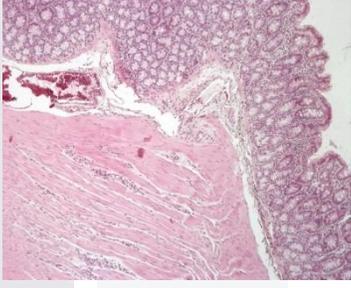
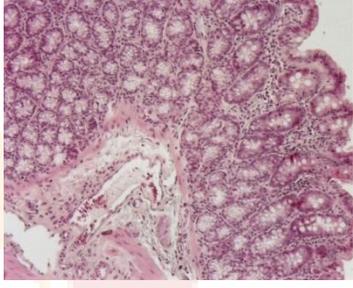
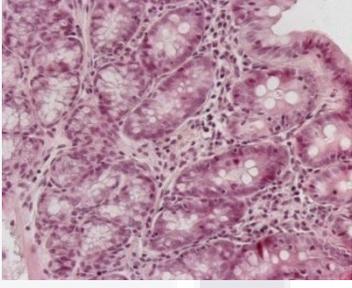
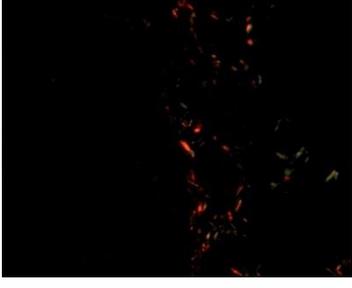
L3	5x	10x	20x
Hígado HE			
Hígado RS			
Intestino HE			
Intestino RS			

Tabla 94 Imágenes al microscopio de Lacto 4

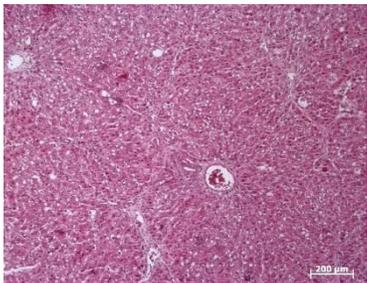
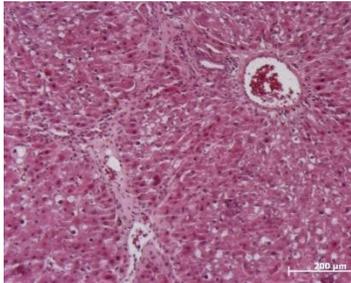
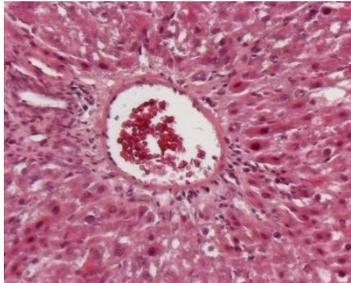
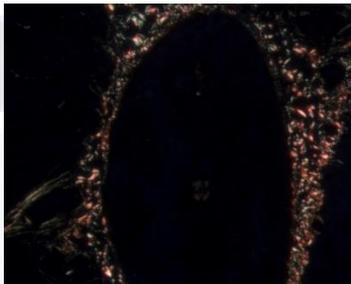
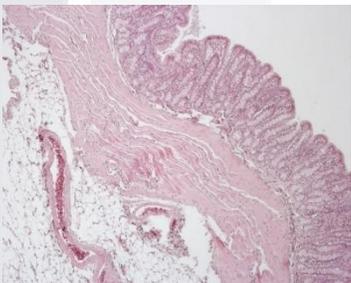
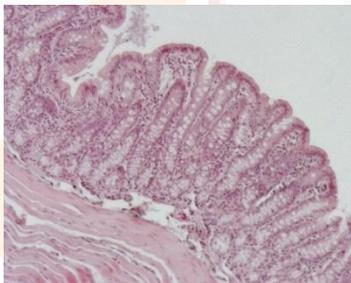
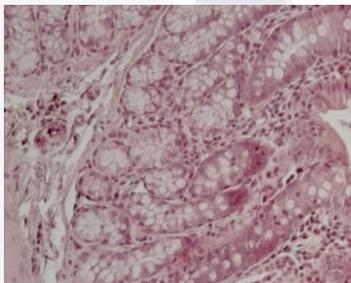
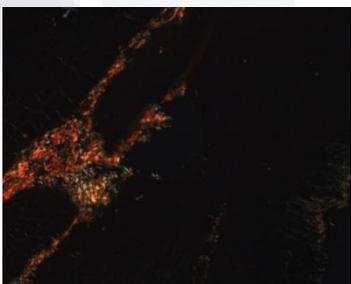
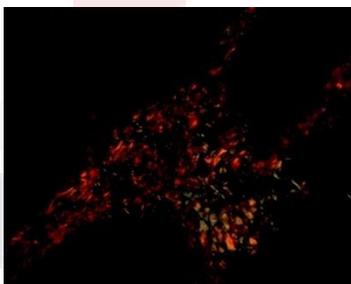
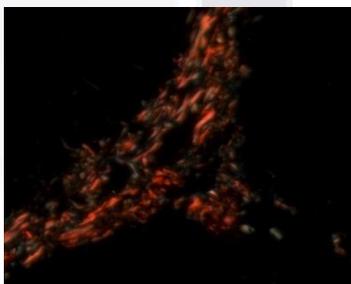
L4	5x	10x	20x
Hígado HE			
Hígado RS			
Intestino HE			
Intestino RS			

Tabla 95 Imágenes al microscopio de Lacto 5 (NL1)

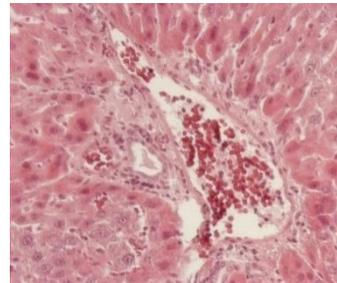
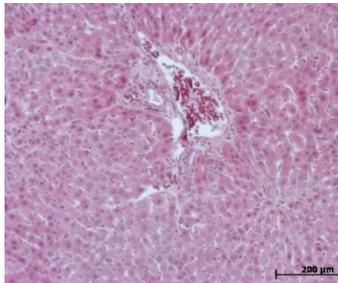
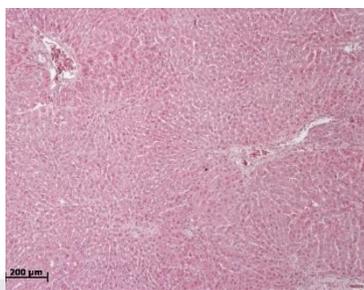
NL1/
5

5x

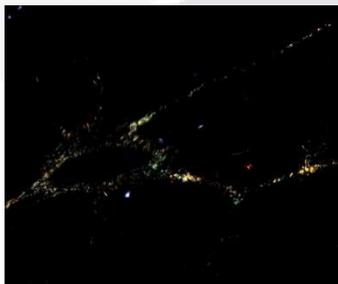
10x

20x

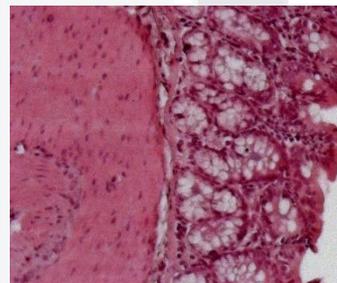
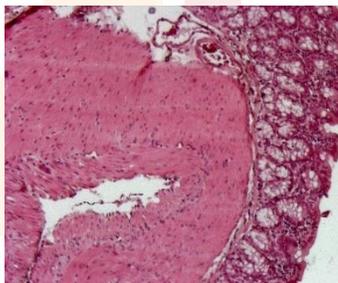
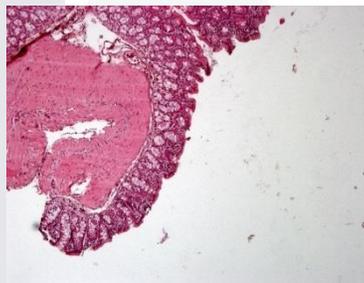
Hígado HE



Hígado RS



Intestino HE



Intestino RS

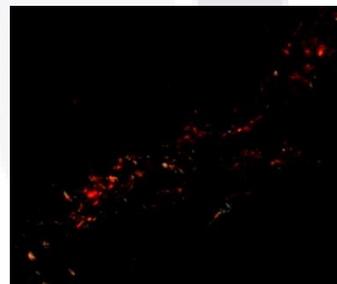
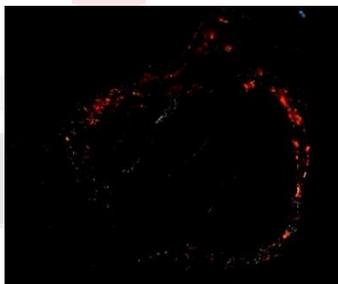
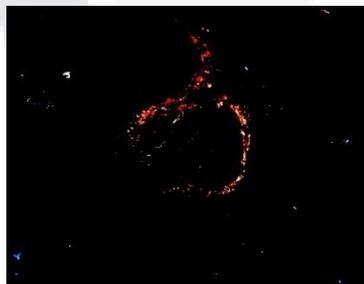


Tabla 96 Imágenes al microscopio de Lacto 6 (NL2)

