



“Envejecimiento y eje hígado-intestino durante la enfermedad hepática crónica”

Autora:

Alicia Maestre Cirugeda

Tutor:

Prof. Dr. Rubén José Francés Guarinos

Prof^a. Esther Caparros Cayuela

Cotutor:

Sebastián Martínez López

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Medicina clínica

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ , ELCHE

INDICE

Resumen.....	4
Abstract.....	4
Palabras clave.....	4
Abreviaturas.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Cirrosis-hígado.....	6
1.1.2 Función Hepática.....	7
1.2 Eje hígado-intestino.....	8
1.3 Barrera intestinal.....	9
1.4 Envejecimiento.....	12
2. Antecedentes y Objetivos.....	14
2.1 Antecedentes.....	14
2.2 Objetivos.....	14
3. Materiales y Métodos.....	15
3.1 Inducción de cirrosis, laparotomía y perfusión hepática.....	15
3.2 Inmunofluorescencia.....	15
3.3 Extracción y cuantificación de ARN.....	17
3.4 qPCR.....	17
3.5 Extracción y cuantificación de proteína.....	18
3.6 Electroforesis en poliacrilamida y Western Blot.....	18
3.7 Análisis estadístico.....	20
4. Resultados.....	21
4.1 Inflamación.....	21
4.2 Fibrosis.....	24
4.3 Barrera intestinal.....	27
4.4 Eje hígado-intestino.....	30
5. Discusión.....	32
5.1 Daño hepático y activación del sistema inflamatorio.....	32
5.3 Barrera intestinal y permeabilidad en la cirrosis.....	34
5.4 Comunicación Hígado-Intestino a través del mecanismo de biosíntesis de ácidos biliares.....	35
6. Conclusiones y proyección futuras.....	37
6.1 Conclusiones.....	37
6.2 Proyección futura.....	37
7. Bibliografía.....	39

Resumen

La cirrosis es la etapa final de la enfermedad hepática ocasionada por distintos factores que dañan al hígado. Cuando se genera una lesión hepática se desencadena una respuesta inflamatoria mediada por citocinas para combatir el daño, sin embargo, esta inflamación puede ser persistente y causar necrosis celular. En consecuencia, el hígado activa las células hepáticas estrelladas que producen proteínas de matriz extracelular. Sin embargo, a medida que se genera mayor tejido cicatricial del que se degrada, la estructura hepática se ve alterada, en un proceso denominado fibrogénesis. La fibrosis altera el flujo sanguíneo normal lo que conduce, junto con la inflamación, a la cirrosis. Otro factor relevante es el eje hígado-intestino, que se ve afectado por alteraciones en la microbiota intestinal, la permeabilidad del intestino y la hipertensión portal, además de por la propia patología hepática que favorece la pérdida de la integridad intestinal aumentando así la traslocación bacteriana en el intestino lo que exacerba la inflamación crónica en este órgano. Uno de los mecanismos moleculares de comunicación hígado-intestino es el sistema FXR que controla la síntesis de ácidos biliares y cuyo funcionamiento se ve alterado durante la cirrosis. En este trabajo de fin de grado se ha explorado el papel del envejecimiento en el eje hígado-intestino en un modelo de cirrosis hepática por CCl₄ oral. Además, se ha comprobado que la cirrosis incipiente genera daños a nivel intestinal junto con alteraciones del sistema FXR.

Abstract

Cirrhosis is the final stage of hepatic disease caused by several factors that damage the liver. When the liver is damaged, an inflammatory response is triggered by cytokines to combat the insult. However, if this inflammation persists it can cause cell necrosis. Consequently, the liver activates hepatic stellate cells in order to produce extracellular matrix proteins. Nevertheless, as in chronic diseases more scar tissue is generated than is degraded, the liver structure is altered, in a process known as fibrosis. Fibrosis disrupts normal blood flow leading, along with inflammation, to cirrhosis. Another relevant factor in hepatic disease is the gut-liver axis, which is affected by alterations in gut microbiota, gut permeability and portal hypertension, as well as by hepatic pathology itself, which favour the loss of intestinal integrity and, in turns, contribute to an increase in bacterial translocation in the intestine, which aggravates chronic inflammation in this organ. One of the molecular mechanisms of communication between the two organs is the FXR system which controls the synthesis of bile acids and whose functioning is impaired during cirrhosis. In this study we have explored the role of aging in the gut-liver axis during cirrhosis in a model of chronic liver disease by oral administration of CCl₄. We have seen that the age is an aggravating factor for liver disease progression and that incipient cirrhosis causes intestinal damage along with alterations in FXR system.

Palabras clave

Cirrosis, envejecimiento, inflamación, fibrosis, eje hígado-intestino, permeabilidad intestinal

Abreviaturas

- AB: Ácidos biliares
- ACTA2: α actina 2
- APCs: Células presentadoras de antígenos
- α SMA: Actina de músculo liso α
- BSA: Albúmina Sérica Bovina
- CCL: Quimiocinas CC o beta
- CYP7A1: Enzima colesterol alfa
- CD8⁺: Linfocitos T citotóxicos
- DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCs: Células dendríticas
- FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos
- FBS: Suero fetal bovino
- FXR: Receptor X farsenoide
- IFN- γ : Interferón gamma
- IGF-1: Factor de crecimiento insulínico
- IL: Interleucina
- KCs: Células de Kupffer
- MAMPs/PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos
- MAPK: Vía de las MAP cinasas
- NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico
- NF-Kb: Factor nuclear de células kappa B
- Nk: Células *Natural killer*
- NOD2: Dominio de oligomerización de nucleótidos
- PBS: Tampón fosfato salino
- PI3K/Akt: Vía de señalización de la fosfatidilinositol- 3-kinasa
- RIG-I: Gen I inducible por ácido retinoico
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- RXR: Receptor X retinoico
- TBST: *Tris-buffered saline con Tween* 20
- TFG- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1.
- TLR: Receptores Toll-like o tipo Toll
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
- WB: Western Blot

1. Introducción

1.1 Cirrosis-hígado

La cirrosis es una enfermedad crónica e irreversible del hígado caracterizada por la presencia de nódulos regenerativos y tejido fibroso además de la alteración de la estructura y funcionalidad hepática. Esta enfermedad se considera el estadio final de la degeneración del tejido hepático que, además de la fibrosis, se caracteriza por un estado inflamatorio desencadenando diferentes enfermedades (Gómez Ayala, 2012)

La cirrosis causa alrededor de 1 millón de muertes anuales mundialmente. Junto con la hepatocarcinoma (CHC), con el que está muy relacionado, representan un 3,5 % de las muertes a nivel mundial. En Europa y Estados Unidos la prevalencia es en torno a 250 casos por 100000 individuos, siendo la cuarta causa de muerte entre los pacientes de 45 a 64 años, especialmente en varones. (Gómez Ayala, 2012)(Sumeet K. Asrani et al., 2019)

Dependiendo de la localización geográfica podemos encontrar diferentes causas de la cirrosis. Las más comunes en el área occidental son el alcoholismo, la infección viral de la hepatitis C y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), mientras que en la zona oriental la hepatitis B es la causa que tiene mayor prevalencia. (Zhou et al., 2014) La cirrosis también puede ser ocasionada por otras enfermedades hereditarias, como la enfermedad de Wilson o la hemocromatosis. (Gómez Ayala, 2012)

Con anterioridad al desarrollo de la cirrosis, se ocasiona la fibrosis hepática que consiste en un proceso de reparación tisular tras un daño hepático. En este proceso actúan de forma conjunta diferentes tipos celulares, en especial células hepáticas estrelladas y las proteínas que producen. Para la regeneración hepática, el hígado restablece el estado necrótico a través de una reacción inflamatoria, que ayuda a eliminar el tejido dañado, junto con un depósito de colágeno y proteínas de matriz extracelular, que actúan como sostén para los hepatocitos regenerados. Si la necrosis hepática se mantiene en el tiempo, la capacidad regenerativa disminuye, sin embargo, aumenta la producción de matriz extracelular de colágeno, proteínas y glucosaminoglicanos generándose una cicatriz fibrosa allí donde antes había parénquima funcional. (Domínguez et al., 2009) La prolongación del daño hepático en el tiempo favorece la cronificación de estos procesos profibrogénicos, así como la aparición de la inflamación desregulada característica de la cirrosis, lo que a su vez altera el proceso de reparación de tejido hepático agravando la fibrosis.

La evolución de esta patología se produce debido al aumento de la presión portal. Esta es conocida como la presión sanguínea en la vena porta, que es la vena encargada del transporte sanguíneo del

intestino al hígado. La hipertensión portal surge como consecuencia del aumento de resistencia en el flujo de la sangre debido al tejido hepático cicatrizado producido durante la cirrosis.

Dependiendo de la etapa de desarrollo pueden darse dos fases: una fase compensada, asintomática, donde no se han manifestado las complicaciones secundarias a la progresión de la enfermedad, seguida de una fase descompensada en la que se produce un rápido desarrollo de complicaciones en la presión portal, sangrado de varices, ascitis, ictericia o encefalopatías, lo que conlleva a la disminución de la función hepática y una supervivencia más baja que la fase compensada. (Figura 1) (D'Amico et al., 2006)(Lesmana et al., 2020)

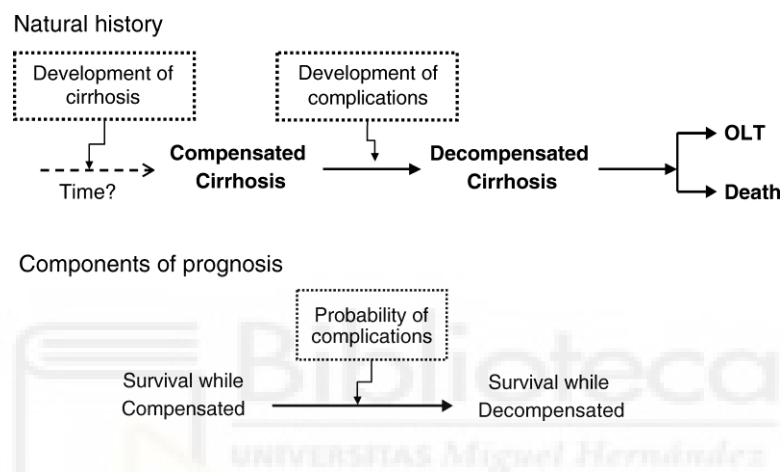


Figura 1. Desarrollo natural de la cirrosis: La primera fase de la cirrosis es la fase compensada, caracterizada por una presión portal normal, conforme progresa la enfermedad, aumenta la presión portal y las lesiones hepáticas pasando de fase compensada a descompensada. Además, el progreso entre ambas fases destaca una disminución de la supervivencia a la enfermedad debido a las complicaciones desarrolladas. (D'Amico et al., 2006)

1.1.2 Función Hepática

El hígado es un órgano esencial en el metabolismo de los nutrientes y eliminación de sustancias tóxicas del organismo a partir de la bilis. Una de las funciones más características del hígado es filtrar la sangre que le llega desde el aparato digestivo a través de la porta, para procesar parte de los nutrientes y limpiarla, circulándola después al corazón a través de la vena cava inferior. (Gómez Ayala, 2012)

La cirrosis hepática, como hemos comentado, es consecuencia de una lesión a largo plazo donde el hígado sufre una restitución del parénquima hepático por diferentes lesiones fibrosas que rodean nódulos regenerativos. Se origina por la necrosis celular del tejido hepático que como consecuencia se ven afectados grandes grupos de hepatocitos lo que conduce al poco tiempo a la aparición de cirrosis, sin embargo, si se ven afectados pequeños grupos celulares, la cirrosis no aparece hasta varias décadas después de la fase asintomática. Tras la necrosis hepática se forma un tejido compuesto por colágeno que da lugar a la formación de septos fibróticos que encapsulan el tejido hepático funcional. En el

interior de estos septos las células hepáticas proliferan produciendo nódulos de regeneración. La anatomía del hígado cirrótico se representa, microscópicamente, como un órgano de consistencia leñosa con una superficie irregular y con la presencia de nódulos con depresiones cicatriciales de aspecto fibroso. (Gómez Ayala, 2012) (Guilera Sardá, 2000)

Con el deterioro del hígado, este pierde ciertas funciones por lo que no es capaz de detoxificar sustancias o desechos metabólicos, disminuye la producción de proteínas para la coagulación sanguínea y la producción de albúmina. Consecuentemente, se acumulan sustancias procedentes de medicamentos y del cuerpo en sangre aumentando la posibilidad de padecer efectos secundarios, además de la acumulación de bilis en sangre y la aparición de ictericia en los pacientes. La función de la bilis es facilitar la absorción de grasas del intestino y transportar desechos para su excreción en las heces. Cuando la cirrosis causa obstrucciones en las vías biliares se ve alterada la absorción de grasas y vitaminas, y se dificulta la eliminación de la bilis, así como de algunas sustancias de desechos. (Zhou et al., 2014)

1.2 Eje hígado-intestino

El tracto gastrointestinal está colonizado por numerosos microorganismos en homeostasis cuya función es importante tanto para el funcionamiento correcto de nuestro organismo, como para la progresión de diversas patologías incluida la cirrosis. La comunicación hígado-intestino viene dada por el drenaje de sangre de la vena porta del intestino delgado y grueso, del bazo, y del páncreas directamente a la circulación hepática. Esta interacción conlleva el transporte de sangre rica en nutrientes absorbidos por el intestino al hígado, donde se procesa la sangre y se metabolizan parte de estos nutrientes. De esta forma el hígado regula los procesos glucólisis y glucogenólisis, la síntesis de ácidos grasos, cuerpos cetónicos y proteínas, además, tiene la capacidad de detoxificación de sustancias tóxicas que provienen del exterior y son absorbidas por el intestino, como se ha mencionado previamente.

