



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**TESIS**

**“Análisis del efecto de la tamsulosina y *Lactococcus lactis* sobre la microbiota y en la permeabilidad intestinal en un modelo de cirrosis hepática en ratas Wistar”**

**PRESENTA**

QFB Silvia Valeria Padilla García

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA**

**TUTORES:**

Dr. Javier Ventura Juárez

Dra. Sandra Luz Martínez Hernández

**INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORA**

Dr. Abraham Loera Muro

Dra. Raquel Guerrero Alba

Aguascalientes, Ags., mayo 2023

**M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**PRESENTE**

Por medio del presente como **CO-TUTOR** designado del estudiante **SILVIA VALERIA PADILLA GARCÍA** con ID **308210** quien realizó la tesis titulado: **ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y *Lactococcus lactis* SOBRE LA MICROBIOTA Y EN LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN UN MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 12 de abril de 2023.**



**Dra. Sandra Luz Martínez Hernández**  
**Co-Tutor de tesis**

*El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres*

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

**M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**PRESENTE**

Por medio del presente como **CO-TUTOR** designado del estudiante **SILVIA VALERIA PADILLA GARCÍA** con ID **308210** número quien realizó la tesis titulado: **ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y *Lactococcus lactis* SOBRE LA MICROBIOTA Y EN LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN UN MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 12 de abril de 2023.**



**Dr. Javier Ventura Juárez**

**Co-Tutor de tesis**

*El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres.*

**M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**PRESENTE**

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **SILVIA VALERIA PADILLA GARCÍA** con ID **308210** número quien realizó la tesis titulado: **ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y *Lactococcus lactis* SOBRE LA MICROBIOTA Y EN LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN UN MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 12 de abril de 2023.**



**Dr. Abraham Loera Muro**  
**Asesor de tesis**

*El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres.*

**M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**PRESENTE**

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **SILVIA VALERIA PADILLA GARCÍA** con ID **308210** número quien realizó la tesis titulado: **ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA TAMSULOSINA Y *Lactococcus lactis* SOBRE LA MICROBIOTA Y EN LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN UN MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 12 de abril de 2023.**



**Dra. Raquel Guerrero Alba**  
**Asesor de tesis**

*El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres*

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 05/04/2023

**NOMBRE:** Silvia Valeria Padilla García **ID ##** \_\_\_\_\_

**PROGRAMA:** Maestría en Ciencias áreas Biotecnología Vegetal o toxicología **LGAC (del posgrado):** Toxicología

**TIPO DE TRABAJO:** (  ) Tesis ( ) Trabajo práctico

**TÍTULO:** Análisis del efecto de la tamsulosina y Lactococcus lactis sobre la microbiota y en la permeabilidad intestinal en un modelo de cirrosis hepática en ratas Wistar  
Se contribuye al conocimiento sobre una nueva propuesta de tratamiento para disminuir la afectación intestinal que se presenta en la cirrosis hepática

**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
- N.A 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
- N.A 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
- N.A 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**  **No**

**FIRMAS**

**Elaboró:**

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

Elisa Marcela Ramírez López  
 Dra. Elisa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Raquel Guerrero Díaz  
 Dra. Raquel Guerrero Díaz

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

**Revisó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Juan Jauregui Piñón  
 Dr. Juan Jauregui Piñón

**Autorizó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Dr. C. Jorge Martín Alférez Chávez  
 Dr. C. Jorge Martín Alférez Chávez

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

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico:..... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para llevar a cabo el posgrado.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Centro de Ciencias Básicas, por brindarme el espacio y las herramientas para el desarrollo de mi proyecto.

Al Bioterio de Crianza e Investigación Científica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, a la encargada MVZ Karen Estefany Sánchez Hernández y MVZ Brenda Verónica Márquez Hermosillo por el apoyo y capacitaciones para el manejo de animales de investigación durante el desarrollo del proyecto.

A mi comité tutorial, por el aprendizaje y apoyo.

Dra. Sandra Luz Martínez Hernández, por su enseñanza y apoyo incondicional durante el proyecto, así como por recibirme con calidez en el laboratorio.

Dr. Javier Ventura Juárez por su enseñanza, paciencia y retroalimentación durante la realización del trabajo.

Dr. Abraham Loera Muro por su apoyo y aprendizaje en la realización del proyecto.

Dra. Raquel Guerrero por las aportaciones y apoyo durante el proyecto.

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega y Dr. Manuel Enrique Ávila Blanco, por el apoyo y aprendizaje para la realización del proyecto.

A mis compañeros Marisol Pacheco Sánchez, Samson Solei y Roberto de Jesús Buendía Delgado por el apoyo y motivación desde el inicio del proyecto.

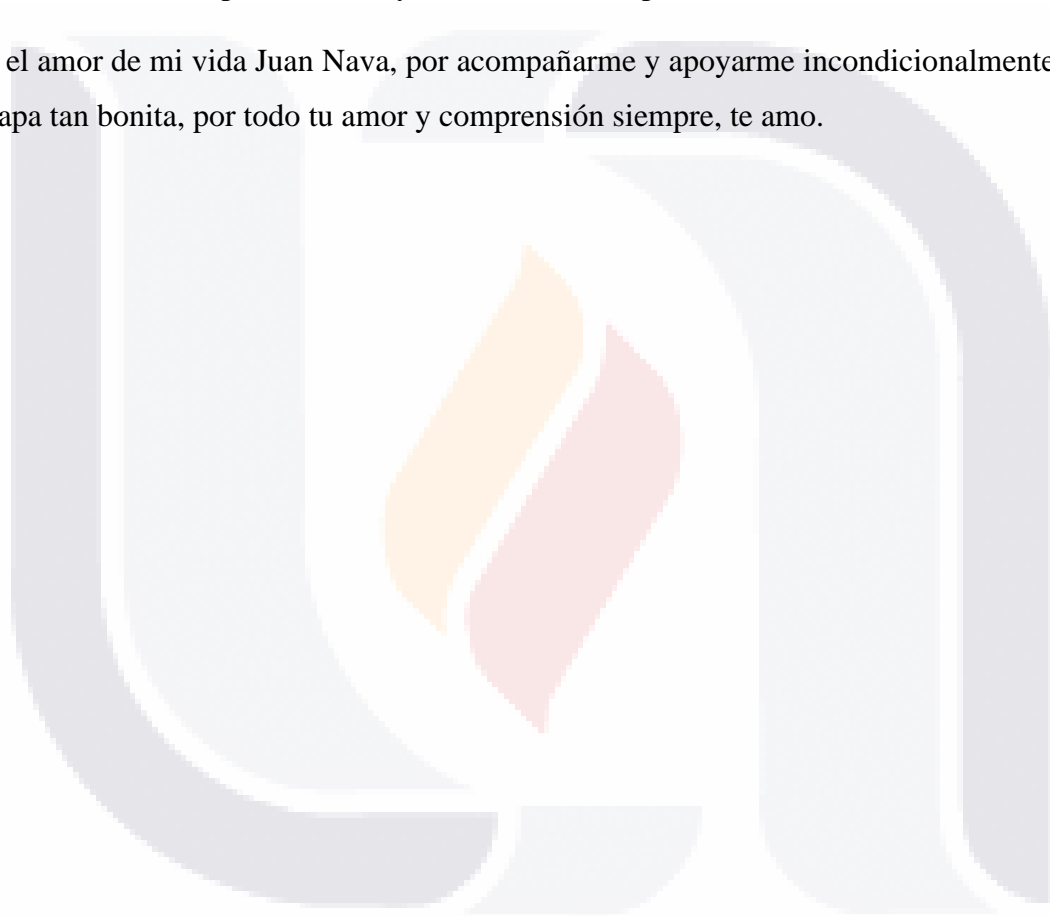
### **DEDICATORIAS**

Con todo mi cariño a mis papás Silvia García Falcón y Gerardo Martín Padilla, por creer en mí, y apoyarme en esta etapa que fue de las más importantes en mi vida tanto profesional y personal, por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermano Gerardo Salvador Padilla García, por apoyarme en la distancia y por tu cariño.

A mi tía Carmelita por su cariño y bendiciones siempre.

A el amor de mi vida Juan Nava, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en esta etapa tan bonita, por todo tu amor y comprensión siempre, te amo.





## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
1.1 INTESTINO: <i>ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN</i> .....	12
<b>2. AFECTACIÓN INTESTINAL DURANTE LA CIRROSIS HEPÁTICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 COMUNICACIÓN EJE INTESTINO-HÍGADO.....	15
2.2 ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL .....	17
2.3 CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	19
2.3.1 <i>Disbiosis</i> .....	21
2.3.2 <i>Translocación bacteriana</i> .....	22
2.3.3 <i>Inflamación intestinal como consecuencia de la cirrosis hepática</i> .....	23
<b>3. FARMACOTERAPIA ACTUAL PARA LA CIRROSIS HEPÁTICA .....</b>	<b>24</b>
3.1 ANTAGONISTA DEL RECEPTOR ALDOSTERONA .....	24
3.2 BETA BLOQUEADORES ADRENÉRGICOS.....	25
3.3 ESTIMULADORES DEL TRÁNSITO INTESTINAL.....	26
3.4 ANTIBIÓTICOS .....	26
<b>4. NUEVAS PROPUESTAS DE TRATAMIENTO PARA LA CIRROSIS HEPÁTICA.....</b>	<b>28</b>
4.1 ANTIOXIDANTES .....	28
4.2 ALFA-BLOQUEADORES .....	29
4.3 PROBIÓTICOS.....	30
4.3.1 <i>Lactococcus lactis</i> .....	31
<b>5. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>6. HIPÓTESIS .....</b>	<b>34</b>
<b>7. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
7.1 GENERAL .....	34
7.2 ESPECÍFICOS .....	34
<b>8. METAS .....</b>	<b>34</b>
<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
9.1 MODELO ANIMAL .....	35
9.2 MODELO DE INDUCCIÓN DE CIRROSIS HEPÁTICA CON CCL <sub>4</sub> EN RATA WISTAR .....	35
9.3 TRATAMIENTO CON TAMSULOSINA Y <i>L. LACTIS</i> .....	36
9.3.1 <i>Condiciones de cultivo para Lactococcus lactis</i> .....	36
9.4 EVALUACIÓN DE LA ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN EL MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATA WISTAR .....	37
9.4.1 <i>Estudio histopatológico del intestino grueso</i> .....	37
9.4.2 <i>Análisis de Inmunofluorescencia para la detección de ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en intestino grueso</i> .....	38
9.4.3 <i>Análisis por RT-qPCR para ZO-1, Ocludina, Claudina-2 y MUC2</i> .....	39
9.4.4 <i>Retrotranscripción de ARN</i> .....	39
9.4.5 <i>Análisis por PCR en tiempo real</i> .....	40

9.4.6	<i>Análisis por Western blot de la expresión de ZO-1, Ocludina y Claudina-2</i>	41
9.5	EVALUACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA (TB)	43
9.5.1	<i>Análisis microbiológico para detectar la presencia de bacterias en GLM, hígado y bazo</i>	43
9.5.2	<i>Detección de ADN bacteriano en muestras de sangre</i>	43
9.5.3	<i>Detección de endotoxina (LPS) en muestras de sangre mediante el método LAL</i>	44
9.6	EFFECTO DE LA TAMSULOSINA Y <i>L. LACTIS</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTETSINAL EN EL MODELO DE CIRROSIS HEPATICA.	45
9.6.1	<i>Extracción de ADN de materia fecal</i>	45
9.6.2	<i>Análisis de Secuenciación de nueva generación</i>	45
9.6.3	<i>Análisis de datos con Qiime 2</i>	46
9.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	46
<b>10.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
10.1	EFFECTO DE LA TAMSULOSINA Y <i>L. LACTIS</i> SOBRE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN EL MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS WISTAR.	47
10.1.1	<i>Análisis cualitativo de la expresión de proteínas involucradas en el mantenimiento de la permeabilidad intestinal: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en muestras de intestino grueso</i>	48
10.1.2	<i>Evaluación de la expresión génica de las proteínas de unión estrecha: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en muestras de intestino grueso</i>	49
10.1.3	<i>Análisis por Western blot de las proteínas de unión estrecha: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en muestras de intestino grueso</i>	51
10.2	EFFECTO DE LA TAMSULOSINA Y <i>L. LACTIS</i> SOBRE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA EL MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS WISTAR.	51
10.2.1	<i>Análisis microbiológico para la detección de bacterias en GLM, Bazo e hígado</i>	51
10.2.2	<i>Detección de endotoxinas bacterianas mediante la prueba de amebocitos de Limulus polyphemus (LAL)</i>	53
10.2.3	<i>Detección de ADN bacteriano en muestras de sangre</i>	54
10.3	EFFECTO DE LA TAMSULOSINA Y <i>L. LACTIS</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN RATAS WISTAR: ANÁLISIS METAGENÓMICO	56
10.3.1	<i>Métricas de secuenciación y estructuras generales de la comunidad bacteriana</i>	56
10.3.2	<i>Diversidad bacteriana en el intestino grueso</i>	56
10.3.3	<i>Composición de la comunidad bacteriana</i>	57
<b>11</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>12</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>67</b>
<b>13</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>
<b>14</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>81</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1:** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia. .... **38**

**Tabla 2:** Reactivos para mezcla de reacción para la síntesis de ADNc..... **40**

**Tabla 3:** Condiciones del termociclador para síntesis de ADNc..... **40**

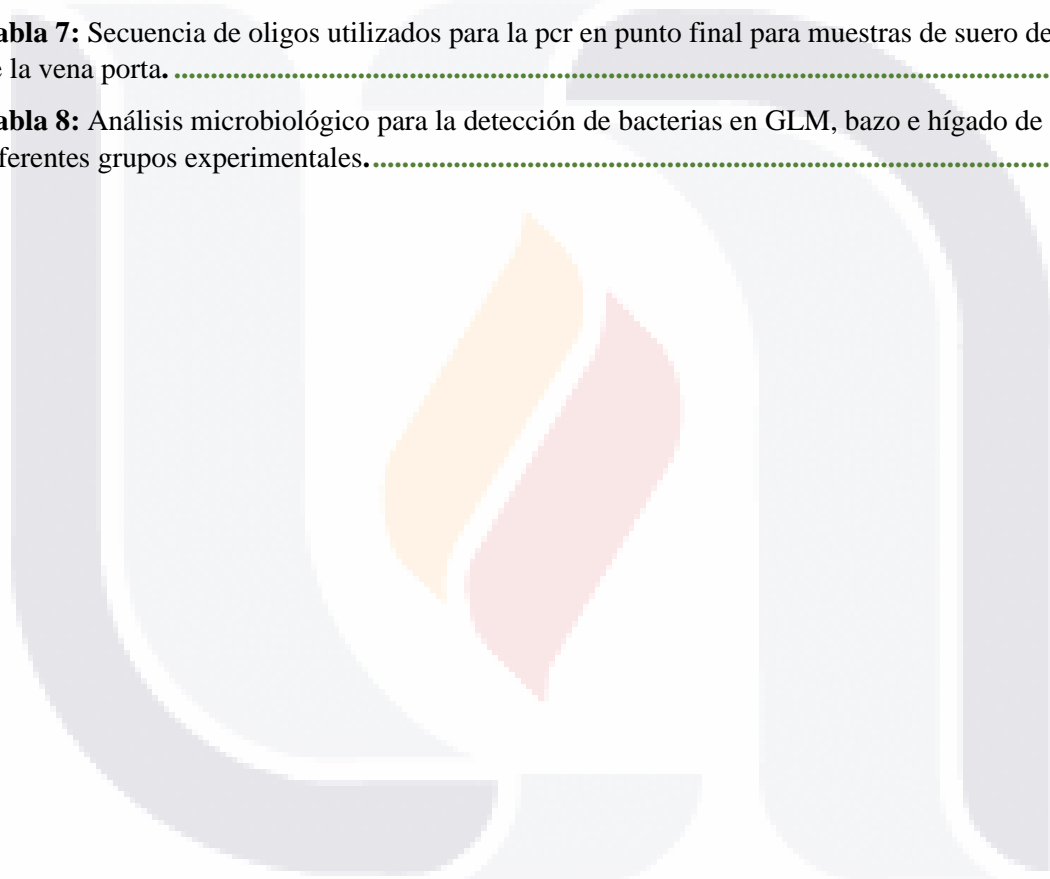
**Tabla 4:** Condiciones utilizadas para la qPCR..... **41**

**Tabla 5:** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de ZO-1, ocludina, claudina-2, y MUC2..... **41**

**Tabla 6:** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western blot. .... **42**

**Tabla 7:** Secuencia de oligos utilizados para la pcr en punto final para muestras de suero de sangre de la vena porta. .... **44**

**Tabla 8:** Análisis microbiológico para la detección de bacterias en GLM, bazo e hígado de los diferentes grupos experimentales..... **53**



**INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1:** Anatomía del intestino delgado y grueso..... 12

**Figura 2.** Conte transversal del intestino..... 13

**Figura 3.** Estructura del intestino. .... 14

**Figura 4.** Comunicación del eje intestino e hígado..... 16

**Figura 5:** Rol de las proteínas de unión estrecha en el estado de salud. .... 18

**Figura 6:** Composición de la microbiota intestinal..... 20

**Figura 7:** Estructura química de la espironolactona. .... 25

**Figura 8:** Estructura del carvedilol. .... 26

**Figura 9:** Estructura del ciprofloxacino..... 27

**Figura 10:** Estructura química y principales fitoconstituyentes de la cúrcuma. .... 28

**Figura 11:** Representación esquemática de la estructura molecular de la tamsulosina..... 30

**Figura 12:** Esquema del protocolo de inducción de cirrosis hepática y del tratamiento utilizado... .. 36

**Figura 13:** Análisis histopatológico de intestino grueso de los diferentes tratamientos..... 47

**Figura 14:** Análisis por inmunofluorescencia de las proteínas de unión estrecha en muestras de intestino grueso..... 49

**Figura 15:** Efecto de los tratamientos *L. lactis* y tamsulosina sobre la expresión de ZO-1, ocludina, claudina-2 y MUC-2. .... 50

**Figura 16:** Análisis por western blot de ZO-1, ocludina y claudina-2 en muestras de intestino grueso de los grupos de tratamiento. .... 52

**Figura 17:** Detección de endotoxina bacteriana en muestras de suero a través del método de LAL..... 54

**Figura 18:** Identificación de adn bacteriano en muestras de sangre mediante PCR. .... 55

**Figura 19:** Análisis de rarefacción..... 56

**Figura 20:** Índices de diversidad alfa y beta de las comunidades bacterianas..... 59

**Figura 21:** Perfiles de comunidades bacterianas en intestino con base a los ASV'S (Secuencias Variantes de Amplicón)..... 61

## ACRÓNIMOS

**ADH:** Alcohol-deshidrogenasa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AGCC:** Ácidos grasos de cadena corta

**ALDH:** Aldehído-deshidrogenasa

**ALT:** Alanina aminotransferasa

**APC:** Células presentadoras de antígenos

**AST:** Aspartato aminotransferasa

**BA:** Ácidos biliares

**BAL:** Bacterias ácidas lácticas

**CCl<sub>4</sub>:** Tetracloruro de carbono

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EH:** Encefalopatía hepática

**FAE:** Epitelio asociado al folículo

**FDC:** Células dendríticas foliculares

**GALT:** Tejido linfoide asociado a intestino

**GLM:** Ganglios linfáticos mesentéricos

**GRAS:** Generally Recognized As Safe

**HPB:** Hipertrofia prostática benigna

**ICC:** Infusión cerebro corazón

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IL:** Interleucina

**ILF:** Folículos linfoides aislados

**INF- $\gamma$ :** Interferón gamma

**JAM:** Moléculas de adhesión de la unión

**K:** Potasio

**LAL:** Lisado de Amebocitos *Limulus*

**LIA:** Agar Lisina Hierro

**LPS:** Lipopolisacáridos

***L. lactis:*** *Lactococcus lactis*

**LTA:** Ácido lipoteicoico

**MDP:** Muramildipéptido

**MIO:** Motilidad.indol.ornitina

**MUC:** mucina-glicoproteína

**Na<sup>+</sup>:** Sodio

**OD:** Densidad óptica

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos

**PBE:** Peritonitis bacteriana espontánea

**PGN:** Péptidoglicanos

**PI:** Permeabilidad intestinal

**PP:** Placas de Peyer

**PRR:** Receptores de reconocimiento de patrones

**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SB:** Small bowel – intestino delgado

**SBI:** Sobrecrecimiento bacteriano intestinal

**SUAVE:** Sistema Único Automatizado para la Vigilancia Epidemiológica

**Sx:** Síndrome

**TB:** Translocación bacteriana

**Th:** Células T helper

**TJ:** Tight junctions – Proteínas de unión estrecha

**T/L. *lactis*:** Tamsulosina/*Lactococcus lactis*

**TLR:** Receptores tipo Toll

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TSI:** Triple azúcar hierro

**Tx:** Tratamiento

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**ZO-1:** Zonula Occludens-1 protein

## RESUMEN

La cirrosis hepática es un problema de salud a nivel mundial. El daño por la cirrosis provoca alteraciones del eje intestino-hígado, induciendo daño en la barrera intestinal, cambios en la composición de la microbiota y translocación bacteriana, factores que destacan en la patogenia de las frecuentes infecciones bacterianas en la cirrosis. En la actualidad, gracias al desarrollo de modelos experimentales de cirrosis hepática se ha desarrollado diversas propuestas de tratamiento, por lo cual el objetivo de este estudio fue analizar si la tamsulosina y *Lactococcus lactis* tienen efectos benéficos sobre la microbiota y permeabilidad intestinal en un modelo de cirrosis hepática inducida por CCl<sub>4</sub>. Se trabajó con ratas macho Wistar de 200-300 g a las cuales se indujeron a cirrosis mediante la administración intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> (0.4g/kg/animal) durante 4 semanas. El tratamiento de tamsulosina (0.8 mg/kg/día) y *L. lactis* (1x10<sup>9</sup> células/ml/día) de forma individual o combinada fue por vía oral durante 2 semanas. Después del tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron muestras biológicas para la evaluación de la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana, modificación de la microbiota intestinal, así como la histopatología del intestino. Los resultados obtenidos muestran que los grupos tratados con tamsulosina y *L. lactis* administrada de forma individual o combinada presentaron mejora en la estructura histológica del intestino y menor disrupción del epitelio intestinal. Respecto a la expresión de las proteínas involucradas en la permeabilidad intestinal (ZO-1, Ocludina y Claudina-2) y MUC-2, se observó que el tratamiento *L. lactis* incrementa ZO-1 y Claudina-2, mientras que Ocludina y MUC-2 se observa incremento en los grupos *L. lactis* y T/*L. lactis*, sugiriendo que el tratamiento disminuye el daño sobre la mucina y permeabilidad intestinal durante la enfermedad. En la evaluación de translocación bacteriana no se detectó, LPS, DNAbac en la circulación sistémica, ni bacterias translocadas en diferentes órganos (GLM, bazo e hígado), indicando que el tratamiento de forma individual y combinada evita el paso de bacterias a sitios extraintestinales. Así mismo, en la evaluación de la composición de la microbiota intestinal el tratamiento con *L. lactis* de manera individual y combinada T/*L. lactis*, mostraron una reducción de las modificaciones de la microbiota intestinal. En conclusión, el tratamiento con tamsulosina y *L. lactis* muestra un efecto terapéutico sobre la afectación intestinal presente durante la cirrosis hepática.



## RESUMEN EN INGLÉS

Liver cirrhosis is a global health problem. The damage caused by cirrhosis causes alterations in the intestine-liver axis, inducing damage to the intestinal barrier, changes in the composition of the microbiota and bacterial translocation, factors that stand out in the pathogenesis of frequent bacterial infections in cirrhosis. At present, thanks to the development of experimental models of liver cirrhosis, various treatment proposals have been developed, for which the objective of this study was to analyze whether tamsulosin and *Lactococcus lactis* have beneficial effects on the microbiota and intestinal permeability in a CCl<sub>4</sub> induced liver cirrhosis model. Male Wistar rats weighing 200-300 g were induced to cirrhosis by intraperitoneal administration of CCl<sub>4</sub> (0.4g/kg/animal) for 4 weeks. Treatment of tamsulosin (0.8 mg/kg/day) and *L. lactis* (1x10<sup>9</sup> cells/ml/day) individually or in combination was orally for 2 weeks. After the treatment, the rats were sacrificed and biological samples were obtained for the evaluation of intestinal permeability, bacterial translocation, modification of the intestinal microbiota, as well as histopathology of the intestine. The results obtained show that the groups treated with tamsulosin and *L. lactis* administered individually or combined presented improvement in the histological structure of the intestine and less disruption of the intestinal epithelium. Regarding the expression of the proteins involved in intestinal permeability (ZO-1, Occludin and Claudin-2) and MUC-2, it was observed that the *L. lactis* treatment increases ZO-1 and Claudin-2, while Occludin and MUC -2 an increase is observed in the groups *L. lactis* and T/*L. lactis*, suggesting that treatment decreases mucin damage and intestinal permeability during illness. In the evaluation of bacterial translocation, LPS, DNAbac in the systemic circulation, or bacteria translocated in different organs (MLG, spleen and liver) were not detected, indicating that individual and combined treatment prevents the passage of bacteria to extraintestinal sites. Likewise, in the evaluation of the composition of the intestinal microbiota, treatment with *L. lactis* individually and combined T/*L. lactis*, showed a reduction in the modifications of the intestinal microbiota. In conclusion, treatment with tamsulosin and *L. lactis* shows a therapeutic effect on intestinal involvement present during liver cirrhosis.

## 1. Introducción

La cirrosis hepática es una enfermedad con consecuencias importantes para el organismo, ésta se desarrolla por diferentes afectaciones hepáticas que propician el proceso inflamatorio. Durante la cirrosis hepática los pacientes exhiben distintas características de disfunción intestinal lo que a su vez pueden contribuir al progreso de las complicaciones de la propia enfermedad y tener un impacto en el estado de salud del paciente (Kalaitzakis, 2014). Las alteraciones que se presentan de forma frecuente en el intestino durante la cirrosis hepática son la alteración en la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana y procesos de endotoxemia, al mismo tiempo un sobrecrecimiento bacteriano provocando un cambio en la conformación de la microbiota comensal proceso denominado disbiosis (Rose et al., 2021). Tanto la endotoxemia como la disbiosis están implicadas en la muerte directa de los hepatocitos, infecciones e inflamación sistémica y vasodilatación que contribuye a la descompensación aguda y fallo orgánico (Trebicka et al., 2021).

Por lo general, los tratamientos utilizados para la cirrosis tienen como objetivo regular las propias complicaciones hepáticas. Los fármacos cotidianamente recomendados son por ejemplo los antagonistas del receptor de aldosterona como la *espironolactona* que promueven la excreción de agua y sodio (Carone et al., 2017), los beta bloqueadores como el *propranolol*, *nadolol*, y *carvedilol* los cuales mejoran el flujo de sangre y disminuyen la presión arterial (Oliver et al., 2019), aquellos que regulan el tránsito intestinal ya sea por estreñimiento o diarrea como *lactulosa* y *rifaximina* (Ford et al., 2018; Mueller-Lissner & Wald, 2010) y por ultimo los antibióticos como *cefotaxime*, *ceftriaxona*, y *ciprofloxacino*, los cuales se administran cuando el paciente desarrolla ascitis y endotoxemia bacteriana (Zhang et al., 2018). Sin embargo, ninguno de estos tratamientos está enfocado en evitar o prevenir las alteraciones intestinales que con llevan a la disbiosis, alteración de la permeabilidad del intestino e inflamación, sin dejar a un lado la afectación hepática.