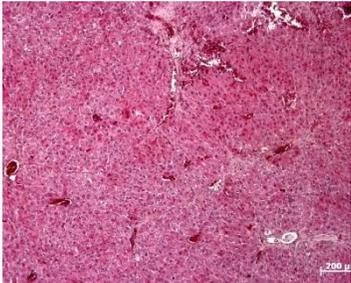
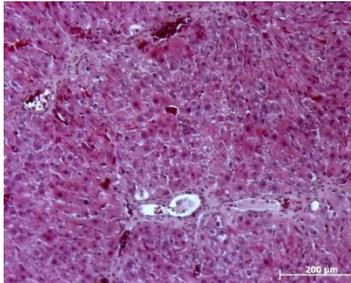
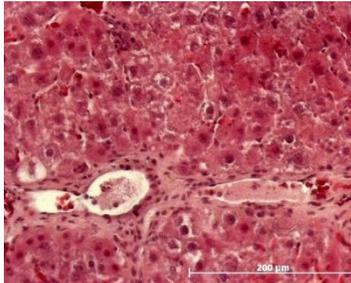
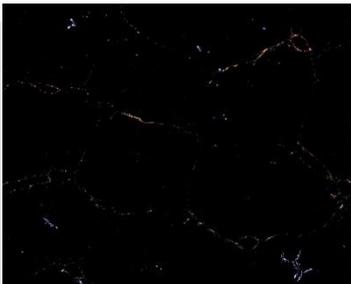
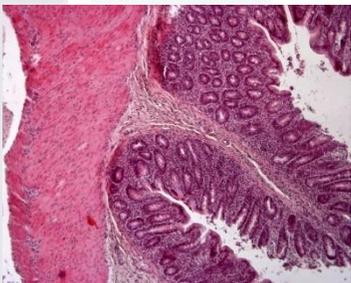
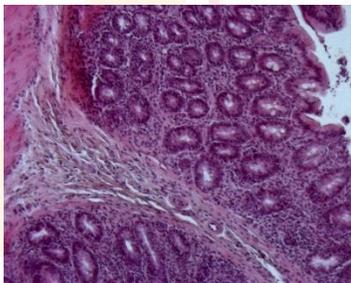
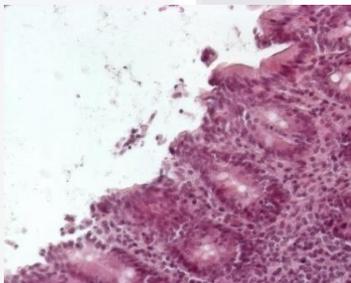
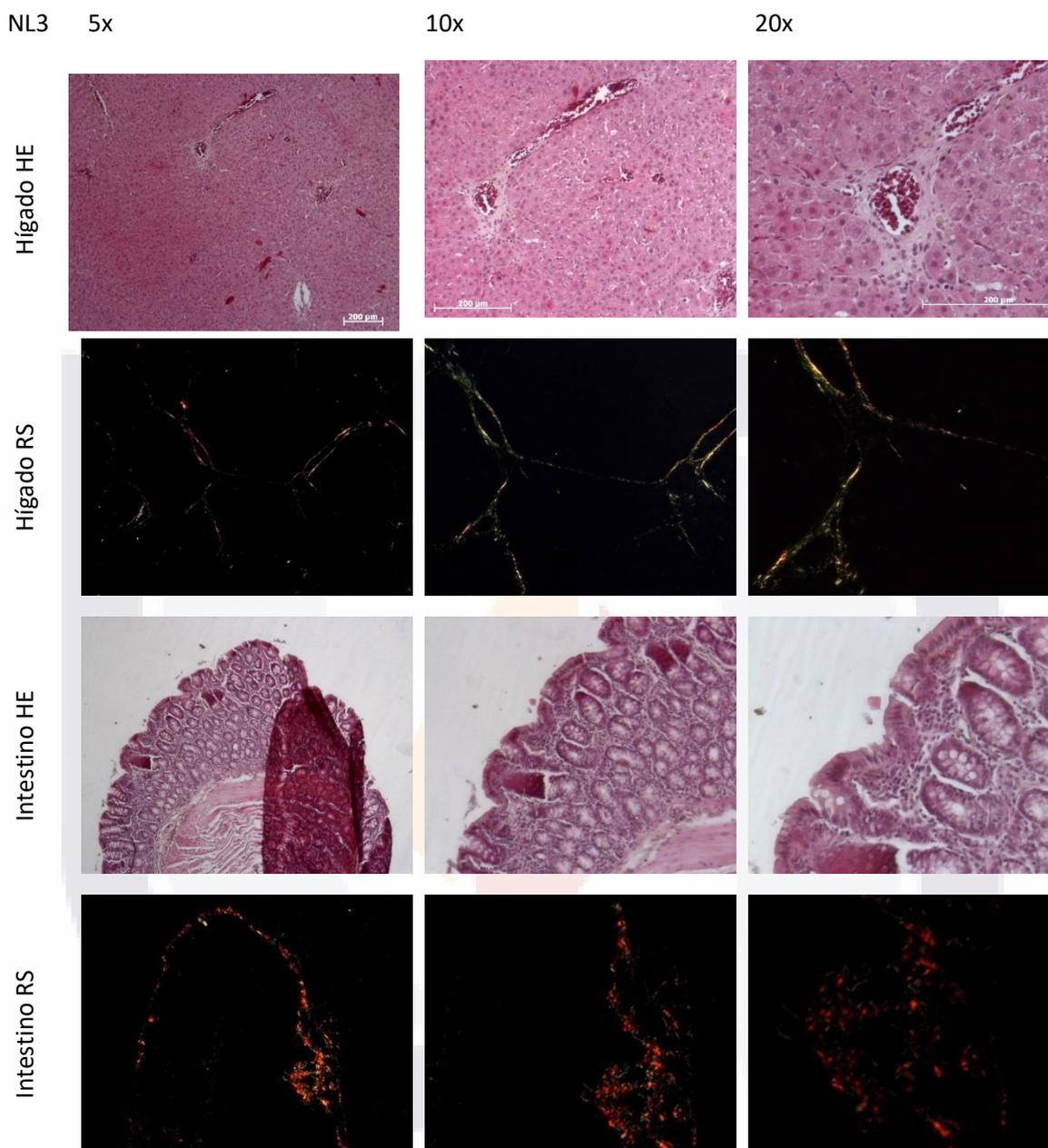
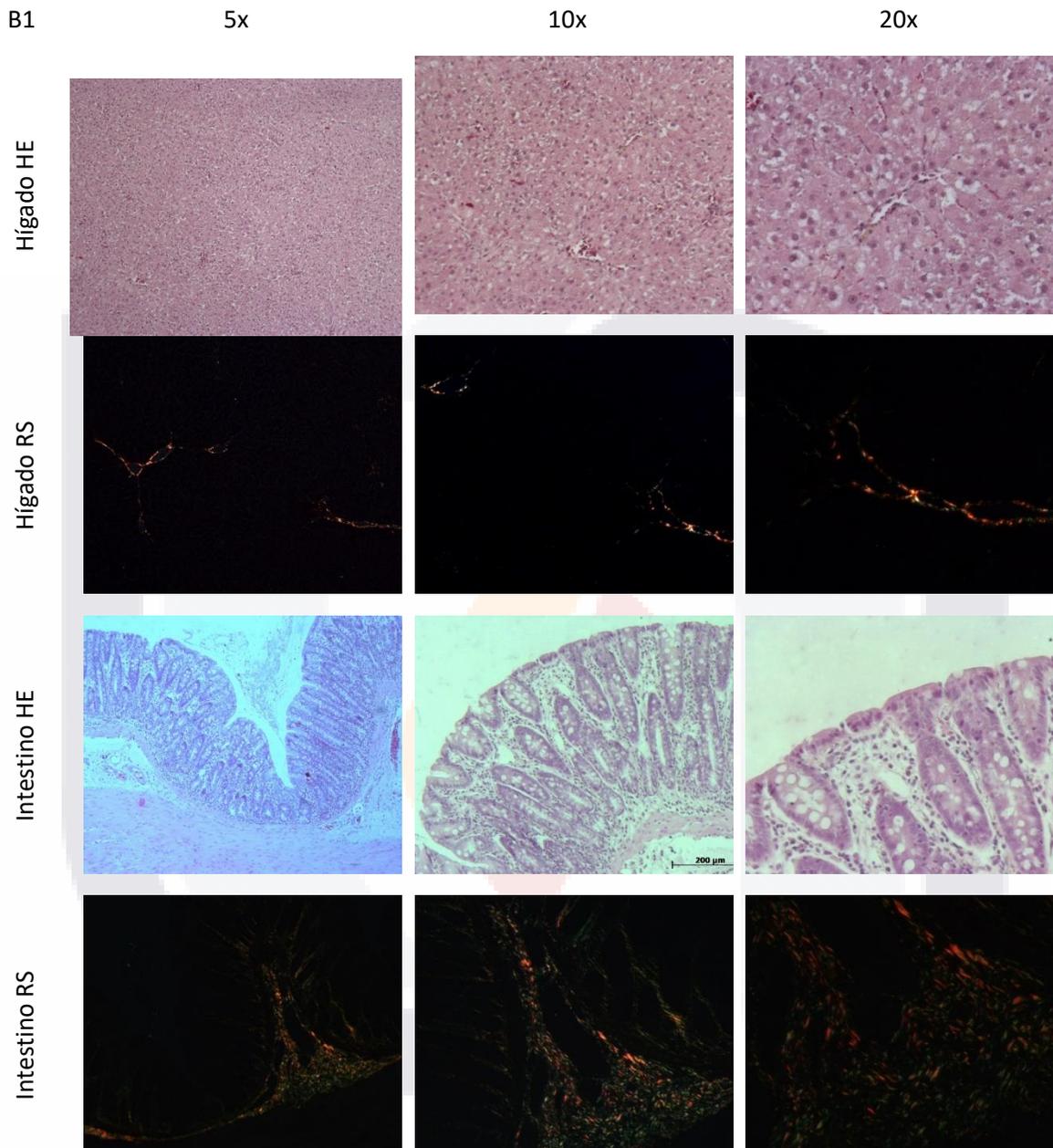
NL2	5x	10x	20x
Hígado HE			
Hígado RS			
Intestino HE			
Intestino RS			

Tabla 97 Imágenes al microscopio de Lacto 7 (NL3)



9.24.5 Berro

Tabla 98 Imágenes al microscopio de Berro 1



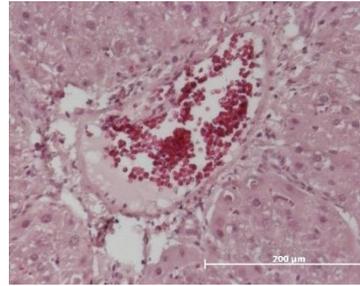
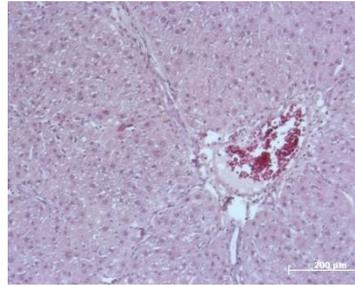
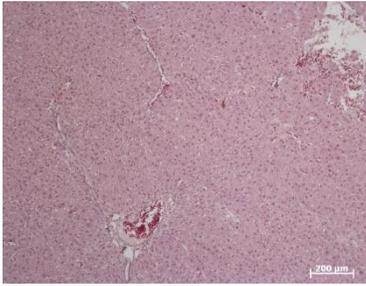
B2

5x

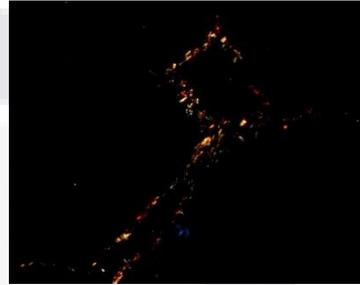
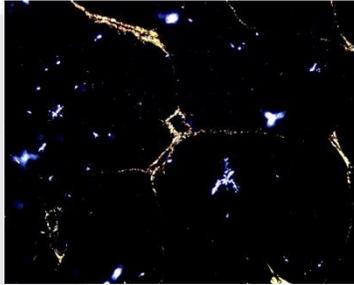
10x

20x

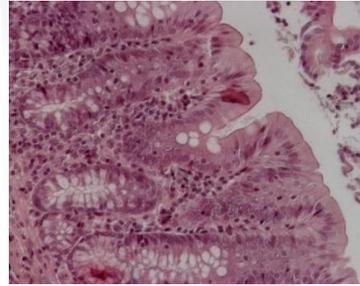
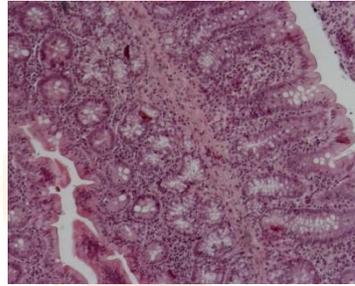
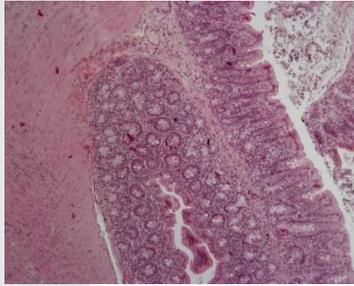
Hígado HE



Hígado RS



Intestino HE



Intestino RS

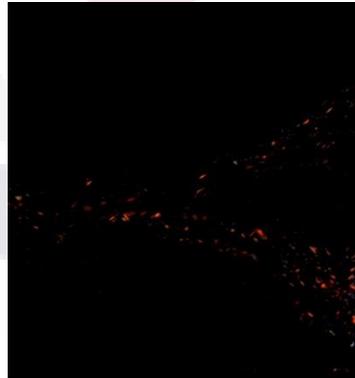
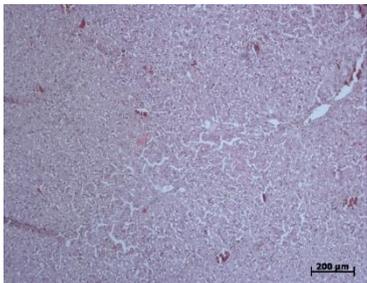
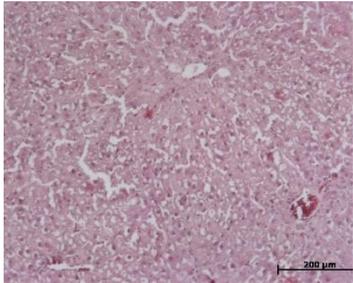
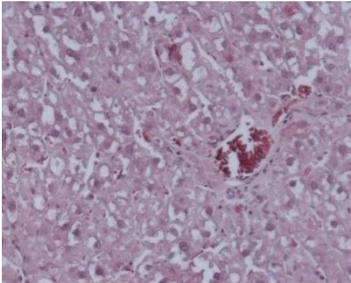
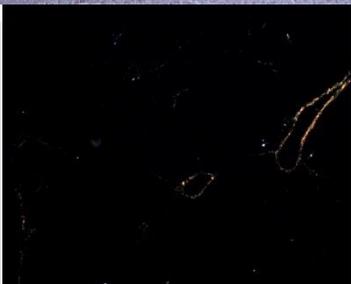
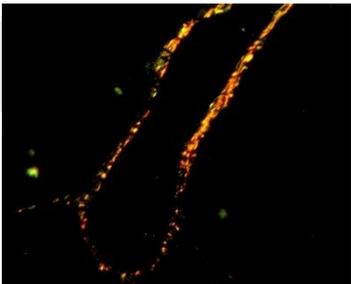
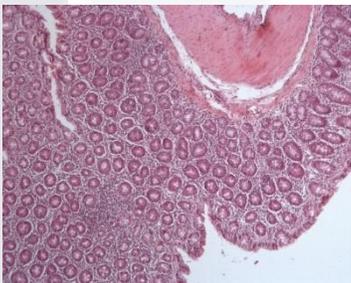
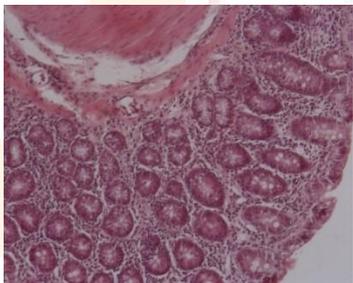
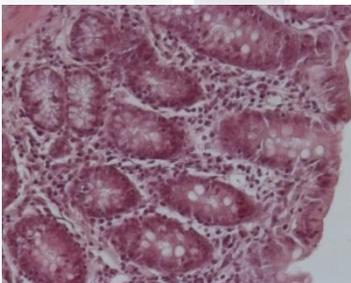
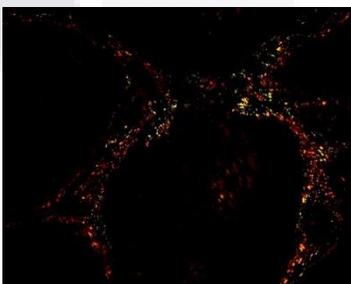
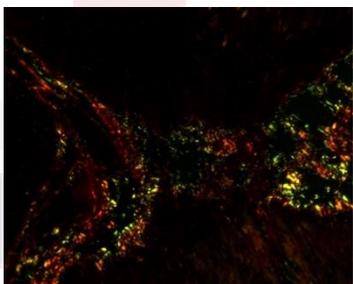
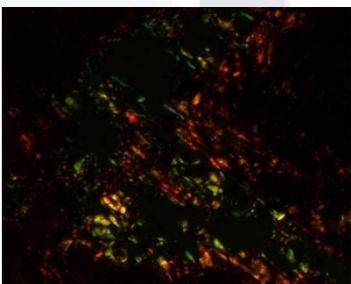