Además, esta interacción incluye vasos linfáticos, mensajeros lipídicos procedentes del intestino y nervios del hígado lo que es una complejidad adicional en la conexión entre ambos sistemas. De hecho, uno de los mecanismos de comunicación bidireccional del eje hígado-intestino consiste en la secreción y reabsorción en el intestino de ácidos biliares, comunicación que se puede desequilibrar durante diversas patologías del hígado.

Las enfermedades hepáticas avanzadas como cirrosis, donde se observa una alta hipertensión portal, están relacionadas con el deterioro de la barrera intestinal. En estas enfermedades se observa una disbiosis lo que conlleva una alteración del microbioma que habita en la luz y el epitelio intestinal, lo que a su vez altera la función de este, en especial la permeabilidad de esta barrera. La deficiencia en la barrera intestinal, a su vez, afecta al hígado produciendo una sobredosis de antígenos microbianos,

microorganismos intestinales y metabolitos lo que puede acabar agravando a la enfermedad hepática. (Tilg et al., 2022)(Schoultz & Keita, 2020)

El hígado, en consecuencia, debe desempeñar un papel esencial en el control de los microorganismos que superen la barrera intestinal y todos sus productos. De hecho, se considera que el hígado presenta un sistema inmunológico muy potente formado por leucocitos residentes (fagocitos y linfocitos), que patrullan el órgano, y células hepáticas, propiamente dichas, que colaboran con los leucocitos en la respuesta inmune (endotelio y hepatocitos). Dentro de los leucocitos en homeostasis, destacan las células T reguladoras (Foxp3⁺), así como las células de Kupffer (KCs), un tipo de macrófago hepático, cuya función es producir citocinas y mediadores biológicos en el hígado. (Chiang & Ferrell, 2018)(J. Clària & E. Titos, 2004)

Otros componentes importantes que mantienen la homeostasis son las células dendríticas (DCs) mieloides y plasmocitoides, productoras de IL-10 y TFG-β1 lo que da lugar a una precisa regulación de la respuesta inflamatoria favoreciendo respuestas más suaves o tolerantes. Los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y las células *natural killer* (Nk), son células abundantes que también participan en la respuesta.

En el caso de una sobrecarga antigénica en el órgano, se produce una respuesta inflamatoria, que protege contra sustancias tóxicas y microorganismos patógenos, sin embargo, si la respuesta inmune es crónica o muy elevada, puede favorecer la progresión del daño hepático, agravando el proceso de fibrosis y favoreciendo a la evolución de enfermedades hepáticas, como la cirrosis. (Hastings et al., 2020)

1.3 Barrera intestinal

La barrera intestinal permite absorber nutrientes y líquidos a la vez que protege al cuerpo de metabolitos tóxicos y bacterias gracias a su característica de permeabilidad selectiva. Adicionalmente existe un alto grado de control inmunológico sobre la microbiota comensal en esta barrera. Para mantener el equilibrio entre el cuerpo y los microorganismos que colonizan el intestino hay muchos factores contribuyendo, como la relación entre distintas especies de microorganismos, las respuestas inmunitarias del huésped y las relaciones físicas y químicas entre células epiteliales y endoteliales de la barrera intestinal. La regulación de la barrera intestinal también está controlada por receptores de reconocimiento de patrones de los enterocitos. Entre ellos podemos encontrar los receptores tipo Toll (receptores Toll-like o TLR), los receptores similares al dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD2) y el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), que son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (MAMPs/PAMPs) y desencadenan una respuesta inflamatoria. (Tilg et al., 2022)(Schoultz & Keita, 2020)

Además de la microbiota intestinal, que compite con los patógenos por los recursos del huésped, otros agentes en la barrera intestinal serían la bilis, cuya producción tiene lugar en el hígado, y una de sus funciones es proteger contra dichos patógenos; el glicocálix y el agua adyacente a la pared intestinal son otros componentes de la barrera, donde predomina gran cantidad de moco e inmunoglobulinas (producidas por células secretoras especializadas y leucocitos de la barrera respectivamente); por debajo encontramos una capa de células epiteliales, que pueden ser entre otras enterocitos, células de Paneth y células caliciformes que evita el paso de elementos nocivos secretando compuestos antimicrobianos y cloruro; la parte más interna es la de la lámina propia que está formada por tejido conjuntivo con gran presencia de células inmunitarias innatas y adaptativas que secretan las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente y distintas citocinas que contribuyen a la eliminación de los microorganismos. Los macrófagos y neutrófilos, por ejemplo, limitan la invasión de patógenos por fagocitosis, mientras que las células T reguladoras controlan la homeostasis inmunitaria evitando un exceso de inflamación. Además, en esta capa encontramos la regulación intestinal por parte del sistema nervioso, endocrino y entérico. (Tilg et al., 2022)

A nivel molecular, la permeabilidad en el intestino está controlada por diferentes especializaciones de la membrana de los enterocitos en los que están involucradas distintas proteínas distribuidas diferencialmente por todas las células epiteliales (figura 2). Las uniones estrechas (o *tight junctions*), que se encuentran en la zona más externa de las células, están formadas por proteínas como claudina y ocludina. Por debajo de estas encontramos uniones adherentes con proteínas pertenecientes a la familia de las cadherinas, y junto con las anteriores se encuentran en la parte apical de las células epiteliales. Por debajo, encontramos adherencias más densas llamadas desmosomas. En conjunto, sirven como anclaje de los enterocitos adyacentes, pero especialmente para crear la primera línea de defensa en forma de barrera impermeable contra los microorganismos. Dependiendo de la zona de la barrera intestinal podemos encontrar en la superficie, prevalencia de las uniones estrechas mientras que en la parte inferior la adhesión de las células epiteliales está controlada por *zonula adherens*. Asimismo, mediadores inmunológicos se encargan de controlar el deterioro o mantenimiento de la barrera intestinal. Entre ellos podemos encontrar citoquinas como $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, y $IL-1\beta$, que son

mediadores proinflamatorios que contribuyen a la pérdida de la barrera intestinal, mientras que otros como IL-22, IL-18, IL-21 y CCL-3 mantiene la homeostasis. (Schoultz & Keita, 2020)

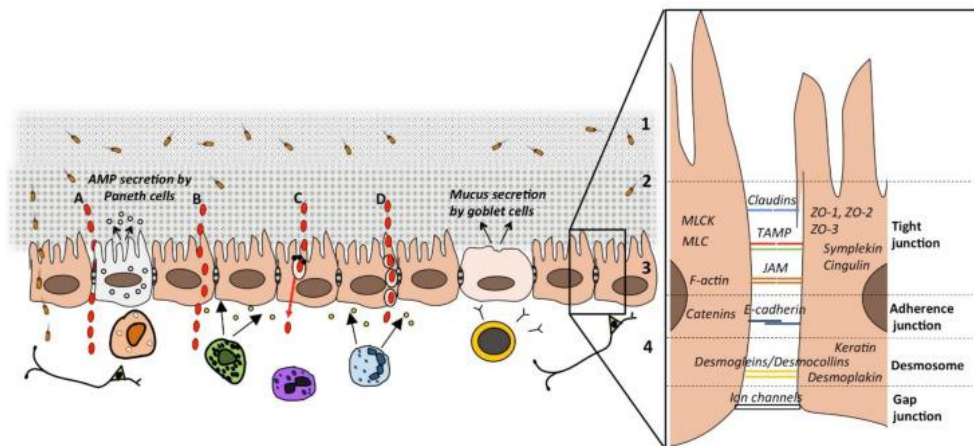


Figura 2. Esquema sobre la barrera intestinal y las vías de paso a través del epitelio. Los diferentes pasos a través de la membrana intestinal permiten una mayor o menos permeabilidad, entre ellos encontramos la ruta paracelular, la ruta transcelular, a través de poros acuosos, transportadores activos y endocitosis o exocitosis. Por otro lado, encontramos las diferentes partes por las que está formada la barrera y las uniones que mantienen adheridas las células epiteliales, en ellas destacan proteínas como ZO1, ZO2, ZO3, cateninas, f-actina, claudina, participando cada una de ellas en un tipo de unión diferente. (Schoultz & Keita, 2020)

Cuando existe algún tipo de daño en el epitelio, se puede producir un aumento de la permeabilidad lo que se relaciona con una disfunción de la barrera intestinal. Un aumento sistémico de los niveles de TNF α o IL-1 β durante el daño hepático crónico podrían promover el daño del epitelio intestinal. De hecho, la alteración del epitelio intestinal suele estar asociada con algunas enfermedades hepáticas, como la cirrosis, favoreciendo a su vez mayor daño en el hígado por el aumento de la carga antigénica como hemos mencionado. (Schoultz & Keita, 2020)

Dentro de las formas de comunicación hígado-intestino, hay que destacar también el papel del receptor X farsenoide (FXR), que participa en la señalización de los ácidos biliares. Los ácidos biliares son moléculas derivadas del catabolismo del colesterol en los hepatocitos que se encargan de la absorción intestinal y el transporte de nutrientes, lípidos y otras vitaminas lipofílicas. Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado y son secretados al duodeno donde se desconjugan para formar ácidos biliares secundarios y se reabsorben en el íleon desde donde se recirculan al hígado a través de la vena porta. Esto es lo que se conoce como circulación enterohepática. Los ácidos biliares se unen al FXR que se expresa en el hígado y en el intestino regulando diferentes funciones fisiológicas.

El mecanismo de acción del FXR se basa en la formación de un heterodímero con el receptor X retinoico (RXR), que suprime la expresión de CYP7A1, que limita la velocidad de conversión de colesterol en ácidos biliares. La represión de CYP7A1 viene regulado por dos mecanismos. El primero de ellos se da en el hígado, donde FXR induce la expresión de SHP, lo que inhibe a CYP7A1, por otro lado, en el intestino FXR incrementa los niveles de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF19, FGF15), estos disminuyen la expresión de CYP7A1 en el hígado, afectando a la síntesis de ácidos biliares (Figura 3). Adicionalmente, este mecanismo de comunicación se ha visto involucrado en el control de diferentes procesos metabólicos, afectando a la glucemia o la síntesis de lípidos, así mismo contribuye en la homeostasis del intestino. Durante la patología hepática, por tanto, la vía del FXR también se puede alterar en función de la gravedad del daño. La alteración de esta vía de comunicación afecta por consiguiente bidireccionalmente tanto la integridad del hígado como al intestino. (Shapiro et al., 2018)

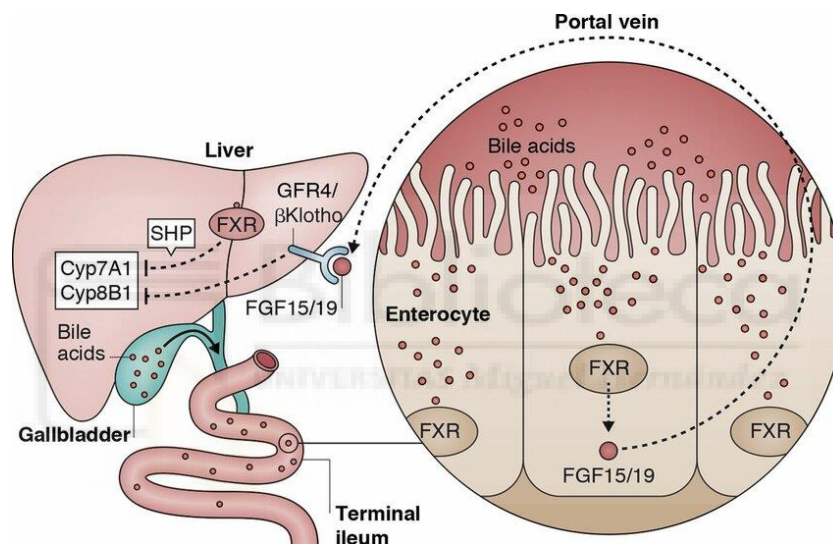


Figura 3. Los dos mecanismos de supresión de CYP7A1 se dan en el hígado, donde FXR activa la producción de SHP, suprimiendo CYP7A1. Por otro lado, en el intestino FXR aumenta la producción de FGF19 y FGF15, reduciendo también la actividad de CYP7A1 y afectando a la producción de ácidos biliares. (Shapiro et al., 2018)

1.4 Envejecimiento

El envejecimiento es el proceso por el cual disminuye gradualmente el equilibrio interno tanto a nivel genético, celular y de tejidos, produciendo una disminución de la longevidad y la capacidad reproductiva al igual que aumenta el factor de riesgo de padecer una enfermedad crónica. (Hastings et al., 2020)

Como se ha comentado anteriormente el hígado es un órgano metabólico que se encarga de mantener el equilibrio energético. Este órgano no tiene una relación directa con el envejecimiento ya que no hay enfermedades hepáticas específicas de la vejez, sin embargo, los cambios anatómicos y fisiológicos que se producen en el hígado a edades avanzadas, son los responsables de favorecer la aparición de

enfermedades hepáticas significativas. Además, dado que la probabilidad de presentar otras patologías en la vejez es mayor, la interacción entre diferentes enfermedades ocasiona una manifestación más severa de las enfermedades hepáticas. (Hunt et al., 2019)

En el envejecimiento los hepatocitos sufren una reducción en la síntesis y reparación del ADN debido al acortamiento de los telómeros en la senescencia, producido por estrés oxidativo ocasionado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que puede dañar a las células. Además, se ha comprobado en varios estudios que la alteración del ADN en el envejecimiento genera un aumento en la densidad y la compactación de la cromatina en los ratones más viejos.