La tamsulosina pertenece a una clase de medicamentos denominados alfa bloqueadores, su función antagonista es sobre los receptores alfa, dichos receptores se encuentran en músculo liso, y principalmente es usado para síntomas del tracto urinario asociado a la hipertrofia prostática benigna y prostatitis crónica (Dunn, et al, 2002). En la actualidad se han investigado nuevos enfoques terapéuticos de la tamsulosina, donde se ha visto un papel

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

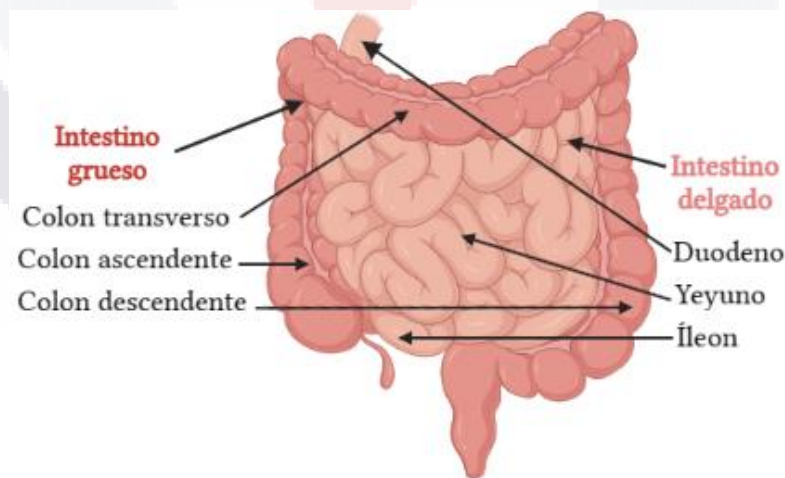
importante de este fármaco en la disminución de la expresión de factores pro-fibrogénicos en modelos de ratón con obstrucción ureteral unilateral (Zuo et al., 2020), así mismo se ha visto que este fármaco puede mitigar el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en la nefropatía diabética (Sun et al., 2021). Por último, se ha visto que la tamsulosina ha tenido efectos favorables en la disminución de la fibrosis, en la remodelación del parénquima hepático y además efectos antioxidantes, esto observado por nuestro grupo de trabajo realizando modelos de rata con cirrosis hepática inducida con CCL<sub>4</sub> (Soleil et al., 2022). No existe evidencias del efecto de la tamsulosina sobre el daño intestinal que se presenta durante la cirrosis hepática, por lo cual es probable que este fármaco pueda ayudar a mitigar algunas complicaciones intestinales asociadas con la cirrosis.

Por otro lado, el uso de probióticos en el tratamiento de las enfermedades hepáticas desempeña un papel importante, debido a su efecto modulador en la microbiota intestinal, al disminuir las endotoxinas e inhibe la adherencia de bacterias (G. Romero, 2016b), al regular la permeabilidad intestinal y la respuesta inmunológica, por esa razón pueden ser eficaces en el tratamiento y prevención de las complicaciones intestinales causadas por la cirrosis (Germán Soriano et al., 2013). De tal modo que la modulación de la microbiota y la permeabilidad intestinal parece ser una herramienta prometedora para un nuevo enfoque terapéutico y de prevención de la cirrosis y sus complicaciones.

En la actualidad gracias al desarrollo de modelos experimentales de cirrosis hepática se ha podido evaluar diversos parámetros clínicos de la enfermedad, y con ello desarrollar diversas propuestas de tratamiento, por lo que en este trabajo se analizó si la tamsulosina y *Lactococcus lactis* tienen efectos benéficos sobre la microbiota y permeabilidad intestinal en un modelo de cirrosis hepática inducida por CCL<sub>4</sub>.

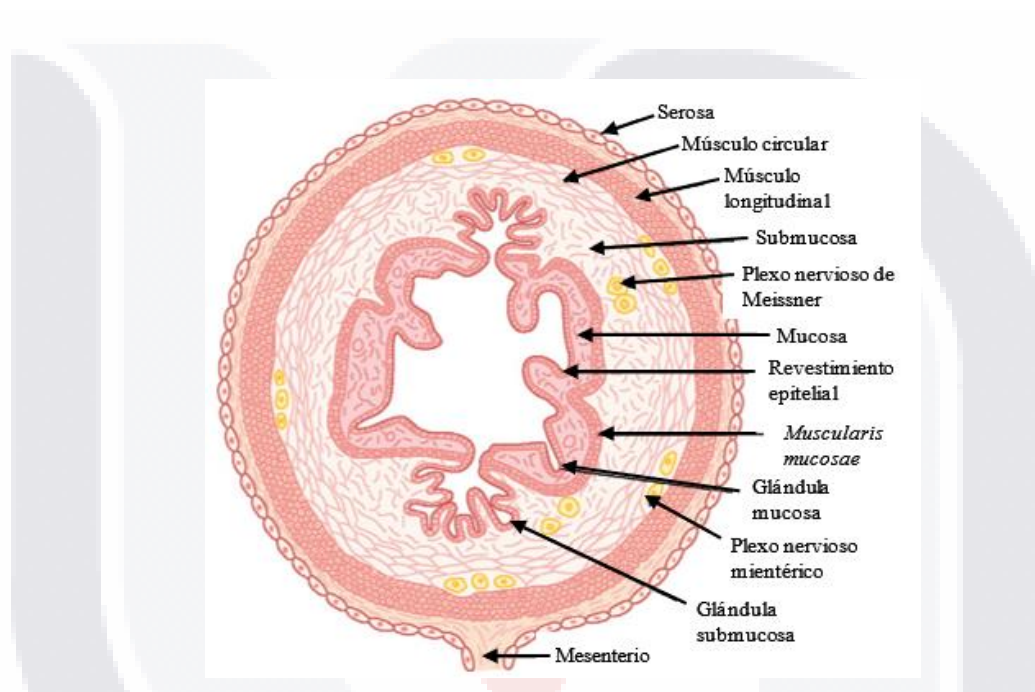
**1.1 Intestino: Estructura y composición**

El intestino es un órgano cuyas funciones son indispensables en el organismo y porta el revestimiento epitelial más amplio del cuerpo, que, a su vez funge como intermediario entre el medio interno y externo del organismo. Además, su función es continuar con el proceso de digestión y absorción selectiva de productos como agua, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, grasas y los distintos electrolitos, además de ser clave para el metabolismo de dichos nutrientes (Guyton & Hall, 2011). El intestino se conforma por el intestino delgado que a su vez tiene tres porciones (duodeno, yeyuno e íleon) y el grueso (ciego, colon y recto) (Fig. 1) (Fox et al., 2011). El intestino delgado desarrolla una gran parte de la absorción de nutrientes. En el duodeno, el alimento triturado en el estómago se mezcla con el jugo pancreático y bilis, que ayudan a facilitar la digestión; el yeyuno cuenta con una estructura óptima que agiliza la absorción de los nutrientes y de casi todos los minerales; en el íleon es donde se lleva mejor la absorción de vitamina B<sub>12</sub> y ácidos biliares. Respecto al intestino grueso, sus funciones principales son de absorción de agua y algunos electrolitos para formar las heces y almacenamiento de materia fecal hasta la excreción. La deshidratación del quimo se lleva a cabo en el colon, se dice que reduce el volumen de agua (1000-1500 ml hasta 100 a 200 ml) y que finalmente es expulsado por el recto (Jameson et al., 2018).



**Figura 1: Anatomía del intestino delgado y grueso.** El intestino delgado se conforma por duodeno, yeyuno e íleon, mientras que el intestino grueso se conforma por el ciego, colon (ascendente, transverso y descendente) y recto (figura creada en BioRender.com, acceso 17/ene/2023).

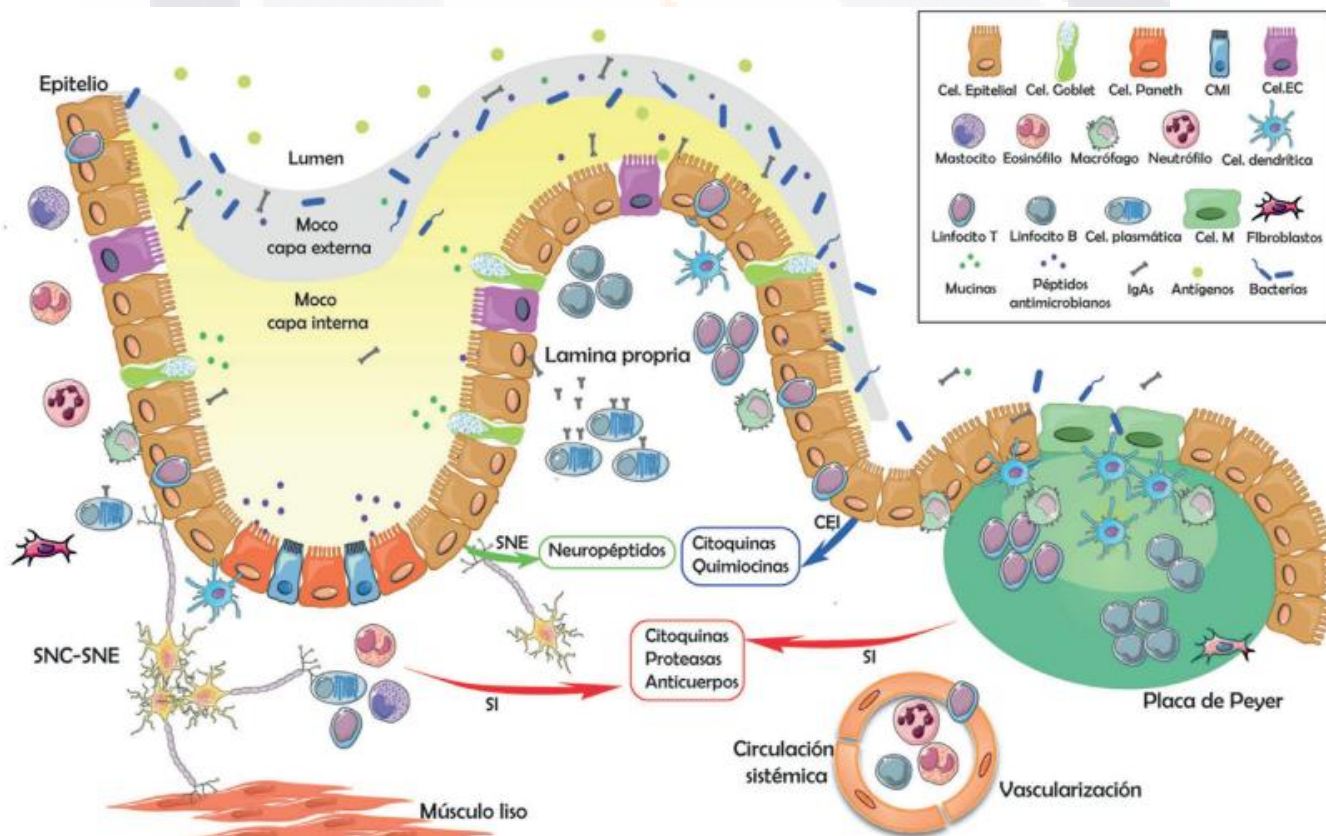
Así mismo, la pared del intestino está constituida por capas perfectamente definidas que ayudan a realizar las diferentes funciones de cada porción; está formada de fuera hacia dentro por las siguientes capas: serosa, capa muscular lisa longitudinal, capa muscular lisa circular, submucosa y mucosa, además, la zona más profunda de la mucosa contiene fibras de músculo liso (*muscularis mucosae*), indispensable para realizar las funciones motoras gastrointestinales (Fig. 2) (Guyton-Hall, 2011;Gómez-Cortés et al., 2015).



**Figura 2. Conte transversal del intestino.** La pared del intestino se forma de fuera a dentro por las siguientes capas: 1) serosa; 2) capa muscular lisa longitudinal; 3) capa muscular lisa circular; 4) submucosa y 5) mucosa. Modificada de Guyton-Hall, 2011.

Ahora bien, la mucosa forma la barrera intestinal, y anatómicamente se conforma por distintos componentes: capa de moco, monocapa de células epiteliales, lamina propia y capas musculares (Salvo-Romero et al., 2015). La capa de moco se encuentra en contacto con los microorganismos, además, el grosor de está es diversa en los distintos segmentos del intestino, aunque es mayor donde se encuentra la microbiota residente como lo es en el íleon y el colon. La monocapa de células epiteliales es conformada por enterocitos, células Goblet, células de Paneth y células madre intestinales, que se mantienen unidas gracias a complejos proteicos que protegen y brindan integridad estructural a la barrera epitelial. Estas proteínas

se clasifican en tres grupos importantes los cuales son: *proteínas de uniones estrechas*, *de uniones de anclaje* y *de uniones comunicantes* (Villanueva et al., 2021). Las proteínas de *uniones estrechas* son primordiales en el mantenimiento de la barrera y polaridad epitelial, esto restringe la difusión de iones y translocación de microorganismos y toxinas (Salvo-Romero et al., 2015). En la lámina propia residen células del sistema inmune como péptidos antimicrobianos secretados por las células de Paneth, células plasmáticas que secretan IgA, y linfocitos B y T, además de células dendríticas y tejido conectivo. En las capas musculares se realiza el proceso de peristaltismo con la finalidad de evacuar el contenido luminal como sustancias tóxicas o patógenas y evitar su permanencia en la luz intestinal (Fig. 3) (Agustín Albillos et al., 2020; Ciaula et al., 2020; Tripathi et al., 2019).



**Figura 3. Estructura del intestino.** Las diferentes capas que conforman la barrera intestinal tienen sus elementos que las distinguen entre ellas. El epitelio intestinal se conforma principalmente por enterocitos, células Goblet encargadas de sintetizar mucina, células de Paneth quienes sintetizan péptidos antimicrobianos, células enterocromafines encargadas de producir hormonas y células madre intestinales. Encima del epitelio intestinal, se encuentra la capa de moco con glucocáliz y posterior la capa de moco agitada donde se encuentra la microbiota, IgA, mucinas y péptidos antimicrobianos. En la lámina propia cuenta con tejido linfático

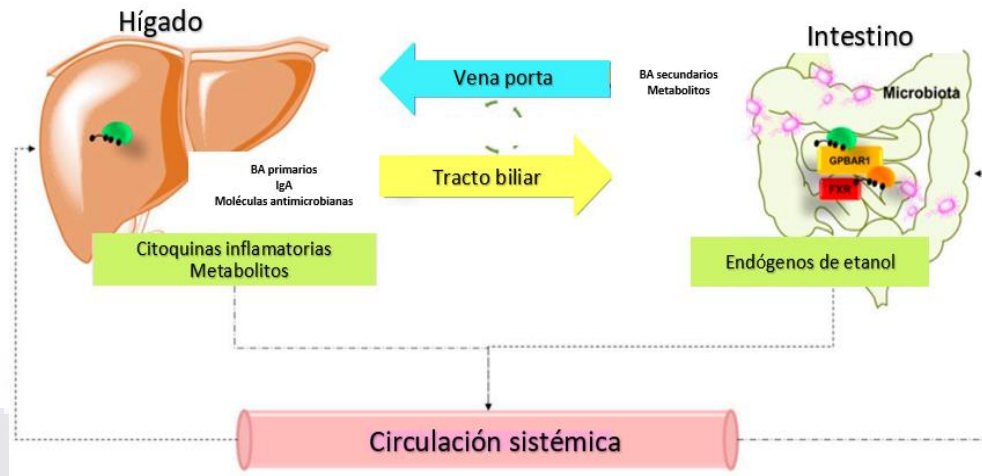
conformado por macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos y en algunas ocasiones neutrófilos (Salvo-romero et al., 2015).

Por lo tanto, la barrera intestinal, es una barrera física de defensa, conformada por diferentes elementos extracelulares y celulares que mantienen una coordinación y hemostasia entre sus componentes, para impedir el paso de toxinas, antígenos y microorganismos (Salvo-Romero et al., 2015).

## **2. Afectación intestinal durante la cirrosis hepática**

### **2.1 Comunicación eje intestino-hígado**

Existe una importante y estrecha comunicación bidireccional entre el intestino e hígado en efecto de las interacciones generadas por factores dietéticos, genéticos y ambientales. Se sabe que hay una dependencia reciproca entre ambos órganos, lo cual explica que, al haber una disrupción de la barrera intestinal, al mismo tiempo induce un flujo considerable de bacterias por circulación portal hasta llegar al hígado, haciendo que las alteraciones del eje intestino-hígado promuevan a un empeoramiento de la enfermedad hepática (Agustín Albillos et al., 2020). Como se mencionó anteriormente la cirrosis hepática es inducida por varios factores, que a su vez presentan diferentes mecanismos fisiopatológicos en el desarrollo de la enfermedad. La manera que se da la comunicación en el eje intestino-hígado es por medio del tracto biliar, la vena porta, la circulación sistémica y una serie de mediadores sistémicos. La interacción es bidireccional, ya que los productos derivados del intestino penetran en la vena porta pasando al hígado, mientras que los ácidos biliares primarios y algunas otras moléculas secretadas por el hígado fluyen hacia el tracto biliar, después llegan a la luz intestinal e inhiben el crecimiento bacteriano intestinal (Fig. 4) (Agustín Albillos et al., 2020)



**Figura 4. Comunicación del eje intestino e hígado.** Los productos secretados por el hígado como ácidos biliares primarios y diversas moléculas transitan por tracto biliar, al llegar a la luz intestinal contribuyen a inhibir el crecimiento bacteriano. Los productos intestinales como metabolitos del huésped y bacterianos, fluyen a través de la vena porta hasta llegar al hígado, de esta forma pueden influir en las funciones hepáticas. Modificada de (Ciaula et al., 2020).

El intestino alberga productos derivados del metabolismo del huésped y de los microorganismos presentes, así como ácidos biliares secundarios, donde la microbiota participa en la biotransformación de los ácidos biliares. Por lo tanto, todos estos productos se transportan por medio de las venas mesentéricas hacia la vena porta y de ahí llegan al hígado (Ciaula et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, el hígado secreta bilis que a su vez contiene ácidos biliares, y la comida incrementa su secreción. Cuando la bilis llega al intestino durante la comida, los ácidos biliares que retornan al hígado desde el intestino por medio de la vena porta, estimulan al hígado para que secrete más bilis (Fox et al., 2011). El cuerpo humano de manera normal siempre cuenta con una reserva de ácidos biliares, la cual depende de la síntesis de ácidos biliares hepáticos, secreción biliar, tránsito intestinal, la biotransformación, reabsorción de la microbiota y la excreción fecal. Cuando el organismo se encuentra en ayuno, la bilis fluye desde el hígado en dirección a la vesícula biliar donde se mantiene conservada. Alrededor del 95% de ácidos biliares se reabsorben en la vena porta, sin embargo, los ácidos biliares restantes ingresan al colon y sufren una biotransformación a



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ácidos biliares secundarios por acción de la microbiota intestinal residente (Ciaula et al., 2020).

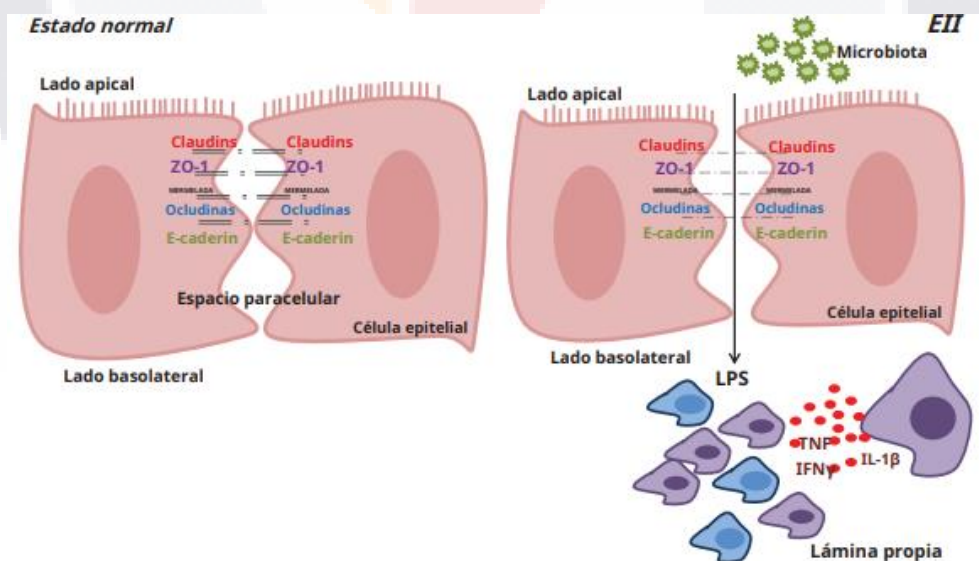
Además, los ácidos biliares tienen propiedades antimicrobianas, ya que eluden proliferación de microorganismos y aportan protección contra patógenos (Ciaula et al., 2020), y ayudan a prevenir la translocación bacteriana, ya que inhiben el crecimiento de microorganismos, también ejercen un efecto trófico sobre la mucosa intestinal, es decir, producen una ausencia de nutrientes provocando la atrofia de vellosidades intestinales y ayuda a neutralizar las endotoxinas. Cuando la cirrosis hepática está en progresión la síntesis de ácidos biliares en el hígado disminuye y esto favorece al crecimiento de microorganismos patógenos (Fukui, 2015), los cuales cuando progresa la enfermedad, estos pueden translocarse del intestino hacia regiones extraintestinales provocando grave disfunción multiorgánica, predisponer a insuficiencia hepática aguda, síndrome hepato-renal y encefalopatía hepática (Wiest et al., 2014).

## **2.2 Alteración de la permeabilidad intestinal**

Cuando el eje intestino-hígado se encuentra en comunicación estable, existe un equilibrio bidireccional en dicho eje, pero cuando hay presencia de enfermedad como es el caso de la cirrosis hepática, esta promueve una serie de complicaciones (Ciaula et al., 2020). Como se mencionó anteriormente, durante la cirrosis el hígado comienza a secretar menor cantidad de ácidos biliares primarios, los cuales favorecen la proliferación de microorganismos. Hay que mencionar, que la cirrosis por alcohol involucra de manera activa a la microbiota intestinal, de manera que el alcohol incrementa el crecimiento de bacterias Gram negativas, al mismo tiempo, dichas bacterias Gram negativas metabolizan el etanol en acetaldehído, y este producto incrementa la permeabilidad intestinal (G. Romero, 2016a). Por lo tanto, el sobrecrecimiento bacteriano, la disbiosis e inflamación intestinal son los principales factores que perturban la permeabilidad (Tripathi et al., 2019).

Cuando hay disrupción intestinal existe pérdida de la integridad anatómica y funcional de la barrera intestinal. Al ser permeable favorece el paso de moléculas y de bacterias al organismo por medio del sistema venoso entérico, vía vena porta y ganglios

linfáticos mesentéricos (GLM) (Lorenzo et al., 2007; Germán Soriano et al., 2013). Anteriormente mencionado, la barrera intestinal está conformada por células epiteliales formando una barrera permeable y muy selectiva, esta función se desarrolla gracias a las proteínas que unen los espacios intracelulares (Gómez-Cortés et al., 2015). Estas proteínas conocidas como *uniones estrechas* o TJ por sus siglas en inglés, son proteínas que dentro de sus principales funciones es sellar la membrana y regula el paso de iones y proteínas desde el lumen, además, son clave en la regulación de la permeabilidad intestinal, así como para aumentar la protección en la barrera intestinal contra agentes externos. Una alteración o modificación en la expresión y función de las proteínas de unión estrecha, es un factor que puede provocar la disrupción de la barrera intestinal (Gómez-Cortés et al., 2015; Silva et al., 2019). Las proteínas de *uniones estrechas* son complejos transmembrana que se encargan principalmente de sellar espacios entre las células, dentro de estas proteínas se encuentran las *occludinas* y *claudinas* con localización membranal y las *zonulinas* ubicadas en el citoplasma, dentro de sus funciones son el mantenimiento de la barrera y polaridad epitelial, lo cual restringe la difusión de iones y translocación de microorganismos y toxinas (Fig. 5) (D. Díaz et al., 2015; Salvo-romero et al., 2015).



**Figura 5: Rol de las proteínas de unión estrecha en el estado de salud.** En condiciones normales, el epitelio intestinal expresa proteínas de unión estrecha en el espacio intracelular. En la enfermedad hepática, la barrera intestinal se ve comprometida, la ausencia o disminución de estas proteínas tiene un rol importante en conservar la integridad de la barrera intestinal (Castoldi et al., 2015).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Es necesario enfatizar que las uniones estrechas son clave fundamental en la regulación de la permeabilidad del intestino por medio de su naturaleza dinámica y una alteración de estos componentes conlleva a la alteración funcional de la mucosa intestinal, estrés oxidativo y aumento de peroxidación lipídica (Aceves-Martins, 2014; Mesejo et al., 2008; Muñoz & Albillos, 2008). La importancia de estas proteínas se ha demostrado en varios modelos *in vivo*, donde Serek et al. (2021), mostraron en ratones transgénicos, que la degradación de las proteínas de unión estrecha promueve un aumento en la permeabilidad intestinal.

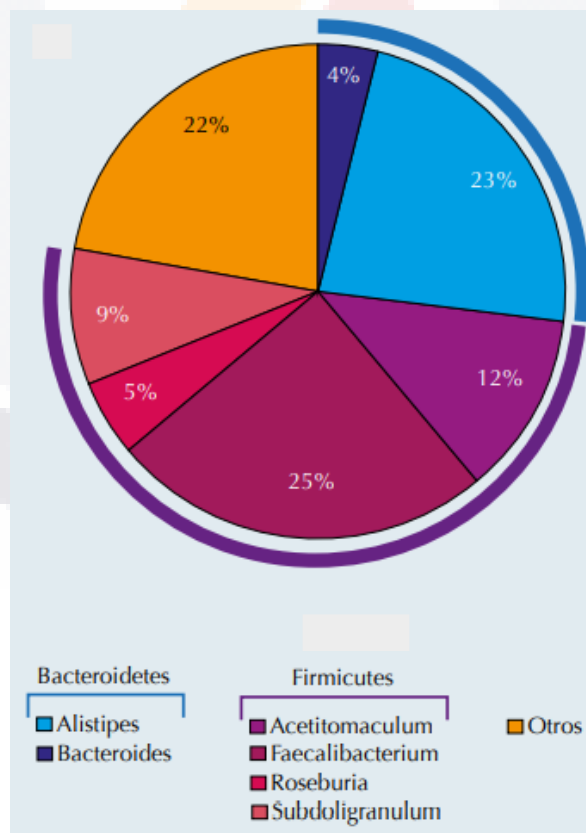
### **2.3 Cambios en la composición de la microbiota intestinal**

La microbioma o microbiota intestinal está formada por una comunidad microbiana abundante y diversa, que además es un sistema ecológico complejo. Así mismo, participa en producción de vitaminas, condiciones fisiológicas, transformación de ácidos biliares, digestión de nutrientes y brinda inmunidad local y general (Cesaro et al., 2011; Jameson et al., 2018). La microbiota intestinal ejerce una barrera de defensa contra la invasión de patógenos, ya que el equilibrio que existe en las bacterias residentes se opone a que los microorganismos exógenos y oportunistas colonicen (G. Romero, 2016a). Puede agregarse que la microbiota ayuda a preservar la integridad de la monocapa epitelial por medio de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ya que estos ácidos grasos son la principal fuente de energía para las células intestinales, además, la cantidad de ácidos grasos de cadena corta son indispensables para la inmunorregulación del hospedero (Icaza-Chávez, 2013). Además, investigaciones previas afirman que el 99.1% de la población microbiana intestinal está constituida por aproximadamente unas 1000 especies bacterianas diferentes las cuales que son muy susceptibles a las alteraciones fisiopatológicas y ambientales (Gómez-Hurtado et al., 2016). Durante los primeros años de vida, la dieta es el principal factor que determina la microbiota, más tarde, dicha composición de la microbiota depende en gran medida de la edad, medicamentos y medio ambiente (Milosevic et al., 2019).

La microbiota intestinal está conformada principalmente por microorganismos comensales del *phylum Firmicutes* con un 60%, *Bacteroidetes* 15-20%, *Actinobacteria* <10% y *Proteobacteria* con el 1%, esta proporción puede variar dependiendo de la alimentación, y

enfermedades como la cirrosis hepática (Fig. 6). Hay estudios donde reportan que a nivel *phylum* *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* incrementan significativamente en la cirrosis hepática, en contraste con *Firmicutes* y *Actinobacteria* que disminuyen en la enfermedad. En cuanto a nivel familia *Campylobacter* y *Gemella* incrementan en la cirrosis (Pérez-Monter et al., 2019), en otras palabras, un desequilibrio en la composición de la población microbiana normal, predispone a un estado de disbiosis intestinal (Castañeda Guillot, 2018).