Tabla 99 Imágenes al microscopio de Berro 3

B3	5x	10x	20x
Hígado HE			
Hígado RS			
Intestino HE			
Intestino RS			

9.24.6 Berro-Lacto

Tabla 100 Imágenes al microscopio de Berro-Lacto 1

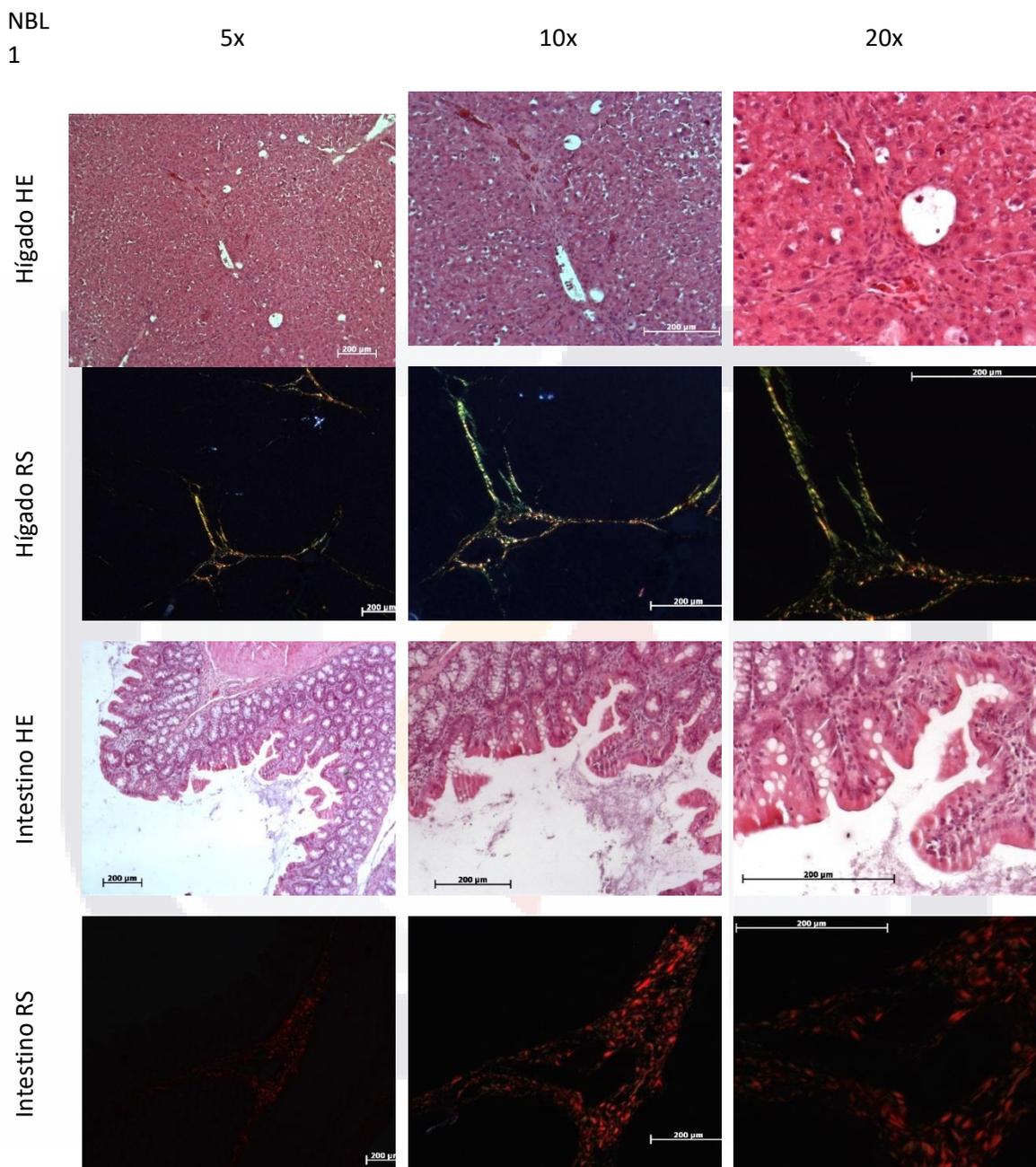
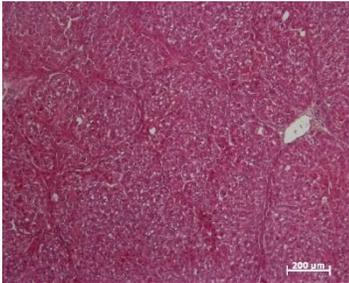
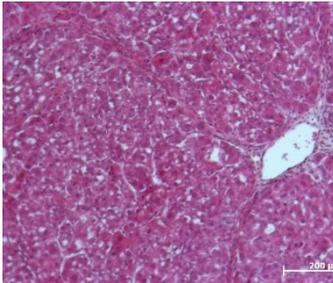
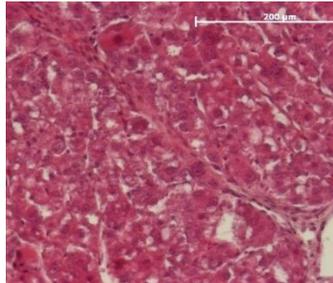
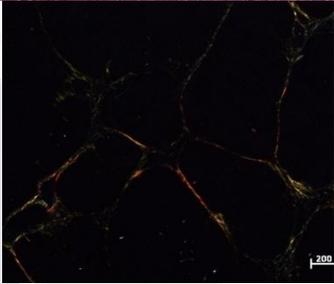
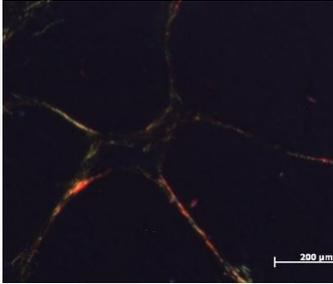
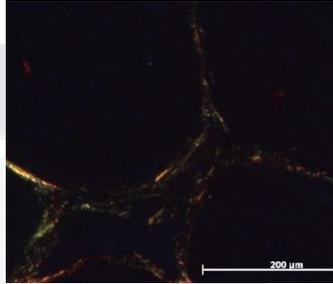
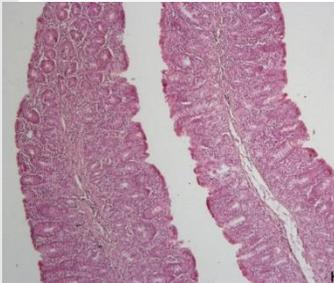
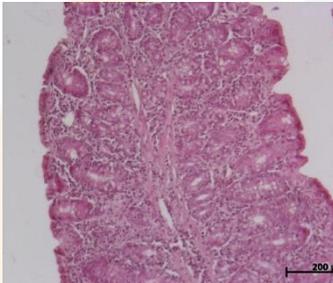
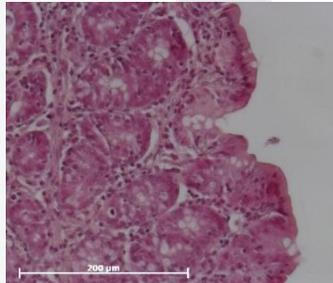
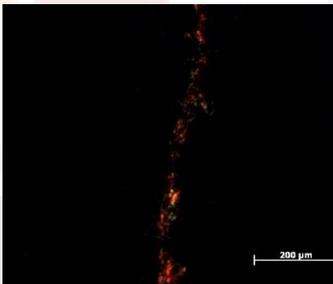
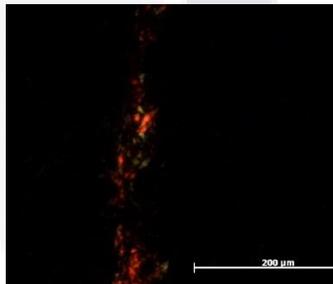


Tabla 101 Imágenes al microscopio de Berro-Lacto 2

	NBL 2	5x	10x	20x
Hígado HE				
Hígado RS				
Intestino HE				
Intestino RS				

9.25 Análisis estadístico del perfil hepático

A continuación, se muestra la tabla con los valores obtenidos de los marcadores séricos de todas las ratas de todos los grupos.

9.25.1 Datos del perfil hepático

Tabla 102 Marcadores séricos para evaluar el perfil hepático de los diferentes grupos

Muestra	ALT (U/L)	AST (U/L)	Urea (mg/dL)	Albúmina (mg/dL)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
4s1	635	899	46	3.6	582
4s2	822	876	36	2.9	437
4s3	1009	1108	37	3.1	404
Intacta 1	32	144	37	2.8	249
Intacta 2	30	114	33	2.7	262
Intacta 3	28	136	44	2.7	238
Berro 1	80	317	50	2.7	261
Berro 2	41	132	41	2.6	231
Berro 3	231	358	48	2.9	350
Lacto 1	72	169	37	2.8	286
Lacto 2	88	263	50	3.3	383
Lacto 3	270	453	43	3	259
Lacto 4	118	698	48	2.8	213
Nuevo Lacto 1	35	303	49	2.0	1255
Nuevo Lacto 2	62	199	44	2.3	517
Nuevo Lacto 3	180	391	42	2.1	310
Berro-Lacto 1	252	375	44	3.0	341
Berro-Lacto 2	206	545	38	2.6	369
Control 8s 1	63	192	41	2.8	238
Control 8s 2	46	298	45	3.1	322
Control 8s 3	47	153	49	2.9	384

ALT

ANOVA de ALT

Tabla 103 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de ALT

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.2829 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas	0.2143 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los

	$\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente		pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%
--	--	--	---

Tabla ANOVA ALT

Analysis of Variance Table

Response: ALT

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	1381450	276290	31.56	1.889e-07 ***
Residuals	15	131316	8754		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Imagen 25 ANOVA ALT

Interpretación de ANOVA para ALT

Tabla 104 Interpretación ANOVA para ALT

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con ALT diferente	1.889*10 ⁻⁰⁷	Se rechaza H0 y los niveles séricos de ALT son diferentes al menos para un grupo, con una confianza del 95%.

Como 1.889*10⁻⁰⁷ < 0.05, se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con valores de ALT diferente, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los valores de ALT de las ratas no son constantes.

Método de Fisher-LSD para ALT

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

```

$groups
      ALT groups
CuartaS      822.0000      a
BerroLacto  229.0000      b
Lactos       117.8571     bc
Berro        117.3333     bc
OchoS        52.0000      bc
Intacto      30.0000       c
    
```

Imagen 26 Test Fisher-LSD para ALT modificado

Tabla 105 Interpretación del método de Fisher-LSD para ALT

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H0: $\mu_{4s} = \mu_{BL}$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son diferentes.
H0: $\mu_{4s} = \mu_{Int}$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
H0: $\mu_{4s} = \mu_B$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
H0: $\mu_{4s} = \mu_{8S}$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y 8S son diferentes.

H₀: μ_{4s}=μ_L	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_L	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son iguales.
H₀: μ_{BL}=μ_B	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
H₀: μ_{BL}=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: μ_L=μ_B	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos y Berro son iguales.
H₀: μ_L=μ_{Int}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos e intacto son iguales.
H₀: μ_L=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales
H₀: μ_B=μ_{Int}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
H₀: μ_B=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: μ_{Int}=μ_{8s}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son iguales.

El grupo control positivo (4S) fue diferente a todos los demás, los grupos BerroLacto, Lactos, Berro y control positivo de las 8 semanas (8S) son iguales, y los grupos Lactos, Berro, 8S e intacto son iguales ($p < 0.05$).