Por otro lado, las vías de señalización de la senescencia p53, p16 y p21 se ven desequilibradas al igual que la expresión de algunos genes que participan en el metabolismo hepático como PI3K/Akt, MAPK, NF-Kb, TGF- β e IGF-1, asimismo los hepatocitos senescentes liberan citocinas inflamatorias como IL-6, TNF α e IL-8. Otro factor relacionado con el envejecimiento es la autofagia, que se ve reducida en los hígados envejecidos, reduciendo así la tasa de proteólisis e hidrólisis por lo que se acumulan proteínas dañadas y agregados proteicos que agrava la producción de especies reactivas de oxígeno lo que contribuye al envejecimiento hepático. Todas estas alteraciones contribuyen a la reducción del flujo sanguíneo hepático, la disminución de la función del citocromo P450 y la reducción de la función fagocitaria de las KCs.

La cirrosis hepática se manifiesta con menor frecuencia en ancianos que en personas de mediana edad, esto es debido a que en la población muy envejecida la enfermedad limita la esperanza de vida, impidiendo a muchos de ellos llegar a la vejez. La supervivencia y la respuesta a las diferentes terapias no se diferencia mucho de personas más jóvenes, aunque los pacientes más envejecidos presentan mayor riesgo de hemorragias digestivas debido a la ruptura de varices esofágicas. Además, es más probable que presenten otro tipo de complicaciones de manera precoz como la aparición de un carcinoma hepatocelular. La población anciana suele consumir diferentes tipos de medicamentos simultáneamente, estos compuestos se metabolizan en el hígado convirtiéndose en toxinas y pudiendo ocasionar daño hepático lo que predispone a una alteración de la función normal del hígado. Aun así, existen muchos factores como la edad el sobrepeso, la predisposición genética o el alcoholismo que igualmente predisponen al daño hepático. (Bruguera, 2014)

2. Antecedentes y Objetivos

2.1 Antecedentes

En los últimos años, el grupo de investigación de inmunobiología hepática y digestiva ha basado su trabajo en estudiar el papel del sistema inmunológico en diferentes enfermedades hepáticas e intestinales. Principalmente, se han enfocado en investigar las características inmunes de las células presentadoras de antígenos (APCs) como las KCs, las células endoteliales sinoidales del hígado (LSECs) y la función de los receptores innatos que expresan, como LSECtin, en modelos experimentales cirróticos. (Caparrós et al., 2020) (Martínez-López et al., 2024)

Adicionalmente, en el laboratorio también se ha estudiado previamente el papel que ejerce la traslocación bacteriana desde el intestino al hígado en la enfermedad hepática crónica avanzada, de forma que las bacterias provenientes del intestino afectan a la inflamación del hígado y a la hipertensión portal lo que es un factor dominante en la evolución de la cirrosis compensada a la descompensada. Algunos de estos estudios sugieren que la traslocación bacteriana en la cirrosis se ve relacionada con el deterioro de la barrera intestinal, la secreción de péptidos antimicrobianos y la desregulación de la expresión de las proteínas de unión de las células del epitelio intestinal, siendo todos factores de riesgo para la progresión de la enfermedad hepática crónica. (Simbrunner et al., 2023a)

2.2 Objetivos

En este trabajo se propone caracterizar la repercusión del envejecimiento en la enfermedad hepática crónica en el modelo animal del ratón. Además, se pretende ahondar en los efectos de la cirrosis hepática en el intestino debido a la comunicación entre ambos órganos. Se definen los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar las diferencias por edad en el daño hepático a través del estudio de diferentes marcadores profibrogénicos y de inflamación relevantes durante la enfermedad hepática.
- Evaluar las diferencias por edad en la permeabilidad de la barrera intestinal a través del estudio de proteínas clave involucradas en el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal.
- Estudiar si existen alteraciones en distintas vías de comunicación entre el hígado y el intestino en el contexto de la edad.

3. Materiales y Métodos

3.1 Inducción de cirrosis, laparotomía y perfusión hepática

El modelo animal escogido son ratones macho C57Bl6/J (Harlan Laboratories S.A., Barcelona. España). Se emplean dos grupos de ratones diferenciados, los jóvenes de 6 a 8 semanas y los viejos de 40 semanas de edad. El protocolo de inducción de cirrosis se basa en 4 semanas en las que se administra fenobarbital en el agua con el fin de estimular la actividad hepática, tras ello fueron tratados por vía intragástrica, con tetracloruro de carbono (CCl₄) diluido en aceite de oliva administrado dos veces por semana durante 12 semanas. La alimentación administrada a los ratones fue pienso estándar para roedores, en condiciones de 21±2°C de temperatura, 60±10% de humedad y fueron sometidos a ciclos de luz y oscuridad de 12:12 horas.

Tras la inducción de cirrosis, el primer paso de la laparotomía fue esterilizar todo el material que se usaría y la superficie de trabajo. A continuación, se anestesia a los ratones con isoflurano inhalado (IsoFlo, Esteve Veterinaria). Una vez anestesiado, se prosigue con la laparotomía practicando una incisión en el vientre del ratón, se retiran los intestinos para tener mayor campo de visión y se inyecta 0,1 ml de heparina al 1% en la vena cava inferior, para evitar la coagulación de la sangre en el hígado.

A continuación, se les extrae sangre a los ratones por punción cardíaca y se emplea un analizador bioquímico *Skylla BV1* para analizar algunos parámetros bioquímicos de la sangre de estos animales. En nuestro caso, nos interesa obtener la concentración (μMol/dL) de ácidos biliares en sangre que presenta cada animal.

Tras la perfusión hepática a través de la vena cava, se extraen los hígados e intestinos de los ratones y se cortan pequeños fragmentos para subsiguientes técnicas moleculares y otro fragmento algo más grande para su fijación y posterior inclusión en parafina.

Los animales fueron tratados según la Guía para Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Este procedimiento fue aprobado por el Comité de investigación Animal de la Universidad de Miguel Hernández bajo el código de identificación UMH-HA-RFG-01-19. Todo el proceso anterior fue realizado por Isabel Gómez Hurtado, veterinaria e investigadora del Grupo y responsable del manejo de los animales.

3.2 Inmunofluorescencia

Tras la laparotomía, se incubaba parte del hígado e intestino de ratón, de un tamaño aproximado de 0,5 cm en un tubo Falcon de 15 ml con formalina, durante un tiempo mínimo de 24 horas. El siguiente paso es deshidratar el tejido, para ello comenzamos con lavados en tampón fosfato salino (PBS) aumentando el tiempo de lavado. Posteriormente se incluye en diferentes concentraciones crecientes de etanol

(70°, 96° y 100°) y dos lavados de butanol. Por último, se procede a la inclusión en parafina, esta se deja enfriar a temperatura ambiente. A continuación, empleando un microtomo de parafina (Leica), se hacen cortes del tejido fijado de 5 mm de grosor. Tras unos minutos en agua a 40 °C, se recogen los cortes en portaobjetos de cristal y se colocan en una placa caliente para que se sequen.

El desparafinado comienza colocándose los portaobjetos sobre una placa calefactora para que funda la parafina, el siguiente paso consiste en hidratar las muestras con el fin de restaurar la naturaleza acuosa del tejido, para ello se sumerge el tejido en diferentes soluciones de xylol, etanol en decreciente concentración y por último PBS. A continuación, se hierven los portaobjetos en una solución llamada “retrieval” con el fin de exponer los antígenos del tejido, esta solución depende del anticuerpo que se utiliza y puede hacerse de tampón citrato (10mM, pH 6.0) (Sigma-Aldrich, Ref. W302600) o tampón Tris-EDTA (10 Mm Tris Base, 1mM EDTA, pH 9) (Sigma-Aldrich, Ref. T6066)-(Panreac AppliChem, Ref. A5097,0500). A continuación, se hace un bloqueo con una solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich, Ref. A2153) y suero fetal bovino (FBS, Sigma Aldrich, Ref.12103C) con el objetivo de evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo. Para la incubación con anticuerpo primario debemos utilizar una cámara húmeda con agua destilada. Una vez preparado el anticuerpo primario (tabla 1) en buffer de bloqueo se delimitan los tejidos con un *Liquid Blocker Super PAP-pen* (Sigma Aldrich) para evitar que se salga la solución de anticuerpo primario y se incuba toda la noche a 4 °C. Posteriormente, tras lavar los tejidos con PBS, se incuban con el anticuerpo secundario (tabla 1) y con DAPI durante una hora. Este último que tiñe el núcleo celular ya que es capaz de atravesar la membrana y unirse a las regiones ricas en adenina y timina del ADN. Por último, se montan los cubreobjetos con una solución de Mowiol + NPG (poli vinil alcohol) que proporciona fijación y protección al tejido lo que facilita la visualización de los tejidos a través del microscopio óptico con cámara de fluorescencia (Leica Microsystems) y se tomaron las fotos de los resultados con el programa LAS X Life Science. (Parra-Medina & Polo, 2017)

Anticuerpo	Especie	Dilución	Retrieval	Proveedor	Referencia
ACTA2 (α SMA)	Rabbit	1:250	Citrato	Cell Signaling	#19245
COL1A1	Rabbit	1:150	Citrato	Sigma Aldrich	EPR7785
VIM	Rabbit	1:200	Citrato	Cell Signaling	35741
CLDN1	Rabbit	1:200	Tris-EDTA	Abcam	15098
CLDN2	Rabbit	1:200	Tris-EDTA	Abcam	125293
ZO1	Rabbit	1:200	Tris-EDTA	Thermofisher	PA5-28858
F4/80	Rabbit	1:300	Citrato	Cell Signaling	#70076
CD3	Rabbit	1:250	Citrato	Cell Signaling	#85061

488Anti Rabbit	Donkey	1:250		Biolegend	406416
594Anti Rabbit	Donkey	1:250		Thermo Fisher	A-21207
488Anti Rat	Donkey	1:250		Abcam	150153

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los experimentos de inmunofluorescencia, las diluciones correspondientes, la especie huésped y el “retrieval” empleado. También se indica la marca de la empresa de origen.

3.3 Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción de ARN se emplea un RNeasy Mini Kit (Qiagen, Ref. 74104). En primer lugar, se corta el tejido con un tamaño aproximado de 0,5 cm de hígado y colon, se disgrega el tejido con buffer de lisis empleando un TissueLyser (Qiagen). Se procede a usar la columna de filtrado de RNeasy Mini spin aplicando una serie de productos del kit, tras centrifugar el lisado. Por último, se recoge la solución en un tubo colector que se centrifuga con 40 μ L de *RNase free water*.

A continuación, se cuantifica la concentración de ARN mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Una vez se determina la concentración de ARN de cada muestra, se preparan alícuotas de ARN a 5 ng/ μ L de concentración.

3.4 qPCR

Se utilizan las alícuotas de ARN preparadas para estudiar la expresión de algunos genes en el hígado y en el colon. Para ello se emplea el kit *qScript One-Step SYBR Green quantitative real-time PCR kit*. Este lleva a cabo la retrotranscripción y amplificación en un solo paso. Se utiliza β -Actina para normalizar los valores de la expresión génica, se emplea la media de los animales control (Ct) y se realiza la $\Delta\Delta$ Ct para analizar los valores obtenidos a través del programa GraphPad.

Gen	Secuencia de cebador
β -Actina - Forward	GCT CCG GCA TGT GCA AAG
β -Actina - Reverse	CCT TCT GAC CCA TTC CCA CC
Acta2 - Forward	GTC CCA GAC ATC AGG GAG TAA
Acta2 - Reverse	TCG GAT ACT TCA GCG TCA GGA
Col1a1 - Forward	GTG TTC CCT ACT CAG CCG
Col1a1 - Reverse	ACT CGA ACG GGA ATC CAT
Mmp2 - Forward	CCG AGG ACT ATG ACC GGG ATA

<i>Mmp2</i> - Reverse	CTT GTT GCC CAG GAA AGT GAA
<i>Timp1</i> - Forward	CCA GAA CCG CAG TGA AGA GT
<i>Timp1</i> - Reverse	GAA ACA CTG TGC ACA CCC CA
<i>Il6</i> - Forward	CTC TGC AAG AGA CTT CCA TCC A
<i>Il6</i> - Reverse	TGG AAA TTG GGG TAG GAA GGA C
<i>Il10</i> - Forward	GAG GCG CTG TCA TCG ATT TCT
<i>Il10</i> - Reverse	GTT TTC AGG GAT GAA GCG GC
<i>Il-1β</i> - Forward	TGC CAC CTT TTG ACA GTG ATG
<i>Il-1β</i> - Reverse	AAG GTC CAC GGG AAA GAC AC
<i>Tgfb1</i> - Forward	ACG TGG AAA TCA ACG GGA TCA
<i>Tgfb1</i> - Reverse	AGA AGT TGG CAT GGT AGC CC

Tabla 2. Secuencias de cebadores empleados en el estudio de la expresión de los genes en la RT-qPCR. El gen β -Actina se emplea como control para normalizar la expresión de los demás genes a estudio.