Los microorganismos residentes de la microbiota intestinal (bacterias, hongos y virus) se encuentran en simbiosis entre sí, y actualmente se reconoce que la microbiota tiene un papel clave en la patogenia de diversas enfermedades como: depresión, cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal, carcinoma colorrectal, síndrome de intestino irritable, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades renales y enfermedades hepáticas (Milosevic et al., 2019). Por lo tanto, las alteraciones de la microbiota intestinal son pieza importante en la patogénesis y progresión del daño hepático (Cesaro et al., 2011).



**Figura 6: Composición de la microbiota intestinal.** Modificada de (Zamudio-Vázquez et al., 2017).

### 2.3.1 Disbiosis

La disbiosis se define como la alteración de la composición y/o funciones de los microorganismos comensales que habitan en el intestino. Cuando existe un desequilibrio intestinal causado principalmente por factores ambientales tales como la dieta, algunas toxinas, drogas y agentes patógenos se promueve un estado de disbiosis (Arce, 2020).

La disbiosis es resultado del deterioro de factores involucrados en la composición de la microbiota intestinal, como lo es una reducción en la motilidad y tránsito intestinal, descenso en los niveles de ácidos biliares primarios ya que tienen propiedades antimicrobianas y eluden el crecimiento bacteriano, incremento en los ácidos biliares secundarios que pueden contribuir a la lesión hepatocelular, y así como un defecto en la inmunidad intestinal (Agustín Albillos et al., 2020; Ciaula et al., 2020; Fukui, 2015).

El crecimiento exacerbado y alteraciones en la población microbiana (disbiosis) es un sello distintivo que promueve inflamación como lo es la colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y cáncer colorrectal, además de comprometer la barrera intestinal (Chopyk & Grakoui, 2020; Weiss & Hennet, 2017). Cabe destacar, que aún no se sabe si la disbiosis ocurre en la primera etapa de la lesión hepática o si es el resultado de una alteración en la función hepática, pero contribuye a la alteración en la permeabilidad intestinal y conduce a la translocación bacteriana (Raj et al., 2019). Por otro lado, el detonante clave para desencadenar la disbiosis es la alteración o daño en las comunidades de la microbiota intestinal, sin embargo, para poder restaurar las especies bacterianas de la microbiota intestinal es mediante terapia con antibióticos, pero también puede ser contraproducente ya que exagera la disbiosis intestinal, predispone a infecciones oportunistas, interrumpe la simbiosis de las bacterias intestinales, además de incrementar el crecimiento bacteriano (Sinha et al., 2021; Trebicka et al., 2021).

Como ya se mencionó anteriormente, la disbiosis corresponde a una modificación en la microbiota intestinal, que es cuando hay una alteración en el equilibrio de la microbiota normal y hay un sobrecrecimiento bacteriano que es definido como  $\geq 10$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro, contribuyendo a un aumento de la permeabilidad intestinal. Por lo tanto, cuando se rompe el equilibrio de la microbiota residente en el intestino y hay un sobrecrecimiento bacteriano se relaciona con tránsito intestinal lento y una disminuida secreción de ácidos biliares. Estudios con ratas cirróticas informan que un desequilibrio en

la microbiota y con niveles altos de bacterias como *Enterobacterias*, obtuvieron una tasa más alta de traslocación bacteriana (Fukui, 2015).

Silva et al. (2019) mencionan que en los ratones se encuentran libres de microbiota intestinal y se demuestra que están más predispuestos a desarrollar alguna enfermedad inflamatoria intestinal, ya que una de las funciones de la microbiota residente es mantener al sistema inmune.

### **2.3.2 Translocación bacteriana**

La translocación bacteriana (TB) es un factor de riesgo para el desarrollo posterior de complicaciones como lo es la peritonitis bacteriana espontánea (PBE), y actualmente se define como el paso de bacterias y/o productos bacterianos como lo son: lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ADN bacteriano, a través de la barrera intestinal hasta los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) (Wiest et al., 2014). Es incierta la vía por la que las bacterias pasan la luz intestinal hasta llegar a ganglios linfáticos mesentéricos y órganos sistémicos, sin embargo, los macrófagos pueden transportar las bacterias y alcanzar la circulación sistémica por el sistema linfático o por el sistema portal hasta el hígado. La translocación bacteriana puede llegar a causar graves problemas como el shock hemorrágico y sepsis (Nodarse Hernández, 2000; Planas, 2008).

Los mecanismos principales que conducen a que se desarrolle la translocación bacteriana son las alteraciones en la microbiota intestinal, el sobrecrecimiento bacteriano, disrupción de la barrera aumentando la permeabilidad intestinal y alteraciones inmunológicas (Gómez-Hurtado et al., 2016; Lorenzo et al., 2007). Para evitar que la translocación bacteriana se produzca, la barrera intestinal tiene que funcionar como un mediador físico entre las bacterias y la monocapa epitelial, promover la protección inmunológica para la rápida detección y eliminación de bacterias que se internalicen en el tejido (Wiest et al., 2014). Sin embargo, durante la enfermedad hepática se ha demostrado que cuando se presenta el sobrecrecimiento bacteriano derivado por los cambios en la microbiota, además, por la disminución en la motilidad intestinal y el tránsito lento, se da un ambiente y condiciones favorables para que este proceso se desarrolle (G. Romero, 2016a).

Las bacterias de importancia clínica que logran translocar son bacterias Gram negativas. Una característica de la membrana de estas bacterias es que presentan una fracción inherente llamada endotoxina o lipopolisacárido (LPS). Esta es una biomolécula que es liberada cuando hay muerte de células bacterianas por algún traumatismo mecánico o térmico cuyo efecto es tóxico, puede llegar a provocar fiebre, shock séptico, falla multiorgánica e incluso llegar a la muerte (Su & Ding, 2015).

La endotoxemia es el proceso por el cual acceden las endotoxinas o lipopolisacáridos al sistema circulatorio activan al sistema inmune innato y la respuesta inflamatoria sistémica, sobre expresando citocinas inflamatorias, factor de necrosis tumoral, interleucina-6 entre otros más (Su & Ding, 2015). Cuando se genera la endotoxemia es porque la capacidad hepática no es suficiente para la eliminación de un gran número de endotoxinas, por lo tanto, es un factor que contribuye a que estas biomoléculas transiten a circulación sistémica (Han, 2002).

### **2.3.3 Inflamación intestinal como consecuencia de la cirrosis hepática**

Durante la progresión de la cirrosis hepática, a nivel sistémico ocurre la activación del sistema inmunitario, cabe mencionar, que durante la fase avanzada de la cirrosis, dicha activación inmune comienza en ganglios linfáticos mesenterios por la constante interacción de bacterias traslocadas con las células inmunitarias residentes, esto estimula a monocitos y células T activadas a viajar por sangre periférica por recirculación, haciendo que la inflamación se extienda a nivel sistémico, por lo tanto, estas células activadas pueden interferir en las modificaciones de las células de los tejidos y promover el deterioro hemodinámico, así como el daño de la barrera intestinal y la progresión de la fibrosis hepática (Muñoz & Albillos, 2008).

El sobrecrecimiento bacteriano y alteraciones en la composición de la población microbiana, además del paso de bacterias patógenas o biomoléculas a través de la barrera intestinal, son los principales acontecimientos que contribuyen a la inflamación intestinal (Chopyk & Grakoui, 2020; Salvo-Romero et al., 2015). Existen receptores de reconocimiento de patrones (PRR), cuya función es reconocer estructuras llamadas patrones moleculares

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

asociados a patógenos (PAMPs) que son expresadas por varios microorganismos como bacterias, parásitos, hongos y virus (Cubana & Biom, 2010; Rumbo et al., 2006). Los receptores tipo Toll (TLR) forman parte de los PRR y son los encargados de desencadenar la respuesta inmune, ya que son sensores que reconocen bacterias patógenas e inducen la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias que desencadenan la inflamación intestinal (Cesaro et al., 2011; Weiss & Henet, 2017). Además, se identifica aumento de secreción de anticuerpos IgG que actúan contra las bacterias comensales, mientras que los linfocitos T de la mucosa son hiperreactivos frente a los antígenos de la microbiota normal (Guarner, 2011).

El reconocimiento de patógenos percibidos por células presentadoras de antígenos (APC) promueven el reclutamiento de células inmunes y la propia activación de las APC (Salvo-Romero et al., 2015). Una vez activado el sistema inmune de la barrera intestinal y las APC durante la enfermedad hepática, el reconocimiento de patógenos induce a macrófagos tisulares que generen citocinas como como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Muñoz & Albillos, 2008). TNF- $\alpha$  es capaz de generar estrés y daño en las células residentes, además un incremento de esta citocina y de IL-6 contribuye a desregulación del sistema inmune (A. Albillos et al., 2001). Por otro lado, las APC activadas interactúan con los linfocitos T, que desempeñan un papel central en la regulación inmune, ya que durante la enfermedad hepática se incrementa la secreción de citocinas reguladoras antiinflamatorias como IL-10 (Guarner, 2011).

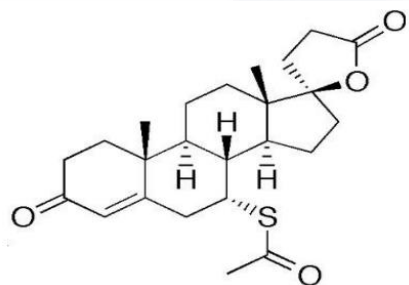
### **3. Farmacoterapia actual para la cirrosis hepática**

#### **3.1 Antagonista del receptor aldosterona**

Dentro de las complicaciones que suelen ocurrir durante la enfermedad de cirrosis hepática es la ascitis que es la acumulación de líquido en el abdomen, es una condición muy frecuente en los pacientes originando alteración en la circulación sistémica, desencadenando hipovolemia central e hipotensión arterial, al mismo tiempo activando el sistema vasoconstrictor y el aumento de reabsorción de sodio y agua (Valer et al., 2004). Por lo tanto, se considera que la ascitis es una complicación controlable con tratamiento dietético y con diuréticos. Los fármacos antagonistas específicos de la aldosterona principalmente actúan de



manera competitiva con los receptores de intercambio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que dependen de la aldosterona y se localizan en el túbulo contorneado distal (Carone et al., 2017). El hiperaldosteronismo, es una condición presente en la cirrosis con ascitis se utiliza *espironolactona* (100 mg/día) y *furosemida* que actúa como antagonista competitivo con la aldosterona, ya que cuando hay ascitis y no es controlable, el tratamiento estándar son los diuréticos (Martínez & Albillos, 2014). La *espironolactona* actúa como diurético ahorrador de potasio, pero promoviendo la excreción de sodio, además de tener efecto antiinflamatorio, aunque cabe destacar que hay efectos secundarios con este fármaco diurético, como lo es la ginecomastia y la impotencia (Ortega & Ginés, n.d.).



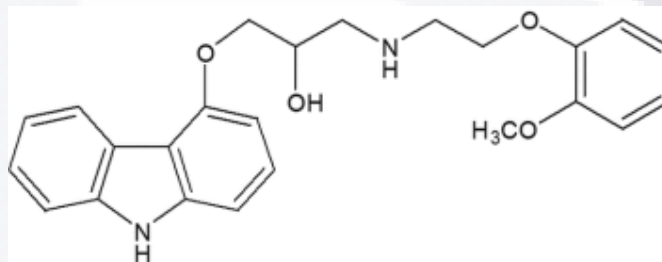
**Figura 7: Estructura química de la espironolactona.** Tomada de (Horna Castro & Casazola Quispe, 2019).

### 3.2 Beta bloqueadores adrenérgicos

Otra de las consecuencias que se produce en la enfermedad hepática es la hipertensión, la cual se desencadena por un incremento de flujo venoso portal y que es mediado por la dilatación esplácnica, al mismo tiempo esto conlleva a muchas complicaciones relacionadas en la hipertensión portal como las hemorragias de várices esofágicas (Bosch et al., 2012). Por lo tanto, el tratamiento es dirigido a contrarrestar la hipertensión portal y se orienta en la reversión de las alteraciones hemodinámicas. Se basa principalmente en la administración de fármacos que disminuyen la presión portal, y el tratamiento de elección son los beta bloqueadores (Cisneros Garza et al., 2022; García-tsau, 1992). Así mismo, estos fármacos al ser hipotensores ayudan a disminuir la presión arterial de los pacientes, sin embargo, durante la cirrosis hepática hay que mantener monitoreada la presión de dichos pacientes, ya que se recomienda interrumpir la administración con beta bloqueadores cuando la presión arterial es menor a 90 mm Hg (Arredondo Bruce et al., 2019).

Los fármacos beta bloqueadores son ampliamente utilizados por su actividad antagonista de los receptores adrenérgicos beta acoplado a proteínas G, y que reciben estímulo de las catecolaminas endógenas (Oliver et al., 2019). Algunos de ellos son, *propranolol* (20-40 mg dos veces al día), *nadolol* (20-40 mg/día) y *carvedilol* (6.25 mg/día), los cuales ayudan a disminuir la presión arterial, además son de profilaxis primaria en el tratamiento de várices esofágicas para prevenir eventos hemorrágicos (Cisneros Garza et al., 2022).

El *carvedilol*, es un  $\alpha/\beta$  adrenobloqueante, es utilizado como antihipertensivo y para reducir la hipertensión portal cuando hay presencia de daño hepático, además, de brindar efectos antioxidantes y antifibróticos (Serna-Salas et al., 2018).



**Figura 8: Estructura del carvedilol.** Tomado de (Ruffolo & Feuerstein, 1997).

### 3.3 Estimuladores del tránsito intestinal

En la cirrosis el tránsito intestinal enlentecido es un trastorno que se ha observado en relación con la gravedad de la enfermedad hepática (Sánchez et al., 2005). Los laxantes como la *lactulosa* (25 ml/día), el cual es un azúcar sintético que es metabolizado en ácido acético por la microbiota intestinal es ampliamente utilizado (De Lorenzo Pinto et al., 2017). Su uso específico es para tratar el estreñimiento ayudando a extraer agua y ayuda a evacuar las heces hacia el colon, ya que tiene un efecto osmótico y ayuda a disminuir el pH del colon por la descomposición de la lactulosa en ácidos orgánicos (Mueller-Lissner & Wald, 2010; Trebicka et al., 2021).

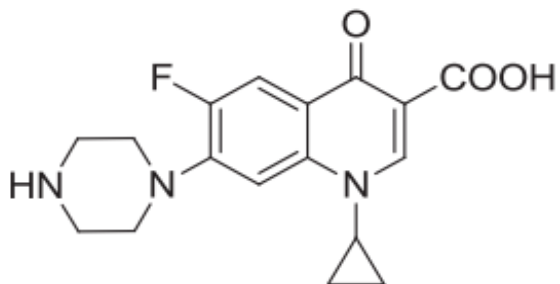
### 3.4 Antibióticos

Dentro de las complicaciones de la cirrosis, la diarrea y síndrome de intestino irritable son tratados con antibióticos como lo son las *rifaximinas*. La *rifaximina* (550 mg/día) es un

antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram negativas y positivas (Ford et al., 2018). Así mismo, la *rifaximina* se prescribe en el tratamiento de la encefalopatía hepática (EH) ya que también es una complicación frecuente durante la cirrosis, ya que la EH incluye infecciones, estreñimiento y hemorragias de tubo digestivo (Fрати-Munari & Galindo-Suárez, 2020).

Existen más alternativas terapéuticas con otros antibióticos de amplio espectro, como es el caso de los *betalactámicos* como lo son las *cefalosporinas* (*cefotaxime*, *ceftriaxona*, etc.) estos antibióticos tienen actividad contra la mayoría de las bacterias Gram positivas, sin embargo, su actividad ante las bacterias Gram negativas depende en gran medida de las modificaciones estructurales de dichas bacterias (Arango et al., 1985). El tratamiento de elección ante infecciones bacterianas en pacientes cirróticos son las *cefalosporinas* de tercera generación, sin embargo, existen casos específicos de infecciones o peritonitis bacteriana espontánea causada por bacilos Gram negativos que son resistentes a los antibióticos betalactámicos como las *cefalosporinas*. Cuando se trata de tratamiento profiláctico, se emplean *cefalosporinas* de primera o segunda generación (Fernández-Gómez, 2006).

Por otro lado, y no menos importante, las *quinolonas* también son antibióticos de amplio espectro que es casualmente empleado en el tratamiento de peritonitis bacteriana espontánea en la cirrosis hepática, sin embargo, la administración prolongada de este antibiótico ha causado resistencia bacteriana. El *ciprofloxacino*, es una quinolona de segunda generación que tiene excelente actividad antimicrobiana, cabe destacar, que el incremento de patógenos resistentes a los antibióticos, hace que este fármaco sea cada vez menos efectivo (Fernández-Gómez, 2006; Zhang et al., 2018).



**Figura 9: Estructura del ciprofloxacino.** Tomada de (Zhang et al., 2018).

#### 4. Nuevas propuestas de tratamiento para la cirrosis hepática

##### 4.1 Antioxidantes

Uno de los antioxidantes probados para la cirrosis hepática es la curcumina que es el ingrediente más efectivo extraído de los rizomas de la planta de jengibre (Zeng et al., 2022), y actualmente es considerado benéfico para la salud, además, de tener capacidad de prevenir enfermedades, posee efectos antiinflamatorios y es un excelente antioxidante (Elizondo-luévano et al., 2020).

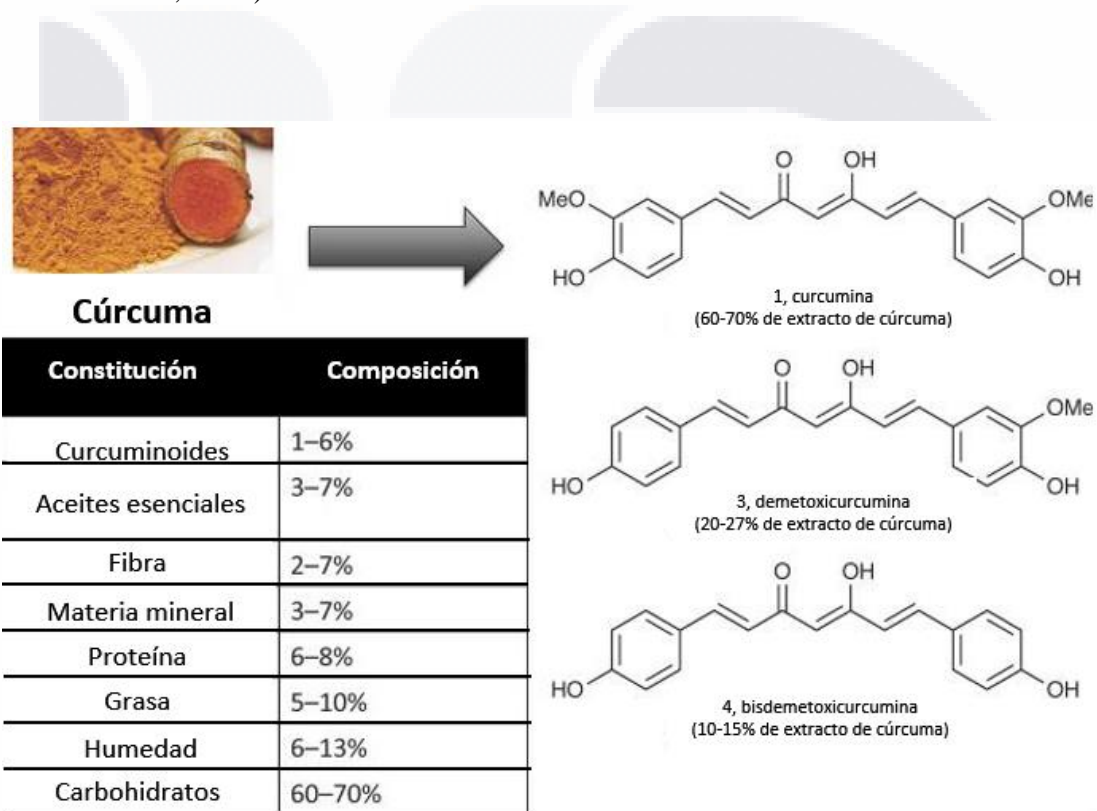


Figura 10: Estructura química y principales fitoconstituyentes de la cúrcuma. Modificada de (Nelson et al., 2017).

Además, varios estudios demuestran que la curcumina posee propiedades hepatoprotectoras por medio de sus mecanismos celulares y moleculares, ya que activa la vía de señalización del elemento de respuesta antioxidante Nrf2, que a su vez regula la expresión de genes involucrados en la eliminación de ROS (Macías-pérez et al., 2019; Medina-Pizaño et al., 2022).

## 4.2 Alfa-bloqueadores

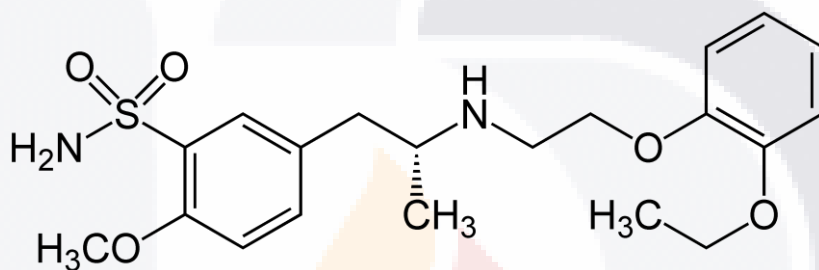
Los alfa bloqueadores o bloqueadores de los receptores adrenérgicos, relajan el musculo liso del cuerpo, además se prescriben con frecuencia para síntomas de tracto urinario inferior asociados a hiperplasia prostática benigna (Alcántara-Montero, 2016).

La *doxazosina* es utilizada en el tratamiento de hiperplasia prostática benigna e hipertensión arterial. Además, induce disminución de fibrosis ayudando como modulador de las células mesangiales renales y los fibroblastos miocárdicos que son productores de colágeno. Se ha observado que este fármaco también ayuda a revertir la generación de fibrosis hepática y ayuda a mejorar la función del hígado promoviendo la vasodilatación periférica (Serna-Salas et al., 2018).

La *tamsulosina* es un fármaco con alta afinidad y bloquea selectivamente a los receptores adrenérgicos postsinápticos  $\alpha$ -1A. Los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos poseen efecto vasoconstrictor y producen excitación en órganos como útero, corazón y vasos sanguíneos, pero tiene solo un efecto inhibitorio que es la relajación en el intestino. El intestino está recubierto por músculo liso y está ayudado para el funcionamiento gastrointestinal, el efecto conocido de la tamsulosina es sobre músculo liso (Guyton-Hall, 2011; Alcántara-Hernández, 2018). Este medicamento es utilizado en el tratamiento de signos y síntomas del tracto urinario con asociación a la hipertrofia prostática benigna, ya que el antagonismo de estos receptores ayuda a relajar el músculo liso prostático y uretral reduciendo la tensión, permitiendo un mejor flujo urinario. Este fármaco de liberación prolongada es absorbido en el intestino de manera gradual y su biodisponibilidad es  $> 90\%$ . Es indispensable tomar el medicamento después de los alimentos ya que la presencia de ellos puede reducir la absorción. Además, es distribuido en todos los tejidos, y es metabolizado en el hígado mediante el sistema P-450. Por último, es excretado alrededor del 75% de sus metabolitos por la orina (Tamsulosin, 2018).

La *tamsulosina* a una dosis de 0.4 mg una vez al día, es eficaz en pacientes con síntomas del tracto urinario inferior asociado a hipertrofia prostática benigna, en pacientes ancianos y con diabetes mellitus, tampoco interfiere con la terapia concomitante como antihipertensivos, además tiene una acción rápida y tiene efecto en síntomas moderados y graves (Dunn, et al, 2002).

Sun et al. (2021) mostraron que la *tamsulosina* mitigó la respuesta inflamatoria y la fibrosis renal. En los últimos años se ha considerado la tamsulosina como agente en la terapia de la litotricia extracorpórea por ondas de choque, que es una técnica no invasiva para el tratamiento de litiasis urinaria, pero se desconoce si la tamsulosina tiene algún efecto antiinflamatorio en la nefropatía diabética (Zuo et al., 2020). Además, se ha usado la *tamsulosina* en modelos de cirrosis hepática donde se observa que ayuda a la regeneración de la fibrosis hepática y es probable que pueda ayudar a disminuir los efectos secundarios provocados por la enfermedad hepática.



**Figura 11: Representación esquemática de la estructura molecular de la tamsulosina.** Tomado de (Medina Pizaño, 2020).

### 4.3 Probióticos

La importancia de la microbiota intestinal en la salud y en las enfermedades ha sido un tema de interés por intentar modular la microbiota, ya sea mediante la administración de microorganismos vivos o modificando el medio intestinal. La OMS define a los probióticos como microorganismos vivos que, al ser administrados en una cantidad adecuada, provocan un efecto benéfico para la salud del huésped (Gómez-López, 2019; Soriano et al., 2013). Se ha demostrado que los probióticos ayudan en las enfermedades hepáticas ya que tienen efecto modulador en la microbiota intestinal, ayudan a disminuir las endotoxinas e inhibe la adherencia de bacterias (G. Romero, 2016b).

Los probióticos conservan pH ácido que favorece el crecimiento de las bacterias tolerantes del ácido, y a su vez promueven la producción de ácidos grasos de cadena corta que pueden impedir el crecimiento de patógenos. Además, hay probióticos que producen bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas. Por otro lado, los probióticos contribuyen a restablecer la flora normal, disminuyendo la permeabilidad

intestinal y aumentando el efecto de la barrera inmune, tienen la capacidad de elevar la expresión de las mucinas ileocolónicas MUC-2 y MUC-3, cooperando en el recubrimiento del intestino, mecanismo muy eficaz contra bacterias patógenas. Otro punto importante, es que dificultan la traslocación bacteriana (Carnicé, 2006;Cl & Probi, 2015).

La implementación de los probióticos en el tratamiento de la cirrosis hepática puede resultar muy eficaz debido a que poseen actividad moduladora en la microbiota, permeabilidad intestinal y la respuesta inmune. Wiest et al. (2005) utilizaron *Lactobacillus acidophilus* en el tratamiento de hipertensión portal, donde no observaron diferencias en el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) ni en la incidencia de translocación bacteriana (TB). Chiva et al., en 2002 trabajaron con *Lactobacillus johnsonii* en un modelo experimental de ratas cirróticas, donde obtuvieron como resultado que con antioxidantes (vitamina C y glutamato) disminuían las enterobacterias intestinales y la translocación bacteriana. Así mismo, Stadlbauer et al., en 2008 trabajaron con *Lactobacillus casei Shirota*, en un modelo de cirrosis hepática por alcohol y como resultado obtuvieron una mejora en la actividad de neutrófilos, también una disminución de TNF-1, TNF-2 y TLR4.

Delgado-Venegas et al. (2021), trabajaron con *Lactococcus lactis*, administrándolo en un modelo animal de fibrosis hepática, en dicho estudio se administró el probiótico de forma preventiva durante la inducción a fibrosis hepática. Por lo que *L. lactis* provocó cambios en el desarrollo de la fibrosis como: reducción del daño hepático, reducción del área de fibrosis, ayudo aumentar los ganglios linfáticos en placas de Peyer, disminuyó ALT y AST e incremento la expresión de IL-10. Sugiriendo los autores que la administración oral de *L. lactis* puede ser un medio de prevención y protección contra daño hepático.