Gráficos de ALT para todos los grupos

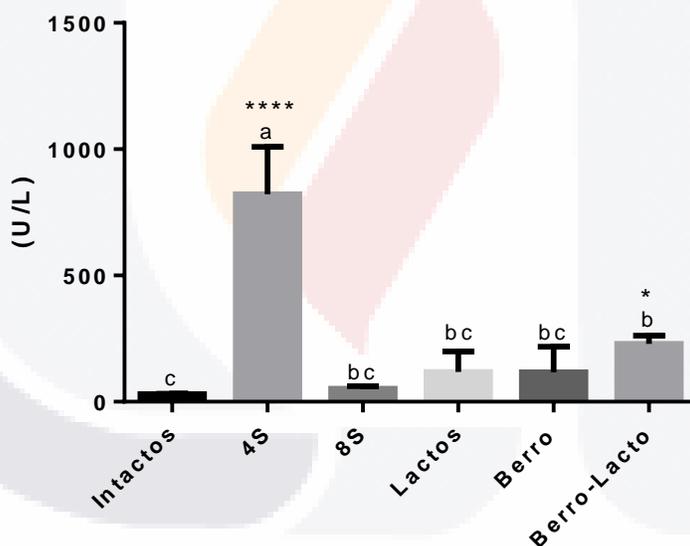


Figura 87 ALT. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

AST

ANOVA de AST

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 106 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de AST

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.9446 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.6242 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

Tabla ANOVA para AST

```

Analysis of Variance Table

Response: AST
      Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Tx      5 1334150  266830   13.97 3.422e-05 ***
Residuals 15  286503   19100
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

Imagen 27 ANOVA de ALT

Interpretación de ANOVA para AST

Tabla 107 Interpretación ANOVA para AST

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1^2 = \mu_2^2 = \mu_3^2 = \mu_4^2 = \mu_5^2 = \mu_6^2$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	3.422×10^{-05}	Se rechaza H0 y los niveles séricos de AST son diferentes al menos para un grupo, con una confianza del 95%.

Como $3.422 \times 10^{-05} < 0.05$, se rechaza H0 y existe al menos un tratamiento con AST diferente, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los niveles séricos de AST de los tratamientos no son constantes.

método de Fisher-LSD para AST

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

\$groups		AST groups
CuartaS	961.0000	a
BerroLacto	460.0000	b
Lactos	353.7143	b
Berro	269.0000	bc
OchoS	214.3333	bc
Intacto	131.3333	c

Imagen 28 Test Fisher-LSD para AST

Tabla 108 Interpretación del método de Fisher-LSD para AST

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H₀: μ_{4s}=μ_{BL}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son diferentes.
H₀: μ_{4s}=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
H₀: μ_{4s}=μ_B	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
H₀: μ_{4s}=μ_{8S}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y 8S son diferentes.
H₀: μ_{4s}=μ_L	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_{BL}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son iguales.
H₀: μ_{BL}=μ_B	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
H₀: μ_{BL}=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: μ_L=μ_B	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos y Berro son iguales.
H₀: μ_L=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos e intacto son diferentes.
H₀: μ_L=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales
H₀: μ_B=μ_{Int}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
H₀: μ_B=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: μ_{Int}=μ_{8s}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son iguales.

El tratamiento control positivo de la cuarta semana se comporta diferente a todos los demás. Los tratamientos Berro-Lacto, Lactos, Berro y ocho semanas son iguales; los tratamientos Berro, ocho semanas y el intacto, son iguales. Con una confianza del 95%.

Gráfico de AST para todos los grupos

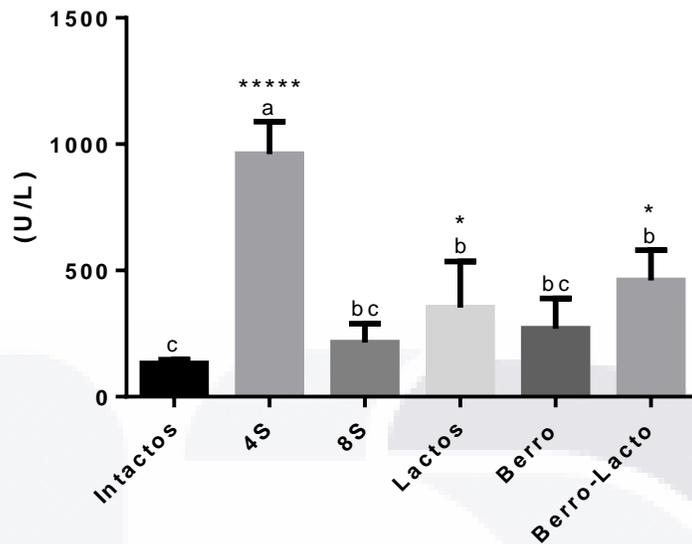


Figura 88 AST Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

Urea

ANOVA de Urea

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 109 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de Urea

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.7088 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.9981 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

Tabla ANOVA para Urea

Analysis of Variance Table

Response: Urea

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	182.19	36.438	1.5854	0.224
Residuals	15	344.76	22.984		

Imagen 29 ANOVA para urea

Interpretación de ANOVA para Urea

Tabla 110 Interpretación ANOVA para Urea

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.224	No se rechaza H0 y los niveles séricos de urea son iguales para todos los tratamientos, con una confianza del 95%.

Como $0.224 > 0.05$, no se rechaza H0 y los niveles séricos de urea son iguales para todos los tratamientos, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los niveles séricos de urea de los tratamientos son constantes.

Gráfico de Urea para todos los grupos

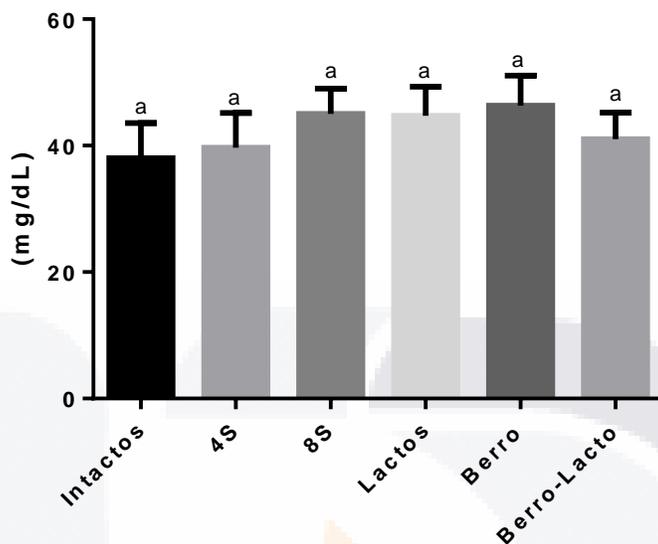


Figura 89 Urea. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

Albumina

ANOVA de Albumina

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 111 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de albúmina

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.5964 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.5604 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

Tabla ANOVA para Albumina

Analysis of Variance Table

Response: Alb

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	0.48194	0.096389	1.904	0.1673
Residuals	12	0.60750	0.050625		

Imagen 30 ANOVA para albúmina

Interpretación de ANOVA para Albumina

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1^2 = \mu_2^2 = \mu_3^2 = \mu_4^2 = \mu_5^2 = \mu_6^2$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.1673	No se rechaza H0 y los niveles séricos de albúmina son iguales para todos los tratamientos, con una confianza del 95%.

Tabla 112 Interpretación ANOVA para albumina

Como $0.1673 > 0.05$, no se rechaza H0 y los niveles séricos de albúmina son iguales para todos los tratamientos, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los niveles séricos de albúmina de los tratamientos son constantes.

Gráfico de Albumina para todos los grupos

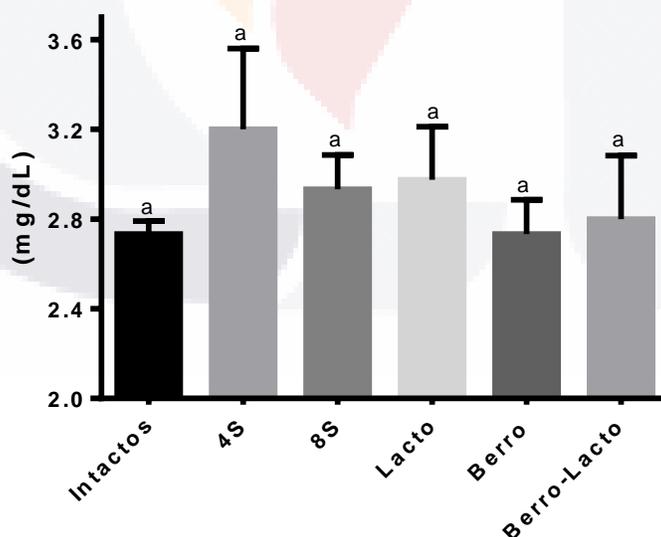


Figura 90 Albúmina. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

Fosfatasa alcalina

ANOVA de Fosfatasa alcalina

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 113 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de fosfatasa alcalina

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.07342 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.724 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

Tabla ANOVA para Fosfatasa alcalina

```

Analysis of Variance Table

Response: Fosf
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Ix      5 166217   33243  0.5991 0.7015
Residuals 15 832400   55493
    