3.5 Extracción y cuantificación de proteína

Para extraer proteína, se corta aproximadamente 0,5 cm de tejido de hígado y colon. La muestra de tejido se incuba con buffer RIPA y con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se lisa la muestra en un sistema de fraccionamiento con agitación intensa empleando un TissueLyser (Qiagen)

Se cuantifican las proteínas de las muestras a través de un kit comercial “DC Protein Assay” (Biorad, Ref. 5000114), formado por el reactivo S, reactivo A y reactivo B, empleándose una placa de 96 pocillo y siguiendo las indicaciones del proveedor. Para medir el nivel total de proteínas en las soluciones se lleva a cabo el ensayo de Lowry, en el que se detecta la concentración de proteínas de las muestras por la diferencia colorimétrica. Por último, se miden las absorbancias mediante un lector de placas (*Epoch microplate reader*, BioTek) donde obtenemos los valores que se analizan para obtener la cantidad de proteína en cada caso, preparándose finalmente alícuotas de proteína para cada muestra y la cantidad necesaria de *loading buffer* y agua para cada una de ellas.

3.6 Electroforesis en poliacrilamida y Western Blot

Tras cuantificar las muestras de proteínas de hígado y colon, se lleva a cabo la técnica de Western Blot (WB) con el fin de obtener un análisis de la expresión de las proteínas escogidas mediante el sistema ChemiDoc (Biorad).

En primer lugar, se preparan geles SDS-PAGE a 8%, 10% y 15%, dependiendo del tamaño de las proteínas que se van a separar. Para ello se prepara el *resolving* gel a partir de agua, Tris, SDS al 10%, TEMED y acrilamida al 30%, estos dos últimos son los que comienzan la reacción de polimerización del gel entre dos cristales en un soporte. Una vez polimeriza este gel se prepara el *stacking* gel, se introduce en el soporte por encima del *resolving* gel y se deja polimerizar.

En los pocillos del gel se cargan 20 µl de las alícuotas de proteínas y en las calles vacías del principio y del final se incluye el marcador de peso molecular. Se lleva a cabo una electroforesis para separar las proteínas de interés aplicando un voltaje de 120V durante 1 hora y media, tras ello, se produce una transferencia semiseca a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio Rad). Para ello comenzamos activando las membranas con metanol y posteriormente se sumergen en *Transfer Buffer*. Por último, se monta el sándwich con la membrana y el gel de poliacrilamida y se procede a la transferencia en el equipo.

A continuación, se incuban las membranas en buffer de bloqueo con BSA (Sigma Aldrich, Ref. A2153) durante 1 hora en rotación constante a temperatura ambiente para evitar las uniones inespecíficas. Tras el bloqueo, se incuban la membrana con el anticuerpo primario a la dilución indicada en la Tabla 3 durante 24 horas a 4 °C. Una vez finalizada la incubación con anticuerpo primario, se lava la membrana con TBST (*Tris-buffered saline* con Tween 20) y se incuba con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Finalmente, se lava con TBST y se aplica el buffer de revelado empleando el sustrato SuperSignal West Pico PLUS (ThermoFisher Scientific, Ref. 34580). Se emplea el equipo ChemiDoc para obtener las imágenes quimioluminiscentes de las membranas. Como control para normalizar los valores obtenidos en las imágenes, se utiliza β-ACTINA. En este caso el anticuerpo primario y secundario se incuban conjuntamente durante 30 minutos en rotación.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor	Referencia
αSMA	Rabbit	1:1000	Cell Signaling	19245
COL1A1	Rabbit	1:1000	Sigma Aldrich	AB765P
CLDN1	Rabbit	1:1000	Abcam	15098
CLDN2	Rabbit	1:1000	Abcam	125293
ZO-1	Rabbit	1:1000	Thermofisher	PA5-28858
B-ACTINA	Mouse	1:10000	Sigma Aldrich	A5441
HRP Anti-Rabbit	Goat	1:3000	Boster	BA1054
HRP Anti-Mouse	Goat	1:3000	Santa Cruz Biotechnology	sc-516102

Tabla 3. *Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los experimentos de Western Blot, las diluciones correspondientes y la especie huésped. También se indica la marca de la empresa de origen.*

3.7 Análisis estadístico

Tras la obtención de las imágenes de inmunofluorescencia y western blot, se cuantificaron empleando el software ImageJ (ImageJ Software Inc., Wayne Rasband). En el caso de la inmunofluorescencia de hígados se analiza el porcentaje de área señalizada por el fluoróforo, que nos da la señal relativa de este, sin embargo, en el caso de la inmunofluorescencia de colon, dado que el área de la mucosa de las vellosidades del órgano no abarca el área total de las imágenes tomadas, se analizan únicamente las regiones donde aparece la mucosa intestinal para ser más específicos con la cuantificación proteica.

Con los resultados obtenidos de esta cuantificación y los resultados obtenidos de los demás experimentos, se emplea el software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Boston, EE.UU) para el análisis estadístico. Con este programa se han tratado todos los datos y creado las gráficas necesarias para representar visualmente los datos obtenidos y así proporcionar una explicación clara de los resultados.

Las variables continuas se representan como media \pm desviación estándar. Adicionalmente, se calcula la significancia estadística a partir del análisis ANOVA, donde se analizan y comparan los valores en una misma condición y entre las diferentes condiciones. Los valores $p < 0,05$ se indican en las gráficas como (*), $p < 0,01$ se indican como (**), para $p < 0,001$ (***) y para $p < 0,0001$ (****). Todos estos resultados se clasifican como significativos.

4. Resultados

4.1 Inflamación

Como ya hemos comentado con anterioridad, este trabajo se centrará en el estudio del efecto de la cirrosis en la conexión entre el hígado y el intestino y como afecta el envejecimiento en el desarrollo de esta enfermedad.

En primer lugar, se evalúan ciertos marcadores característicos del estado inflamatorio del hígado, ya que son clave para el desarrollo de cirrosis. En concreto evaluamos la presencia de leucocitos que suelen ser indicadores indirectos del estado inflamatorio por su mayor reclutamiento.

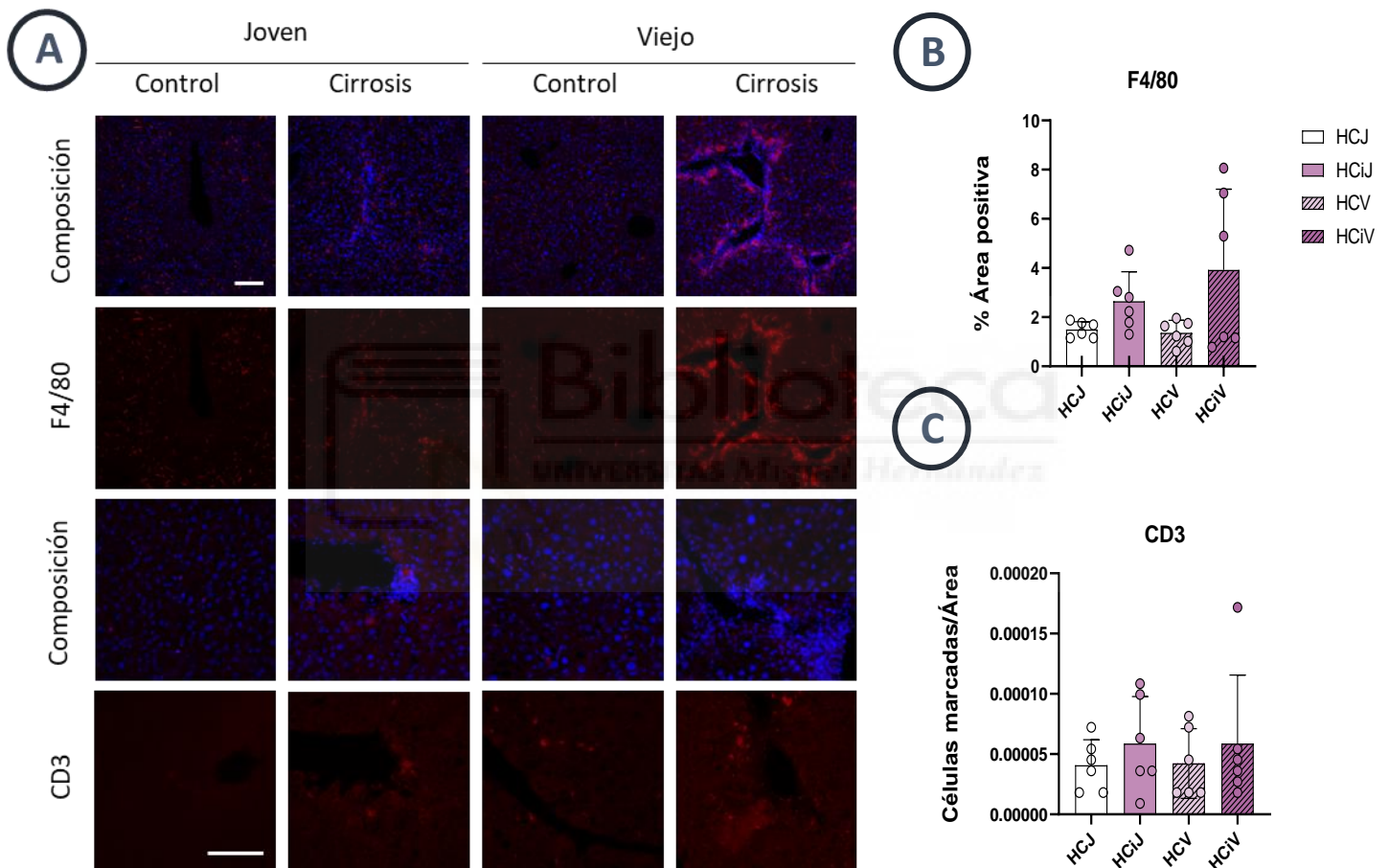


Figura 4.A Imágenes de inmunofluorescencia de marcadores inflamatorios, en histología de hígado de ratones jóvenes y viejos, separados en controles y cirróticos ($n=3$). Los marcadores empleados son: F4/80 (magnificación 20x) y CD3 (magnificación 40x), se representan en conjunto con DAPI. Escala 50 μ m. **B. Representación gráfica del porcentaje de área positiva de F4/80** y **C. Representación gráfica de la relación entre el número de células marcadas con CD3 y el área de la imagen**. Se representa en cajas la media del porcentaje de área y las barras la desviación estándar de cada grupo experimental. HCJ: Hígado Control Joven; HClJ: Hígado Cirrótico Joven; HCV: Hígado Control Viejo; HCIV: Hígado Cirrótico Viejo. La significancia estadística se representa de la siguiente forma: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Para $p > 0,05$ se consideran resultados no significativos.

La figura 4.A. representa la distribución hepática de dos marcadores en muestras de tejido hepático de ratones jóvenes y viejos, divididos en controles y cirróticos. El primer marcador empleado ha sido F4/80, es uno de los marcadores de superficie celular más específico de los macrófagos. La distribución de F4/80 se da de forma homogénea por toda la superficie hepática en los tejidos control, mientras que en los cirróticos se observa una distribución mayoritaria en las zonas adyacentes a la zona periportal, debido al daño producido por la enfermedad. En el caso del marcador CD3, se encuentra en el receptor de los linfocitos T maduros que sirve para el reconocimiento antigénico. En los controles la señal de CD3 es más débil ya que hay una cantidad menor de linfocitos reclutados. Mientras que se puede ver un leve aumento de la señal en los cirróticos al haber mayor presencia de linfocitos T que hacen frente a la enfermedad. Podemos confirmar los resultados de inmunofluorescencia a través del análisis gráfico (Figura 4.B y Figura 4.C), donde se muestran tendencias de aumento de ambos marcadores en los animales cirróticos, tanto jóvenes como viejos, sin llegar a presentar resultados significativos.

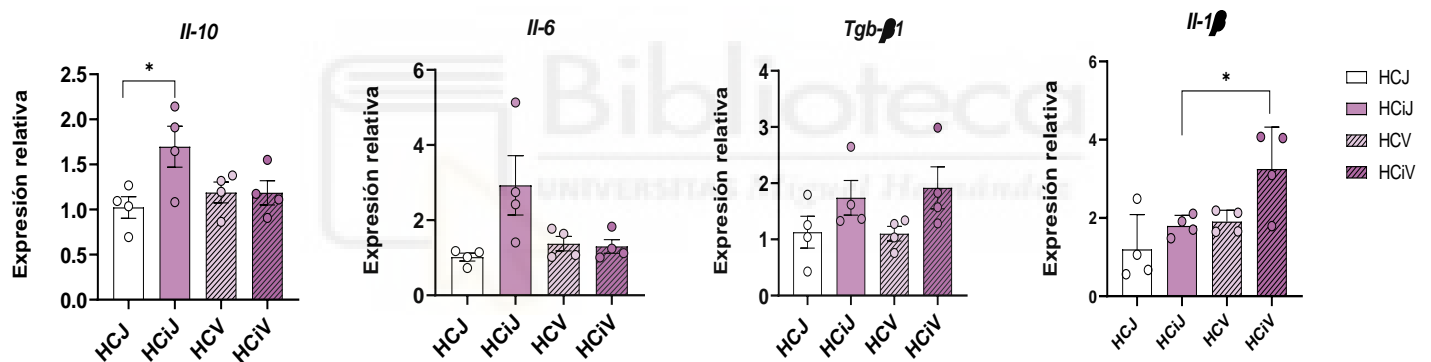


Figura 5. Expresión relativa de IL-10, IL-6, Tgf-β1 y IL-1β en el hígado de ratones jóvenes y viejos, control y cirrótico, obtenida mediante la técnica de RT-qPCR. Se extrajo ARN de hígado de ratón en las diferentes condiciones y se realizó una RT-qPCR con cebadores específicos para cada gen. Se emplea una n=4. HCJ: Hígado Control Joven; HCiJ: Hígado Cirrótico Joven; HCV: Hígado Control Viejo; HCiV: Hígado Cirrótico Viejo. La significancia estadística se representa de la siguiente forma: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Para $p > 0,05$ se consideran resultados no significativos.