#### **4.3.1 *Lactococcus lactis***

Es una bacteria láctica, Gram positiva no invasiva y no patógena, esférica, no esporulante y facultativa. Además, son excelentes como vectores para producir proteínas en el tracto digestivo. Existen investigaciones donde se introduce un plásmido modificado genéticamente a *L. lactis*, para que tenga la capacidad de reproducir o expresar antígenos o moléculas terapéuticas (Araujo Álvarez, 2010). Algunos beneficios que se le atribuyen a *L.*

*Lactis* es que puede mantener la homeostasis intestinal y funciona como inmunomodulador, ya que gracias a su pared de peptidoglicanos tiene función como adyuvante natural ayudando a la respuesta inmunológica y tener un potencial antiinflamatorio. Por otra parte, *L. lactis* no es capaz de colonizar el intestino, a diferencia de otros microorganismos similares, este probiótico es excelente sobreviviendo en el tracto gastrointestinal, tiene buena adherencia al epitelio intestinal, ayuda a la disminución de la permeabilidad intestinal y es seguro para los humanos. Es importante mencionar que *L. lactis* es catalogado como bacteria probiótica, ya que está dentro de la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe) gracias a que cumple requisitos y características específicas de seguridad para el huésped (Araujo-Álvarez, 2010; Soriano et al., 2013).

Existen estudios donde se demuestra la eficacia de tratamientos con antibióticos para las infecciones bacterianas causadas por bacterias entéricas en las enfermedades hepáticas como lo es la cirrosis. Pero, los antibióticos cuando se usan de manera prolongada o de la forma incorrecta, puede provocar resistencia bacteriana a antibióticos lo que hoy en día es un problema de salud importante. Por lo tanto, *L. lactis* y sus propiedades moduladoras en la microbiota y permeabilidad intestinal podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades hepáticas y una alternativa en los tratamientos de infecciones bacterianas de alguna forma para evitar la resistencia bacteriana a antibióticos (Rodríguez-Noriega et al., 2014; Soriano et al., 2013)



## 5. Justificación

La cirrosis hepática constituye un importante problema de salud alrededor del mundo, formando parte de las diez primeras causas de muerte (Méndez-Sánchez et al., 2007). En la actualidad, la afectación en la microbiota y en la permeabilidad intestinal, han sido reconocidas como un factor importante en la fisiopatología de varias enfermedades humanas como la cirrosis hepática (Lozupone et al., 2012). Algunos estudios han informado que una composición o cantidad alterada de bacterias intestinales (disbiosis) en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas como la cirrosis, se relaciona con el empeoramiento de la enfermedad. En lo que respecta a la permeabilidad intestinal alterada puede favorecer el paso de productos derivados de bacterias a la circulación sistémica, provocando un estado inflamatorio sistémico.

La modulación farmacológica de la microbiota y la permeabilidad intestinal parece ser una herramienta prometedora para un nuevo enfoque terapéutico y de prevención de la cirrosis y sus complicaciones. Por tal motivo, este trabajo propone una nueva perspectiva de tratamiento usando un alfa-bloqueador como la *tamsulosina* y un probiótico como *Lactococcus lactis* para reducir las modificaciones en la composición de la microbiota, y evitar el daño en la permeabilidad intestinal en un modelo de cirrosis hepática. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo contribuirán a la generación de nuevos conocimientos de usos terapéuticos para tratar las complicaciones intestinales de la cirrosis hepática.

## 6. Hipótesis

El efecto combinado de tamsulosina y *Lactococcus lactis* reducen las modificaciones en la composición de la microbiota intestinal, y el daño en la permeabilidad intestinal en ratas cirróticas inducidas con CCl<sub>4</sub>.

## 7. Objetivos

### 7.1 General

Analizar los cambios en la composición de la microbiota, y la permeabilidad intestinal en ratas cirróticas inducidas con CCl<sub>4</sub>, y tratadas con tamsulosina y *Lactococcus lactis*.

### 7.2 Específicos

- Evaluar si existen modificación en las proteínas de unión estrecha: ZO-1, Ocludina, Claudina en muestras de intestino de animales cirróticos tratados con tamsulosina y *Lactococcus lactis*.
- Evaluar marcadores de translocación bacteriana: LPS, DNAb y bacterias translocadas a órganos linfoides.
- Analizar los cambios en la comunidad microbiana en muestra de intestino a través de un análisis metagenómico por 16S.

## 8. Metas

- Caracterización de proteínas de unión estrecha por medio de inmunofluorescencia, western blot y qPCR.
- Confirmar presencia de LPS, DNAb y bacterias translocadas en órganos linfoides.
- Corroborar cambios en la composición microbiana intestinal.

## 9. Materiales y métodos

### 9.1 Modelo animal

Se trabajó con ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) machos (edad, 6 a 8 semanas; peso, 200-300 g), estas fueron obtenidas del bioterio de crianza para investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Aguascalientes, México). Las ratas se mantuvieron alimentadas durante todo el experimento con nutricubo Purina y croquetas Pedigree® estas últimas se usaron por el alto contenido de grasas. Las ratas permanecieron en un ciclo de luz/oscuridad (12:12) en una habitación con temperatura controlada (25°C). Antes de comenzar los experimentos con los animales, el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, además de realizarse bajo los lineamientos institucionales para el cuidado de animales de experimentación y la NOM-062-ZOO-1999 (fecha de aprobación: 02/04/2018).

### 9.2 Modelo de inducción de cirrosis hepática con CCl<sub>4</sub> en rata Wistar

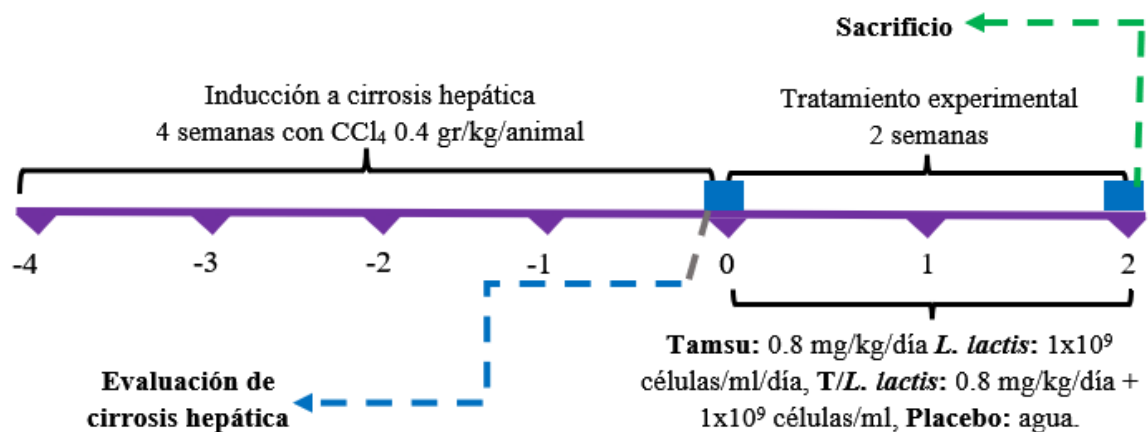
Las ratas fueron desparasitadas con una suspensión de amplio espectro (One Suspension CG: fenbendazol-500mg, toltrazuril-150mg, prazicuantel-50mg), la dosis administrada fue de 28 mg/por cada 250g de peso, el desparasitante se administró dos veces durante una semana y después se dejaron descansar por 7 días.

Las ratas fueron clasificadas al azar en 6 grupos, los cuales se muestran a continuación: **control** (sano, n=3), **cirrótico** (enfermo, n=3), **placebo** (enfermo sin tratamiento, n=3), ***L. lactis*** (enfermo y tratado con *L. lactis*, n=3), **tamsulosina** (enfermo y tratado con Tamsulosina, n=4), **T/*L. lactis*** (enfermo y tratado con tamsulosina y *L. lactis* n=4).

Para la inducción de la cirrosis se utilizó CCl<sub>4</sub> vía intraperitoneal a una dosis de 0.4 g/kg (como vehículo se utilizó petrolato), administrado 3 veces por semana, durante 4 semanas (Aldaba-Murato et al., 2021). Al finalizar las 4 semanas de inducción los grupos *L. lactis*, tamsulosina y T/*L. lactis* iniciaron con sus respectivos tratamientos, y solo el grupo cirrótico fue sacrificado con pentobarbital al 10%.

### 9.3 Tratamiento con tamsulosina y *L. lactis*

El tratamiento se realizó administrando una concentración de 0.8mg/kg/día de clorhidrato de tamsulosina (uso farmacéutico) diluida en agua purificada estéril y en lo que respecta al probiótico, se utilizó una dosis de  $1 \times 10^9$  células/ml (Delgado-Venegas et al., 2021) (las condiciones de cultivo, purificación y cuantificación de *L. lactis* se describen en el apartado 7.3.1). Los tratamientos fueron administrados oralmente utilizando una cánula gastro-esofágica. Las dosis fueron administradas cada 24 horas durante 2 semanas, al término del tratamiento, los grupos de animales tratados y no tratados (placebo y control), fueron sacrificados con pentobarbital al 10% (Fig. 10).



**Figura 12:** Esquema del protocolo de inducción de cirrosis hepática y del tratamiento utilizado. CCl<sub>4</sub>: tetracloruro de carbono (0.4g/kg/animal); *L. lactis*: *Lactococcus lactis* ( $1 \times 10^9$  células/ml); Tamsu: tamsulosina (0.8 mg/kg/día); T/*L. lactis*: tamsulosina/*L. lactis*: 0.8mg/kg/día+ $1 \times 10^9$  células/ml).

#### 9.3.1 Condiciones de cultivo para *Lactococcus lactis*

La cepa utilizada en este trabajo fue *L. lactis* NZ9000, de forma inicial el cultivo se realizó en 50 ml de medio M17 BD (DIBICO) previamente esterilizado y suplementado con glucosa al 10%, se dejó 24 horas a 30°C en agitación orbital suave por toda la noche para el crecimiento y desarrollo del probiótico. Para la determinación de la biomasa se midió la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 600 nm (OD<sub>600</sub>) en el espectrofotómetro BK-UV1600, la absorbancia se monitoreó cada hora durante el periodo de incubación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.17-0.20, cabe mencionar que para medir la OD se tomó

una alícuota 1:10 del cultivo. En seguida, se realizó el cálculo de la biomasa para el volumen final de  $1 \times 10^9$  células/ml/dosis por cada animal. Posteriormente el probiótico se centrifugó 15 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con agua purificado estéril para eliminar el exceso de medio de cultivo, el probiótico fue resuspendido en agua purificada estéril para su administración.

#### **9.4 Evaluación de la alteración de la permeabilidad intestinal en el modelo de cirrosis hepática en rata Wistar**

##### **9.4.1 Estudio histopatológico del intestino grueso**

Se recolectaron secciones de intestino grueso de aproximadamente 1 cm de longitud de los diferentes grupos experimentales, las muestras fueron conservadas en paraformaldehído al 4%. Posteriormente las muestras de intestino fueron procesadas en el procesador de tejidos Microm STP 120 (ThermoFisher, U.S.A) para la deshidratación, aclaración e infiltración del tejido. En seguida, las muestras fueron incluidas en parafina para obtener bloques de tejido (Microm, EC350-2, ThermoFisher, U.S.A) y realizar cortes de  $5 \mu\text{m}$  de espesor con un microtomo RM2125RT (LEICA, Alemania). Las secciones de tejido fueron incubadas a  $60^\circ\text{C}$  durante 10 horas para retirar el exceso de parafina, posteriormente fueron utilizadas para realizar diferentes análisis.

Para la evaluación histopatológica, los cortes de intestino grueso fueron teñidos usando la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) para realizar la tinción los cortes histológicos fueron desparafinados en xileno (2 baños, 3 minutos c/u), rehidratando con etanol al 100% (2 baños, 2 minutos c/u), agua de grifo (1 baño: 10 segundos), agua destilada (1 baño: 1 minuto) y luego se siguió el protocolo de tinción, el cual consistió en someter los tejidos en hematoxilina (30 segundos) y eosina (3 minutos). Al finalizar las tinciones y el montaje de las muestras, las laminillas se observaron en el microscopio Óptico Axioskop 46 y la captura de la imagen fue realizada con el programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) a una magnitud de 20 y 40x, para evaluar la integridad de las diferentes capas del intestino.

#### 9.4.2 Análisis de Inmunofluorescencia para la detección de ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en intestino grueso

Las laminillas con cortes de intestino se sometieron a un método que conjuga la observación morfológica con la especificidad inmunológica, por medio de la reacción antígeno-anticuerpo, empleando un colorante conjugado a un anticuerpo con la propiedad física de fluorescencia bajo una fuente de excitación luminosa (Franco-Cardoza, 2005). Para ello las laminillas se desparafinaron, deshidrataron e hidrataron, posteriormente se realizó el desenmascaramiento de epítomos con una solución de Citratos 1X (ácido cítrico 0.1 M, citrato de sodio tribásico dihidratado 0.1M) a presión de vapor durante un minuto y se hicieron lavados con PBS 1X. El bloqueo de uniones inespecíficas se realizó con PBS 1X-Tritón 0.2% con suero fetal bovino al 20%, durante 1 hora de incubación. Se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 2) diluido en PBS 1X-Tritón a 4°C toda la noche. Se continuó, con 3 lavados con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 2) diluido en PBS 1X-Tritón 0.2% durante 1 hora. La tinción de los núcleos se realizó con Hoechst (1:1000) en PBS 1X por 10 minutos. Después se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se llevó a cabo el montaje con el medio de montaje *mowiol*<sup>®</sup>. Las laminillas fueron analizadas en el microscopio Axioskop 40 y las imágenes fueron capturadas con el programa AxioVision e Imagen pro Plus a una magnitud de 20 y 40x, para detectar células positivas a ZO-1, ocludina y claudina-2. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImagenJ Fiji.win64.

**Tabla 1: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia.**

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Host</i>	<i>Dilución</i>	<i>Catalogo</i>	<i>Casa comercial</i>
<i>ZO-1</i>	Rata monoclonal IgG	1:50	sc-33725	Santa Cruz Biotechnology
<i>Ocludina</i>	Ratón monoclonal IgG	1:400	sc-133256	Santa Cruz Biotechnology
<i>Claudina-2</i>	Ratón monoclonal IgG	1:400	sc-293233	Santa Cruz Biotechnology
<i>Anticuerpo secundario</i>				
<i>Alexa Fluor 488</i>	Cabra anti-rata IgG	1:200	A11006	Invitrogen
<i>Alexa Fluor 594</i>	Cabra anti-ratón IgG	1:200	A11005	Life Technologies

### **9.4.3 Análisis por RT-qPCR para ZO-1, Ocludina, Claudina-2 y MUC2**

#### **9.4.3.1 Extracción de RNA**

Para este análisis las secciones de intestino grueso obtenidas previamente de los diferentes grupos experimentales fueron utilizadas, se tomaron 100 mg de tejido el cual fue puesto en un tubo con RNAlater, los tubos se dejaron 24 horas a 4°C y en el caso de que el procedimiento no se realizara inmediatamente las muestras se almacenaban a -80°C.

Para la extracción de RNA las muestras de tejido de intestino grueso fueron procesadas con el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep® (ZYMO RESEARCH), siguiendo el protocolo del fabricante. El tejido se homogenizó con 400 µl de Trizol®, se centrifugó y el sobrenadante se recuperó y se añadió 400 µl de etanol absoluto y se llevó al vortex por 30 segundos, en seguida la mezcla se transfirió a una columna y se llevó a centrifugar por 30 segundos, se eliminó el sobrenadante, luego se agregaron 400 µl de pre-wash y se centrifugó por 30 segundos, nuevamente se eliminó el sobrenadante, se añadió 700 µl del buffer wash y se centrifugó por 30 segundos, por último, se agregó 30 µl de agua libre de nucleasas y se llevó a la centrifuga por 45 segundos

Una vez obtenido el ARN, se cuantificó en el espectrofotómetro BioDrop µLITE® a una absorbancia de 260/280 nm, las muestras fueron almacenadas a -80°C. La pureza del ARN se determinó sacando la relación la relación  $A_{260}/A_{280}$ , considerando valores puros aquellos mayores a 1.8, mientras para la relación  $A_{260}/A_{230}$  valores mayores a 1.5.

Para verificar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, la migración de las muestras se llevó a 60 V en buffer TAE 1X (Tris-Acetate-EDTA) por 60 minutos en una cámara de electroforesis horizontal Gel Box MidiPlus VWR®. El gel se tiñó con bromuro de etidio y fue visible en luz ultravioleta.

#### **9.4.4 Retrotranscripción de ARN**

Para la retro transcripción del ARN se realizó con el kit GoScript Reverse Transcription System de Promega® siguiendo el protocolo del fabricante.

**Tabla 2: Reactivos para mezcla de reacción para la síntesis de ADNc.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Oligo dT	1 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas	10 $\mu$ l
ARN	500 ng
<b>Reactivos de mix</b>	
<b>Buffer de reacción</b>	4 $\mu$ l
<b>Inhibidor de RNAasa</b>	1 $\mu$ l
<b>dNTP mix</b>	2 $\mu$ l
<b>RevertAid H Minus</b>	1 $\mu$ l

Se colocaron las reacciones realizadas en el termociclador Swift™ MiniPro® a 70°C durante 5 minutos a un volumen de 12  $\mu$ l. Posteriormente, se agregó al tubo la mezcla de reacción para ajustar el volumen a 20  $\mu$ l (Tabla 2). Posteriormente, las muestras se llevaron al termociclador para llevar a cabo el protocolo de síntesis de ADNc (Tabla 3).

**Tabla 3: Condiciones del termociclador para síntesis de ADNc.**

<b>Segmento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Desnaturalización inicial	3 minutos	95°C
Desnaturalización	45 segundos	95°C
Hibridación	30 segundos	60°C
Elongación	12 segundos	72°C
Elongación final	3 minutos	72°C

#### **9.4.5 Análisis por PCR en tiempo real**

Al ADNc obtenido fue ajustado a una concentración de 50 ng/ $\mu$ l, todas las muestras se llevaron a una dilución de 1:10 en agua libre de nucleasas. Las reacciones se hicieron en placas de 48 pocillos para qPCR (Applied Biosystems® MicroAmp® - N8010560), se añadió a cada pocillo 5  $\mu$ l de SybGreen (PCR Master Mix, Thermo-Scientific®), 1  $\mu$ l de oligonucleótido Forward, 1  $\mu$ l de oligonucleótido Reverse, 2  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ l de ADNc diluido. El análisis se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (Tabla 4). Por último, se analizaron



los resultados obtenidos mediante el método de expresión relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando  $\beta$ -Actina como gen constitutivo para la normalización de los datos.

**Tabla 4: Condiciones utilizadas para la qPCR.**

Segmento	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización previa	2 minutos	50°C
Desnaturalización	3 minutos	95°C
Alineación	0.35 segundos	58°C

Los oligos utilizados para el análisis de qPCR se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5: Secuencia de oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de ZO-1, Ocludina, Claudina-2, y MUC2.**

Gen	Secuencia	Tm
ZO-1	FW:5`-ATTCAGTTCGCTCCCATGAC-3` RW:5`-GCTGTGGAGACTGTGTGGAA -3`	58°C
Ocludina	FW: 5`-AGGACAGACCCAGACCACTA-3` RW:5`-ACTCTTCGCTCTCCTCTCTG-3`	58°C
Claudina-2	FW:5`-AAGGTGCTGCTGAGGGTAGA-3` RW:5`-CATAGCAAAAAGTGGCAGCA-3`	57°C
MUC-2	FW:5`-GTATGTGCTCGCCTGTATGC-3` RW:5`-TGACCAGATGTGAGCAG-3`	57°C
$\beta$ -Actina	FW:5`-GTCGTACCACTGGCATTGTG-3` RW:5`-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA -3`	62°C

#### 9.4.6 Análisis por Western blot de la expresión de ZO-1, Ocludina y Claudina-2

Los tejidos de intestino grueso se homogenizaron con buffer de lisis RIPA (Sigma) y con inhibidores de proteasas (cOmplete Mini, Merck). La proporción de tejido con respecto al buffer de lisis fue de 1 g/ml. Una vez homogenizado el tejido, se realizó la cuantificación de proteínas a través del método de Bradford (Bradford, 1976). Para la electroforesis se preparó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %. La cantidad de proteína utilizada fue

de 50- 60 µg. Las muestras fueron preparadas a una dilución 1:1 con buffer de corrida, y hervidas a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas fueron trasferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol. Una vez concluida la transferencia, las membranas fueron lavadas con TBS-1X (3 veces/10 minutos) y fueron bloqueadas con la solución de bloqueo (TBS-1X-Tween 0.05%-leche descremada al 5%) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación, después las membranas se lavaron con TBS-1X (3 veces/10 minutos) y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 6) por toda la noche a 4°C. Al terminó de la incubación, se realizaron lavados con TBS-1X y se incubó con el anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente, nuevamente se hicieron lavados con TBS-1X-Tween 0.05% (3 veces/10 minutos). Para el revelado se utilizó el kit Clarity and Clarity Max Western ECL substrates (Bio-Rad) (v/v). Las membranas fueron analizadas utilizando el fotodocumentador Image Studio Digits ver 5.2 (LI-COR). Para el análisis de densitometría se utilizó el programa Image J (Fiji), los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al control interno ( $\beta$ -actina).

**Tabla 6: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western blot.**

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Host</i>	<i>Dilución</i>	<i>Catalogo</i>	<i>Casa comercial</i>
<i>ZO-1</i>	Rata	1:1000	sc-33725	Santa Cruz
	monoclonal IgG			Biotechnology
<i>Ocludina</i>	Ratón	1:300	sc-133256	Santa Cruz
	monoclonal IgG			Biotechnology
<i>Claudina-2</i>	Ratón	1:400	sc-293233	Santa Cruz
	monoclonal IgG			Biotechnology
<i><math>\beta</math>-Actina</i>	Conejo	1:10 000	AB8227	ABCAM
<i>monoclonal IgG</i>	monoclonal IgG			
<b><i>Anticuerpo secundario</i></b>				
<i>Anti-ratón IgG</i>	Cabra	1:5000	31430	Thermo scientific
<i>Anti-conejo IgG</i>	Cabra	1:5000	31464	Thermo scientific
<i>Anti-rata IgG</i>	Cabra	1:10 000	AB6845	ABCAM

## **9.5 Evaluación de la translocación bacteriana (TB)**

### **9.5.1 Análisis microbiológico para detectar la presencia de bacterias en GLM, hígado y bazo**

Se tomaron muestras de GLM, bazo e hígado los cuales fueron recolectados en condiciones de esterilidad y procesados en una campana de flujo laminar Lumina V-120, los tejidos se lavaron con PBS-1X estéril. Las muestras fueron posteriormente homogenizadas, utilizando aproximadamente 100 mg de cada tejido, se utilizó un homogeneizador automático (Pellet Pestle, Kontes). Una vez homogenizados se tomaron 100  $\mu$ l de cada muestra las cuales fueron cultivados en diferentes medios de cultivo (M17, ICC, tioglicolato y agar cuenta estándar). Los cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas. Después se evaluó cada uno de los cultivos para determinar el crecimiento bacteriano y aquellos cultivos que mostraron crecimiento fueron sembrados en agares selectivos como MaConkey, sal-manitol y agar sangre, nuevamente se llevaron a incubación 37°C por 24 horas. Posteriormente, se revisaron los medios selectivos con crecimiento y se procedió a realizar tinción de Gram, después se continuó con pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias, los medios de cultivo empleados fueron; MIO (Motilidad-Indol-Ornitina) permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción de indol a la descarboxilación de la ornitina, LIA (Agar Lisina Hierro) ayuda a diferenciar microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina, TSI (Triple Azúcar Hierro) es un medio nutriente y diferencial que permite analizar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa, catalasa y urea.

### **9.5.2 Detección de ADN bacteriano en muestras de sangre**

Para la detección de ADN bacteriano, se tomaron muestras de sangre obtenidas directamente de los diferentes grupos experimentales, la muestra se recolecto directamente de la vena porta-hepática (Nodarse Hernández, 2000). Para la extracción de ADN, se utilizó el kit *Quick-DNA*<sup>TM</sup> Miniprepr Plus, siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo K). El volumen de elución final fue de 20  $\mu$ l. Posteriormente la concentración de ADN obtenido se determinó con el espectrofotómetro BioDrop-LITE, la pureza se sacó a través de la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Luego se preparó una mwzcla de reacción: 5  $\mu$ l de SybGreen, 1  $\mu$ l de

oligonucleótido Forward, 1 µl de oligonucleótido Reverse (Tabla 5) y 3 µl de muestra sin diluir. Se llevaron las muestras al termociclador Swift MiniPro, las condiciones que se usaron para la amplificación fueron: 95°C por 3 min, 95°C por 45 segundos, 58°C 35 segundos, 72°C 12 segundos y 72°C 3 min. Se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para ver los productos de amplificación. Los productos de amplificación fueron determinados a través de la expresión del gen 16S. Como control positivo Se utilizó una muestra de sangre inoculada con *Escherichia coli*.

**Tabla 7: Secuencia de oligos utilizados para la PCR en punto final para muestras de suero de sangre de la vena porta.**

Gen	Secuencia	Temperatura
16S	FW 5`-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3` RW 5`-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3`	58°C

### 9.5.3 Detección de endotoxina (LPS) en muestras de sangre mediante el método LAL

El ensayo de lisado de amebocitos *Limulus* (LAL) detecta exclusivamente endotoxinas/lipopolisacárido (LPS), que es un compuesto que se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Se fundamenta en la coagulación de la hemolinfa en base a la interacción entre la endotoxina y los amebocitos, al utilizar un sustrato cromogénico y al activarse la cascada LAL, la enzima coaguladora induce la liberación de una molécula llamada pNA que proporciona el color amarillo, el cual es proporcional a la concentración de endotoxina presente en la muestra (Burguet & Brito, 2012; Perdomo Morales, 2004). Para este análisis, también se utilizaron muestras de sangre de los diferentes grupos experimentales, estas muestras fueron centrifugadas para obtener el suero. Las muestras de suero se analizaron utilizando el kit Pierce™ Cromogénico Endotoxina Quant (Pierce™), permitiendo medir los niveles de endotoxinas (LPS). Las muestras fueron diluidas 1:50 y sometidas a un choque térmico de 70°C. Posteriormente, se montaron 50 µl de cada muestra en los pocillos manteniendo la placa a 37°C, después se añadió 50 µl del lisado de amebocitos en cada pocillo, se golpeó suavemente para mezclar y se regresó la placa a incubación por 20

minutos. En seguida, se añadió 100 µl del sustrato cromogénico y se regresó la placa a incubación por 6 minutos. Finalmente, se paró la reacción con 50 µl de ácido acético al 25%. La placa fue leída en un lector de absorbancia a 405 nm, y para determinar la concentración de endotoxina presente en las muestras se realizó una curva de calibración.

## **9.6 Efecto de la tamsulosina y *L.lactis* sobre la composición de la microbiota intestinal en el modelo de cirrosis hepática.**

### **9.6.1 Extracción de ADN de materia fecal**

Las muestras de materia fecal fueron extraídas directamente del intestino grueso al momento de la cirugía, cada muestra fue pesada y depositada en tubos estériles. Para la extracción de ADN de materia fecal, las muestras fueron procesadas con el kit de aislamiento Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Anexo M). Se realizó una cuantificación de ADN tomando en cuenta la absorbancia de 260 y 280 nm en el espectrofotómetro BioDrop-LITE. Posteriormente, para determinar la pureza del ADN extraído se consideró la relación  $A_{260}/A_{280}$ , tomando valores mayores a 1.8, mientras para la relación  $A_{260}/A_{230}$  valores mayores a 1.5. Por último, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar la integridad del ADN. El gel fue visualizado con un fotodocumentador MiniBIS Pro y las imágenes fueron tomadas con el programa GelCaptureBis.

### **9.6.2 Análisis de Secuenciación de nueva generación**

El ADN total obtenido fue enviado a secuenciar al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) “Unidad Mazatlán. Los perfiles taxonómicos se realizaron mediante el gen 16S. Se realizaron amplificaciones mediante PCR para la región V3 del gen 16S. Los primers utilizados fueron V3-338f y V3-533r<sup>1</sup> con adaptadores Illumina. Después, las muestras fueron cuantificadas en Qubit. Las lecturas de las secuencias se generaron utilizando 300 ciclos 2 x 150 con la plataforma Illumina MiniSeq.