```

Tabla 114 ANOVA para fosfatasa alcalina

Interpretación de ANOVA para A Fosfatasa alcalina

Tabla 115 Interpretación ANOVA para fosfatasa alcalina

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.7015	No se rechaza H0 y los niveles séricos de fosfatasa alcalina son iguales para todos los tratamientos, con una confianza del 95%.

Como $0.7015 > 0.05$, no se rechaza H0 y los niveles séricos de fosfatasa alcalina son iguales para todos los tratamientos, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los niveles séricos de fosfatasa alcalina de los tratamientos son constantes.

Gráfico de Fosfatasa alcalina para todos los grupos

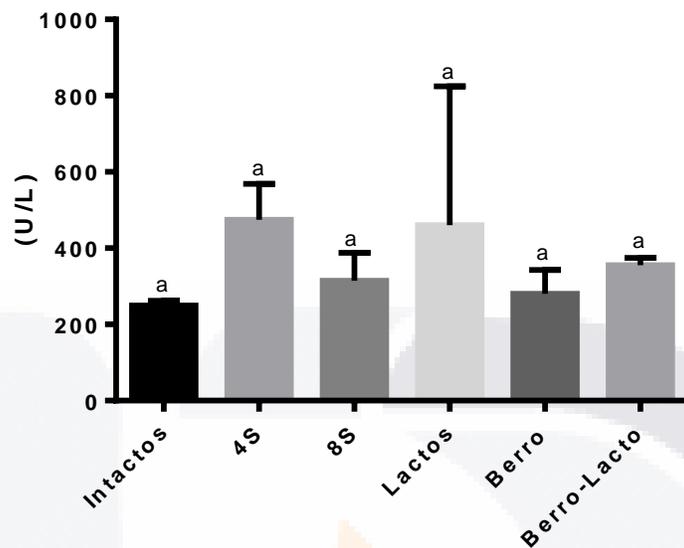


Figura 91 fosfatasa alcalina. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

Gráfico de barras para todos los grupos séricos

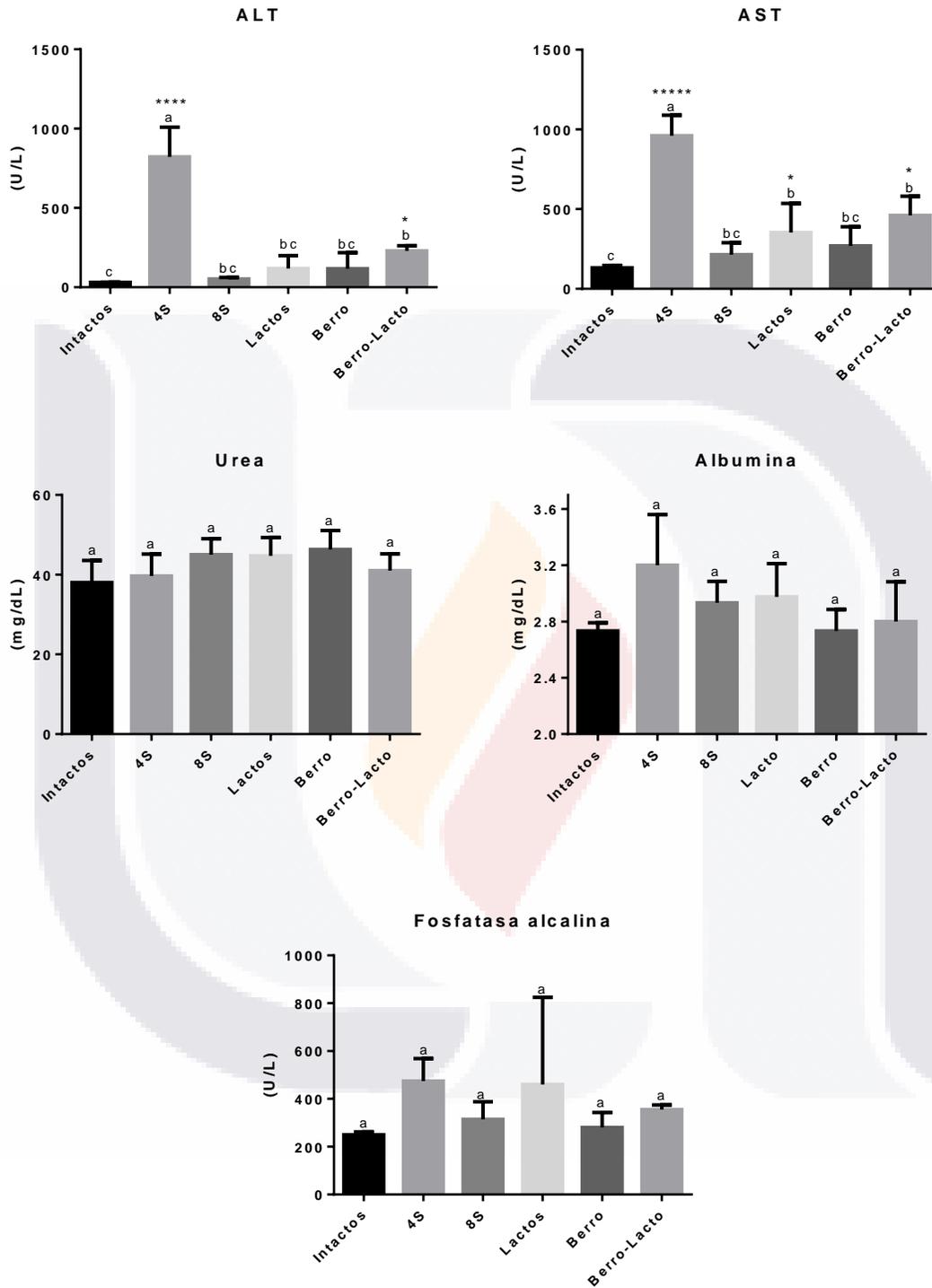


Figura 92 Perfil hepático. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

9.26 Análisis estadístico del análisis morfométrico

Se realizó un análisis morfométrico de las imágenes obtenidas en el microscopio invertido, de las muestras teñidas con rojo sirio. Se analizaron en todos los casos las imágenes con aumento de 5x, tanto para hígado como para intestino, con la finalidad de conocer el área afectada.

9.26.1 Colágena total en hígado e intestino

Se utilizó el software ImageJ para dicho análisis. Con el cuál se obtuvo un área total de 1751.41*1312.30 μm, es decir, de 2298375.343 μm². Todas las imágenes tienen la misma área debido a que se analizaron en todos los casos con el mismo aumento (5x). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 116 Porcentaje de colágena total en hígado e intestino

Grupo y rata	Porcentaje de colágena total por rata (%)	
	Hígado	Intestino
4s1	1.66135171	7.53939997
4s2	0.45880796	2.43037284
4s3	0.80580616	3.0067404
INTACTO 1	0.35516392	0.00942139
INTACTO 2	0.25091385	0.36965111
INTACTO 3	0.19050609	5.05118254
8S 1	0.6004752	1.9387286
8S 2	2.90933982	1.05332552
8S 3	1.86391166	5.9747561
LACTO 1	2.07048954	3.57306304
LACTO 2	1.50111874	3.58768011
LACTO 3	2.03418942	2.016178
LACTO 4	3.54071167	4.2643577
NL 1	2.07513095	1.6707731
NL 2	0.63054053	2.15860726
NL 3	0.57879215	1.55688509
BERRO 1	0.60809563	3.4482296
BERRO 2	1.67035746	1.2117573
BERRO 3	0.85776233	2.466188
BERRO-LACTO 1	1.14469915	1.37760153
BERRO-LACTO 2	2.96967831	4.25438214

9.48.1.1 Colágena total en hígado

Identificar si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.15).

El análisis indica que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unirán los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA para Colágena total en hígado

9.48.1.1.1 Verificación de supuestos de ANOVA para Colágena total en hígado

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 117 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena total en hígado

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.9041 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.4765 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

9.48.1.1.2 Tabla ANOVA para Colágena total en hígado

Analysis of Variance Table

```

Response: FibH
      Df  Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tx      5   7.0728  1.41456   1.781 0.1774
Residuals 15 11.9137  0.79425
    
```

Imagen 31 ANOVA de colágena total en hígado

9.48.1.1.3 Interpretación de ANOVA para Colágena total en hígado

Tabla 118 Interpretación ANOVA para colágena total en hígado

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.1774	No se rechaza H0 y el porcentaje de colágena total en hígado de todos los tratamientos es igual, con una confianza del 95%.

Como $0.1774 > 0.05$, no se rechaza H0 con una confianza del 95%. Por lo tanto, el porcentaje de fibrosis en hígado de todos los tratamientos es igual.

9.48.1.1.4 Gráfico para Colágena total en hígado

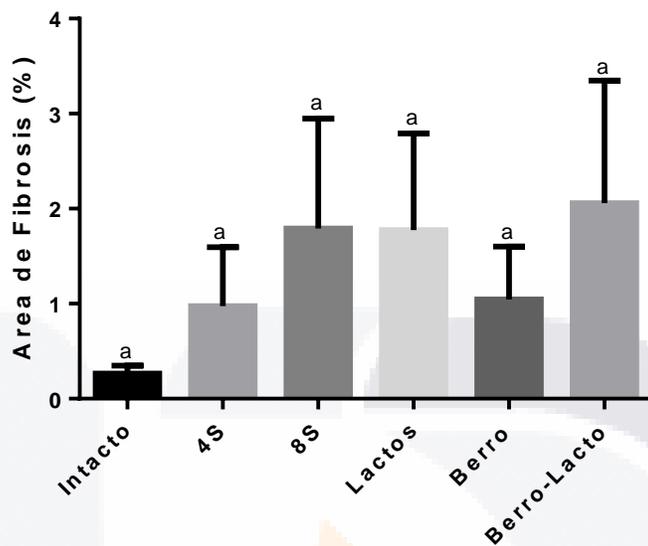


Figura 93 Porcentaje de colágena total en hígado. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto (n=21).

9.48.1.2 Colágena total en intestino

Identificar si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.16).

El análisis indica que NO pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se utilizarán únicamente los datos de Lacto.

ANOVA para Colágena total en intestino

9.48.1.2.1 Verificación de supuestos de ANOVA para Colágena total en intestino

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 119 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena total en intestino

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.9041 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.9156 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los tratamientos, con una confianza del 95%

9.48.1.2.2 Tabla ANOVA para Colágena total en hígado

Analysis of Variance Table

Response: FibI

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	11.266	2.2533	0.4951	0.7742
Residuals	12	54.619	4.5515		

Imagen 32 ANOVA de colágena total en intestino

9.48.1.2.3 Interpretación de ANOVA para Colágena total en hígado

Tabla 120 Interpretación de ANOVA de colágena total en intestino

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente	0.7742	No se rechaza H0 y el porcentaje de colágena total en intestino de todos los tratamientos es igual, con una confianza del 95%.

Como $0.7742 > 0.05$, no se rechaza H_0 y el porcentaje de fibrosis en intestino es igual para todos los tratamientos, con una confianza del 95%. Por lo tanto, porcentaje de fibrosis en intestino de los tratamientos son constantes.

9.48.1.2.4 Gráfico para Colágena total en hígado

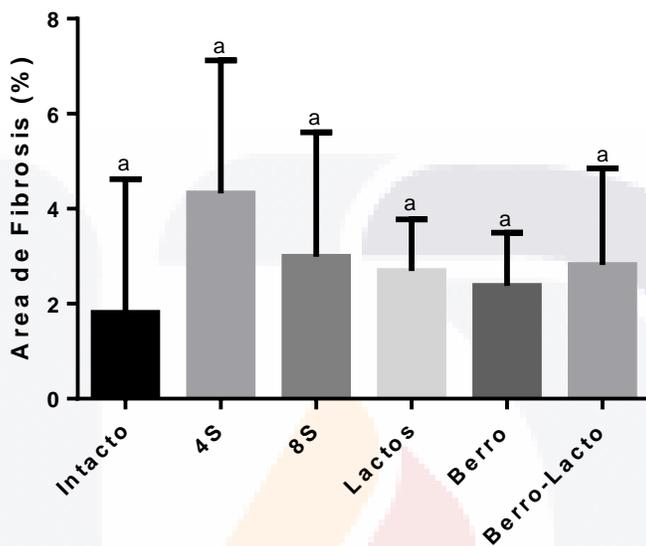


Figura 94 Porcentaje de colágena total en intestino. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

9.26.2 Colágena tipo I y tipo III en hígado e intestino

Se realizó un análisis morfométrico de las imágenes obtenidas en el microscopio invertido, de las muestras teñidas con rojo sirio. Se analizaron a diferentes aumentos, ajustando el área ara cada uno. Se utilizó el software ImageJ para dicho análisis. En dicho software, las imágenes tanto de hígado como de intestino se separaron sus canales (“Split channels”) por colores, para conocer el área abarcada por la colágena roja (colágena tipo I) y la colágena verde (colágena tipo III). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 121 Porcentaje de colágena tipo I en hígado e intestino

GRUPO Y RATA	PORCENTAJE DE COLÁGENA TIPO I (ROJA) EN LA RATA (%)	
	Hígado	Intestino
4s1	3.59	27.82
4s2	1.08	7.89
4s3	3.09	21.91
INTACTO 1	3.70	22.27
INTACTO 2	0.81	4.91
INTACTO 3	0.66	34.45
8S 1	7.315	19.21
8S 2	10.29	1.86
8S 3	4.34	17.24
LACTO 1	1.52	7.02
LACTO 2	2.24	5.35
LACTO 3	1.88	4.75
LACTO 4	3.95	27.09
NL 1	3.82	5.15
NL 2	1.35	11.53
NL 3	6.67	13.79
BERRO 1	2.81	5.98
BERRO 2	5.54	5.98
BERRO 3	3.13	14.74
BERRO-LACTO 1	4.12	21.97
BERRO-LACTO 2	4.66	28.53

Tabla 122 Porcentaje de colágena tipo III en hígado e intestino

Grupo y rata	Porcentaje de colágena tipo III (verde) en la rata (%)	
	Hígado	Intestino
4s1	3.28	25.27

4s2	3.22	13.93
4s3	1.45	28.28
INTACTO 1	6.33	27.89
INTACTO 2	0.59	4.45
INTACTO 3	0.45	34.20
8S 1	2.17	11.01
8S 2	5.35	16.69
8S 3	3.59	12.54
LACTO 1	4.19	0.23
LACTO 2	1.06	2.12
LACTO 3	2.91	3.23
LACTO 4	3.25	25.62
NL 1	3.64	1.73
NL 2	1.02	8.97
NL 3	6.67	9.42
BERRO 1	3.41	23.21
BERRO 2	1.95	12.72
BERRO 3	2.68	15.91
BERRO-LACTO 1	9.72	16.95
BERRO-LACTO 2	4.64	6.78

9.26.2.1 Colágena tipo I en hígado

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.17).

El análisis indicó que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA para Colágena tipo I en hígado

9.26.2.1.1 Verificación de supuestos de ANOVA para Colágena tipo I en hígado

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 123 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo I en hígado

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.7455 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$	0.8031 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los

	H1: Al menos una varianza diferente		tratamientos, con una confianza del 95%
--	-------------------------------------	--	---

9.26.2.1.2 Tabla ANOVA para Colágena tipo I en hígado

Analysis of Variance Table

Response: C1h

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	58.438	11.6876	3.279	0.03371 *
Residuals	15	53.466	3.5644		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Imagen 33 ANOVA de colágena tipo I en hígado

9.26.2.1.3 Interpretación de ANOVA para Colágena tipo I en hígado

Tabla 124 Interpretación ANOVA de colágena tipo I en hígado

Hipótesis	Valor p	Conclusión
<p>H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$</p> <p>H1: al menos hay un grupo con colágena tipo I en hígado diferente</p>	0.03371	Se rechaza H0 y el porcentaje de colágena tipo I en hígado es diferente al menos para un grupo, con una confianza del 95%.

Como $0.03371 < 0.05$, se rechaza H0 con una confianza del 95%. Por lo tanto, el porcentaje de colágena tipo I en hígado es diferente al menos en un tratamiento.

9.26.2.1.4 Método de Fisher-LSD para Colágena tipo I en hígado

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

\$groups

	C1h groups	
OchoS	7.315000	a
BerroLacto	4.390000	ab
Berro	3.826667	b
Lactos	3.061429	b
CuartaS	2.586667	b
Intacto	1.723333	b

Imagen 34 Test Fisher-LSD colágena tipo I en hígado

Tabla 125 Interpretación del método de Fisher-LSD para colágena tipo I en hígado

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H₀: $\mu_{4s}=\mu_{BL}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son iguales.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_{Int}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S e intacto son iguales.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_B$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro son iguales.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_{8S}$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y 8S son diferentes.
H₀: $\mu_{4s}=\mu_L$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Lactos son iguales.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_L$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Lacto son iguales.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_B$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_{Int}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son iguales.
H₀: $\mu_{BL}=\mu_{8S}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son iguales.
H₀: $\mu_L=\mu_B$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lacto y Berro son iguales.
H₀: $\mu_L=\mu_{Int}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos e intacto son iguales.
H₀: $\mu_L=\mu_{8S}$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos y Control positivo 8 semanas son diferentes.
H₀: $\mu_B=\mu_{Int}$	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
H₀: $\mu_B=\mu_{8S}$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro y Control positivo 8 semanas son diferentes
H₀: $\mu_{Int}=\mu_{8s}$	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son diferentes.

Para la colágena tipo I en hígado, los tratamientos Berro-Lacto y 8S son estadísticamente iguales; los tratamientos Berro-Lacto, Berro, Lactos, 4S e intactos son iguales, con una confianza del 95%.

9.26.2.1.5 Gráfico para Colágena tipo I en hígado

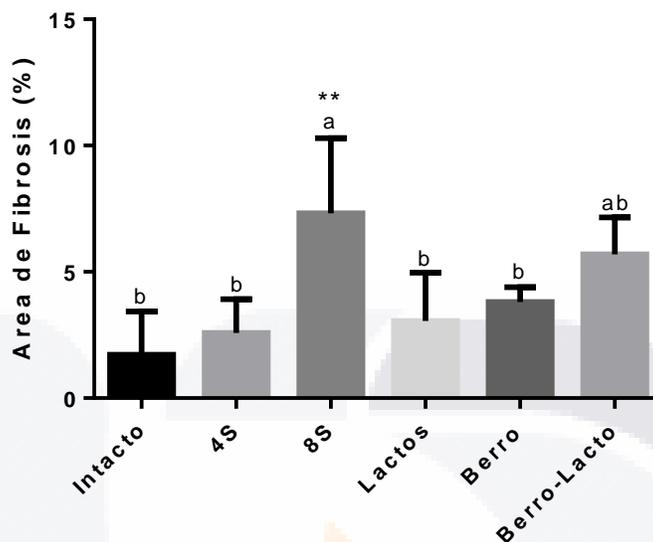


Figura 95 Porcentaje de colágena tipo I en hígado. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

9.26.2.2 Colágena tipo I en intestino

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.18).

El análisis indicó que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA para Colágena tipo I en intestino

9.26.2.2.1 Verificación de supuestos de ANOVA para Colágena tipo I en intestino

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 126 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo I en intestino

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.9629 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.8122 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

9.26.2.2.2 Tabla ANOVA para Colágena tipo I en intestino

Analysis of Variance Table

Response: C1i

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	295.72	59.143	0.543	0.7411
Residuals	15	1633.81	108.920		

Imagen 35 ANOVA para porcentaje de colágena tipo I en intestino

9.26.2.2.3 Interpretación de ANOVA para Colágena tipo I en intestino

Tabla 127 Interpretación ANOVA para porcentaje de colágena tipo I en intestino

Hipótesis	Valor p	Conclusión
<p>H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$</p> <p>H1: al menos hay un grupo con porcentaje de colágena tipo I en intestino diferente</p>	0.7411	No se rechaza H0 y el porcentaje de colágena tipo I en intestino de todos los tratamientos es igual, con una confianza del 95%.

Como $0.7411 > 0.05$, no se rechaza H0 con una confianza del 95%. Por lo tanto, el porcentaje de colágena tipo I en hígado de todos los tratamientos es igual.

9.26.2.2.4 Gráfico para Colágena tipo I en intestino

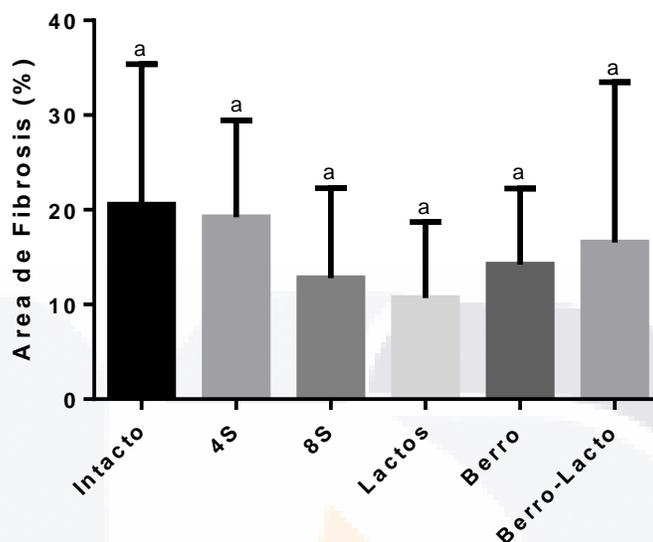


Figura 96 Porcentaje de colágena tipo I en intestino. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

9.26.2.3 Colágena tipo III en hígado

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.19).

El análisis indicó que SÍ pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA para Colágena tipo III en hígado

9.26.2.3.1 Verificación de supuestos de ANOVA para Colágena tipo III en hígado

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 128 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo III en hígado

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.928 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%

Homocedasticidad	<p>H0: Igualdad de varianzas</p> $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ <p>H1: Al menos una varianza diferente</p>	0.6458 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%
------------------	---	---------------------------	--

9.26.2.3.2 Tabla ANOVA para Colágena tipo III en hígado

Analysis of Variance Table