En la figura 5 se representa gráficamente la expresión de genes asociados con la inflamación. Se estudiaron las diferencias en la expresión de diferentes citoquinas que actúan en el contexto de la cirrosis (IL-10, IL-6, IL-1β y Tgf-β1). Por un lado, IL-10 y Tgf-β1 tiene una función antiinflamatoria, que impide a las células inmunitarias elaborar más citoquinas. Por otro lado, IL-6, IL-1β son citoquinas proinflamatorias que inducen la producción de otras citoquinas y promueven la inflamación. Además, en el caso de Tgf-β1 es un factor multifuncional ya que tiene función profibrogénica, lo que induce la

activación de células hepáticas estrelladas hepáticas y mayor deposición de matriz extracelular. Con todo esto podemos entender mejor los resultados obtenidos, ya que, a pesar de no obtener resultados con significancia estadística en todas las gráficas, como ocurre en *Il-10* e *Il-6*, se observa una tendencia en la que la expresión de estas citocinas aumenta en el contexto de la cirrosis en los animales jóvenes debido a la activación del sistema inflamatorio desencadenada por la progresión de la enfermedad. Por otro lado, en *Tgf- β 1* sí que se aprecian tendencias más claras en los animales enfermos jóvenes y viejos comparados con los controles sin haber diferencias entre los animales de diferente edad, a diferencia de la gráfica de expresión de *Il-1 β* donde se observan diferencias significativas entre el grupo enfermo de jóvenes y el grupo enfermo de ratones viejos, siendo mayor en los envejecidos lo que podría explicar el aumento de daño en estos hígados junto con la menor expresión de *Il-10*.



4.2 Fibrosis

A continuación, evaluamos una serie de marcadores profibrogénicos en el hígado de ratones control y cirróticos en dos grupos: jóvenes y viejos.

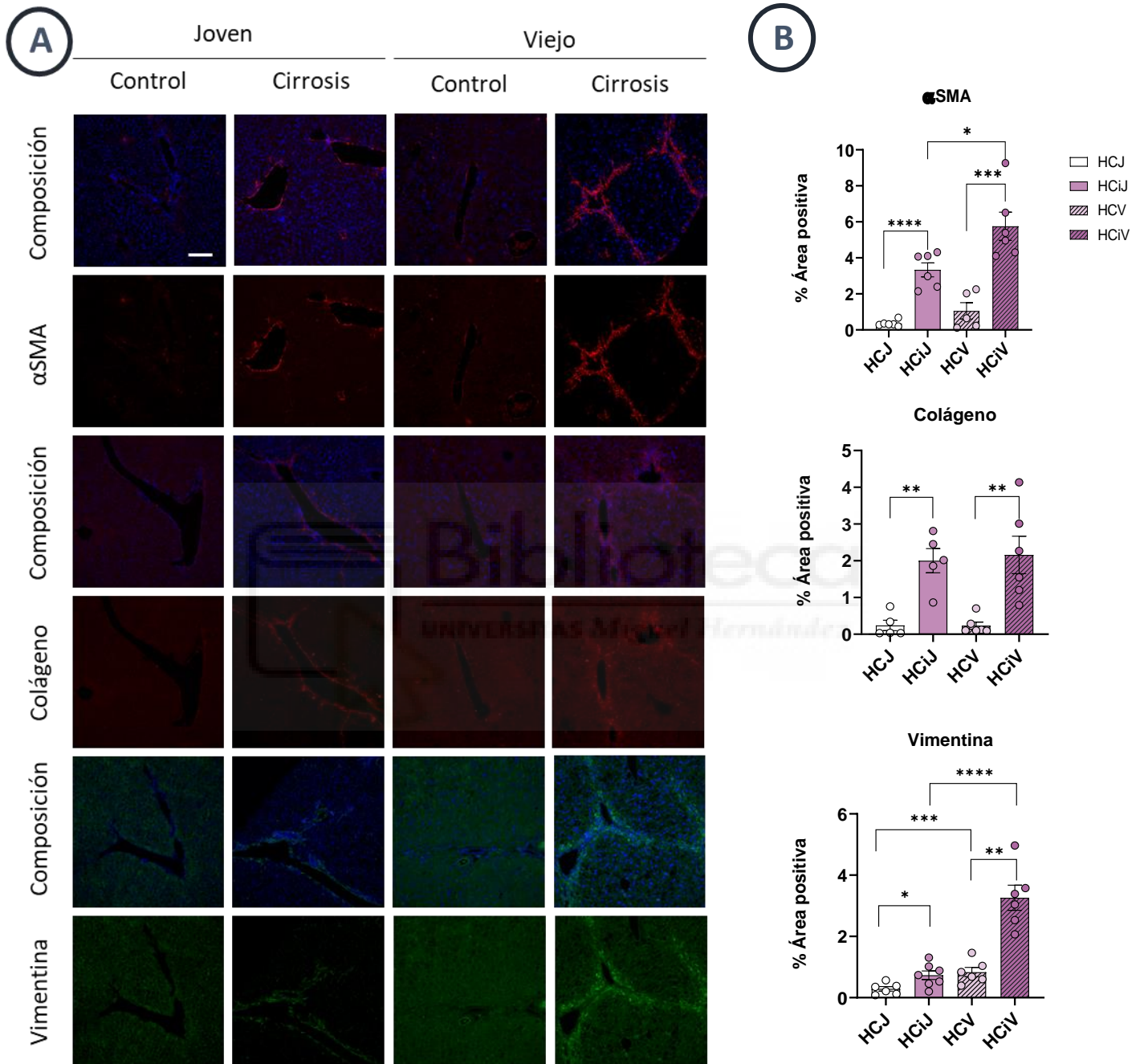


Figura 6.A. Imágenes de inmunofluorescencia de marcadores profibrogénicos, en histología de hígado de ratones jóvenes y viejos, controles y cirróticos (n=3). Los marcadores empleados son: αSMA, COL1A1 y VIM, se representan en conjunto con DAPI. Escala 50 μm y magnificación 20x. B. Representación gráfica del porcentaje de área positiva de los marcadores profibrogénicos. Representación en cajas de la media del porcentaje de área y las barras la desviación estándar de cada grupo experimental. HCJ: Hígado Control Joven; HCiJ: Hígado Cirrótico Joven; HCV: Hígado Control Viejo; HCiV: Hígado Cirrótico Viejo. La significancia estadística se representa como: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (), $p < 0,001$ (***). (***) Para $p > 0,05$ se consideran resultados no significativos.**

En primer lugar, en la Figura 6.A se observa la distribución de actina de músculo liso α (α SMA). Se puede distinguir entre los hígados controles y cirróticos, ya que en los controles α SMA solo está presente en el músculo liso de los vasos sanguíneos, mientras que en los cirróticos se observa como la señal aumenta alrededor área periportal lo que indica que se está produciendo mayor matriz extracelular por la activación de las células hepáticas estrelladas. Con relación al envejecimiento, los tejidos envejecidos presentan mayor distribución de α SMA, que se extiende por el parénquima hepático conforme avanza la enfermedad y la edad. Lo mismo ocurre con el colágeno tipo 1 (COL1A1) y la Vimentina (VIM), donde se ve como los hígados cirróticos presentan mayor cantidad de estos marcadores a diferencia de los controles donde apenas se observa señal y se destaca los hígados cirróticos viejos con mayor señal lo que sugiere mayor daño hepático en estos animales.

En la figura 6.B se representa el porcentaje de área positiva que se ha analizado de las imágenes de inmunofluorescencia de α SMA, COL1A1 y VIM. Por consiguiente, de una manera similar a lo que ve en las imágenes, en las gráficas se observa que en los hígados cirróticos hay mayor porcentaje de área de dichos marcadores destacando los hígados cirróticos viejos donde la expresión es mayor.

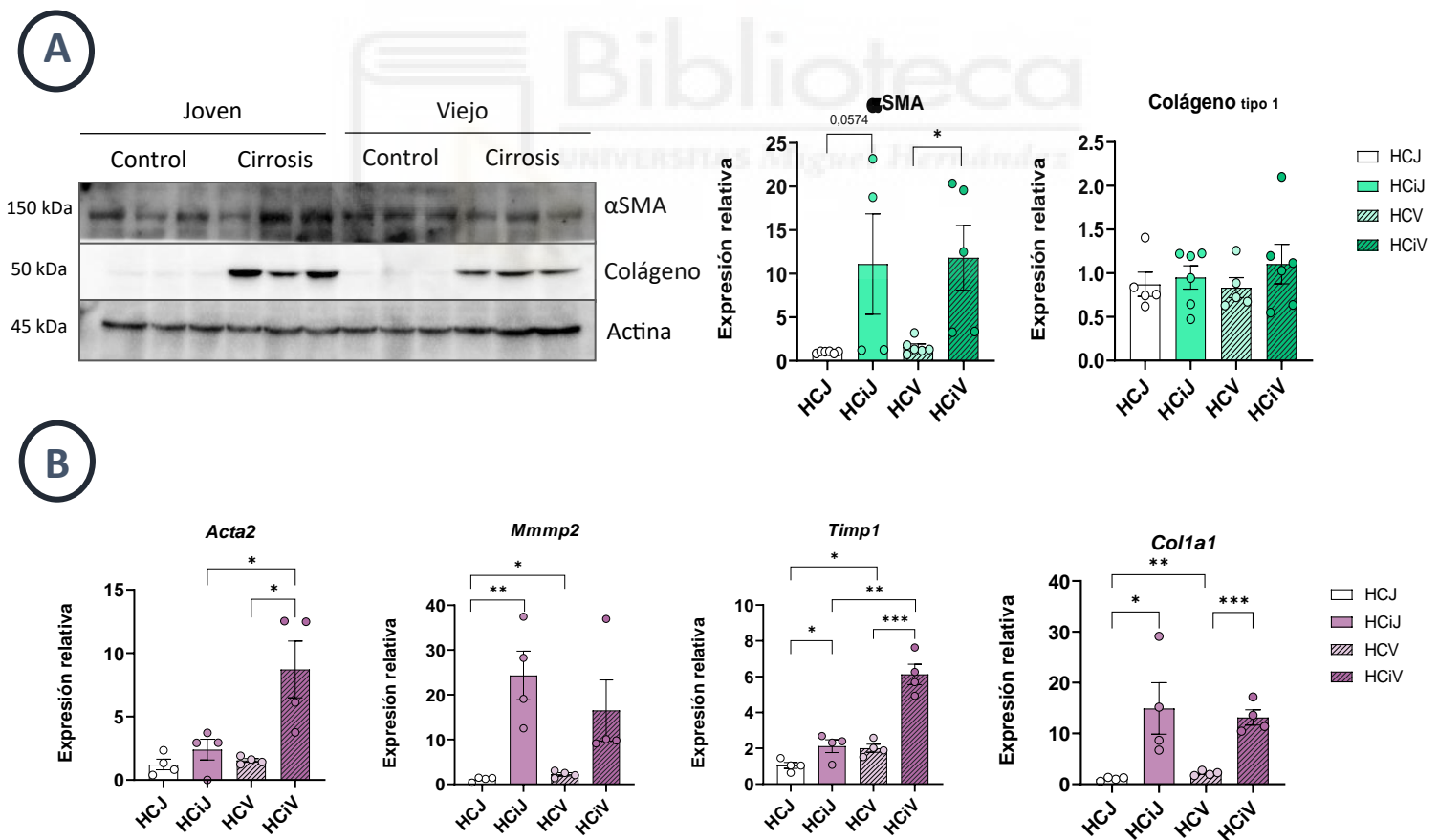


Figura 7. A. Imágenes de Western Blot (WB) y análisis de cuantificación de la expresión relativa de los marcadores de fibrosis: α SMA y Colágeno tipo 1. Se utiliza el marcador de β -Actina como control de carga y se realizan un total de $n=4$ para α SMA y $n=6$ para Colágeno. **B. Expresión relativa de Col1a1, Acta2, Mmp2 y Timp1 en el hígado de ratones jóvenes y viejos, control y cirrótico, obtenida mediante la técnica de RT-qPCR.** Se extrajo ARN de hígado de ratón en las diferentes condiciones y se realizó una RT-qPCR con cebadores específicos para cada gen. Se emplea una $n=4$. HCJ: Hígado Control Joven; HClJ: Hígado Cirrótico Joven; HCV: Hígado Control Viejo; HCiV: Hígado Cirrótico Viejo. La significancia estadística se representa de la siguiente forma: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Para $p > 0,05$ se consideran resultados no significativos.