### 9.6.3 Análisis de datos con Qiime 2

Las secuencias obtenidas de la plataforma Illumina MiniSeq fueron en formato Fasq, en seguida se ingresaron a la plataforma Qiime 2 versión 2022.2.0 para realizar el análisis de la microbiota a partir de los datos de secuenciación de ADN. Teniendo las secuencias cargadas en la plataforma, se sometieron a un proceso de control de calidad “Denoising & clustering”, que ayudo a eliminar o corrige secuencias ruidosas, es decir lecturas inespecíficas, además, fueron agrupadas según su similitud con ayuda del algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2016). Una vez obtenidas las secuencias representativas, se llevó a cabo la clasificación o asignación taxonómica, donde se compararon con la base de datos Silva para la región V3 para obtener la tabla de secuencias variantes de amplicón (ASVs) en Qiime 2 versión 2022.2.0.

Posteriormente, se realizó la construcción filogenética, primero haciendo un alineamiento de secuencias múltiples. Después, se hizo un enmascaramiento para eliminar regiones engañosas o poco informativas, luego se realizó una construcción de árbol (Price et al., 2010). Por otro lado, se hizo un análisis de rarefacción de los datos y se estimaron los índices de diversidad alfa Pielou, Shannon y Simpson. Por último, se calculó una matriz de distancia UniFrac ponderado por la plataforma Qiime2.

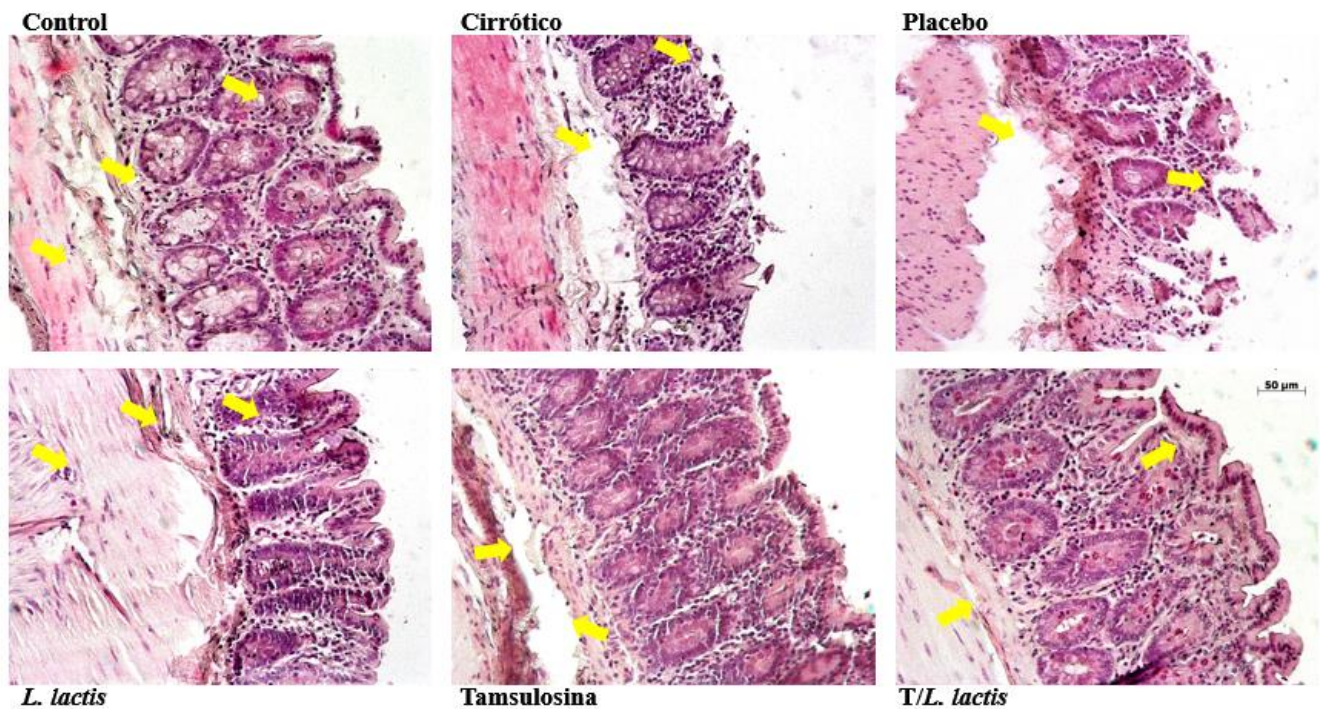
### 9.7 Análisis estadísticos

Los datos que presentaron distribución normal representan la media de los valores  $\pm$  el error estándar de la media (SEM), para las diferencias significativas en la varianza de los parámetros se evaluaron con una ANOVA y sus comparaciones correspondientes se realizaron con la prueba de Tukey. Para los datos que no tiene distribución normal se realizó una prueba no paramétrica como la de Kruskal-Wallis. Además, se realizó un análisis PERMANOVA para la distribución de las comunidades bacterianas.

## 10. Resultados

### 10.1 Efecto de la tamsulosina y *L. lactis* sobre la permeabilidad intestinal en el modelo de cirrosis hepática en ratas Wistar

Para evaluar el daño causado a nivel intestinal a consecuencia de la cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub>, y valorar la efectividad de los tratamientos se realizaron análisis histopatológicos de muestra de intestino de cada grupo en estudio. El tratamiento con *L. lactis*, muestra una recuperación en la integridad del epitelio intestinal, lamina propia y submucosa, además se observarse en buen estado el músculo, asemejándose al grupo control (sano). En el caso del grupo de tratamiento con tamsulosina, se aprecia aún disrupción del epitelio intestinal y lámina propia, además, un proceso de inflamación.



**Figura 13: Análisis histopatológico de intestino grueso de los diferentes tratamientos.** Imágenes representativas de los cortes histológicos de intestino grueso obtenido de cada uno de los grupos control, cirrótico, placebo *L. lactis*, Tamsulosina y *T/L. lactis* teñidos con hematoxilina y eosina, observadas a 20X. Las flechas indican los principales cambios morfológicos como disrupción del epitelio intestinal y de la lámina propia, separación de la submucosa y el músculo. El tratamiento con *L. lactis* y *T/L. lactis* contribuyo a un restablecimiento del epitelio y la lámina propia, además de ayudar a mejorar el estado de la submucosa y el músculo.

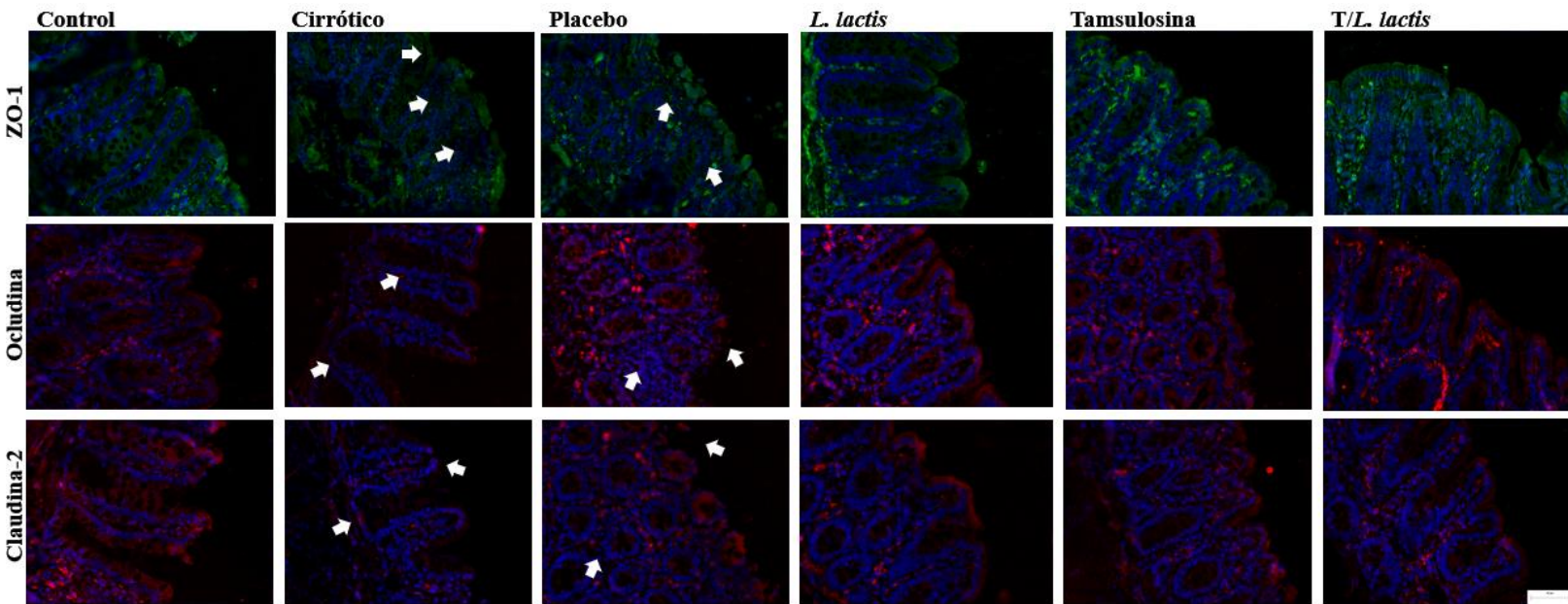
En lo que respecta al grupo que se le administró la terapia combinada (T/*L. lactis*), mostró un restablecimiento del epitelio y de la lámina propia, e integridad en submucosa y músculo. (Fig. 13).

#### **10.1.1 Análisis cualitativo de la expresión de proteínas involucradas en el mantenimiento de la permeabilidad intestinal: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en muestras de intestino grueso**

Como anteriormente se mencionó las proteínas de unión estrecha, son microdominios de la membrana plasmática del intestino, además de fungir como una barrera ante la difusión de fluidos y componentes, con una permeabilidad selectiva a iones, agentes patógenos, factores de crecimiento y algunos otros solutos. A través de análisis de epifluorescencia, se realizó un análisis cualitativo para la identificación de ZO-1, ocludina y claudina-2, donde se observó un mayor número de células positivas a ZO-1, ocludina y claudina-2 en el grupo control, en cuanto al grupo cirrótico, hay una disminución evidente de células positivas para estas proteínas (flechas) esto evidencia un daño en las uniones estrechas en comparación al grupo control.

En lo que respecta al grupo placebo, además de mostrar un daño en la mucosa intestinal, se denota también una disminución de células positivas a dichas proteínas (flechas). De la misma forma, al evaluar las muestras de intestino de los grupos tratados con *L. lactis*, tamsulosina y T/*L. lactis*, se aprecia un aumento de células positivas a ZO-1, ocludina y claudina-2 similar al grupo control (Fig. 14).



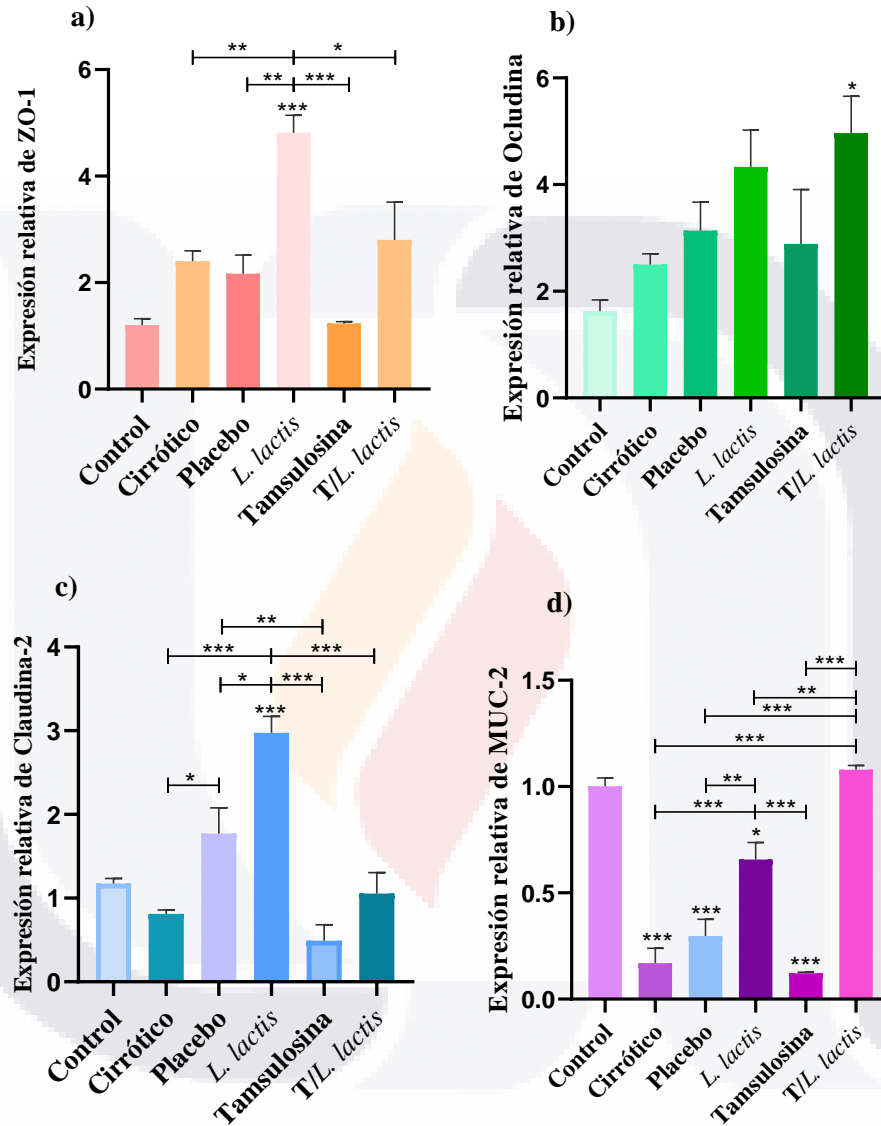


**Figura 14: Análisis por inmunofluorescencia de las proteínas de unión estrecha en muestras de intestino grueso.** El grupo control muestra células positivas a proteínas de unión estrecha ZO-1, ocludina y claudina-2; grupo cirrótico y placebo, evidencian una disminución de células positivas y zonas de ausencia (flechas blancas); tratamiento con *L. lactis*, tamsulosina y *T/L. lactis*, muestran incremento en células positivas, observadas a 20X.

### 10.1.2 Evaluación de la expresión génica de las proteínas de unión estrecha: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en muestras de intestino grueso

Para corroborar lo observado por epifluorescencia, se evaluó la expresión génica en muestras de intestino, retomando algunos aspectos importantes anteriormente mencionados, ZO-1, ocludina y claudina-2 son clave en la regulación de la permeabilidad intestinal, mientras que MUC-2 es una mucina que proporciona una barrera mucosa de protección al epitelio intestinal. En la figura 15, se observan los resultados, los cuales mostraron que el grupo tratado con *L. lactis* de manera individual incrementó la expresión de ZO-1 (4.81 veces de cambio) respecto al control (1.20 veces de cambio) y cirrótico (2.40 veces de cambio), el mismo grupo de tratamiento, incremento la expresión de claudina-2 (2.97 veces de cambio) respecto al control (1.17 veces de cambio) y cirrótico (0.81 veces de cambio), sin embargo, la expresión de ocludina se observó incrementada en los grupos tratados con *L. lactis* (4.33 veces de cambio), y con la terapia combinada *T/L. lactis* (4.96 veces de cambio) aunque no se logró restablecer como el control (1.62 veces de cambio). En relación con el grupo tratado

con tamsulosina no observamos cambios significativos en la expresión de dichos genes. Al mismo tiempo, se evaluó la expresión de MUC-2, donde pudimos observar que su expresión



**Figura 15: Efecto de los tratamientos *L. lactis* y tamsulosina sobre la expresión de ZO-1, Occludina, Claudina-2 y MUC-2.** Se observa un incremento de la expresión de las proteínas de unión estrecha (ZO-1, Claudina-2) en el grupo de tratamiento con *L. lactis*, además se muestra un incremento en la expresión de occludina en los grupos tratados con *L. lactis* y T/*L. lactis*. Además, se restableció la expresión de MUC-2 en el grupo de tratamiento T/*L. lactis*. Se utilizaron pruebas unidireccionales de ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos representan la media ± SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fue significativamente mayor en el grupo tratado con T/*L. lactis* (1.07 veces de cambio), esto sugiere buena sinergia en la terapia combinada, ya que la expresión de MUC-2 se correlaciona con lo obtenido en el grupo control (1.0 veces de cambio), por otro lado, también observamos un incremento importante en el grupo tratado solo con *L. lactis* (0.65), es decir, los grupos de tratamiento con *L. lactis* y T/*L. lactis* incrementaron la expresión de MUC-2 respecto al grupo cirrótico (0.16 veces de cambio).

### **10.1.3 Análisis por Western blot de las proteínas de unión estrecha: ZO-1, Ocludina y Claudina-2 en muestras de intestino grueso**

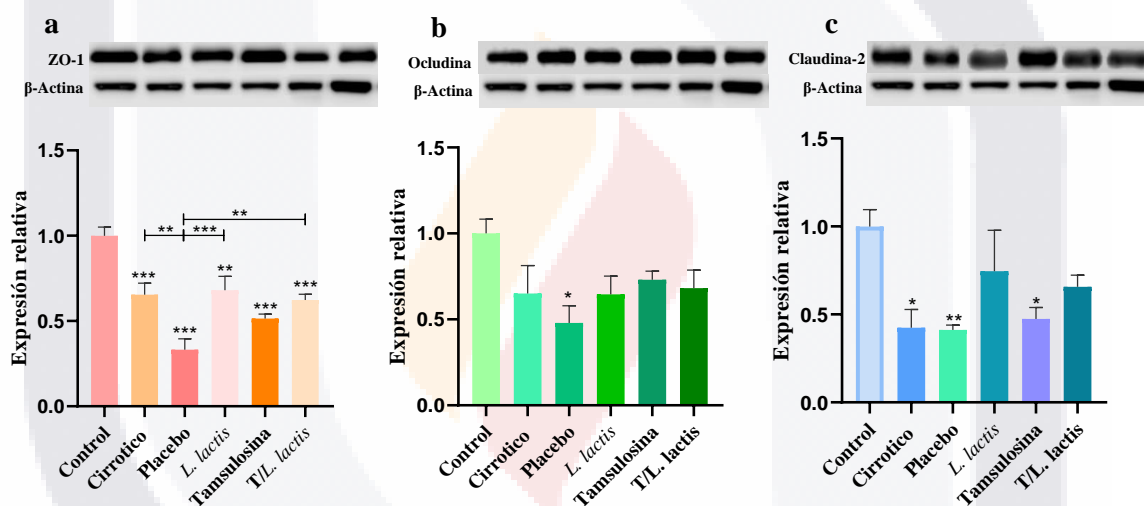
Por otro lado, para correlacionar los resultados obtenidos de la expresión génica de ZO-1, ocludina, claudina-2, se realizó un análisis de Western blot. Los resultados obtenidos mediante el inmunoblot muestran que los niveles de expresión de las proteínas de unión estrecha (ZO-1, ocludina y claudina-2) tuvieron un ligero incremento en todos los grupos de tratamiento respecto al grupo cirrótico, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 16). Cabe destacar, que en los grupos de tratamiento con *L. lactis* y T/*L. lactis* se observó un incremento en la expresión de ZO-1 y claudina-2, mientras que los grupos de tratamiento con *L. lactis*, tamsulosina y T/*L. lactis* incrementaron de manera similar la expresión de ocludina.

## **10.2 Efecto de la tamsulosina y *L. lactis* sobre la translocación bacteriana el modelo de cirrosis hepática en ratas Wistar**

### **10.2.1 Análisis microbiológico para la detección de bacterias en GLM, Bazo e hígado**

Anteriormente, los primeros estudios que se realizaban para indicar presencia de translocación bacteriana consistían en realizar cultivos de GLM y al ser positivos era indicativo de translocación bacteriana, por lo tanto, en este modelo experimental se realizaron cultivos no solo de GLM, sino también de tejidos como son el bazo e hígado, debido que las bacterias transitan desde la luz intestinal hacia GLM, después a órganos como son hígado y bazo, promoviendo la translocación bacteriana. Realizados los cultivos de los diferentes tejidos de los grupos experimentales, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 8), respecto al grupo control, no hubo ningún crecimiento en los medios selectivos como lo es

agar MacConkey para bacterias Gram negativos y agar sal y manitol para bacterias Gram positivas, donde no se observó crecimiento, ya que, en condiciones normales, no debe de haber presencia de bacterias en órganos linfoides. Respecto al grupo cirrótico, se observó crecimiento únicamente en el agar MacConkey para bacterias Gram negativas, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas para determinar el tipo de bacteria presente, los resultados mostraron cultivos positivos en tejidos (GLM, bazo e hígado) con presencia de *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, y *Proteus vulgaris* las cuales forman parte del grupo de las enterobacterias.



**Figura 16: Análisis por western blot de ZO-1, Occludina y Claudina-2 en muestras de intestino grueso de los grupos de tratamiento.** Los resultados fueron obtenidos a través del análisis densitométrico de las imágenes de las bandas de ZO-1, Occludina y Claudina-2, y normalizados con respecto al control ( $\beta$ -actina), los ensayos se realizaron por triplicado. Se utilizaron pruebas unidireccionales de ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Respecto a los grupos correspondientes a los tratamientos, en el caso de los grupos tratados con *L. lactis* y tamsulosina de manera individual, no se observó crecimiento bacteriano en los cultivos de los tejidos (GLM, bazo e hígado), sin embargo, en el grupo experimental de la terapia combinada de T/L. *lactis*, se observó crecimiento bacteriano en los

cultivos de los tejidos bazo e hígado, tratándose de *Staphylococcus aerus*, su presencia puede deberse a una contaminación externa.

**Tabla 8: Análisis microbiológico para la detección de bacterias en GLM, bazo e hígado de los diferentes grupos experimentales.**

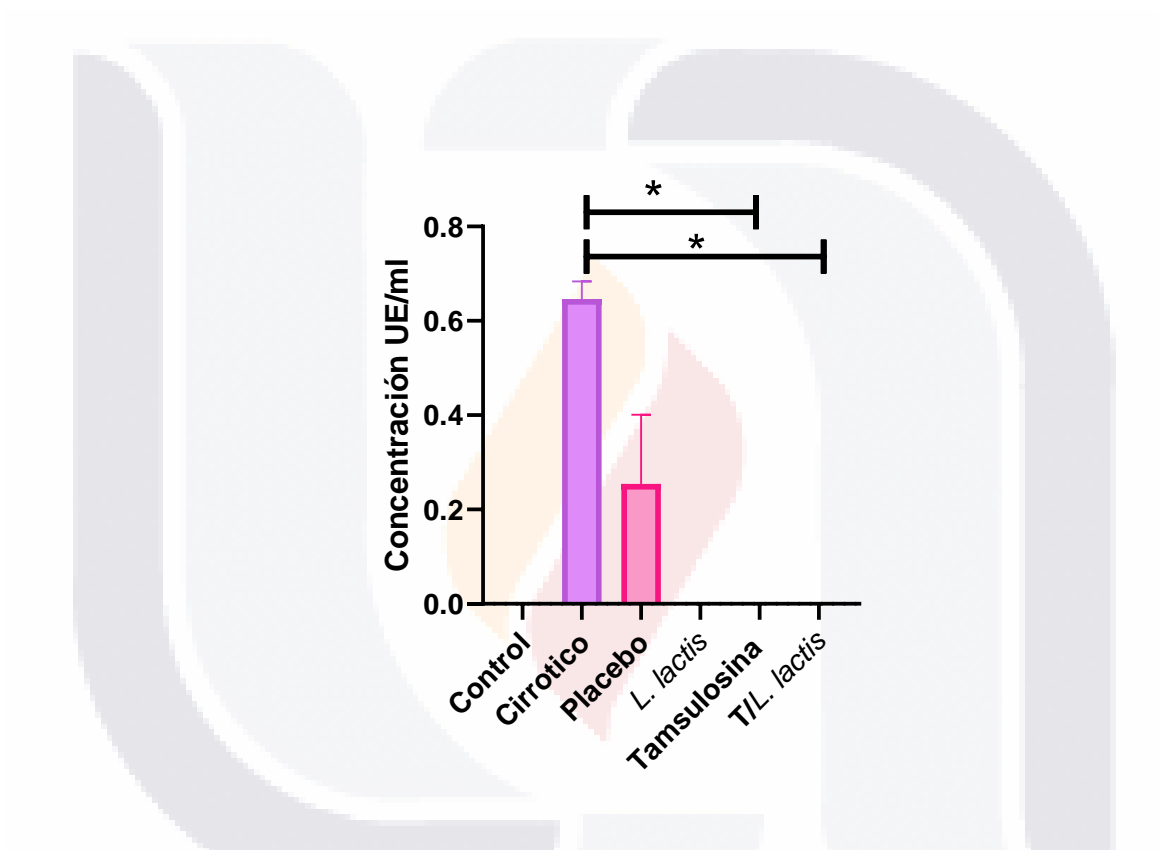
Grupo	GLM	Bazo	Hígado	Bacteria
<b>Control</b>	-	-	-	-
<b>Cirrótico</b>	+	+	+	<i>E. coli</i> <i>E. agglomerans</i> <i>P. vulgaris</i>
<b>Placebo</b>	+	+	+	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>
<i>L. lactis</i>	-	-	-	-
<b>Tamsulosina</b>	-	-	-	-
<i>T/L. lactis</i>	-	+	+	<i>S. aerus</i>

### 10.2.2 Detección de endotoxinas bacterianas mediante la prueba de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL)

Uno de los procesos más evidentes que se presentan cuando hay una afectación intestinal es la traslocación bacteriana, y una de las principales consecuencias de la TB es la liberación de productos bacterianos. Actualmente hay diferentes parámetros para descartar un proceso de translocación bacteriana evaluando diferentes productos bacterianos, uno de ellos son las endotoxinas también llamadas lipopolisacáridos (LPS), son una fracción presente únicamente en la membrana externa (de la pared) de las bacterias Gram negativas, y que son liberadas cuando hay lisis celular.

Las endotoxinas causan efectos tóxicos como fiebre, sepsis, falla multiorgánica e incluso la muerte (Wang et al., 2016). A través del ensayo de lisado de amebocitos *Limulus* (LAL) se realizó la cuantificación de endotoxina bacteriana en muestras de suero (sangre

portal) de los animales tratados. Donde se identificó en el grupo cirrótico y placebo la presencia de endotoxinas con una concentración de 0.6462 UE/ml y 0.2545 UE/ml respectivamente. En lo que respecta a los grupos tratados con *L. lactis*, tamsulosina y la terapia combinada T/*L. lactis*, no se identificó concentración de endotoxina en suero (Fig. 17). Las concentraciones de LPS reportadas de acuerdo con la literatura oscilan entre 0.0005 a 5 UE/ml.

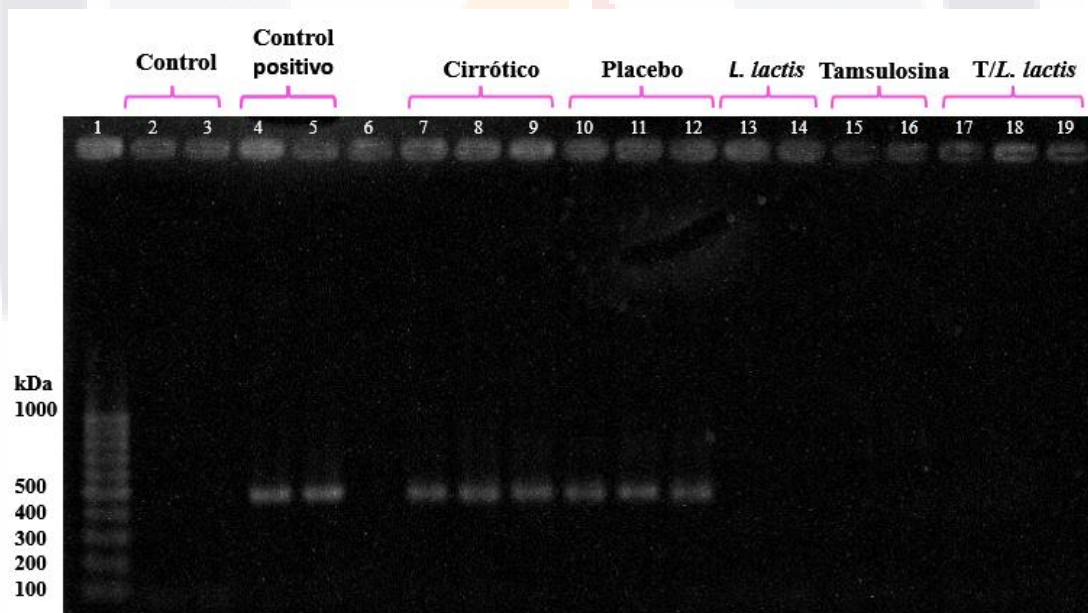


**Figura 17: Detección de endotoxina bacteriana en muestras de suero a través del método de LAL.** Las concentraciones de endotoxina de los diferentes grupos fueron: Control 0 UE/ml, cirrótico 0.6462 UE/ml, placebo 0.2545 UE/ml, *L. lactis*, tamsulosina y T/*L. lactis* 0 UE/ml. \*P<0.05 denota las diferencias significativas entre el grupo cirrótico y los grupos de tratamiento. Se realizaron ensayos por triplicado, ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos representan la media ± SEM.