```

Response: C3h
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tx          5  34.924   6.9849   1.5794 0.2256
Residuals 15  66.337   4.4225
    
```

Imagen 36 ANOVA de colágena tipo III en hígado

9.26.2.3.3 Interpretación de ANOVA para Colágena tipo III en hígado

Tabla 129 Interpretación ANOVA de colágena tipo III en hígado

Hipótesis	Valor p	Conclusión
<p>H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$</p> <p>H1: al menos hay un grupo con porcentaje de colágena tipo III en hígado diferente</p>	0.2256	No se rechaza H0 y el porcentaje de colágena tipo III en hígado de todos los tratamientos es igual, con una confianza del 95%.

Como $0.2256 > 0.05$, no se rechaza H0 con una confianza del 95%. Por lo tanto, el porcentaje de colágena tipo III en hígado de todos los tratamientos es igual.

9.26.2.3.4 Gráfico para Colágena tipo III en hígado

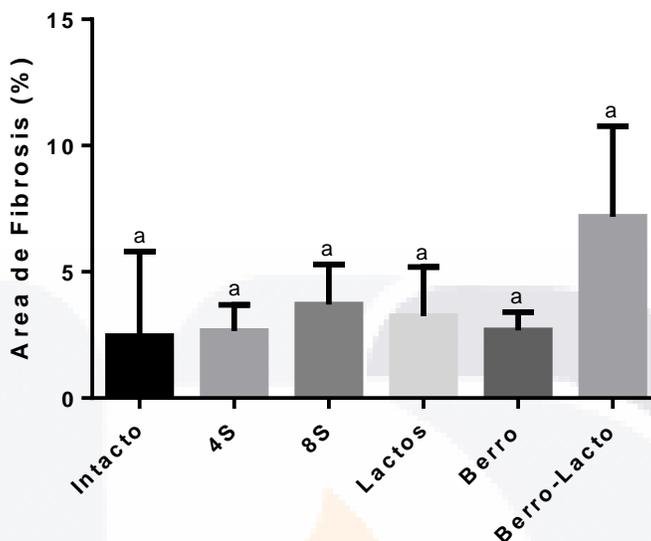


Figura 97 Porcentaje de colágena tipo III en hígado. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media ± DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

9.26.2.4 Colágena tipo III en intestino

Se identificó si los grupos de Lacto-NL pertenecen al mismo grupo (Anexo 9.21.20).

El análisis indicó que Sí pertenecen al mismo grupo, por lo tanto, se unieron los datos en un grupo llamado Lactos, que comprende tanto al grupo Lacto y NL.

ANOVA para Colágena tipo III en intestino

9.26.2.4.1 Verificación de supuestos de ANOVA para Colágena tipo III en intestino

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 130 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena tipo III en intestino

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.8473 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%

Homocedasticidad	<p>H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$</p> <p>H1: Al menos una varianza diferente</p>	0.8149 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%
------------------	---	---------------------------	--

9.26.2.4.2 Tabla ANOVA para Colágena tipo III en intestino

Analysis of Variance Table

```

Response: C3i
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tx         5  768.43  153.685   1.9209 0.1503
Residuals 15 1200.09   80.006
    
```

Imagen 37 ANOVA de colágena tipo III en intestino

9.26.2.4.3 Interpretación de ANOVA para Colágena tipo III en intestino

Tabla 131 Interpretación ANOVA para colágena tipo III en intestino

Hipótesis	Valor p	Conclusión
<p>H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$</p> <p>H1: al menos hay un grupo con porcentaje de colágena tipo III en intestino diferente</p>	0.1503	No se rechaza H0 y el porcentaje de colágena tipo III en intestino de todos los tratamientos es igual, con una confianza del 95%.

Como $0.1503 > 0.05$, no se rechaza H0 con una confianza del 95%. Por lo tanto, el porcentaje de colágena tipo III en intestino de todos los tratamientos es igual.

9.26.2.4.4 Gráfico para Colágena tipo III en intestino

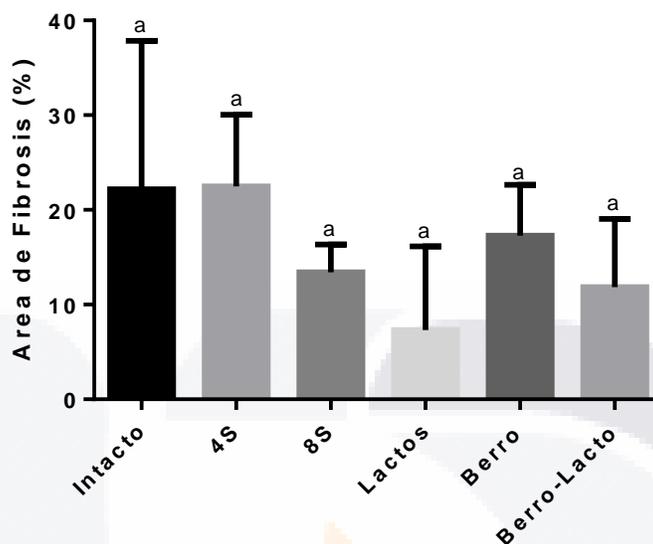


Figura 98 Porcentaje de colágena tipo III en intestino. Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=21$).

9.27 Análisis estadístico del PCR

Hígado: IL-1, IL-10, Colágena

A continuación, se muestra en la tabla la expresión relativa de IL-1, IL-10 y colágena total, obtenida mediante qPCR del hígado.

Tabla 132 Expresión relativa de IL-1, IL-10 y colágena en hígado (qPCR)

Grupo	Expresión relativa		
	IL-1	IL-10	Colágena
Intacto 1	0.9855	1.0298	0.9619
Intacto 2	0.8230	0.9810	1.1761
Intacto 3	0.6538	0.6115	1.0154
4S 1	3.7244	0.5379	4.5378
4S 2	3.1799	0.3003	4.1583
4S 3	3.8132	0.3801	3.4774
Lactos 1	2.1421	9.5688	2.7132
Lactos 2	1.0196	11.4029	3.2199
Lactos 3	0.9965	6.0685	3.5876
Berro 1	5.9753	29.1482	1.0454
Berro 2	6.0377	24.6469	1.7399
Berro 3	5.0141	20.8119	1.3113

OchoS 1	14.4701	0.9715	3.1383
OchoS 2	13.1592	0.7853	3.9806
OchoS 3	9.9521	1.1829	3.9834
Berrolacto 1	2.9876	10.6319	6.9548
Berrolacto 2	2.6574	12.3405	6.5296

9.27.1 IL-1 en hígado

ANOVA para IL-1 en hígado

9.27.1.1 Verificación de supuestos de ANOVA para IL-1 en hígado

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 133 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de IL-1 en hígado (qPCR)

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.3767 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.3255 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

9.27.1.2 Tabla ANOVA para IL-1 en hígado

Analysis of Variance Table

Response: IL1