A continuación, se estudia la expresión de los marcadores profibrogénicos α SMA y COL1A1 por WB (Figura 7.A) donde, debido a la variabilidad en las muestras, no se alcanzan a apreciar diferencias esperadas. Se observa un aumento significativo de α SMA en el hígado de ratones cirróticos sin apreciar diferencias por la edad, mientras que en el colágeno únicamente se ve una leve tendencia de aumento en los animales cirróticos sin llegar a ser un resultado significativo estadísticamente.

Por otro lado, se lleva a cabo un análisis de expresión de diferentes genes profibrogénicos que codifican proteínas participantes en la fibrosis (Figura 7.B). Como se observa en la expresión génica, al igual que los resultados de inmunofluorescencia, parece existir un aumento de la fibrosis en los hígados cirróticos de la expresión de los genes que codifican para α SMA y COL1A1. En la gráfica de *Acta2* se observa una relevante significancia estadística entre los ratones controles y cirróticos viejos. Además, se puede destacar la mayor expresión en los animales viejos enfermos comparados con los jóvenes. En el caso de COL1A1, también vemos resultados significativos estadísticamente comparando los grupos control con los cirróticos y se destaca mayor expresión en los ratones envejecidos.

En el análisis de la expresión de *Mmp2* (gen que codifica para la metaloproteinasas de matriz 2) se destaca un aumento significativo en la expresión de los animales jóvenes cirróticos, destacando también el papel de los hígados viejos. Por último, estudiamos la actividad de *Timp1*, este gen codifica para inhibidores tisulares de metaloproteinasas en la cirrosis. En la gráfica se muestra un aumento de la expresión de este gen en los animales jóvenes cirróticos comparados con los sanos jóvenes y un aumento más significativo en los animales envejecidos que padecen la enfermedad, ya que se disparan mucho los valores de expresión en estos ratones.

4.3 Barrera intestinal

A continuación, se analizan marcadores de la integridad de la barrera intestinal. Estos consisten en proteínas de las uniones estrechas. Debido a la evolución de la enfermedad cirrótica se ve alterada la presencia de estas proteínas en el intestino, causando un aumento de la permeabilidad epitelial.

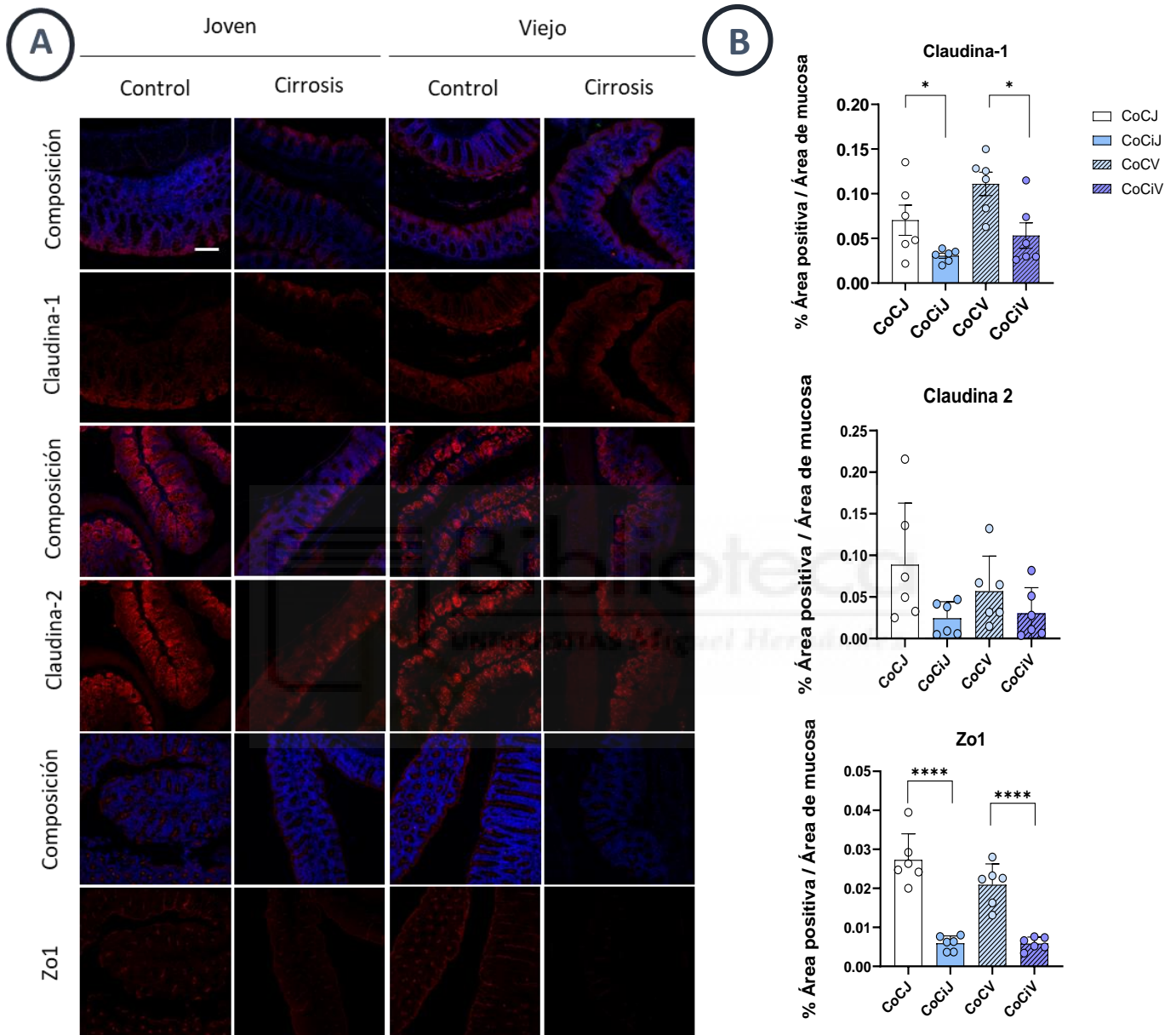


Figura 8. A. Imágenes de inmunofluorescencia de marcadores de integridad de la barrera intestinal, en histología de colon de ratones (n=3). Los marcadores empleados son: Claudina-1, Claudina-2 y ZO-1 se representan en conjunto con DAPI. Escala 50 μ m. Magnificación 20x. B. Representación gráfica del porcentaje de área positiva de los marcadores anteriores. Representación en cajas la media del porcentaje de área y las barras la desviación estándar de cada grupo experimental. La cuantificación de la expresión de estos marcadores se ha analizado aislando la región de la mucosa de las vellosidades del colon. CoCJ: Colon Control Joven; CoCiJ: Colon Cirrótico Joven; CoCV: Colon Control Viejo; CoCiV: Colon Cirrótico Viejo. La significancia estadística se representa como: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (), $p < 0,001$ (***). (***). Para $p > 0,05$ se consideran resultados no significativos.**

En la Figura 8.A se observa que las proteínas relevantes en la integridad de la barrera intestinal, Claudina-1 (CLDN1), Claudina-2 (CLDN2) y ZO-1, se expresan mayoritariamente en el epitelio de los animales control, tanto en ratones jóvenes como envejecidos. Por un lado, ZO-1 y Claudina-1 se expresan fundamentalmente en las zonas más superficiales de las vellosidades del colon, mientras que Claudina-2 se expresa fundamentalmente en las criptas. Si comparamos con la Figura 6.B se observa que el porcentaje de área donde se expresan los marcadores de integridad epitelial en los controles es significativamente mayor independientemente de la edad sin que se lleguen a apreciarse diferencias entre los grupos cirróticos jóvenes y viejos. Debido a la variabilidad de los resultados, las diferencias no son significativas en la gráfica de Claudina-2 aunque como se ha comentado anteriormente si se aprecia tendencia hacia la alteración de la barrera durante el curso de la enfermedad sin tener en cuenta la influencia de la edad. Por otro lado, en las gráficas de Claudina-1 y ZO-1 sí que se observa significancia estadística entre los ratones control y cirrótico sin llegar a observarse diferencias relevantes entre los animales de diferentes edades.

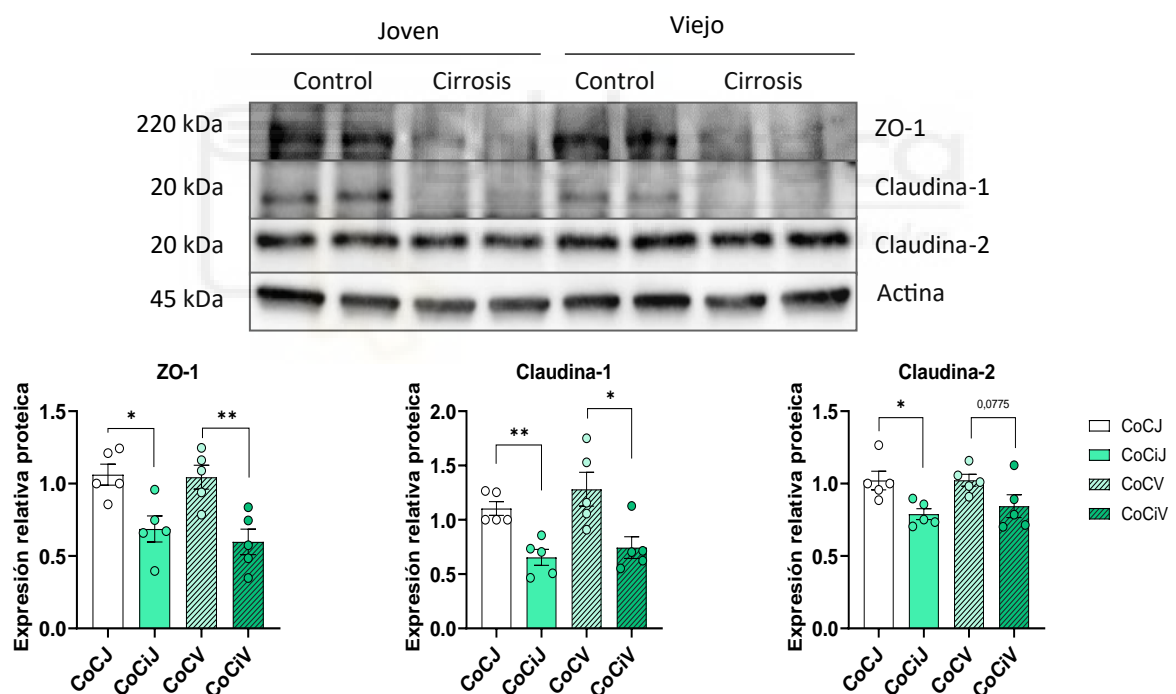


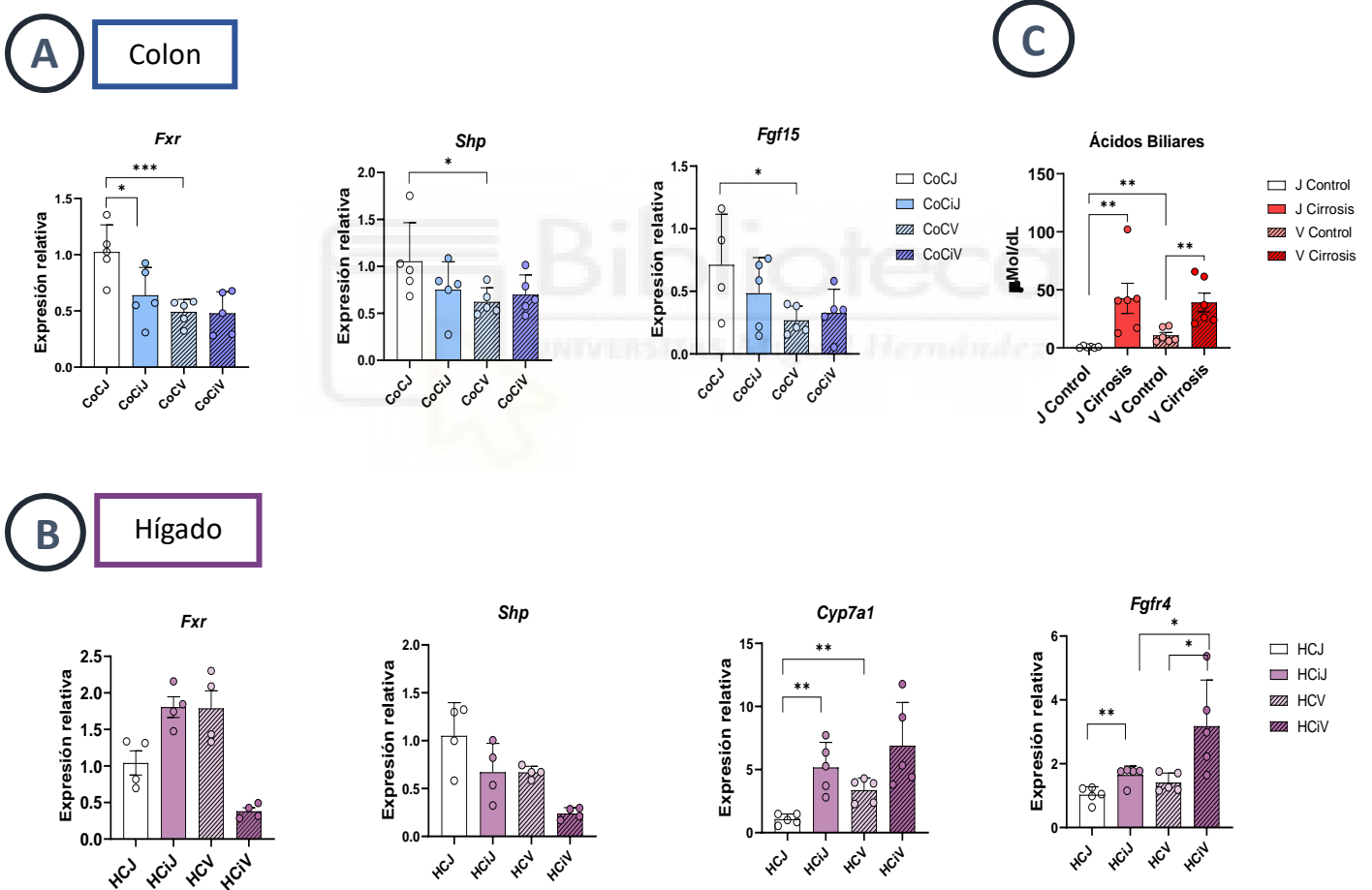
Figura 9. Imágenes de WB y análisis de cuantificación de la expresión relativa de proteínas de integridad de la barrera epitelial: Claudina-1, Claudina-2 y ZO-1. Tras la extracción y cuantificación de proteína de colon de ratones viejos y jóvenes en dos condiciones, sanos y cirróticos, se somete a las muestras al protocolo de Western Blot. Se utiliza el marcador de β -Actina como control de carga y se realizan un total de $n=5$. CoCJ: Colon Control Joven; CoCiJ: Colon Cirrótico Joven; CoCV: Colon Control Viejo; CoCiV: Colon Cirrótico Viejo. La significancia estadística se representa de la siguiente forma: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . Para $p > 0,05$ se consideran resultados no significativos.