### 10.2.3 Detección de ADN bacteriano en muestras de sangre

Otro parámetro para determinar translocación bacteriana es la identificación de ADN bacteriano en muestras de sangre, ya que es una forma de identificar si las bacterias

atravesaron la barrera intestinal y se encuentran en circulación sistémica. En la Figura 18, se observa la electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de PCR usando el gen 16S, que es el más utilizado para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. En el grupo cirrótico y placebo, se evidenciaron las bandas del gen 16S indicando presencia de ADN bacteriano en las muestras de sangre. En cuanto a los grupos de tratamiento con *L. lactis*, tamsulosina y la terapia combinada de T/*L. lactis*, mostraron un importante resultado, ya que no se obtuvo la banda respectiva del del gen 16S. Cabe mencionar, que el ADN bacteriano es un factor que corrobora la presencia de translocación bacteriana en pacientes cirróticos y al no detectarse en los grupos de tratamiento puede indicar que *L. lactis*, tamsulosina y la terapia combinada T/*L. lactis* están evitando el proceso de translocación bacteriana que se presenta comúnmente en la etapa avanzada de la cirrosis.



**Figura 18: Identificación de ADN bacteriano en muestras de sangre mediante PCR.** Gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los productos de amplificación obtenidos del gen 16S; carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, 2 y 3 control negativo, 4 y 5 control positivo, 7, 8 y 9 grupo cirrótico, 10, 11 y 12 grupo placebo, 13 y 14 grupo tratado con *L. lactis*, 15 y 16 grupo tratado con tamsulosina, 17, 18 y 19 grupo tratado con T/*L. lactis*.

### 10.3 Efecto de la tamsulosina y *L. lactis* sobre la composición de la microbiota intestinal en el modelo de cirrosis hepática en ratas Wistar: Análisis metagenómico

#### 10.3.1 Métricas de secuenciación y estructuras generales de la comunidad bacteriana

A partir de la secuenciación del ADN obtenido de la materia fecal de los diferentes grupos se obtuvieron un total de 1,794,138 secuencias de alto rendimiento de las 18 muestras para la región 16S-V3 rRNA con la plataforma Illumina MiniSeq (300 ciclos, 2X150). Posteriormente, los datos pasaron por un control de calidad y se ensamblaron 1,134,169 lecturas. Se obtuvieron de este proceso 659,780 secuencias. Después del procesamiento de secuencias se clasificaron 1,625 ASVs (Secuencias Variantes de Amplicón) de todas las muestras por medio de la base de datos Silva para la región V3.

#### 10.3.2 Diversidad bacteriana en el intestino grueso

Para determinar el efecto de la tamsulosina y *L. lactis* sobre la diversidad bacteriana, se realizaron curvas de rarefacción para la normalización de los datos, este método permite ajustar las diferencias en los tamaños de las bibliotecas entre las muestras, y que es necesario para permitir la determinación de la diversidad alfa, lo que evidencia si los ASVs obtenidos son suficientes con las secuencias conseguidas (Fig. 19) donde se aproximaron a una asíntota estable en todos los grupos, por lo tanto, la cantidad de secuencias obtenidas fue suficiente para determinar la diversidad alfa de cada grupo.

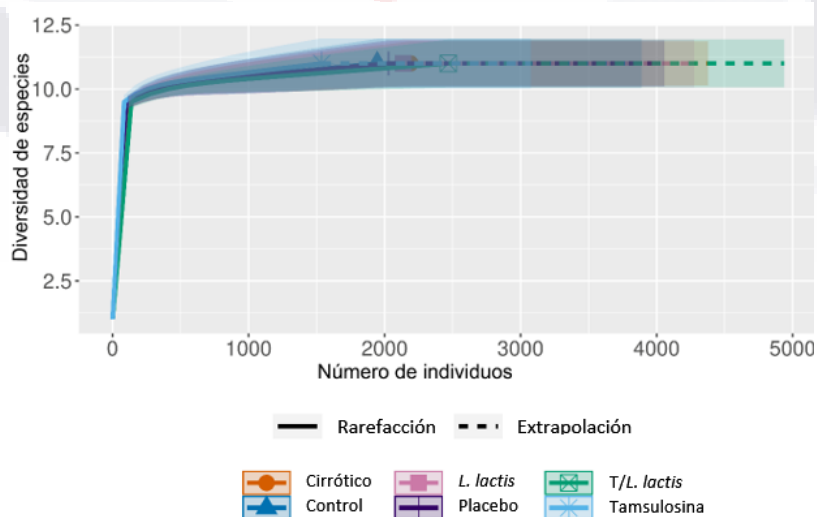


Figura 19: Análisis de rarefacción. Método que determina el número de ASV's promedio de las muestras.



Por otra parte, la diversidad, riqueza y equitatividad de las comunidades bacterianas en los diferentes grupos problema, se evaluó por medio de la estimación de los índices de diversidad alfa (índice de Pielou, Shannon y Simpson). El índice de diversidad alfa revela la diversidad biológica que existe en una sola muestra. El índice de Pielou mide la proporción de la diversidad observada, su valor va de 0-1, entre más cercano sea a 1 significa que todas las especies son igualmente abundantes y más cercano a 0 indica ausencia de uniformidad. El índice de Shannon es la incertidumbre de una especie seleccionada al azar entre la comunidad, es decir, si hay alta entropía, por lo tanto, habrá alta diversidad, y el índice de Simpson es una probabilidad tomada de una comunidad aleatoriamente, pero está enfocado a la dominancia de una especie. El análisis de diversidad mediante dichos índices (Fig. 20a, b, c), estadísticamente revelan que no hubo diferencia significativa entre los grupos, sin embargo, los grupos que presentan mayor diversidad y riqueza según los índices estimados son el grupo tratado con *L. lactis* y el tratado con T/*L. lactis*.

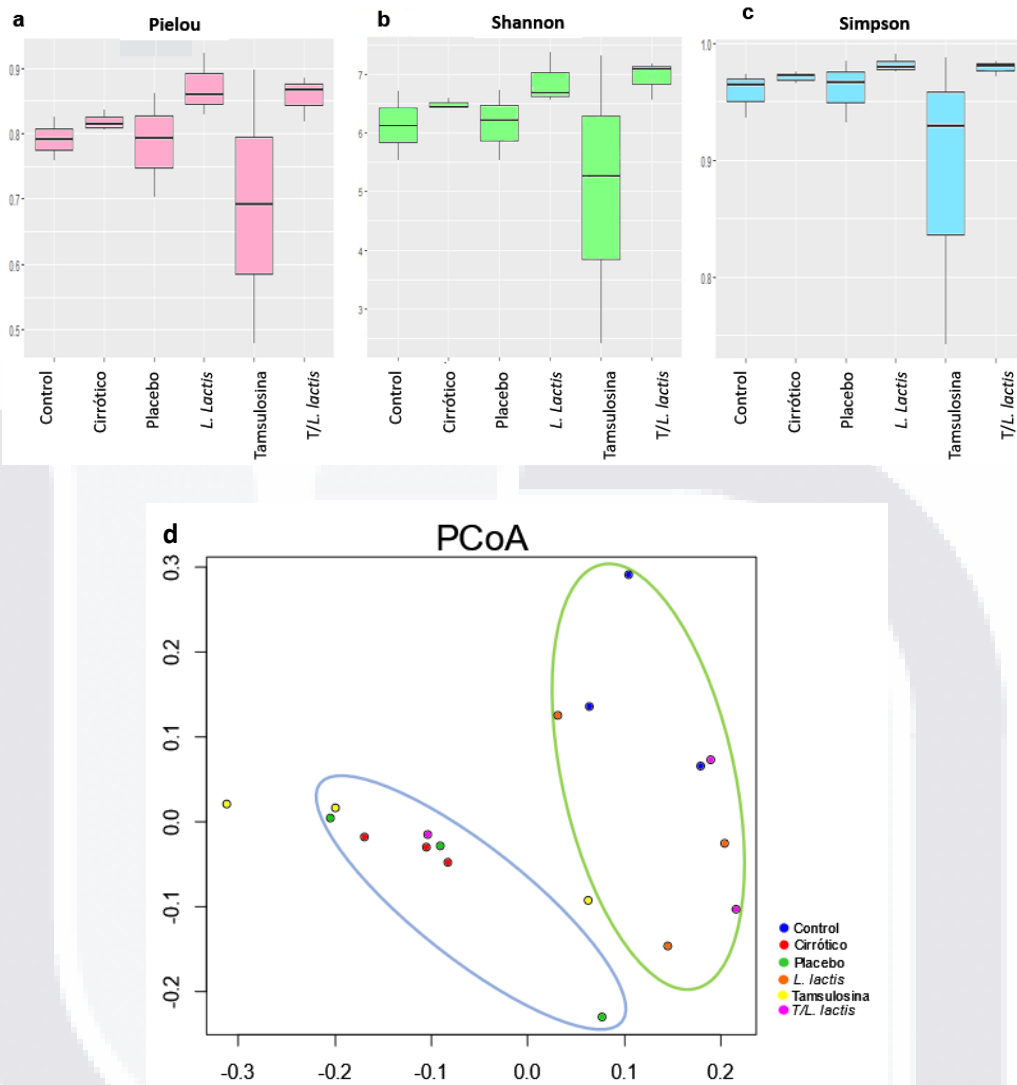
Así mismo, para determinar diferencias entre las comunidades se realizó un análisis de diversidad beta basado en una matriz de distancia UniFrac realizando un análisis de componentes principales (PCoA) (Fig. 20d). Se observó dos grupos formados por las muestras problema, es decir, se encuentran formando un grupo las muestras del grupo control y el tratamiento con *L. lactis* y, por otro lado, el grupo cirrótico, placebo y tamsulosina se encuentran formando otro grupo. Sin embargo, el grupo T/*L. lactis* se encuentra disperso. Los resultados obtenidos nos indican que las comunidades microbianas del tratamiento control y *L. lactis* son similares y son diferentes a las comunidades encontradas en los tratamientos cirrótico, placebo y tamsulosina. Para corroborarlo de manera estadística, se realizó una PERMANOVA, indicando que si hay diferencia significativa entre las comunidades ( $p < 0.05$ ).

### **10.3.3 Composición de la comunidad bacteriana**

La composición de las comunidades microbianas en los organismos bajo diferentes tratamientos dada gracias a la abundancia relativa de ASVs reveló que, a nivel de *phylum* en el grupo cirrótico se incrementó radicalmente la proporción de *Firmicutes* (81.7-91.1%), que es el *phylum* más abundante en todas las muestras, seguido por *Bacteroidetes* (5.4-14.2%),

*Proteobacteria* (0.52-2.2%) y *Actinobacteria* (0.44-0.78%) (Fig. 21a). En el grupo placebo, los *Firmicutes* se encuentra en una proporción similar al cirrótico (56.4-92.8%), *Bacteroidetes* (5-35%), *Proteobacteria* (0.06-0.7%) y *Actinobacteria* (0.4-0.7%). Respecto al grupo control según la abundancia relativa a nivel de *Phylum* los *Firmicutes* (43.6-62.9%), *Proteobacteria* (22.5-45.5%), *Bacteroidetes* (10.1-22%) y *Actinobacteria* (0.17-1.6%). En el grupo tratado con *L. lactis* se observó una reducción de *Firmicutes* (53-68.4%) en comparación al cirrótico y similar la observada en el grupo control, *Proteobacteria* (7.8-20.3%), *Bacteroidetes* (10.2-27.8%) y *Actinobacteria* (0.1-0.5%). En el caso del grupo tratado con tamsulosina resultó un incremento en *Firmicutes* (70.6-99.7%) semejante al grupo cirrótico, *Proteobacteria* (0.04-4.6%), *Bacteroidetes* (0.006-23.4%) y *Actinobacteria* (0.17-0.23%). Así mismo, los resultados muestran que en el grupo de la terapia combinada T/*L. lactis* se identificó la abundancia relativa de *Firmicutes* (51.3-85.7%), *Proteobacteria* (1.3-23%), *Bacteroidetes* (11-32%) y *Actinobacteria* (0.4-0.7%). Cabe mencionar que se evidenció a nivel de *Phylum* menor abundancia relativa de ASVs, tales como: *Cyanobacteria*, *Elusimicrobiota*, *Thermoplasmatota* y *Planctomycetota*.

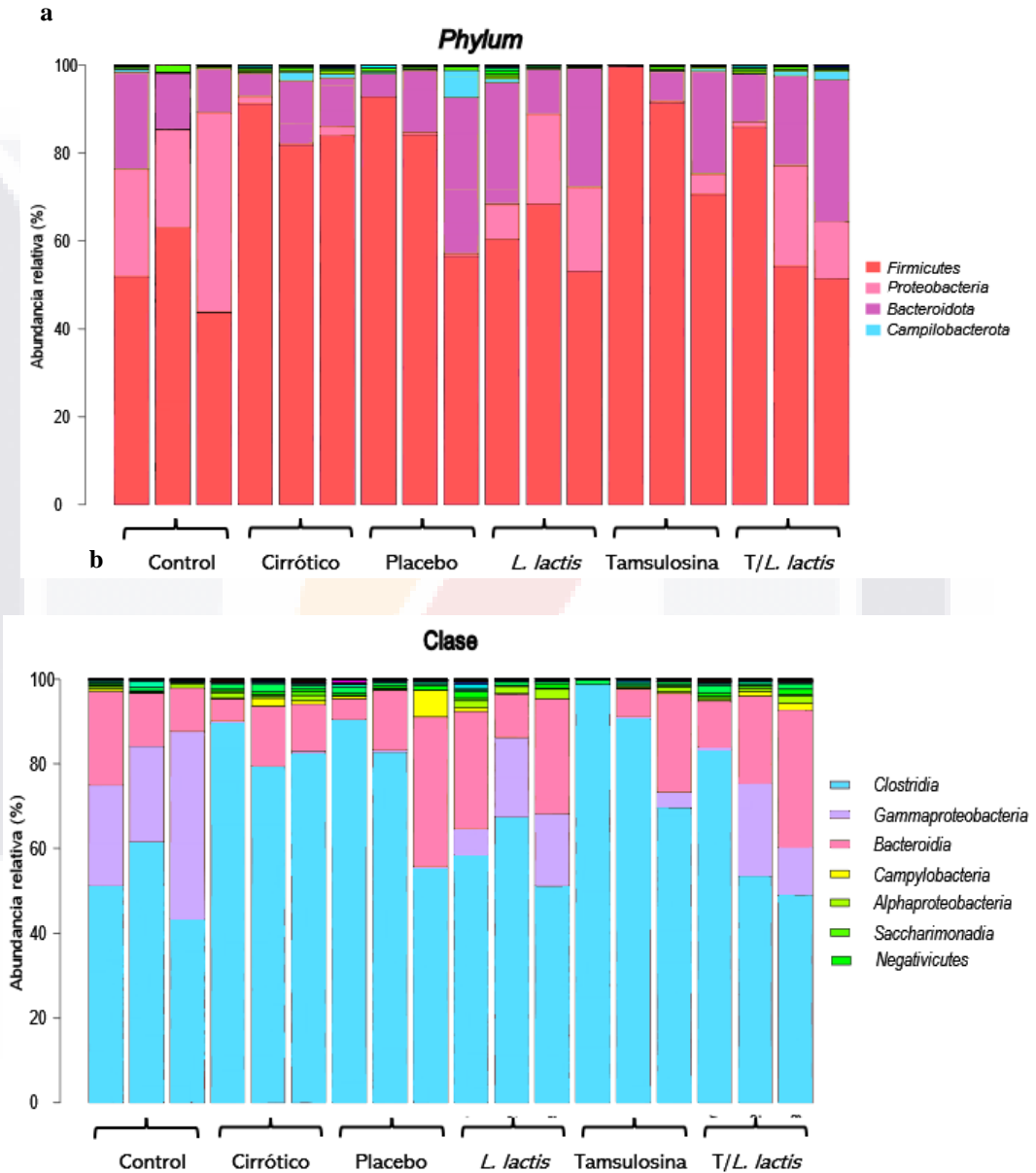
A nivel de clase, *Clostridia* es quien más predomina en todos los grupos, sin embargo, en el grupo control se encuentra en una proporción 50-60%, seguida de *Gammaproteobacteria* con 20-40%, *Bacteroidia* 10-20% y *Campylobacteria* 0.8%, en comparación con el cirrótico y placebo, se observó un aumento en *Clostridia* de 80%, una disminución de *Gamaproteobacteria* 0.7% (Fig. 21b). El grupo tratado con *L. lactis* las proporciones fueron similares al control, *Clostridia* con 50-67%, *Gamaproteobacteria* con 18%, *Bacteroidia* con 26%, *Campylobacteria* con 0.8%. En el caso del grupo tratado con tamsulosina, se observó un aumento significativo de *Clostridia* (98%). En el grupo T/*L. lactis* se observó *Clostridia* (48-53%).

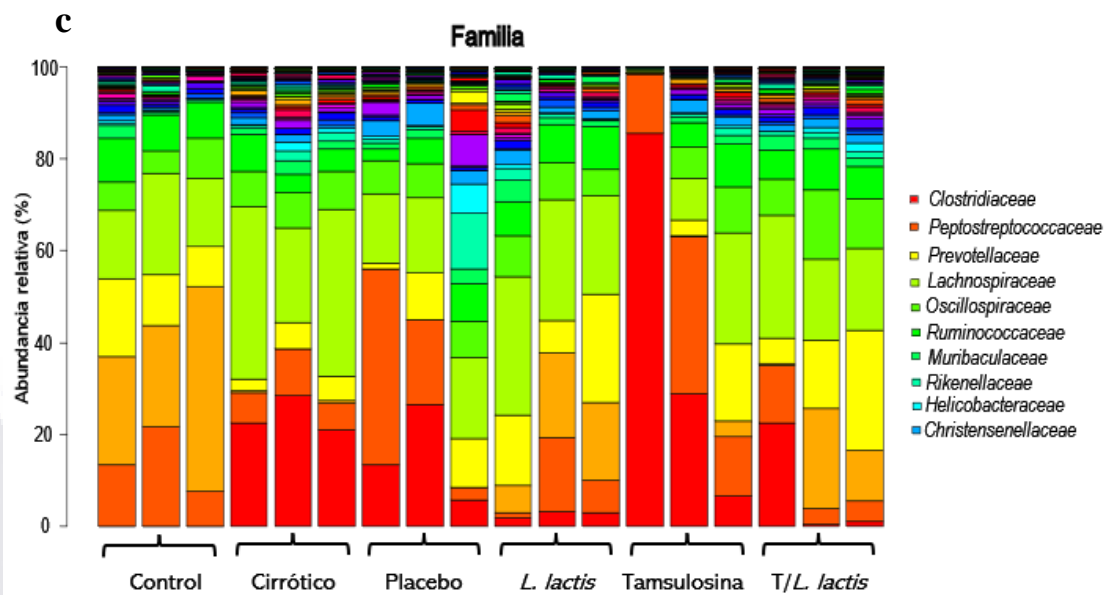


**Figura 20: Índices de diversidad alfa y beta de las comunidades bacterianas.** Los grupos de tratamiento con *L. lactis* y *T/L. lactis* muestran diversidad entre cada muestra y entre cada comunidad. Las gráficas representan los rangos intercuartílicos, la línea que divide la caja representa la mediana entre cada grupo. Índice a) Pielou, b) Shannon y c) Simpson  $p < 0.05$ , prueba Kruskal-Wallis. d) Análisis de coordenadas principales PCoA basados en una matriz de distancia UniFrac ponderado, PERMANOVA ( $p < 0.05$ ).

A nivel familia las proporciones de AVSs que conforman cada muestra aumentan, en el grupo control no encontramos *Clostridiaceae*, pero sí *Peptostreptococcaceae* 21%, *Prevotellaceae* (17%), *Lachnospiraceae* (20%), *Oscillospiraceae* (8%) y *Ruminococcaceae* (7%) (Fig. 21c). En el grupo cirrótico y placebo, hay un incremento de *Clostridiaceae* del 20%, y una disminución de *Peptostreptococcaceae*, en el grupo tratado con *L. lactis* y la

terapia combinada de T/L. *lactis* encontramos que hay una pequeña reducción de *Clostridiaceae* 3%, en el grupo tratado con tamsulosina hay un gran incremento de *Clostridiaceae* (30-80%).





**Figura 21: Perfiles de comunidades bacterianas en intestino con base a los ASV's (Secuencias Variantes de Amplicón).** a) Abundancia relativa a nivel de *Phylum*, b) abundancia relativa a nivel clase y c) abundancia relativa a nivel familia.

## 11 Discusión

La función del intestino, los cambios presentes en la microbiota y la translocación bacteriana son aspectos importantes que se deben de considerar en pacientes con cirrosis hepática. Por lo general, los tratamientos utilizados para la cirrosis tienen como objetivo regular las propias complicaciones hepáticas, sin embargo, no son suficientes debido a la falta de eficacia o especificidad. Por lo cual, el tratamiento farmacológico del intestino y el mantenimiento o la mejora de la microbiota, es un área importante que debe de seguir estudiándose. Este trabajo demostró que el uso de un alfa-bloqueador como la tamsulosina y *L. lactis* reducen las alteraciones provocadas sobre el intestino en el modelo de cirrosis hepática inducida con CCl<sub>4</sub>. Una de las evidencias más sustanciales obtenidas en este modelo es la mejoría en la histopatología del epitelio del intestino grueso en los animales que recibieron el tratamiento, es característico que durante la enfermedad la desorganización del tejido y la pérdida de las capas externas del intestino se presente, provocando con ello el paso de macromoléculas no deseadas y de microorganismos patógenos y comensales (Muñoz & Albillos, 2008). Los grupos de animales tratados con *L. lactis* de manera individual y combinada (T/*L. lactis*) mostraron una recuperación de la disrupción intestinal ocasionada por la cirrosis, en comparación con los grupos que no recibieron el tratamiento. Es importante mencionar que el daño del tejido y la función intestinal durante la enfermedad es a consecuencia de la hipertensión portal y factores etiológicos que modifiquen las secreciones de la mucosa (Muñoz & Albillos, 2008).

Por otro lado, a través de diferentes análisis realizados para detectar los daños ocurridos en la permeabilidad intestinal, se evaluaron proteínas de unión estrecha (ZO-1, Ocludina y Claudina-2), donde encontramos que los grupos de tratamiento con *L. lactis* administrado individual y combinada T/*L. lactis* promovieron un incremento en la expresión de dichas proteínas, además de inducir un incremento de MUC-2 que es una mucina de recubrimiento intestinal. Se ha reportado que durante la cirrosis se presenta una disminución de estas proteínas y en particular la de ZO-1 lo cual induce un incremento de la permeabilidad del intestino (Ibrahim et al., (2020) promoviendo el paso de toxinas, antígenos y bacterias que pueden contribuir a las complicaciones de la enfermedad, por lo tanto, alteraciones o daños en estas proteínas perjudica el mantenimiento y regulación de la barrera intestinal

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

durante la enfermedad hepática (Fukui, 2015). Yoseph et al. (2016), realizaron un modelo similar al nuestro, donde evidenciaron que el desequilibrio intestinal (estado de disbiosis) promueve a una disminución de proteínas de unión estrecha. Por lo cual, al encontrar que en los grupos tratados con *L. lactis* y T/*L. lactis*, hay un incremento en la expresión de estas proteínas se está contribuyendo a fortalecer y proteger la barrera intestinal disminuyendo la permeabilidad de toxinas, antígenos y bacterias.

Es posible que los efectos observados en estos grupos de tratamiento pueden deberse a los mecanismos regulatorios generados por el probiótico (*L. lactis*), se ha reconocido ampliamente que una característica propia de los probióticos es promover la reparación y el mantenimiento de la barrera intestinal a través de la expresión y funcionalidad de las proteínas de unión estrecha, además de estimular mecanismos antiinflamatorios, reduciendo el tránsito de productos o moléculas patogénicas a través de la mucosa (Díaz et al., 2015; Romero & Menchén, 2013). Por otro lado, Rondon et al. (2015) sugieren que los probióticos presentan una actividad competitiva contra agentes patógenos para evitar la adherencia al epitelio intestinal, así mismo, coadyuban a incrementar la expresión de MUC-2 favoreciendo la protección del intestino, esto explica los resultados del grupo tratado con *L. lactis* sobre el incremento de la expresión de MUC-2.

En lo que respecta a la translocación bacteriana, la cual es un mecanismo muy presente durante la cirrosis como consecuencia del daño intestinal (Wiest et al., 2014), en nuestro trabajo se realizó un análisis para ver si la afectación ocurrida sobre permeabilidad promovía el proceso de translocación bacteriana y si el tratamiento propuesto prevenía este mecanismo. Nuestro análisis consistió en realizar varios tipos de ensayos que permitieran detectar en la circulación portal, sistema y en diferentes órganos (GLM, bazo e hígado) la presencia de bacterias o de productos bacterianos. En nuestros resultados observamos que en el grupo cirrótico se encontraron diferentes tipos de bacterias tales como: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. agglomerans* y *P. vulgaris*. Nodarse Hernández, (2000) menciona que las bacterias que más se aíslan cuando hay un proceso de translocación bacteriana son las bacterias Gram negativas de la familia de enterobacterias, se sabe que un factor importante que contribuye a la translocación bacteriana además de la alteración de la permeabilidad intestinal es el sobrecrecimiento bacteriano, el cual se presenta cuando existe un decremento

en la síntesis de ácidos biliares y aunado a ello, las modificaciones de la microbiota intestinal (Fukui, 2015). En cuanto a los grupos de tratamiento con *L. lactis* y tamsulosina, no se detectó la presencia de bacterias en los tejidos, esto indica que los tratamientos al restablecer o mejorar la permeabilidad del intestino se evita el paso de microorganismos a diferentes sitios. Para sustentar estos resultados se realizó además un análisis en sangre para evaluar si las bacterias lograron translocar y llegar a la circulación sistémica, los resultados demuestran que en los grupos tratados con *L. lactis*, tamsulosina y T/*L. lactis* no se identificaron productos bacterianos como LPS y ADN bacteriano. La endotoxemia se presenta cuando hay disrupción en la mucosa intestinal permitiendo el libre acceso a bacterias y sus productos; las endotoxinas o LPS, mencionadas anteriormente, son una fracción presente únicamente en las bacterias Gram negativas y es liberado cuando hay lisis celular, estas moléculas son altamente tóxicos para el organismos (Nodarse Hernández, 2000). Las complicaciones de la endotoxemia son muy graves en pacientes críticos, ya que puede contribuir al fallo multiorgánico, deterioro hepático, activan el sistema inmune y respuesta inflamatoria, además de un desequilibrio hemodinámico en la cirrosis (G Soriano & Guarner, 2003; Su & Ding, 2015).