```

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tx      5 275.290  55.058  47.815 4.297e-07 ***
Residuals 11  12.666   1.151

```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Imagen 38 ANOVA de IL-1 en hígado (qPCR)

9.27.1.3 Interpretación de ANOVA para IL-1 en hígado

Tabla 134 Interpretación de ANOVA para IL-1 en hígado (qPCR)

Hipótesis	Valor p	Conclusión
-----------	---------	------------

H0: $\mu_1^2 = \mu_2^2 = \mu_3^2 = \mu_4^2 = \mu_5^2 = \mu_6^2$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente.	4.297x10 ⁻⁰⁷	Se rechaza H0 y la expresión relativa de IL-1 es diferente en al menos uno de los tratamientos, con una confianza del 95%.
--	-------------------------	--

Como 4.297x10⁻⁰⁷ < 0.05, se rechaza H0 con una confianza del 95%. Por lo tanto, la expresión relativa de IL-1 es diferente en al menos uno de los tratamientos.

9.27.1.4 Método de Fischer-LSD para IL-1 en hígado

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

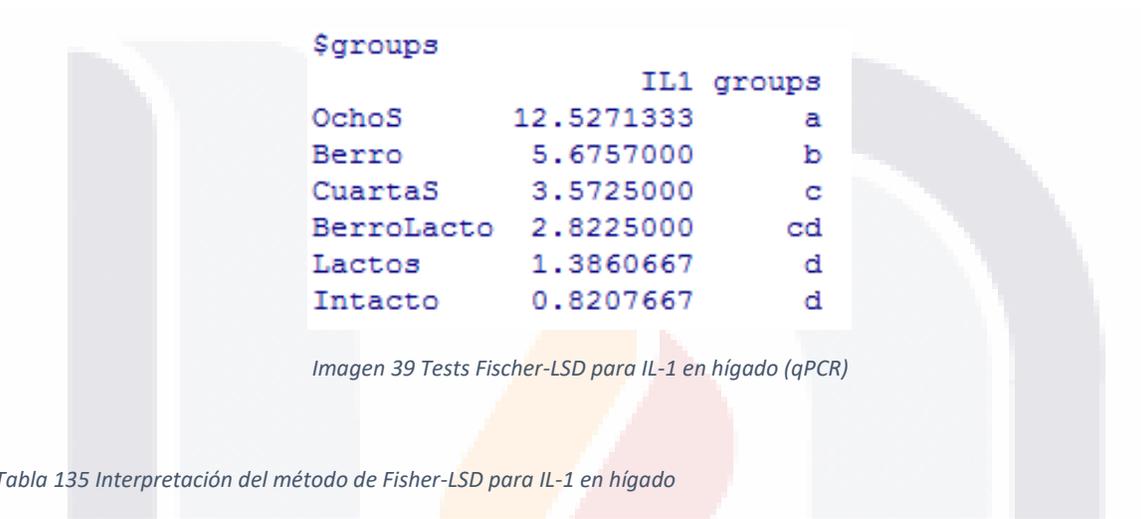


Tabla 135 Interpretación del método de Fisher-LSD para IL-1 en hígado

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H0: $\mu_4s = \mu_{BL}$	No se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son iguales.
H0: $\mu_4s = \mu_{Int}$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
H0: $\mu_4s = \mu_B$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
H0: $\mu_4s = \mu_{8S}$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y 8S son diferentes.
H0: $\mu_4s = \mu_L$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
H0: $\mu_{BL} = \mu_L$	No se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto y Lacto son iguales.
H0: $\mu_{BL} = \mu_B$	Se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son diferentes.
H0: $\mu_{BL} = \mu_{Int}$	No se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son iguales.
H0: $\mu_{BL} = \mu_{8S}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son diferentes.
H0: $\mu_L = \mu_B$	Se rechaza H0	Los tratamientos Lacto y Berro son diferentes.
H0: $\mu_L = \mu_{Int}$	No se rechaza H0	Los tratamientos Lactos e intacto son iguales.
H0: $\mu_L = \mu_{8S}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Lactos y Control positivo 8 semanas son diferentes.
H0: $\mu_B = \mu_{Int}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Berro e Intacto son diferentes.
H0: $\mu_B = \mu_{8S}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Berro y Control positivo 8 semanas son diferentes
H0: $\mu_{Int} = \mu_{8s}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Intacto y Control positivo 8 semanas son diferentes.

Para la IL-1 en hígado, los tratamientos 4S y Berro-Lacto son estadísticamente iguales; los tratamientos Berro-Lacto, 4S, Lactos e Intacto son iguales, el grupo 8S es diferente a todos los demás y el grupo de berro es diferente a todos los demás, con una confianza del 95%.

9.27.1.5 Gráfico para IL-1 en hígado

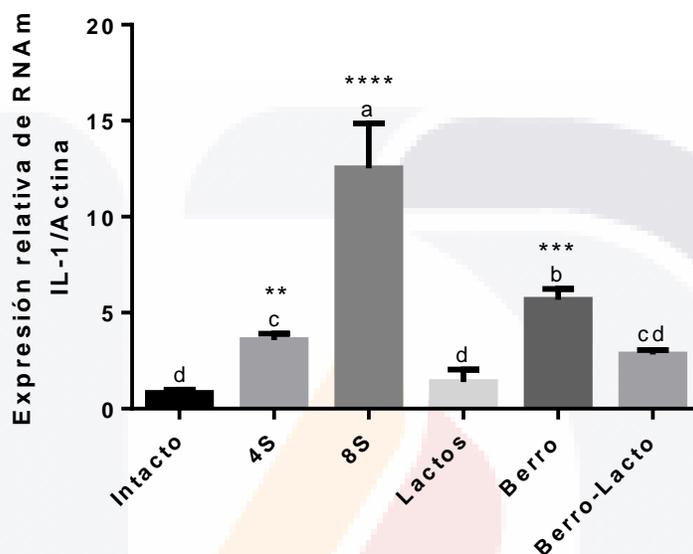


Figura 99 Expresión de IL-1 en hígado (qPCR) Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media ± DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=17$).

9.27.2 IL-10 en hígado

ANOVA para IL-10 en hígado

9.27.2.1 Verificación de supuestos de ANOVA para IL-10 en hígado

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 136 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de IL-10 en hígado (qPCR)

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.08139 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas	0.1149	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los

	$\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	(Levene's test)	pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%
--	--	-----------------	---

9.27.2.2 Tabla ANOVA para IL-10 en hígado

Analysis of Variance Table

Response: IL10

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tx	5	1346.36	269.272	59.214	1.404e-07 ***
Residuals	11	50.02	4.547		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Imagen 40 ANOVA de IL-10 en hígado (qPCR)

9.27.2.3 Interpretación de ANOVA para IL-10 en hígado

Tabla 137 Interpretación del ANOVA de IL-10 en hígado (qPCR)

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1^2 = \mu_2^2 = \mu_3^2 = \mu_4^2 = \mu_5^2 = \mu_6^2$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente.	1.404x10 ⁻⁰⁷	Se rechaza H0 y los niveles de IL-10 al menos un tratamiento es diferente, con una confianza del 95%.

Como 1.404x10⁻⁰⁷ < 0.05, se rechaza H0 y los niveles de IL-10 en al menos un tratamiento es diferente, con una confianza del 95%. Por lo tanto, los niveles de IL-10 de los tratamientos no son constantes.

9.27.2.4 Método de Fisher-LSD para IL-10 en hígado

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

```

$groups
      IL10 groups
Berro      24.8690      a
BerroLacto 11.0174      b
Lactos      9.0134      b
OchoS       0.9799      c
Intacto     0.8741      c
CuartaS     0.4061      c
    
```

Imagen 41 Test de Fisher-LSD para IL-10 en hígado (qPCR)

Tabla 138 Interpretación del método de Fisher-LSD para IL-10 en hígado (qPCR)

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{BL}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{Int}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S e intacto son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_{8S}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y 8S son iguales.
$H_0: \mu_{4s} = \mu_L$	Se rechaza H_0	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_L$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son iguales.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son diferentes.
$H_0: \mu_{BL} = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro-Lacto y 8S son diferentes.
$H_0: \mu_L = \mu_B$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos y Berro son diferentes.
$H_0: \mu_L = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lactos e intacto son diferentes.
$H_0: \mu_L = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Lacto y 8S son diferentes.
$H_0: \mu_B = \mu_{Int}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro e Intacto son diferentes.
$H_0: \mu_B = \mu_{8S}$	Se rechaza H_0	Los tratamientos Berro y 8S son diferentes.
$H_0: \mu_{Int} = \mu_{8s}$	No se rechaza H_0	Los tratamientos Intacto y 8S son iguales.

El tratamiento de Berro es diferente a todos los demás. Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son iguales. Los tratamientos 8S, 4S e intacto, son iguales. Con una confianza del 95%

9.27.2.5 Gráfico para IL-10 en hígado

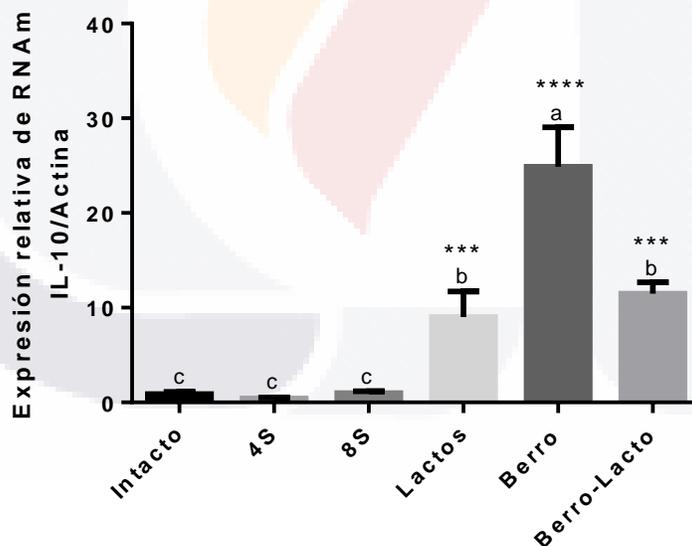


Figura 100 Expresión de IL-10 en hígado (qPCR) Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto ($n=17$).

9.27.3 Colágena en hígado por qPCR

ANOVA para Colágena en hígado

9.27.3.1 Verificación de supuestos de ANOVA para Colágena en hígado

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 139 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de colágena en hígado (qPCR)

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.9879 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.8896 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

9.27.3.2 Tabla ANOVA para Colágena en hígado

Analysis of Variance Table

```

Response: Col
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Tx          5  51.961  10.3921   63.569 9.662e-08 ***
Residuals 11   1.798   0.1635
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

Imagen 42 ANOVA de colágena en hígado (qPCR)

9.27.3.3 Interpretación de ANOVA para Colágena en hígado

Tabla 140 Interpretación de ANOVA de colágena en hígado (qPCR)

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1^2 = \mu_2^2 = \mu_3^2 = \mu_4^2 = \mu_5^2 = \mu_6^2$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente.	9.662x10 ⁻⁰⁸	Se rechaza H0 y la expresión relativa de colágena en hígado es diferente al menos en un tratamiento, con una confianza del 95%.

Como $9.662 \times 10^{-08} < 0.05$, se rechaza H0 y la expresión relativa de colágena en hígado es diferente al menos en un tratamiento, con una confianza del 95%.

9.27.3.4 Método de Fischer-LSD para Colágena en hígado

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

\$groups		Col groups
BerroLacto	6.742200	a
CuartaS	4.057833	b
OchoS	3.700767	bc
Lactos	3.173567	c
Berro	1.365533	d
Intacto	1.051133	d

Imagen 43 Test Fisher-LSD para colágena en hígado (qPCR)

Tabla 141 Interpretación del método de Fisher-LSD para colágena en hígado (qPCR)

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H₀: μ_{4s}=μ_{BL}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son diferentes.
H₀: μ_{4s}=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
H₀: μ_{4s}=μ_B	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
H₀: μ_{4s}=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y 8S son iguales.
H₀: μ_{4s}=μ_L	Se rechaza H ₀	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_L	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_B	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son diferentes.
H₀: μ_{BL}=μ_{8S}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son diferentes.
H₀: μ_L=μ_B	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos y Berro son diferentes.
H₀: μ_L=μ_{Int}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Lactos e intacto son diferentes.
H₀: μ_L=μ_{8S}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Lacto y 8S son iguales.
H₀: μ_B=μ_{Int}	No se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
H₀: μ_B=μ_{8S}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Berro y 8S son diferentes.
H₀: μ_{Int}=μ_{8s}	Se rechaza H ₀	Los tratamientos Intacto y 8S son diferentes.

El tratamiento de BerroLacto se comporta diferente a todos los demás. Los tratamientos 8S y 4S son iguales; los tratamientos 8S y Lactos son iguales; los tratamientos Berro e intacto, son iguales. Con una confianza del 95%.