En la figura 9 se puede comprobar que hay significancia estadística entre las muestras control y cirrótico tanto en animales jóvenes como viejos, sin embargo, no hay diferencias significativas entre ambos grupos de edad, lo que ya se ha comentado en los resultados de inmunofluorescencia anteriores. Conjuntamente los resultados de WB demuestran una reducción de la expresión tanto de Claudina-1, Claudina-2 y ZO-1 en los ratones que presentan la enfermedad. En el caso de Claudina-2 no se observa apenas significancia en ambas edades, siendo la expresión de esta proteína equivalente para los ratones jóvenes y envejecidos.



4.4 Eje hígado-intestino

Una de las formas de comunicación hígado-intestino es la señalización de los ácidos biliares en la que participan algunos marcadores en el metabolismo de lípidos en el hígado y en el intestino. El mecanismo por el que se sintetizan los ácidos biliares (AB) viene regulado por dos mecanismos, uno de ellos se da en el colon donde el FXR, que es un receptor de estos, incrementa la expresión de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF15) que, tras viajar al hígado, disminuye la expresión de CYP7A1 en los hepatocitos donde limita la conversión de colesterol en ácidos biliares. El otro mecanismo tiene lugar en el hígado en sí, donde el receptor FXR induce la expresión de SHP lo que inhibe a CYP7A1 también y la subsiguiente biosíntesis de ácidos biliares. Estudiando la expresión de los genes que codifican para estas proteínas se pueden observar una serie de fenómenos que nos ayudan a entender el estado de la comunicación entre ambos órganos.



C. Análisis bioquímico en suero de ratón revela mayor cantidad de ácidos biliares (AB) en los animales cirróticos, tanto jóvenes como envejecidos. Se analiza el suero de 6 animales por condición (n=6). J Control: Joven Control; J Cirrosis: Joven Cirrótico; V Control: Viejo Control; V Cirrosis: Viejo Cirrótico. La significancia estadística se representa de la siguiente forma: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (), $p < 0,001$ (***) . Para $p > 0,05$ se consideran resultados no significativos.**

En el colon, (Figura 10.A) se muestra una tendencia en disminución de la expresión de los tres genes (*Fxr*, *Shp* y *Fgf15*) a medida que evoluciona la enfermedad hepática, aunque no presenta significancia entre las condiciones de cirrosis y control, sí que podemos afirmar que existe significancia estadística entre los animales jóvenes y viejos, ya que en estos últimos se ve un claro descenso de la expresión de dichos genes.

En la Figura 10.B, a diferencia del colon, se ve que en el hígado la expresión de *Fxr* tiene una tendencia al aumento en los cirróticos jóvenes que desaparece en los cirróticos viejos llegando a niveles inferiores a los controles. En el caso del *Shp*, este presenta una tendencia a disminuir desde el control joven al cirrótico viejo, lo que indica que debido a la evolución de la enfermedad y a las edades avanzadas, se deteriora la comunicación con el intestino. Por otro lado, en cuanto a la expresión de *Cyp7a1*, que es el sistema enzimático encargado de controlar la biosíntesis de ácidos biliares, se observa un aumento significativo en los animales cirróticos jóvenes y una tendencia en los animales cirróticos viejos incluso mayor. Además, en lo animales viejos controles aumenta significativamente la expresión de este marcador. Lo mismo ocurre con el *Fgfr4*, que es el receptor que media la unión de *Fgf15* en el hígado, se ve un aumento de la expresión del receptor en los cirróticos, siendo mayor en los animales envejecidos.

Adicionalmente, se midió en el suero de los ratones los niveles de AB. Tras el análisis conjunto de las diferentes concentraciones de ácidos biliares (Figura 10.C), se muestran diferencias significativas entre los grupos de ratones controles y cirróticos, presentando mayor concentración de ácidos biliares los animales que padecen la enfermedad hepática. Por otro lado, también se muestra significancia estadística entre ambos grupos de controles, manifestando mayor concentración en los animales envejecidos. Con estos resultados podemos confirmar, como se ha comentado previamente, que la alteración del mecanismo FXR-AB ocasiona un aumento de la síntesis de ácidos biliares en condiciones de enfermedad.

5. Discusión

El objetivo principal de este estudio consiste en establecer una relación entre el envejecimiento y la evolución de la enfermedad hepática crónica en ratones. Anteriormente, en otros estudios se ha examinado el efecto del envejecimiento sobre el hígado, confirmando cambios en la estructura y función hepática asociado a éste, sobre todo en los hepatocitos. Estos estudios han sido realizados en ratas, confirmando que el envejecimiento conlleva una reducción del flujo portal. (Maeso Díaz Raquel, 2020) En este trabajo se intenta dar una explicación a esta hipótesis empleando ratones, que aportan ciertas ventajas frente a las ratas, en cuanto cuidado y mantenimiento por su pequeño tamaño.

Se comienza este análisis estudiando los efectos del daño crónico por CCl₄ como modelo de cirrosis. En estos animales el daño en los hepatocitos tras metabolizar el compuesto activa el sistema inmune generando una elevada respuesta proinflamatoria, lo que induce la reparación del tejido la deposición de proteínas y matriz extracelular ocasionado por consiguiente fibrogénesis. Por otro lado, como se ha demostrado en otras ocasiones, la función del hígado y el intestino está muy relacionada en condiciones fisiológicas ya que, durante la absorción y metabolismo de nutrientes, en la sangre portal que viaja por las sinusoides hepáticas también se transporta antígenos bacterianos procedentes del intestino, incluso en las células inmunitarias de ambos órganos. Por ello, se quiere analizar el efecto del desarrollo de la enfermedad hepática crónica en el intestino y así saber el nivel de comunicación que existe entre ambos órganos en condiciones de enfermedad, para ello se estudia una vía de comunicación del hígado-intestino que participan en el metabolismo y señalización de los ácidos biliares y además comprobar el efecto de la edad en esta comunicación. En cuanto al intestino, se evalúa si la permeabilidad intestinal se ve deteriorada con el aumento de la edad, estudiando las proteínas que mantienen la integridad del epitelio intestinal. (Muñoz Leticia & Albillos Agustín, 2008)

5.1 Daño hepático y activación del sistema inflamatorio

Cuando el hígado sufre un daño crónico, causado por múltiples factores, se inicia una respuesta inflamatoria hepática, donde se activan macrófagos que secretan citocinas y factores de crecimiento que tratan de reparar el tejido dañado. En el caso de los marcadores inflamatorios de las KCs y los linfocitos T (F4/80 y CD3), respectivamente, se puede decir que se desencadena una reacción inflamatoria crónica, debido a la tendencia en aumento de los niveles de estos marcadores en los animales cirróticos.

El análisis de la expresión de los genes que codifican para algunas citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias confirma que hay una activación del sistema inmune como consecuencia de la cirrosis. En los hígados de los animales jóvenes tratados con CCl₄, el aumento de expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias sugiere, como ya se ha comentado, una activación del sistema

inflamatorio en respuesta a la enfermedad hepática. En el caso de los animales más viejos, podemos destacar que la expresión de IL-1 β es significativamente mayor lo que sugeriría mayor daño hepático posiblemente debido a una respuesta inflamatoria crónica. Por último, la equidad con la que TGF- β 1 se expresa en ambos grupos cirróticos destacando por encima de los grupos controles, indica que tienen un papel importante debido a su actividad antiinflamatoria y profibrótica, con la activación de células estrelladas hepáticas y la deposición de matriz extracelular.

Algunos estudios en humanos destacan que el papel de citocinas inflamatorias sensibles como IL-6 tiene variaciones muy grandes dependiendo de la etapa en la que se encuentre el desarrollo de la cirrosis (compensada o descompensada) e incluso diferencias entre las subetapas en la descompensación cirrótica. En el caso de IL-6, se demuestra su liberación por macrófagos tras la activación del receptor de tipo Toll y posterior respuesta aguda, siendo un predictor muy sensible de la descompensación y de la activación del sistema inmune.(Costa et al., 2021) Para dar mayor explicación a los resultados obtenidos, he de destacar que el modelo de inducción de cirrosis tiene un periodo de inducción de 12 semanas, con la intención de no llegar a un daño hepático irreversible sino a una fase de la cirrosis intermedia, lo que da sentido a que IL-6 no presente una elevada expresión.

Si el daño hepático persistiese se desencadenaría el desarrollo de cirrosis grave y se produciría un aumento de la hipertensión portal, alterando la arquitectura y función hepática. Algunos estudios demuestran que a medida que aumenta la gravedad de la hipertensión portal aumenta la inflamación en el hígado.(Caballería et al., 2018)

5.2 Daño hepático por desarrollo de fibrosis

Debido al daño hepático y a la producción masiva de citocinas y factores de crecimiento que intentan parar el daño como el TGF- β 1, se activan células estrelladas hepáticas. Sin embargo, al activarse se transforman en miofibroblastos que secretan colágeno y otros componentes de la matriz extracelular entre lo hepatocitos adyacentes, alterando el parénquima hepático. Este proceso viene regulado por las metaloproteinasas (MMP) y por inhibidores tisulares de las MMP (TIMP) que controla la producción y degradación de matriz. La MMP2 es un tipo de enzima que se encarga de degradar proteínas de la matriz depositadas en el parénquima hepático y así regular negativamente la fibrosis. Por otro lado, existen diferentes regulaciones de la degradación proteica mediada por TGF- β 1 que controla la sobreexpresión de TIMP1 y se encarga de inhibir la actividad proteolítica de MMP2 activada. (Daniela Senties-Gómez et al., 2005) En el caso de la fibrosis, se rompe este equilibrio y se genera más colágeno y matriz del que se degrada, acumulándose gran cantidad de tejido cicatricial.

En los resultados obtenidos se observa un aumento de la expresión de proteínas profibrogénicas (α SMA, COL1A1 y VIM) en los animales que padecen la enfermedad indicando una desregulación en la

cicatrización y deposición de tejido de forma crónica y descontrolada. Asimismo, en los animales envejecidos se observa mayor expresión de proteínas fibrogénicas, posiblemente, debido a un mayor deterioro de los mecanismos de reparación y degradación de proteínas ocasionando una formación descontrolada de matriz extracelular.

En el caso de los genes que codifican para MMP2 y TIMP1 se destaca su actividad interconectada. En los resultados se observa como la expresión de MMP2 es más alta en los ratones jóvenes cirróticos que en los viejos, mientras que la expresión de TIMP1 se ve significativamente más elevada en los animales cirróticos viejos, lo que apoyaría la idea de que en los animales más jóvenes existe una regulación de la fibrosis más controlada mientras que en los viejos, tal como se ha comentado, los mecanismos de inhibición de la fibrosis se verían alterados y disminuidos, produciéndose una sobreexpresión de los inhibidores de la actividad proteolítica, lo que explica mayor desarrollo de fibrosis en los animales viejos enfermos.

Adicionalmente, se sabe que la fibrosis hepática es el desencadenante de la evolución de NAFLD a cirrosis. Un estudio poblacional basado en el cribado de fibrosis hepática a través de un algoritmo demuestra una prevalencia muy alta de fibrosis relacionada con NAFLD en una población urbana europea, especialmente en el umbral de edad de 40-50 años y en menor medida en personas menores a ese rango. Lo cual apoyaría los resultados obtenidos durante nuestros experimentos en los que predomina un mayor daño en los ratones envejecidos. (Caballería et al., 2018)

5.3 Barrera intestinal y permeabilidad en la cirrosis

El efecto que tiene la cirrosis hepática en el intestino se debe a la estrecha relación entre ambos órganos en condiciones fisiológicas. Durante la cirrosis, por tanto, también se ve alterado el estado del intestino debido a la hipertensión portal, a las sustancias que no son metabolizadas por el hígado enfermo y al aumento de la tasa de traslocación bacteriana. Con los experimentos realizados, en este trabajo, comprobamos que los marcadores de integridad del epitelio intestinal (CLDN1, CLDN2 y ZO-1) se expresan más en los animales control y se reducen en los animales cirróticos, lo que confirma que la cirrosis es una enfermedad que afecta al intestino al perderse la integridad del epitelio intestinal. Además, se debe destacar que no se han observado grandes diferencias entre los animales jóvenes y viejos tanto en los controles como en la cirrosis, por lo que estos resultados sugerirían que el envejecimiento, al menos a las edades que se han estudiado, no es un factor que contribuya en gran medida al deterioro de la barrera intestinal mientras que la cirrosis sí afecta al intestino a pesar de ser en estadios tempranos.