La adhesión de bacterias a las células epiteliales intestinales es un primer paso para la colonización e introducción. Por consiguiente, limitar el acceso de las bacterias a la superficie apical de los enterocitos que recubren el tracto gastrointestinal es importante para la supervivencia del huésped (Lu & Walker, 2001). En los grupos tratados con *L. lactis* se conoce que al ser un probiótico coloniza transitoriamente el intestino y excluyen de forma competitiva la adhesión de bacterias patógenas al epitelio intestinal (Resta-Lenert & Barrett, 2003). Por lo cual se demuestra que el tratamiento probiótico impide la adhesión de bacterias lumbinales a la superficie del epitelio. En lo que respecta a la tamsulosina no hay datos publicados sobre el efecto de este fármaco en el intestino, sin embargo, en nuestro modelo observamos una mejoría sobre la permeabilidad intestinal. Cabe mencionar que se requieren más estudios para conocer los mecanismos implicados en la modificación de la permeabilidad intestinal realizada por este fármaco.

Otro aspecto importante durante la cirrosis y en muchas enfermedades intestinales son los cambios en la composición de la microbiota (Milosevic et al., 2019). Acerca de la



composición de la microbiota intestinal, al estimar los índices de diversidad alfa se denotó que los grupos con más diversidad y riqueza fueron los tratados con *L. lactis* y T/*L. lactis*, esto se corrobora con lo reportado por Carvalho et al. (2018), ya que ellos estimaron el índice de Shannon, y aunque no encontraron diferencias significativas, evidenciaron que el grupo tratado con *L. lactis* fue el que mostró mayor riqueza sobre los demás grupos. Por otro lado, Pérez-Monter et al. (2019), evaluaron los índices de Chao1 y Shannon, donde compararon la diversidad entre un grupo control (sano) y un grupo cirrótico (enfermo), resultando el grupo cirrótico con menor diversidad alfa en comparación al grupo control, respecto a nuestros resultados se obtuvo de manera contraria, aunque no hubo diferencia significativa, el grupo cirrótico presentó mayor diversidad en comparación al grupo control. Lo que respecta a la diversidad beta, Chen et al. (2016) realizaron un análisis de la microbiota intestinal por secuenciación del gen 16S rRNA, e hicieron un análisis de matrices de distancia UniFrac ponderado y revelaron una notable diferencia en las comunidades bacterianas del grupo cirrótico y control, como lo observamos en nuestros resultados obtenidos.

Otro punto es la abundancia relativa, donde a nivel Phylum *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los más abundantes en todas las muestras, donde principalmente los cambios dietéticos provocan cambios en la composición de la microbiota desencadenando varias complicaciones. Cabe destacar que los *Firmicutes* son bacterias que tienen capacidad de degradar algunos polisacáridos indigeribles convirtiéndolo en butirato que es la principal fuente de energía para las células intestinales, ya que un incremento de este phylum y disminución de *Bacteroidetes* están directamente relacionada con obesidad por una dieta alta en grasas, ya que la producción de energía y calorías a partir de polisacáridos indigeribles altera la homeostasis energética (Pascale et al., 2018). Por lo tanto, nuestros resultados se corroboran, Chen et al. (2016) realizan un estudio similar donde determinan la conformación de la microbiota intestinal e identifican que *Firmicutes* incrementa significativamente en el grupo cirrótico, además en el grupo control *Proteobacteria* fue más abundante en comparación al grupo cirrótico, y fue lo que se observó en nuestros resultados obtenidos. Por otro lado, Castañeda-Guillot, (2018) afirma que *Firmicutes* y *Bacteroidetes* conforman en su mayoría a la microbiota intestinal en humanos y ratones. En cuanto a las condiciones normales de la microbiota intestinal, Pérez-Monter et al. (2019), indican que se constituye

por *Firmicutes* (60%), *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, mientras que en un estado de cirrosis se ve incrementada *Proteobacteria* y hay una disminución en *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, en nuestros resultados se observó que *Proteobacteria* disminuyó significativamente en un estado de cirrosis. Sánchez Martín & Hamre Gil (2021) mencionan que *Firmicutes* es clave en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, además, mencionan que en un estado de cirrosis disminuye *Firmicutes*, respecto a nuestros resultados, *Firmicutes* es quien predomina en las muestras por lo que favorece a mantener la integridad de la barrera intestinal, sin embargo, en el grupo cirrótico fue el *phylum* más abundante. Ahora bien, los grupos de tratamiento con *L. lactis* individual y combinado T/*L. lactis* lograron restablecer las proporciones a nivel *phylum* de manera similar al grupo control (sano), retomando los antecedentes, *L. lactis* al ser un probiótico confiere la capacidad de modular la microbiota intestinal en enfermedades hepáticas (G. Romero, 2016b), además de poder controlar alteraciones en la permeabilidad intestinal (Germán Soriano et al., 2013). Es decir, el tratamiento con *L. lactis*, ayudo a reducir las modificaciones en la composición de la microbiota intestinal consecuencia de la enfermedad de cirrosis hepática.

## 12 Conclusión

1. La administración de tamsulosina y *L. lactis* mostró un efecto benéfico sobre los daños presentes en el intestino durante la cirrosis hepática.
2. El tratamiento con *L. lactis* y T/*L. lactis* promovió a un aumento en la expresión de proteínas de unión estrecha tales como ZO-1, Ocludina y Claudina-2. Así mismo, *L. lactis* aumento de forma significativa la expresión génica de MUC-2.
3. Por otra parte, el tratamiento ya sea administrado de forma individual o combinado, inhibió el paso de bacterias y productos bacterianos como endotoxinas (LPS) y ADN bacteriano a la circulación sistémica.
4. El tratamiento con *L. lactis* reduce las modificaciones de la composición de la microbiota intestinal presentes durante la cirrosis hepática,
5. Este es el primer estudio reportado sobre el potencial terapéutico de la tamsulosina y *L. lactis* sobre el intestino durante la cirrosis hepática.

### 13 Bibliografía

- Aceves-Martins, M. (2014). Cuidado nutricional de pacientes con cirrosis hepática. *Nutricion Hospitalaria*, 29(2), 246–258. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.2.7024>
- Albillos, A., de la Hera, A., & Álvarez-Mon, M. (2001). Consecuencias patogénicas de la translocación bacteriana en la cirrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología*, 24(9), 450–453. [https://doi.org/10.1016/s0210-5705\(01\)79001-2](https://doi.org/10.1016/s0210-5705(01)79001-2)
- Albillos, Agustín, Gottardi, A. De, & Rescigno, M. (2020). The gut-liver axis in liver disease : Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*, 72(3), 558–577. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.003>
- Alcántara-Hernández, Rocío y Hernández-Méndez, A. (2018). *Complejos moleculares de la señalización adrenérgica*. 223–235.
- Alcántara-Montero, A. (2016). Alfa-1 bloqueantes y resultados urodinámicos en varones con síntomas del tracto urinario inferior relacionados con obstrucción benigna de próstata : ¿ fin de la controversia ? Alpha-1 blockers and urodynamic outcomes in men with lower uri. *Revista Mexicana de Urología*, 76(6), 396–397. <http://dx.doi.org/10.1016/j.uromx.2016.10.002>
- Aldaba-Murato, L. R., Ventura-Juárez, J., Pérez-Hernandez, A. M., Hernández-Morales, A., Muñoz-Ortega, M. H., Martínez-Hernández, S. L., Alvarado-Sánchez, B., & Macías-Pérez, J. R. (2021). Therapeutic perspectives of p-coumaric acid: Anti-necrotic, anti-cholestatic and anti-amoebic activities. *World Academy of Sciences Journal*, 3(5), 1–8. <https://doi.org/10.3892/wasj.2021.118>
- Arango, C., Villamarin, N., Gallardo, L. M., De Alviz, A. L., De Ramos, M. E., & De Mejía, L. A. (1985). Tres generaciones de cefalosporinas. Estructura, farmacología y actividad antimicrobiana. *Biomédica*, 5(1–2), 29. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v5i1-2.1899>
- Araujo Álvarez, L. J. (2010). *BACTERIAS LÁCTICAS COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES*. 29(1), 2–7.

- Arce, W. (2020). Disbiosis intestinal : alteración de la relación mutualista entre microbiota y sistema inmune Intestinal dysbiosis : alteration of the mutualistic relationship between microbiota and immune system. *Acta Academica*, 67(67), 171–182.  
<http://revista.uaca.ac.cr/index.php/actas/article/view/913/1190>
- Arredondo Bruce, A. E., Trujillo Pérez, Y., & Chiong Quezada, M. (2019). Acercamiento al tratamiento del paciente cirrótico TT - An approach to the treatment of the cirrhotic patient. *Rev. Medica Electron*, 41(5), 1269–1278.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1684-18242019000501269](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242019000501269)
- Bosch, J., Abraldes, J. G., Albillos, A., Aracil, C., Bañares, R., Berzigotti, A., Calleja, J. L., de la Peña, J., Escorsell, A., García-Pagán, J. C., Genescà, J., Hernández-Guerra, M., Ripoll, C., Planas, R., & Villanueva, C. (2012). Portal hypertension: Recommendations for evaluation and treatment. Consensus document sponsored by the Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH) and the Biomedical Research Network Center for Liver and Digestive Diseases (CIBERehd). *Gastroenterologia y Hepatologia*, 35(6), 421–450.  
<https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.02.009>
- Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. 254, 248–254.
- Burguet, N., & Brito, L. C. (2012). Validación del metodo LAL. *21-03*, 21(3), 32–36.  
<http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v21n3/vac06312.pdf>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carnicé, R. T. (2006). *Probióticos . Concepto y mecanismos de acción*. 4(1), 30–41.
- Carone, L., Oxberry, S. G., Twycross, R., Charlesworth, S., Mihalyo, M., & Wilcock, A. (2017). Spironolactone. *Journal of Pain and Symptom Management*, 53(2), 288–292.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2016.12.320>

- Carvalho, R., Vaz, A., Pereira, F. L., Dorella, F., Aguiar, E., Chatel, J. M., Bermudez, L., Langella, P., Fernandes, G., Figueiredo, H., Goes-Neto, A., & Azevedo, V. (2018). Gut microbiome modulation during treatment of mucositis with the dairy bacterium *Lactococcus lactis* and recombinant strain secreting human antimicrobial PAP. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33469-w>
- Castañeda Guillot, C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(1), 94–110.
- Castoldi, A., Aguiar, C. F. De, & Moraes-vieira, P. M. (2015). *They Must Hold Tight : Junction Proteins , Microbiota And Immunity In Intestinal They Must Hold Tight : Junction Proteins , Microbiota And Immunity In Intestinal Mucosa*. May 2016. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150630133141>
- Cesaro, C., Tiso, A., Del Prete, A., Cariello, R., Tuccillo, C., Cotticelli, G., Del Vecchio Blanco, C., & Loguercio, C. (2011). Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease*, 43(6), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2010.10.015>
- Chen, Y., Ji, F., Guo, J., Shi, D., Fang, D., & Li, L. (2016). Dysbiosis of small intestinal microbiota in liver cirrhosis and its association with etiology. *Scientific Reports*, 6(September), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep34055>
- Chopyk, D. M., & Grakoui, A. (2020). Contribution of the Intestinal Microbiome and Gut Barrier to Hepatic Disorders. *Gastroenterology*, 159(3), 849–863. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.077>
- Ciaula, A. Di, Baj, J., Garruti, G., Celano, G., De, M., Wang, H. H., Maria, D., Palo, D., Bonfrate, L., Qh, D., Portincasa, P., Murri, C. M. A., Ciencias, D. De, Humana, O., Medicina, F. De, Universidad, D., Emergencias, D. De, Medicina, F. De, Moro, A., ... Aldo, B. (2020). *Liver Steatosis, Gut-Liver Axis, Microbiome and Environmental Factors. A Never-Ending Bidirectional Cross-Talk*. 1–44.
- Cisneros Garza, L. E., Ramos Gòmez, M. V., & Flores García, N. C. (2022). Tercera Hepatotriología 2022: Hepatología de vanguardia. In *Asociación Mexicana de*

*Hepatología* (Vol. 44, Issue 8). <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>

Cubana, R., & Biom, I. (2010). *Microbiota intestinal , sistema inmune y obesidad*. 29(3), 364–397.

De Lorenzo Pinto, A., García Sanchez, R., & Lorenzo Salinas, A. (2017). Enemas de lactulosa para el tratamiento de la encefalopatía hepática. ¿Ayudamos o empeoramos? *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 109(2), 715–735. <https://doi.org/10.17235/reed.2017.5106/2017>

Delgado-Venegas, C., Martínez-Hernández, S., Cervantes-García, D., Montes de Oca-Luna, R., Loera-Arias, M. de J., Mata-Martínez, M., Ventura-Juárez, J., & Muñoz-Ortega, M. (2021). Modulating effects of the probiotic *Lactococcus lactis* on the hepatic fibrotic process induced by CCl 4 in Wistar rats . *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(4), 1–9. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9770>

Díaz, D., Dorelo, R., Fleitas, D., & Chifflet, S. (2015). *Rol de las uniones estrechas del epitelio intestinal en la patogenia de la enfermedad de Crohn*. 2(5982), 48–58. <http://anfamed.edu.uy/index.php/rev/article/view/157/70>

Díaz, Dionisio, Dorelo, R., Fleitas, D., & Chifflet, S. (2015). Rol de las uniones estrechas en la Enfermedad de Crohn. *An Facultad Med*, 2(2), 48–58.

Elizondo-luévano, J. H., Hernández-garcía, M. E., & Pérez-narváez, O. A. (2020). *Berberina , curcumina y quercetina como potenciales agentes con capacidad antiparasitaria*. 68(December), 1241–1249.

Fernández-Gómez, J. (2006). Infecciones en la cirrosis hepática. *Revista Clinica Española*, 5(5), 241–250.

Ford, A. C., Harris, L. A., Lacy, B. E., Quigley, E. M. M., & Moayyedi, P. (2018). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 48(10), 1044–1060. <https://doi.org/10.1111/apt.15001>

Fox, S. I., Altamira García, J., Fernández, M., Muñoz Bermejo, M. E., & Solís Soto, J. M.

(2011). *Fisiología HUMANA. 12° Edición.*

Franco Cardoza, Y. (2005). LA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y SU APLICACION EN EL DIAGNOSTICO DE BACTERIAS FITOPATOGENAS. *Fitosanidad, 9.*

Frati-Munari, A. C., & Galindo-Suárez, R. M. (2020). Rifaximina- $\alpha$  en la encefalopatía hepática. Consideraciones fármaco-económicas para México. *Medicina Interna, 36(5), 621–632.*

Fukui, H. (2015). Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia. *World Journal of Hepatology, 7(3), 425–442.*  
<https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i3.425>

García-tSao, G. (1992). Tratamiento farmacológico de la hipertensión portal. *Sección de Enfermedades Digestivas, 17, 1986–1987.*

Gómez-Cortés, E., Pérez-Cabeza de Vaca, R., Martínez-Hernández, J. E., Guerrero-Celis4, N., Mondragón-Terán5, P., Alcaráz-Estrada6, S. L., López-Hernández7, L. B., & Suárez-Cuenca, J. A. (2015). *Permeabilidad intestinal y eje intestino – hígado.* 83–89.

Gómez-Hurtado, I., Such, J., & Francés, R. (2016). Microbioma y traslocación bacteriana en la cirrosis. *Gastroenterología y Hepatología, 39(10), 10.*

Gómez-López, A. (2019). Microbioma, salud y enfermedad: probióticos, prebióticos y simbióticos. *Biomédica, 4, 617–621.*

Guarner, F. (2011). Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterología y Hepatología, 34(3), 147–154.*  
<https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2010.11.009>

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). Tratado de fisiología médica. In *Syria Studies* (Elsevier, Vol. 7, Issue 1).  
[https://www.researchgate.net/publication/269107473\\_What\\_is\\_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars\\_12December2010.pdf%0Ahttps://think-](https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-)



asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625

- Han, D.-W. (2002). Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World Journal of Gastroenterology*, 8(6). www.wjgnet.com
- Horna Castro, D. M., & Casazola Quispe, G. M. (2019). *Efecto diurético del extracto hidroalcohólico del Cucumis melo (Melón) en comparación con furosemida, hidroclorotiazida y espironolactona en ratas albinas*. 123.  
<http://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/UMA/204/45-2019%28Final%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ibrahim, S., Zhu, X., Luo, X., Feng, Y., & Wang, J. (2020). PIK3R3 regulates ZO-1 expression through the NF- $\kappa$ B pathway in inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology*, 85(March), 106610.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106610>
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). *Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad*. 78(199), 240–248.
- Jameson, L., Kasper, D., Longo, D., Fauci, A., Hauser, S., & Joseph, L. (2018). *Harrison Principios de Medicina Interna - 20<sup>o</sup> - Tomo 2* (pp. 1891–1900).
- Kalaitzakis, E. (2014). Gastrointestinal dysfunction in liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), 14686–14695. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14686>
- Lorenzo, A. G. De, Escribano, J. A., & Rodríguez, J. A. (2007). *Importancia clínica de la translocación bacteriana*. 22, 50–55.
- Lu, L., & Walker, W. A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(6), 1124S-1130S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.6.1124s>
- Macías-pérez, J. R., Vázquez-lópez, B. J., Muñoz-ortega, M. H., Aldaba-muruato, L. R., Martínez-hernández, S. L., Sánchez-alemán, E., & Ventura-juárez, J. (2019). *Curcumin and  $\alpha / \beta$  -Adrenergic Antagonists Cotreatment Reverse Liver Cirrhosis in Hamsters : Participation of Nrf-2 and NF-  $\kappa$  B*. 2019.

<https://doi.org/10.1155/2019/3019794>

- Martínez, J., & Albillos, A. (2014). Tratamiento de la ascitis refractaria. *Gastroenterología y Hepatología*, 37(S2), 68–73. [https://doi.org/10.1016/S0210-5705\(14\)70072-X](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(14)70072-X)
- Medina-Pizaño, M. Y., Medina-Rosales, M. N., Martínez-Hernández, S. L., Aldaba-Muruato, L. R., MacÍas-Pérez, J. R., Sánchez-Alemán, E., Ventura-Juárez, J., & Muñoz-Ortega, M. H. (2022). Protective Effect of Curcumin against Doxazosin- and Carvedilol-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6085515>
- Medina Pizaño, M. Y. (2020). *Efecto protector de la curcumina en línea celular HepG2 ante la posible citotoxicidad de doxazosina, carvedilol y tamsulosina, estudio in vitro.*
- Mesejo, A., Juan, M., & Serrano, A. (2008). Cirrosis y encefalopatía hepáticas: Consecuencias clínico-metabólicas y soporte nutricional. *Nutricion Hospitalaria*, 23(SUPPL. 2), 8–18.
- Milosevic, I., Vujovic, A., Barac, A., Djelic, M., Korac, M., Spurnic, A. R., Gmizic, I., Stevanovic, O., Djordjevic, V., Lekic, N., Russo, E., & Amedei, A. (2019). Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: A review of the literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms20020395>
- Mueller-Lissner, S. A., & Wald, A. (2010). Constipation in adults. *BMJ Clinical Evidence*, 2010(October 2009).
- Muñoz, L., & Albillos, A. (2008). Interacción entre el hígado y el intestino en la cirrosis. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 7(4), 170–173. [https://doi.org/10.1016/S1578-1550\(08\)73012-2](https://doi.org/10.1016/S1578-1550(08)73012-2)
- Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>
- Nodarse Hernández, R. (2000). TRANSLOCACIÓN BACTERIANA : ENFOQUE

MICROBIOLÓGICO. *Rev Cubana Med Milit*, 29(3), 199–205.

- Oliver, E., Mayor Jr, F., & D'Ocon, P. (2019). Beta-blockers: Historical Perspective and Mechanisms of Action. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 72(10), 853–862. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2019.04.006>
- Ortega, R., & Ginés, P. (n.d.). *Ascitis en la cirrosis hepática*. 49–51.
- Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., Giustina, A., & Gazzaruso, C. (2018). Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*, 61(3), 357–371. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1605-5>
- Perdomo Morales, R. (2004). Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). *Revista Cubana de Farmacia*, 38(1), 1–1. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152004000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Pérez-Monter, C., Escalona-Nandez, I., Estanes-Hernández, A., Noriega-López, L. G., & Torre-Delgadillo, A. (2019). Determinación de la microbiota intestinal en pacientes cirróticos de población mestizo-mexicana. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.02.010>
- Planas, M. M. (2008). *Desarrollo y validación de un modelo experimental de encefalopatía hepática en ratas Efectos de la administración de IGF-1 frente a rifaximina en este modelo experimental*.
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). *FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments*. 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Raj, A. S., Shanahan, E. R., Tran, C. D., Bhat, P., Fletcher, L. M., Vesey, D. A., Morrison, M., Holtmann, G., & Macdonald, G. A. (2019). Dysbiosis of the duodenal mucosal microbiota is associated with increased small intestinal permeability in chronic liver disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 10(8), 1–8. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000068>

- Resta-Lenert, S., & Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, *52*(7), 988–997. <https://doi.org/10.1136/gut.52.7.988>
- Rodríguez-noriega, E., León-garnica, G., Petersen-morfín, S., Pérez-gómez, H. R., González-díaz, E., & Morfín-otero, R. (2014). *La evolución de la resistencia bacteriana en México , 1973-2013*. *34*, 181–190.
- Romero, G. (2016a). Influencia de la microbiota intestinal en la enfermedad hepática crónica. Su rol en el hepatocarcinoma. *Gen*, *70*(2), 064–069. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-35032016000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032016000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Romero, G. (2016b). *Influencia de la microbiota intestinal enfermedad hepática crónica . Su rol hepatocarcinoma en en la el. 70*, 64–69.
- Romero, M., & Menchén, L. (2013). Probióticos: Nuevas líneas de investigación y aplicaciones terapéuticas en patología digestiva. *Nutricion Hospitalaria*, *28*(SUPPL. 1), 46–48.
- Rondon, L., Añez Zavala, R. M., Salvatierra Hidalgo, A., Meneses Barrios, R. T., & Heredia Rodriguez, M. T. (2015). Probióticos : generalidades. *GUÍAS DE MANEJO CLÍNICO: CONSENSO DE PROBIÓTICOS*, *78*(1), 123–128.
- Rose, E. C., Odle, J., Blikslager, A. T., & Ziegler, A. L. (2021). *Probiotics , Prebiotics and Epithelial Tight Junctions : A Promising Approach to Modulate Intestinal Barrier Function*.
- Ruffolo, R. R., & Feuerstein, G. Z. (1997). Pharmacology of carvedilol: Rationale for use in hypertension, coronary artery disease, and congestive heart failure. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *11*(SUPPL. 1), 247–256. <https://doi.org/10.1023/A:1007735729121>
- Rumbo, M., Nempont, C., Kraehenbuhl, J. P., & Sirard, J. C. (2006). Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: Lessons from flagellin and Toll-like

receptor 5. *FEBS Letters*, 580(12), 2976–2984.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.036>

Salvo-romero, E., Alonso-cotoner, C., Pardo-camacho, C., Casado-bedmar, M., & Vicario, M. (2015). *Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas*. 107, 686–696.

Sánchez, E., Casafont, F., Guerra, A., De Benito, I., & Pons-Romero, F. (2005). Papel del sobrecrecimiento bacteriano intestinal y de la motilidad intestinal en la traslocación bacteriana en un modelo experimental de cirrosis. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 97(11), 805–814. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082005001100005>

Sánchez Martín, E., & Hamre Gil, C. (2021). *Disbiosis intestinal y relación con las enfermedades hepáticas*.

Serna-Salas, S. A., Navarro-González, Y. D., Martínez-Hernández, S. L., Barba-Gallardo, L. F., Sánchez-Alemán, E., Aldaba-Muruato, L. R., Macías-Pérez, J. R., Ventura-Juárez, J., & Muñoz-Ortega, M. H. (2018). Doxazosin and Carvedilol Treatment Improves Hepatic Regeneration in a Hamster Model of Cirrhosis. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4706976>

Silva, F., Gatica, T., & Pavez, C. (2019). Etiología Y Fisiopatología De La Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 30(4), 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2019.06.004>

Sinha, S. R., Hailelassie, Y., Nguyen, L. P., Tropini, C., Becker, L. S., Sim, D., Jarr, K., Spear, E. T., Singh, G., Namkoong, H., Bittinger, K., Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L. (2021). *Dysbiosis-induced Secondary Bile Acid Deficiency Promotes Intestinal Inflammation*. 27(4), 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.021>.Dysbiosis-induced

Soleil, S., Marichal-Cansino, B., Martínez-Hernández, S., Ventura-Juárez, J., & Muñoz-Ortega, M. (2022). Role of tamsulosin in recovery from thioacetamide-induced subchronic liver damage in a Wistar rat model. *Annals of Hepatology*, 27, 100866. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100866>

- Soriano, G., & Guarner, C. (2003). Prevención de la translocación bacteriana mediante probióticos y prebióticos. *Gastroenterología y Hepatología*, 26(Supl.1), 23–30. <https://doi.org/10.1157/13043245>
- Soriano, Germán, Sánchez, E., & Guarner, C. (2013). Probióticos en las enfermedades hepáticas. *Nutricion Hospitalaria*, 28(3), 558–563. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.3.6602>
- Su, W., & Ding, X. (2015). *Methods of Endotoxin Detection*. <https://doi.org/10.1177/2211068215572136>
- Sun, L., Sun, C., Zhou, S., & Zhang, L. (2021). *La tamsulosina atenúa la lesión inducida por niveles elevados de glucosa en las células endoteliales glomerulares*. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1955527>
- Tamsulosin. (2018). *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548017/>
- Trebicka, J., Macnaughtan, J., Schnabl, B., Shawcross, D. L., & Bajaj, J. S. (2021). The microbiota in cirrhosis and its role in hepatic decompensation. *Journal of Hepatology*, 75(Suppl 1), S67–S81. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.013>
- Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M., Schnabl, B., Knight, R., Diego, S., Jolla, L., Diego, S., Jolla, L., & Diego, S. (2019). *The gut-liver axis and the intersection with the microbiome*. 15(7), 397–411. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0011-z>.The
- Valer, P., Ruiz del Árbol, L., Moreira, V. F., & López San Román, A. (2004). Ascitis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 96, 2004.
- Villanueva, S. S. M., Perdomo, V. G., & García, F. (2021). Función de la barrera intestinal. Implicancia en la enfermedad celíaca. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.*, 1, 9–22. <https://doi.org/10.35305/fcm.v1i.16>
- Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A., Chen, P., Schnabl, B., Jolla, L., & Diego, S. (2016). Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation

during liver disease. *Immunol Methods*, 44–53.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.015.Methods>

Weiss, G. A., & Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis.

*Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2959–2977.

<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>

Wiest, R., Lawson, M., & Geuking, M. (2014). Review Pathological bacterial translocation

in liver cirrhosis Intestinal microbiota Inner mucus Portal vein. *Journal of Hepatology*, 60(1), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.044>

Yoseph, B. P., Klingensmith, N. J., Liang, Z., Breed, E. R., Burd, E. M., Mittal, R.,

Dominguez, J. A., Petrie, B., Ford, M. L., & Coopersmith, C. M. (2016). Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis. *Shock*, 46(1), 52–59.

<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000565>

Zamudio-Vázquez, V. P., Ramírez-Mayans, J. A., Toro-Monjaraz, E. M., Cervantes-

Bustamante, R., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J. F., & Cázares-Méndez, J. M. (2017). Importancia de la microbiota gastrointestinal en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, 1(1), 49.

<https://doi.org/10.18233/apm1no1pp49-621323>

Zeng, L., Yang, T., Yang, K., Yu, G., Li, J., Xiang, W., & Chen, H. (2022). Curcumin and

Curcuma longa Extract in the Treatment of 10 Types of Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis of 31 Randomized Controlled Trials. *Frontiers in Immunology*, 13(August). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896476>

Zhang, G. F., Liu, X., Zhang, S., Pan, B., & Liu, M. L. (2018). Ciprofloxacin derivatives

and their antibacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078>

Zuo, S., Hou, Y., Shang, W., & Liu, N. (2020). *La inhibición de los receptores*

*adrenérgicos  $\alpha 1$  reduce la transición epitelial a mesenquimal inducida por TGF- $\beta 1$  y atenúa la fibrosis renal inducida por UUU en ratones.* 1–13.

<https://doi.org/10.1096/fj.202000737RRR>





## 14 Anexos

### Anexo A

#### Preparación de p-formaldehído 4%, pH 7.2:

Poner a calentar a 70 °C PBS 1X.