9.27.3.5 Gráfico para Colágena en hígado

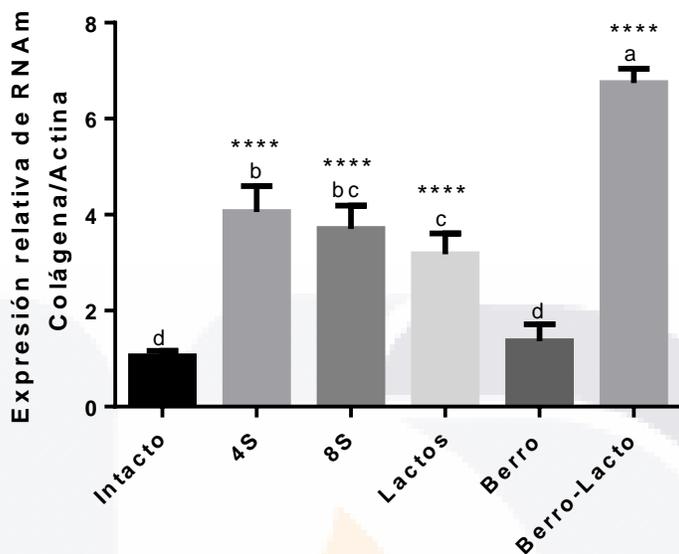


Figura 101 Expresión de colágena en hígado (qPCR) Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media ± DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ para todos los tratamientos comparados con el intacto (n=17).

9.27.4 IL-10 en intestino

A continuación, se muestra la tabla con los datos obtenidos de la expresión relativa de IL-10 en intestino

Tabla 142 Datos de IL-10 en intestino (qPCR)

Grupo	Expresión relativa
	IL-10
Intacto 1	1.217291
Intacto 2	1
Intacto 3	0.964139
4S 1	0.369196
4S 2	0.383535
4S 3	0.372285
Lacto 1	1.923198
Lacto 2	1.577733
Lacto 3	0.834713
Berro 1	1.003943
Berro 2	0.73089
Berro 3	0.971294
8s 1	0.252146
8s 2	0.475757
8s 3	0.439827
BerroLacto 1	1.776093
BerroLacto 2	1.150564

ANOVA para IL-10 en intestino

9.27.4.1 Verificación de supuestos de ANOVA para IL-10 en intestino

Se verifican los supuestos del modelo por medio de hipótesis con una confianza del 95%. ($\alpha=0.05$).

Tabla 143 Verificación de supuestos para realizar el ANOVA de IL-10 en intestino (qPCR)

Supuesto	Hipótesis	Valor p	Conclusión
Normalidad	H0: siguen una distribución normal. H1: no siguen una distribución normal.	0.8486 (Kolmogorov-Smirnov)	No se rechaza Ho, los datos siguen una distribución normal, con una confianza del 95%
Homocedasticidad	H0: Igualdad de varianzas $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2 = \sigma_6^2$ H1: Al menos una varianza diferente	0.1959 (Levene's test)	No se rechaza Ho, existe homocedasticidad en los pesos entre los tratamientos, con una confianza del 95%

9.27.4.2 Tabla ANOVA para IL-10 en intestino

Analysis of Variance Table

```

Response: IL10
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Tx          5  3.1913  0.63827    7.557 0.002654 **
Residuals 11  0.9291  0.08446
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

Imagen 44 ANOVA de IL10 en intestino (qPCR)

9.27.4.3 Interpretación de ANOVA para IL-10 en intestino

Tabla 144 Interpretación de ANOVA de IL10 en intestino (qPCR)

Hipótesis	Valor p	Conclusión
H0: $\mu_1^2 = \mu_2^2 = \mu_3^2 = \mu_4^2 = \mu_5^2 = \mu_6^2$ H1: al menos hay un grupo con peso diferente.	0.002654	Se rechaza H0 y la expresión relativa de colágena en hígado es diferente al menos en un tratamiento, con una confianza del 95%.

Como $0.002654 < 0.05$, se rechaza H0 y la expresión relativa de IL-10 en intestino es diferente al menos en un tratamiento, con una confianza del 95%.

9.27.4.4 Método de Fischer-LSD para IL-10 en intestino

Para conocer las diferencias, se utiliza método de Fisher-LSD con un nivel de confianza de 95%.

```

$groups
          IL10 groups
BerroLacto 1.4633285    a
Lactos     1.4452147    a
Intacto    1.0604767    a
Berro      0.9020423   ab
OchoS      0.3959100   bc
CuartaS    0.3750053    c
    
```

Imagen 45 Test Fisher-LSD para IL-10 en intestino (qPCR)

Tabla 145 Interpretación del método de Fisher-LSD para colágena en hígado (qPCR)

Hipótesis	Método de Fisher	Conclusiones con una confianza del 95%
H0: $\mu_{4s} = \mu_{BL}$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Berro-Lacto son diferentes.
H0: $\mu_{4s} = \mu_{Int}$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S e intacto son diferentes.
H0: $\mu_{4s} = \mu_B$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Berro son diferentes.
H0: $\mu_{4s} = \mu_{8S}$	No se rechaza H0	Los tratamientos 4S y 8S son iguales.
H0: $\mu_{4s} = \mu_L$	Se rechaza H0	Los tratamientos 4S y Lactos son diferentes.
H0: $\mu_{BL} = \mu_L$	No se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto y Lactos son iguales.
H0: $\mu_{BL} = \mu_B$	No se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto y Berro son iguales.
H0: $\mu_{BL} = \mu_{Int}$	No se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto e intacto son iguales.

H0: $\mu_{BL}=\mu_{8S}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Berro-Lacto y Control positivo 8 semanas son diferentes.
H0: $\mu_L=\mu_B$	No se rechaza H0	Los tratamientos Lactos y Berro son iguales.
H0: $\mu_L=\mu_{Int}$	No se rechaza H0	Los tratamientos Lactos e intacto son iguales.
H0: $\mu_L=\mu_{8S}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Lacto y 8S son diferentes.
H0: $\mu_B=\mu_{Int}$	No se rechaza H0	Los tratamientos Berro e Intacto son iguales.
H0: $\mu_B=\mu_{8S}$	No se rechaza H0	Los tratamientos Berro y 8S son iguales.
H0: $\mu_{Int}=\mu_{8s}$	Se rechaza H0	Los tratamientos Intacto y 8S son diferentes.

Los tratamientos de BerroLacto, Lactos, Intacto y Berro son iguales. Los tratamientos Berro y 8S son iguales; los tratamientos 8S y 4S son iguales. Con una confianza del 95%.

9.27.4.5 Gráfico para IL-10 en intestino

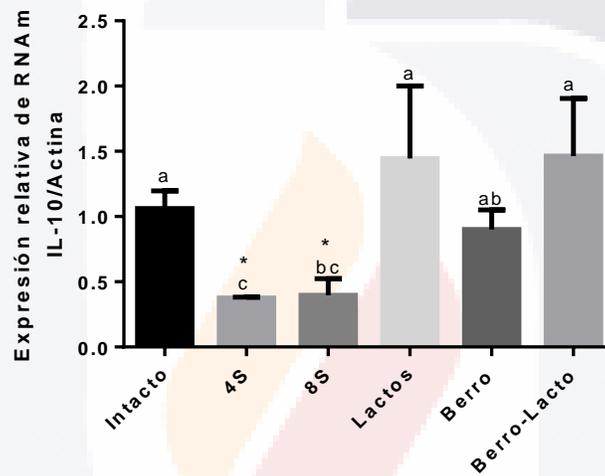


Figura 102 Expresión de IL-10 en intestino (qPCR) Los datos se evaluaron con Fischer-LSD, letras iguales son estadísticamente iguales, los valores son expresados con la media \pm DS. * $p < 0.05$ para todos los tratamientos comparados con el intacto (n=17).

9.28 Datos de área total y área obtenida de colágena total en hígado e intestino

Tabla 146 Área total de colágena en hígado e intestino (análisis morfométrico)

Grupo y rata	área de colágena Hígado	área de colágena Intestino	Área total (µm ²)
4s1	38184.098	173283.71	2298375.34
4s2	10545.129	55859.09	2298375.34
4s3	18520.45	69106.18	2298375.34
INTACTO 1	8163	216.539	2298375.34
IntACTO 2	5766.942	8495.97	2298375.34
IntACTO 3	4378.545	116095.134	2298375.34
8S 1	13801.174	44559.26	2298375.34
8S 2	66867.549	24209.374	2298375.34
8S 3	42839.686	137322.321	2298375.34
LACTO 1	47587.621	82122.4	2298375.34
LACTO 2	34501.343	82458.355	2298375.34
LACTO 3	46753.308	46339.338	2298375.34
LACTO 4	81378.844	98010.946	2298375.34
NL 1	47694.298	38400.637	2298375.34
NL 2	14492.188	49612.897	2298375.34
NL 3	13302.816	35783.063	2298375.34
BERRO 1	13976.316	79253.259	2298375.34
BERRO 2	38391.084	27850.731	2298375.34
BERRO 3	19714.598	56682.257	2298375.34
BERRO-LACTO 1	26309.483	31662.454	2298375.34
BERRO-LACTO 2	68254.354	97781.67	2298375.34

9.29 Datos de área total y área obtenida de la colágena tipo I en hígado e intestino

Tabla 147 Colágena tipo I y sus porcentajes en hígado e intestino, analizada en laminillas a rojo sirio por morfometría con ImageJ

Rojo Sirio	Hígado	Intestino	Área total (µm ²)	% Fibrosis H	% Fibrosis I
4s 1	5342.216	41428.33	148924.264	3.59	27.82
4s 2	1608.999	11753.041	148924.264	1.08	7.89
4s 3	4604.26	32623.196	148924.264	3.09	21.91
Intacto 1	5507.181	33162.452	148924.264	3.70	22.27
Intacto 2	1205.924	7308.382	148924.264	0.81	4.91
Intacto 3	989.169	51308.16	148924.264	0.66	34.45
8S 1	10893.810	115905.265	148924.264	7.32	19.21
8S 2	15329.237	2775.64	148924.264	10.29	1.86
8S 3	6466.948	25670.519	148924.264	4.34	17.24
L 1	9143.575	10447.157	148924.264	1.52	7.02
L 2	3332.728	7968.63	148924.264	2.24	5.35
L 3	2799.7762	7071.099	148924.264	1.88	4.75
L 4	5882.5084	40340.403	148924.264	3.95	27.09
NL 1	5687.767	7662.438	148924.264	3.82	5.15
NL 2	2012.636	17166.568	148924.264	1.35	11.53
NL 3	9937.834	20536.436	148924.264	6.67	13.79
B 1	6214.061	8908.458	148924.264	4.18	5.98
B 2	4668.399	21946.591	148924.264	3.13	14.74
B 3	6132.096	32714.176	148924.264	4.12	21.97
BL 1	6944.516	42485.09	148924.264	4.66	28.53
BL 2	10015.826	6782.755	148924.264	6.725	4.55

9.30 Datos de área total y área obtenida de la colágena tipo III en hígado e intestino

Tabla 148 Área total de colágena tipo III por morfometría con ImageJ

RS/20x	Hígado	Intestino	Área total (µm ²)	% Fibrosis H	% Fibrosis I
4s 1	4881.264	37627.332	148924.264	3.28	25.27
4s 2	4799.04	20745.734	148924.264	3.22	13.93
4s 3	2160.12	42115.219	148924.264	1.45	28.28
Intacto 1	9432.909	41537.275	148924.264	6.33	27.89
Intacto 2	883.732	6626.651	148924.264	0.59	4.45
Intacto 3	671.207	50939.027	148924.264	0.45	34.20
8S 1	3237.497	66454.509	148924.264/ 603433.413 (intestino a 10x)	2.17	11.01
8S 2	7968.859	24858.202	148924.264	5.35	16.69
8S 3	5349.438	18670.809	148924.264	3.59	12.54
L 1	25277.132	341.578	148924.264/ 603433.413 (intestino a 10x)	4.19	0.23
L 2	1581.305	3158.38	148924.264	1.06	2.12
L 3	4326.615	4813.654	148924.264	2.91	3.23
L 4	4840.039	38150.118	148924.264	3.25	25.62
NL 1	5417.889	2571.89	148924.264	3.64	1.73
NL 2	1516.105	13362.378	148924.264	1.02	8.97
NL 3	9937.834	14031.709	148924.264	6.67	9.42
B 1	5078.317	34565.669	148924.264	3.41	23.21
B 2	2899.541	34565.669	148924.264	1.95	23.21
B 3	3991.170	18945.227	148924.264	2.68	12.72
BL 1	21946.591	23691.205	148924.264	14.74	15.91
BL 2	14471.499	25244.553	148924.264	9.72	16.95

El intestino tanto del control positivo de las 8 semanas de la rata 1, como del grupo Lacto de la rata 1, se midieron a 10 X, mientras que todas las demás mediciones están hechas con las microfotografías de 20x. Los resultados en porcentaje no afectan porque es proporcional al área.