Adicionar 4 g de p-formaldehído.

Agregar una pizca de NaOH, hasta que se aclare la solución.

Ajustar pH y el volumen final a 100 ml con PBS 1X.

### Anexo B

#### Silanización de portaobjetos:

Sumergir los portaobjetos en extran-agua destilada por 1 hora, o dejarlos toda la noche.

Enjuagar con agua corriente y después con agua destilada.

Secar los portaobjetos muy bien con papel.

Ponerlos en canastillas listas para sumergir.

Colocar los portaobjetos en acetona grado reactivo por 5 minutos.

Sumergir durante 5 minutos la canastilla en una solución de Silano al 2 % (98 ml de acetona + 2 ml de (3-Aminopropyl) triethoxysilane, SIGMA A364, Refrigeración).

Hacer dos enjuagues rápidos en agua destilada (en dos recipientes).

Poner a secar los portaobjetos silanizados a una temperatura de 56 °C por 24 horas.

Sacarlos de la estufa y colocarlos en sus respectivas cajas y guardarlos y señalar que son silanizados.

(3-Aminopropyl) triethoxysilane: permite que el tejido se fije al portaobjeto y que durante la técnica no se despegue.

Instrucciones de manejo del HISTOQUINET

Oprimir la tecla ↑↓ para subir y bajar el porta-cestas.

Verificar la posición del porta-cestas, se está en el último vaso de parafina oprimir la techa ← para cambiar de lugar el portacestar al paso 1 que contiene agua destilada.

Colocar la canastilla con las cápsulas que contienen los tejidos a procesar.

Volver a oprimir la tecla ↑↓ para bajar el portacestar.

Oprimir la tecla START para comenzar el proceso, elegir primero el programa que se quiere llevar a cabo.

Luego oprimir la tecla TIMER para programar el tiempo del FIN DEL PROGRAMA, con las teclas UP y DOWN incrementar o decrementar el valor visualizado y con la tecla ENTER valida la opción o ajustes establecidos.

Al finalizar la programación del tiempo de FIN DE PROGRAMA oprimir la tecla START.

El objetivo del uso del HISTOQUINET es deshidratación, aclaración e infiltración de los tejidos.

Vaso No.	Reactivo	Tiempo de inmersión (hr)
1	Agua destilada	1:00
2	Alcohol 70%	1:00
3	Alcohol 80%	1:00
4	Alcohol 96%	1:00
5	Alcohol 96%	1:00
6	Alcohol 100%	1:00
7	Alcohol 100%	1:00

8	Alcohol 100%-Xilol (proporción 50:50)	1:00
9	Xilol	1:00
10	Xilol	1:00
11	Parafina	1:00
12	Parafina	1:00

Cuando termina el programa suena la alarma para sacar los tejidos ya procesados. Oprimir la tecla STOP y luego ↑↓ para subir el protacestar y sacar la canastilla con los tejidos para proceder a incluirlos en bloques de parafina en la estación de inclusión.

#### Inclusión de tejidos en bloques de parafina

Encender la estación de inclusión en la parte posterior, luego oprimir el botón de Manual Mode (ON/OFF) verificar que la placa fría (COOL) y caliente (HEAT) este encendido el foco en verde.

Verificar que el contenedor de parafina no esté vacío si es así agregar hojuelas de parafina.

Esperar a que la temperatura de la parafina alcance una temperatura de 63°C para poder usarla.

Tomar el tejido de la placa caliente con una pinza y colocarlo en una base metálica dándole el sentido y ángulo que desee cortar, luego colocar 2 escuadras metálicas acomodando el tamaño del bloque de acuerdo con el tejido.

Colocar una base de cassette plástico sobre las escuadras y se rellena con parafina caliente.

Pasar a la placa fría para que se solidifique y esperar a que se enfríe.

#### Microtomía

El bloque se coloca en el micrótopo, aparto con el que se puede controlar el ángulo y grosor del corte.

Primero se tiene que rebanar el exceso de parafina y los primeros cortes, hasta que se descubra el tejido en el bloque.

Una vez que el tejido es visible, se procede a hacer cortes, comúnmente a 5  $\mu\text{m}$ .

Los cortes salen como pequeñas rebanadas, pegadas en sus bordes lo que constituye una película de parafina. Hasta 5 a 8 cortes consecutivos son adecuados, es importante que los cortes no se doblen sobre sí o se arruguen.

La película es transferida a un baño maría a 42° en donde se deja en la superficie para que se expanda.

Luego con ayuda con un portaobjetos recubiertas con 3-aminopropyl triethoxysilane al 2%, se pesca una rebanada o más, se elimina el exceso de agua de la laminilla y se coloca en una superficie caliente para que se evapore el agua y el tejido se pique al portaobjetos por acción de calor.

Posteriormente los portaobjetos se transfieren a una estufa a 60 °C para desparafinarse por lo menos 1 hora. El objetivo de la desparafinación es para que el tejido quede bien fijado al portaobjetos y se quite el exceso de parafina para su deshidratación y tinción.

## **Anexo C**

### [Procedimiento de fijación de tejidos para criostato](#)

Después de extraer el tejido, se procede a realizar lo siguiente:

Dejar el tejido en paraformaldehído 24 horas.

Posteriormente, pasar el tejido a una solución de sacarosa al 10% (diluida en agua destilada) y dejar 24 horas.

Pasar el tejido a una solución de sacarosa al 20% y dejar 24 horas.

Pasar el tejido a una solución de sacarosa al 30% y dejar 24 horas.

Por último, montar el tejido en el disco con Tissue Tek y enfriar con nitrógeno líquido.

### Obtención de cortes histológicos en criostato

Encender el equipo con un día de anticipación para que se ajuste a la temperatura adecuada.

Primero, se mantiene presionada la flecha (arriba) para recorrer hacia atrás el cabezal.

Se ajustan las micras que se desee el corte (comúnmente a 5 micras).

El bloque frío se coloca en el criostato y se ajusta de acuerdo con el ángulo del corte que se desee con ayuda de los tornillos.

Avanzar de poco a poco con la flecha (abajo) hasta que el bloque esté muy cerca de la cuchilla pero que no lo corte.

Girar la palanca exterior hacia atrás para comenzar a cortar, rebajar el exceso de Tissue Tek y descartar los cortes hasta que el tejido sea visible por completo.

Se procede a hacer cortes.

NOTA: Es importante bajar la tapa de vidrio antes de cortar la sección de tejido, ya que permite la retención de este. Los cortes salen como pequeñas rebanadas pegadas a la platina, por lo que es importante que los cortes no se doblen sobre sí o se arruguen.

Tomar un portaobjetos silanizados y rotulado correctamente con lápiz, abrir la tapa de vidrio y rápidamente pegar el portaobjetos al corte realizado.

NOTA: No demorar mucho tiempo en tomar el corte realizado, ya que el Tissue Tek se descongela rápidamente. Hacer un corte a la vez. Los siguientes cortes pegarlos a lo largo de la laminilla dejando un espacio considerable entre cada tejido (Por ejemplo, 3 cortes por laminilla). Dejar el portaobjetos dentro del criostato para que no pierda temperatura.

9. Por último, realizar la tinción que se desee o se ajuste a la muestra a evaluar.

NOTA: Para el primer paso de la tinción, no se deshidrata el tejido con xilol ni alcohol, sino que se pasa directamente al agua destilada para hidratar el tejido, se continua con los colorantes según el orden de la tinción, y, por último, se deshidrata el tejido antes el montaje con Entellan, para que no sea precedero.

## **Anexo D**

### Tinción de Hematoxilina y Eosina

Procedimiento:

Los tejidos deben estar fijados con p-formaldehído al 4%.

Los cortes de parafina deben ser de 5 micras.

Se comienza por el desparafinado con xilol 2 lavados de 10 min cada uno. Después con el proceso de deshidratación en alcohol absoluto 2 lavados de 10 minutos, después en alcohol 96 ° durante 10 minutos, luego en alcohol 80° 10 minutos y se termina en agua destilada 10 minutos.

Se procede con la tinción en el primer colorante que la hematoxilina, se sumergen en las laminillas durante 3 a 10 minutos (depende del tiempo de uso).

Luego se hace un lavado con agua corriente durante 15 minutos aproximadamente seguido de 2 lavados en agua destilada durante 10 minutos cada uno.

Se sumergen las laminillas en el segundo colorante que es la Eosina durante 30 segundos a 1 minuto y luego deshidratación.

Sumergir en alcohol 80° durante 10 minutos, después alcohol 96° 1 minutos, luego 2 veces alcohol absoluto 10 minutos y se finaliza con xilol 2 veces 10 minutos.

Poner el medio de montaje y el cubreobjetos.

Dejar secar y listo para observar.

## **Anexo E**

### Inmunofluorescencia

Desparafinización del tejido. Se quitó la parafina del tejido con: xileno 2 veces por 7 min; etanol 100% 2 veces por 7 min; etanol 96% 1 vez por 15 min; etanol 70% 1 vez por 5 min.

Se enjuagaron con agua corriente durante 5 min.

Desenmascaramiento de epítomos. Se colocó en una olla 1.5 litros de buffer de citrato de sodio. Se dejó que la presión de la olla subiera a lo máximo, en seguida se apagó la olla. Se introdujeron las laminillas en un porta-laminillas de metal dentro de la olla, procurando que quedaran completamente cubiertas por el buffer. Se encendió la olla y una vez que salió el vapor por la válvula se deja dos minutos, después se apagó y se dejaron las laminillas reposar dentro del buffer 15 minutos.

Lavar con PBS 1X 3 veces por 5 min.

Inactivación de las peroxidases endógenas. Las laminillas se colocaron en una solución de metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Lavar con PBS 1X 3 veces por 5 min.

Alrededor del tejido de interés se marcaron círculos con el pen PAP.

Permeabilización de la membrana. Se lavaron las laminillas con PBS-Tritón X-100 0.2% durante 30 min.

Bloqueo de uniones inespecíficas. Se incubaron las laminillas 1 hora a temperatura ambiente con Suero Fetal de Bovino 20% en PBS-Tritón X-100 0.2%.

Primer anticuerpo. Se incubó el primer anticuerpo durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. El anticuerpo se diluyó en PBS 1X-Tritón X-100 al 0.2% y 0.5% de suero fetal bobino.

Lavar con PBS-Tritón X-100 0.2% 3 veces durante 5 min.

Segundo anticuerpo. Se incubó con el anticuerpo secundario unido al cromógeno diluido en PBS + 0.5% Suero Fetal Bovino, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Lavar con PBS 1X 3 veces por 5 min.

Disminución de la autofluorescencia. Se incubó 10 minutos con Sudan Negro B preparado al 0.1% en etanol al 70% (filtrado). Se lavó con PBS 3 veces por 5 min.

Tinción de núcleos. Se incubaron durante 10 minutos con Hoechst 1x en PBS.

Lavar con PBS 1X 3 veces por 5 min.

Montaje de la laminilla. Se cubrió el tejido con medio de montaje a base de agua, sea Glicergel, Moviol, etc. Sin dejar burbujas.

## **Anexo F**

### Extracción de RNA de tejido

- 1.- Colocar en un tubo de 2 ml de fondo plano 400  $\mu$ l de Trizol, mantener en hielo.
- 2.- Colocar un trozo de tejido dentro del tubo con Trizol aproximadamente 100 mg.
- 3.- Homogenizar la muestra.
- 4.- Centrifugar en frío por 10 minutos a 10,000 RMP.
- 5.- Pasar sobrenadante a tubo de 1.5 ml cónico.
- 6.- Añadir 400  $\mu$ l de etanol absoluto.
- 7.- Llevar al vortex durante 30 segundos.
- 8.- Transferir a columna con camisa del kit de extracción RNA Miniprep.
- 9.- Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos.
- 10.- Descartar el líquido.
- 11.- Agregar 400  $\mu$ l de reactivo pre-wash.
- 12.- Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos.
- 13.- Descartar líquido.
- 14.- Agregar 700  $\mu$ l de reactivo wash.
- 15.- Centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos.



- 16.- Descartar líquido.
- 17.- Centrifugar a velocidad máxima 2 minutos con la tapa del tubo abierta.
- 18.- Colocar columna en tubo cónico nuevo.
- 19.- Oler para detectar Etanol, en caso de percibir olor a etanol, dejar abierto durante 2 minutos.
- 20.- Agregar 30 µl de Agua (kit) y dejar reposar 1 minuto.
- 21.- Centrifugar 45 segundos.
- 22.- Separar 15 µl en tubo de 600 µl.
- 23.- Cuantificación de RNA en nanoanalizador (Biodrop).

## **Anexo G**

### Electroforesis de RNA

- 1.- Preparación de buffer de stock TRIS-ACETATO (TAE) 50X

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración final</b>
Tris base	242 g	1,9 M
Ácido acético	571 ml	57,1%
EDTA 0.5M pH 8.0	100 ml	0,05 M

Completar con 1 lt de agua destilada.

- 2.- Preparar cámara de electroforesis y peine.
- 3.- Preparar gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, calentando hasta disolver completamente.
- 4.- Añadir la agarosa a la cámara asegurando tener los peines debidamente insertados.  
Esperar a que solidifique.
- 5.- Con precaución retirar el peine. Y colocar la cámara de manera que los pozos se ubiquen en el ánodo.

- 6.- Después que la agarosa haya quedado completamente solidificada, añadir el buffer de electroforesis TAE 1X entre 0,5 y 1 cm por encima del gel.
- 7.- En el primer pozo colocar 3  $\mu$ l de marcador de peso molecular.
- 8.- En papel parafilm colocar 1  $\mu$ l de buffer de corrida por alícuotas.
- 9.- Tomar 5  $\mu$ l de muestra y mezclar con el de buffer de corrida
- 10.- Tomar los 6  $\mu$ l y colocar en el siguiente pozo del gel. Continuar así con todas las muestras.
- 11.- Una vez finalizada la colocación de las muestras en los pocillos, cubrir la cámara con la tapa y conectar los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder.
- 12.- Encender la fuente de poder y seleccionar 100 V a 60 min.
- 13.- Detener la electroforesis hasta que el frente de corrida se localice en la posición deseada.
- 14.- Finalizada la electroforesis proceder al desmontaje del equipo empezando con desconectar los electrodos de la fuente de poder ya apagada.
- 15.- Posteriormente, sumergir el gel de agarosa en bromuro de etidio a una concentración de 1 $\mu$ g/ml (Diluir 100  $\mu$ l de bromuro de etidio a partir de la solución stock en 100 ml) y dejar incubando por 15 minutos en reposo.
- 16.- Encender la computadora y el analizador de imágenes asegurando siempre que la luz UV se encuentre apagada.
- 17.-Abrir programa “Gel Capture Mini Bi”.
- 18.- Al terminar el periodo de incubación retirar con precaución el gel de agarosa del envase, permitiendo que el bromuro de etidio escurra completamente.
- 19.- Colocar el gel en la bandeja del analizador de imágenes.
- 20.- Cerrar la bandeja y encender la luz UV.
- 21.- Modificar en el programa la sensibilidad, el tiempo de exposición y el brillo hasta obtener una imagen clara del gel.

- 22.- Seleccionar el área de estudio y guardar la imagen.
- 21.- Limpiar con agua destilada la bandeja del analizador.

## **Anexo H**

### Retrotranscripción

- 1.- Se parte de 500 ng de RNA en 20µl de mezcla de reacción.
- 2.- Preparar mix de reacción, en tubo de 600 µl (reservar para paso 5)
  - 4 µl buffer de reacción
  - 1 µl inhibidor de RNAasa
  - 2 µl de dNTP mix
  - 1 µl de Aid H Minus (RT)
- 3.- Colocar en tubo de PCR
  - 1µl de Oligo dT

La cantidad en muestra calculada en paso 1  
aforar a 12 µl con agua libre de nucleasas
- 4.- Dar un spin en centrifuga.
- 5.- Llevar al termociclador con las siguientes condiciones: tiempo 5 minutos, temperatura: 70 °C y volumen de muestra 12 µl.
- 6.-Al sacar del termociclador colocar en hielo.
- 7.-Agregar al tubo de PCR el mix preparado en paso 2.
- 8.- Dar un spin en centrifuga.

9.-Llevar al termociclador con las siguientes condiciones: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 70°C y volumen 20 µl.

10.- Al finalizar, conservar las muestras a -80°C.

**Anexo I**

PCR en tiempo real

1.-Realizar dilución de primers y muestra a 1:20 con agua libre de nucleasas para obtener una concentración final de 50ng.

2.- En la placa para PCR colocar:

5 µl Syber Green

2 µl agua libre de nucleasas

1 µl primer forward 1:20

1 µl primer reverse 1:20

1 µl muestra 1:20

3.- Programar las condiciones y la ubicación de la muestra en el termociclador.

4.- Analizar resultados mediante el método de expresión relativo  $\Delta \Delta Ct$ .

**Anexo J**

Western blot

1.-Preparación de soluciones

Buffer de corrida	
10X	1X

	[Final]			
<i>Tris base</i>	250 mM	30 g	Buffer de corrida 10X	100 ml
<i>Glicina</i>	1.92 M	144.13 g	H <sub>2</sub> O	900 ml
<i>SDS</i>	1 %	10 g (10 mL SDS 10%)		
		Para 1 litro		Para 1 litro

Buffer de transferencia				
10X			1X	
	[Final]			
<i>Tris base</i>	250 mM	30 g	Buffer de transferencia 10X	100 ml
<i>Glicina</i>	1.92 M	144.13 g	Metanol	200 ml
			H <sub>2</sub> O	700 ml
		Para 1 litro		Para 1 litro

TBS pH 7.4				
TBS 10X pH 7.4			TBS 1X-TWEEN 0.05% pH 7.4	
<i>NaCl</i>		82 g	PBS 10X pH 7.4	200 ml
<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</i>		3.8 g	H <sub>2</sub> O	1800 ml
<i>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</i>	ó	4.3 g	Tween 20	1 ml
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>		17.4 g		

Para 1 litro H <sub>2</sub> O	Para 2 litros
-------------------------------	---------------

TRIS	
TRIS 1.5 M pH 8.8	TRIS 0.5 M pH 6.8
<i>Tris base</i> 181.665 g	<i>Tris base</i> 60 g
H <sub>2</sub> O                                  Para 1 litro	H <sub>2</sub> O                                  Para 1 litro
SDS 10 %	PSA 10 %
10 g SDS + 100 mL H <sub>2</sub> O	10 g PSA + 100 mL H <sub>2</sub> O

Buffer de carga o muestra 4X con β-mercaptoetanol	
(Tris 0.1125M, SDS 4%, Glicerol 20%, Mercaptoetanol 10 %, pH=6.8)	
<i>Tris 0.5 M</i> , pH=6.8	2.5 mL
SDS 10 %	4 mL
Glicerol	2 mL
Mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	0.01 g
H <sub>2</sub> O	0.5 mL

2.- Preparación de gel SDS-PAGE

Gel 12% separador		Gel 4% concentrador	
H <sub>2</sub> O	1.87 mL	H <sub>2</sub> O	3 mL
Acrilamida	2.2 mL	Acrilamida	650 µL
Tris 1.5 M pH=8.8	1.43 mL	Tris 0.5 M pH=6.8	1.25 mL
SDS 10 %	55 µL	SDS 10 %	50 µL
PSA 10 %	55 µL	PSA 10 %	40 µL
TEMED	5 µL	TEMED	6 µL

Montar el gel en la cámara de electroforesis y se utiliza el buffer de corrida 1X.

### 3.- Electroforesis

Cargar con 2 µL del marcador de peso molecular y 40 µg proteínas + buffer de carga (1:1) (4X con β-mercaptoetanol)

Una vez que las muestras son obtenidas y se mezclan con el buffer de carga, son hervidas durante aproximadamente 5 minutos (90-95 °C).

Se procede a cargar la muestra en el gel.

El gel se deja correr los primeros 15 min a 80 V y enseguida se aumenta el voltaje a 110 V durante 1 o 2 horas.

Antes de que termine la electroforesis se activa la membrana si es de PVDF con metanol por 5 minutos.

### 4.- Transferencia electroforética

Para la transferencia es necesario tener: esponjas, filtros, estuches, cámara de transferencia, buffer de transferencia.

Los aditamentos se colocan en orden (se monta sobre la porción negra del estuche: esponja, filtro, gel, membrana, filtro, esponja).

Una vez puesto los aditamentos en orden y colocados en la cámara, la transferencia se deja correr a 12 mA durante toda la noche a 4°C o a 220 mA 1h.

Una vez terminada la transferencia se desmonta el estuche donde se colocaron los aditamentos y se procede a realizar el inmunoblot.

#### 5.- Inmunoblot

Después de parar la transferencia del gel a la membrana de PVDF, hacer un lavado por 5 minutos a la membrana con TBS 1X-Tween 0.05%.

La membrana se bloquea con leche al 5% libre de grasa (SveltyS) en TBS 1X-Tween 0.05% con agitación constante a temperatura ambiente durante 2 horas.

Posteriormente, se incuba la membrana con el anticuerpo primario ocludina 1:300, claudina 1:400 y GAPDH 1:10,000 diluidos en TBS 1X-Tween 0.05% con leche 5% durante toda la noche a 4°C y con agitación constante.

Terminada la incubación se hacen 1 lavados con TBS 1X-Tween 0.05% por 10 minutos, y 2 lavados con TBS 1X por 10 minutos.

Después, la membrana de PVDF se incuba con el anticuerpo secundario anti-mouse 1:500 y anti-rabbit 1:5,000 diluidos en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente.

Hacer 3 lavados con TBS 1X-Tween durante 10 minutos.

Finalmente revelar la membrana.

#### 6.- Revelado

A las membranas ya lavadas se les colocan los sustratos por partes iguales (1:1) del Kit de Quimioluminiscencia (BioRad).



Se baña 5 veces la membrana y después se leen la membrana con el equipo C-Digit (Li-Cor).

Una vez reveladas las membranas estas se sumergen en TBS-1X 5 min y después se dejan secar.

Las imágenes obtenidas de las bandas deberán de ser analizadas por densitometría para obtener datos que se puedan analizar estadísticamente.

## **Anexo K**

### Extracción de ADN bacteriano

Se descongelaron las muestras de suero de sangre portal recuperadas.

Se tomaron 100  $\mu$ l de muestra de suero en un microtubo de 1.5 ml.

Se agrego 200  $\mu$ l de buffer fluidos biológicos y células al tubo con la muestra.

Al mismo tubo se le añadió 20  $\mu$ l de proteinasa K.

Se llevaron al vortex de 10-15 segundos.

Incubaron a 55°C en bala maría durante 10 min.

Se añadió 220  $\mu$ l de buffer de unión genómica

Se mezcló en el vortex de 10-15 segundos.

Se paso a una columna sobre un tubo colector.

Centrifugo a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se decanto lo del tubo colector.

Agregaron 400  $\mu$ l de buffer prelavado de ADN.

Nuevamente se centrifugo a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se decanto lo del tubo colector.

Se añadieron 700  $\mu$ l de buffer de lavado g-ADN.

De nuevo se centrifugo a 12 000 rpm por 1 minuto.

Se decanto lo del tubo colecto.

Añadieron 200  $\mu$ l de buffer de lavado g-ADN.

Se volvió a centrifugar a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se transfirió la columna a un microtubo y se añadió 20  $\mu$ l de buffer de elución de ADN. Se dejo reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugo a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se cuantificó el cADN y se almaceno a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Anexo L**

### Cuantificación de Endotoxina

Solución madre estándar de endotoxinas:

Cada vial de *E. coli* estándar de endotoxina contiene 10-50 EU (unidades de endotoxina) de endotoxina liofilizada; se reconstituyo con agua libre de endotoxinas a temperatura ambiente agregando 1/10 ml de la cantidad de EU indicada en el vial para preparar la solución estándar de endotoxinas (ES) a 10 EU/ml.

Se llevó al vortex durante 15 minutos (recomendado  $<1500$  rpm). La solución madre reconstituida es estable durante 4 semanas a  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Antes del uso atemperar y mezclar durante 15 minutos, es importante porque la endotoxina se adhiere a los lados del vial de vidrio.

Se prepararon estándares altos (0.1-1.0 EU / ml) o estándares bajos (0.01-0.1 EU / ml) a partir de la Solución estándar de endotoxina (10 EU / ml).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Lisado de amebocitos liofilizado:

Se reconstituyó el lisado de amebocitos liofilizado antes de su uso con 1.7 ml de agua libre de endotoxinas y se agitó suavemente para disolver. Se recuperó todo el polvo del vial y se invirtió suavemente de un extremo a otro. El lisado de amebocitos es estable por una semana a  $-20^{\circ}\text{C}$  y una vez descongelado solo puede usarse 1 vez.

Preparación de muestras:

Se hicieron diluciones de las muestras de suero de 50 a 100 veces para que sean compatibles.

Para detener toda actividad bacteriológica en las muestras se almacenaron a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

Sustrato cromogénico:

Cada vial contenía 3.4 mg de sustrato cromogénico liofilizado y se reconstituyó agregando 3.4 ml de agua libre de endotoxinas. Este sustrato es estable durante 4 semanas almacenado entre  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Para el ensayo calentar a  $37^{\circ}\text{C}$  una cantidad suficientes no más de 5 a 10 minutos antes de su uso.

Procedimiento del ensayo:

Se prepararon todos los reactivos y estándares de su uso y se atemperaron.

Se mantuvo durante todo el procedimiento la placa a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Después se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de diluciones estándar de endotoxina, blanco y muestras por pocillo.

Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del lisado de amebocitos reconstituido por pocillo y se comienza a medir el tiempo a medida que se fue agregando el lisado al primer pocillo.

Una vez que se agregó el lisado de amebocitos a los pocillos se retiró del calentador de placas y se mezcló golpeando suavemente 10 veces el costado de la placa. Después se regresó la placa al calentador a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por el T1 indicado en el vial de lisado

El sustrato cromogénico se reconstituyó con 3.4 ml de agua libre de endotoxinas y se mezcló suavemente inclinando y girando el vial. Después se precalentó a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos antes de su uso.

Posterior a ello, se agregó 100  $\mu$ L por pocillo de solución de sustrato cromogénico reconstituida precalentada.

Una vez que la solución de sustrato se agregó a todos los pocillos, se retiró del calentador y se mezcló suavemente golpeando 10 veces para facilitar la mezcla, se regresó a  $37 \pm 1$  ° C para T2 de 6 minutos.

Exactamente en T2 de 6 minutos se agregó 50  $\mu$ L por pocillo de solución de parada (25 % de ácido acético).

Una vez que se agregó la solución de parada a los pocillos, se retiró la placa del calentador y nuevamente se mezcló golpeando suavemente 10 veces el costado de la placa.

A continuación, se midió la densidad óptica (OD) a 405 nm al completar el ensayo.

## **Anexo M**

### [Extracción de ADN de materia fecal](#)

Se tomaron 150 mg de muestra de materia fecal.

Se agregó 200  $\mu$ l de buffer fluidos biológicos y células al tubo con la muestra.

Al mismo tubo se le añadió 20  $\mu$ l de proteinasa K.

Se llevaron al vortex de 10-15 segundos.

Incubaron a 55°C en baño maría durante 10 min.

Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm a 4°C por 3 minutos.

Después se separó el sobrenadante

Se añadió 220  $\mu$ l de buffer de unión genómica

Se mezcló en el vortex de 10-15 segundos.

Se pasó a una columna sobre un tubo colector.

Centrifugo a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se decanto lo del tubo colector.

Agregaron 400  $\mu$ l de buffer prelavado de ADN.

Nuevamente se centrifugo a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se decanto lo del tubo colector.

Se añadieron 700  $\mu$ l de buffer de lavado g-ADN.

De nuevo se centrifugo a 12 000 rpm por 1 minuto.

Se decanto lo del tubo colector.

Añadieron 200  $\mu$ l de buffer de lavado g-ADN.

Se volvió a centrifugar a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se transfirió la columna a un microtubo y se añadió 20  $\mu$ l de buffer de elución de ADN. Se dejo reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugo a 12 000 rpm durante 1 minuto.

Se cuantificó el cADN y se almaceno a  $-20^{\circ}\text{C}$ .