El daño producido en la barrera intestinal contribuye, además, a una mayor adherencia de la flora bacteriana, así como, a una mayor traslocación bacteriana a los ganglios mesentéricos. Como ya se ha

comprobado en otros estudios (Muñoz Leticia & Albillos Agustín, 2008; Simbrunner et al., 2023b), a causa del aumento de permeabilidad, traslocación de bacterias y de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), se produce un aumento en el riesgo de sufrir infecciones en la cirrosis. A su vez las infecciones bacterianas contribuyen a la activación del sistema inmunitario originando una respuesta proinflamatoria durante la enfermedad que también contribuye a la fibrogénesis.

5.4 Comunicación Hígado-Intestino a través del mecanismo de biosíntesis de ácidos biliares

Los ácidos biliares son metabolitos derivados del catabolismo del colesterol que actúan como moléculas de señalización controlando el metabolismo de la glucosa y de los lípidos entre otras moléculas. La biosíntesis de ácidos biliares es un proceso que tiene lugar en los hepatocitos por medio de dos vías una clásica y otra alternativa. La vía clásica representa la mayor parte de la síntesis de ácidos biliares y está controlada por una enzima llamada CYP7A1, que es una enzima limitante de la tasa de colesterol 7 α -hidroxilasa. Recordando lo comentado en apartados anteriores, el FXR participa en la señalización de ácidos biliares al formar un heterodímero con el receptor X retinoico (RXR), su función es inhibir la actividad de CYP7A1, y así reducir la síntesis de ácidos biliares. Esta supresión puede llevarse a cabo por dos métodos: el primero ocurre en el hígado donde FXR directamente induce a SHP para inhibir a CYP7A1; el segundo se da en el intestino donde por el efecto de FXR elevan los niveles de FGF15 producidos por los enterocitos, y este mensajero viaja hasta los hepatocitos donde también reduce la expresión de CYP7A1 a través de su receptor FGFR4. (Shapiro et al., 2018)

Con los resultados obtenidos a nivel transcripcional, podemos entender indirectamente el nivel de comunicación entre el hígado y el intestino a través del mecanismo explicado. En primer lugar, el mayor indicador de que este mecanismo no está siendo bien regulado en estado de cirrosis, son la cantidad de ácidos biliares que hay en sangre en los animales enfermos, independientemente de la edad. Si analizamos los marcadores que participan en este mecanismo se ve como FXR, que es el desencadenante original del proceso, tiene alteraciones distintas entre los dos órganos. En el hígado, los animales jóvenes experimentan un aumento de su expresión en estado de cirrosis, pudiendo ser un efecto de regulación para contrarrestar el exceso de producción de ácidos biliares. Por otro lado, en los animales viejos FXR tiene también una alta expresión en los controles lo que podría ser indicativo de que el envejecimiento podría ser un factor importante para la desregulación del mecanismo y que en los animales sanos se intenta contrarrestar ese efecto mediante la sobreexpresión. En los animales viejos cirróticos, donde el daño podría considerarse el sumatorio de la edad y la cirrosis, el efecto es contrario, disminuyendo marcadamente su expresión, lo que contribuiría, en consecuencia, a una mayor acumulación de ácidos biliares (AB). Por otro lado, en el colon sí que hay un efecto de pérdida de función de FXR en animales viejos y jóvenes, dado que en los animales viejos se observa menor

diferencia en su actividad, se puede confirmar que tanto la enfermedad hepática como el envejecimiento son factores de deterioro del mecanismo en el intestino.

SHP es un heterodímero, miembro de la familia de receptores nucleares que al ser activado por FXR en el hígado interactúa con otros factores de transcripción inhibiendo su actividad y controlando la expresión de CYP7A1. En el caso de SHP se observa un deterioro de su expresión en los animales cirróticos, sobre todo en el hígado que es donde actúa, al igual que FGF15, que actúa en el colon y se ve disminuida su actividad. Ambos resultados son indicativos de una alteración del proceso metabólico de los ácidos biliares, además se ve un efecto en disminución de ambos marcadores en los animales cirróticos viejos.

Por último, se estudia la expresión de CYP7A1, en este caso en los animales enfermos aumenta mucho su expresión, esto se debe a que como en la enfermedad hepática disminuye la regulación negativa de la biosíntesis de ácidos biliares por la inactivación de la actividad de los factores que participan en este mecanismo, el sistema enzimático CYP7A1 se encarga de sintetizar ácidos biliares sin ninguna regulación. Además, en el caso de FGFR4, también se ve un aumento lo que confirma que al disminuir la producción del ligando (FGF15) en el intestino, se incrementa la expresión de FGFR4 para intentar equilibrar el proceso.

Con estos experimentos, se confirma el efecto que tiene la cirrosis en el eje hígado-intestino, a medida que avanza la enfermedad mecanismos moleculares como FXR-AB, entre otros donde participan receptores y factores nucleares, se ven afectados en ambos órganos, lo que supone un deterioro en el proceso de formación de la bilis y su acumulación en la sangre. (Medina et al., 2004)

6. Conclusiones y proyección futuras

6.1 Conclusiones

Tras el análisis de los resultados obtenidos durante la parte experimental descrita anteriormente se puede concluir lo siguiente:

- Existe un mayor daño hepático en animales envejecidos en el modelo experimental de cirrosis por CCl₄. En el caso del componente inflamatorio, independientemente de la edad, existe un aumento del reclutamiento leucocitario y de la expresión de diversas citocinas durante la progresión de la enfermedad. En el caso del componente profibrogénico, existe una mayor acumulación proteínas profibrogénicas en los hígados cirróticos, especialmente en los de los animales envejecidos debido a un desequilibrio en los mecanismos de degradación del colágeno.
- Durante la cirrosis por CCl₄ existe una desregulación de la integridad del epitelio intestinal. Hay una represión de las proteínas responsables de controlar la permeabilidad intestinal lo que podría contribuir agravando la inflamación en la enfermedad hepática debido a una mayor traslocación bacteriana. No hay diferencias entre los animales de diferente edad, por lo que el envejecimiento no supone un factor clave para el deterioro de la barrera intestinal a los estadios en los que se estudia este modelo.
- Existe una alteración aparente de mecanismo de comunicación hígado-intestino dependiente de FXR. Encontramos una represión en general de varios de los genes centrales de la vía, tanto en hígado como en intestino, que acompañan a un aumento de los niveles de ácidos biliares circulantes. Además, se destaca que la alteración tiende a ser mayor en animales envejecidos.

6.2 Proyección futura

El estudio actual ayuda a ahondar en la comprensión de la evolución de la cirrosis como patología sistémica y el efecto del envejecimiento en su progresión, brindándonos la oportunidad de investigar nuevas vías terapéuticas interesantes como las enzimas de reparación del tejido cicatricial que vemos desequilibradas durante la patología en edades avanzadas. Adicionalmente, y dado que la caracterización del componente inflamatorio ha sido muy simple, sería interesante estudiar con mayor precisión qué poblaciones leucocitarias son relevantes durante el daño hepático, así como la identificación de algunas que nos sirvan de biomarcadores específicos de daño durante el envejecimiento. Por otro lado, debido a la conexión estrecha en el eje hígado-intestino, se podrían emplear probióticos, con los cuales el laboratorio tiene experiencia, que pudiesen modular la permeabilidad intestinal y/o la microbiota durante la patología, y así, tener un impacto positivo en la progresión de cirrosis y de las infecciones ocasionadas por la traslocación bacteriana. El último enfoque

podría ser el de explorar como diana terapéutica durante la cirrosis, el mecanismo molecular de FXR, ya existen investigaciones sobre tratamientos basados en ligandos específicos del correceptor de FXR, RXR, que son capaces de modular la progresión de fibrosis en pacientes que padecen enfermedades enterohepáticas sin afecciones colestáticas.(Fiorucci et al., 2017)



7. Bibliografía

- Bruguera, M. (2014). Liver diseases in the elderly. *Gastroenterología y Hepatología*, 37(9), 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2014.04.005>
- Caballería, L., Pera, G., Arteaga, I., Rodríguez, L., Alumà, A., Morillas, R. M., de la Ossa, N., Díaz, A., Expósito, C., Miranda, D., Sánchez, C., Prats, R. M., Urquizu, M., Salgado, A., Alemany, M., Martínez, A., Majeed, I., Fabrellas, N., Graupera, I., ... Ginès, P. (2018). High Prevalence of Liver Fibrosis Among European Adults With Unknown Liver Disease: A Population-Based Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(7), 1138-1145.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.12.048>
- Caparrós, E., Juanola, O., Gómez-Hurtado, I., Puig-Kroger, A., Piñero, P., Zapater, P., Linares, R., Tarín, F., Martínez-López, S., Gracia-Sancho, J., González-Navajas, J. M., & Francés, R. (2020). Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contribute to Hepatic Antigen-Presenting Cell Function and Th17 Expansion in Cirrhosis. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051227>
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2018). Bile acid metabolism in liver pathobiology. In *Gene Expression* (Vol. 18, Issue 2, pp. 71–87). Cognizant Communication Corporation. <https://doi.org/10.3727/105221618X15156018385515>
- Costa, D., Simbrunner, B., Jachs, M., Hartl, L., Bauer, D., Paternostro, R., Schwabl, P., Scheiner, B., Stättermayer, A. F., Pinter, M., Trauner, M., Mandorfer, M., & Reiberger, T. (2021). Systemic inflammation increases across distinct stages of advanced chronic liver disease and correlates with decompensation and mortality. *Journal of Hepatology*, 74(4), 819–828. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.10.004>
- Crespo-Lessmann, A., Juárez-Rubio, C., & Plaza-Moral, V. (2010). Papel de los receptores toll-like en las enfermedades respiratorias. *Archivos de Bronconeumología*, 46(3), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.07.011>
- D'Amico, G., Garcia-Tsao, G., & Pagliaro, L. (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. In *Journal of Hepatology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 217–231). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.10.013>
- Daniela Senties-Gómez, M., Javier Gálvez-Gastélum, F., & Meza-García Juan Armendáriz-Borunda, E. (2005). *Fibrosis Hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF-β β β β β* (Vol. 141). www.anmm.org.mx
- Domínguez, M., Colmenero, J., & Bataller, R. (2009). Treatment of liver fibrosis. *Gastroenterología y Hepatología*, 32(9), 627–632. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.02.015>
- Fiorucci, S., Pellicciari, R., & Pruzanski, M. (2017). *Tratamiento de fibrosis usando ligando Fxr* (Patent 2 609 395).
- Gómez Ayala, A.-E. (2012). Cirrosis hepática. Actualización. *Farmacia Profesional*, 26(4), 45–51.
- Guilera Sardá, M. (2000). Cirrosis hepática compensada. *Medicina Integral*, 35(10), 450–454.
- Hastings, K. L., Green, M. D., Gao, B., Ganey, P. E., Roth, R. A., & Burleson, G. R. (2020). Beyond Metabolism: Role of the Immune System in Hepatic Toxicity. *International Journal of Toxicology*, 39(2), 151–164. <https://doi.org/10.1177/1091581819898399>
- Hunt, N. J., Kang, S. W. (Sophie), Lockwood, G. P., Le Couteur, D. G., & Cogger, V. C. (2019). Hallmarks of Aging in the Liver. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 17, pp. 1151–1161). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.021>
- J. Clària, & E. Titos. (2004). *La célula de Kupffer*. 27(4), 264–273.

- Lesmana, C. R. A., Raharjo, M., & Gani, R. A. (2020). Managing liver cirrhotic complications: Overview of esophageal and gastric varices. In *Clinical and Molecular Hepatology* (Vol. 26, Issue 4, pp. 444–460). Korean Association for the Study of the Liver. <https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0022>
- Maeso Díaz Raquel. (2020). *The hepatic sinusoid in aging*. Universidad de Barcelona.
- Martínez-López, S., Ángel-Gomis, E., Gómez-Hurtado, I., Fernández-Iglesias, A., Morante, J., Gracia-Sancho, J., Boix, P., Cubero, F. J., Zapater, P., Caparrós, E., & Francés, R. (2024). Cirrhosis-downregulated LSEctin can be retrieved by cytokines, shifts the TLR-induced LSECs secretome and correlates with the hepatic Th response. *Liver International*. <https://doi.org/10.1111/liv.15836>
- Medina, J. F., Bañales, J. M., & Medina, J. F. (2004). Mecanismos moleculares en la formación de la bilis. In *Gastroenterol Hepatol* (Vol. 27, Issue 5).
- Muñoz Leticia, & Albillos Agustín. (2008). *Implicaciones clínicas de la investigación básica*. 7(4).
- Parra-Medina, R., & Polo, J. F. (2017). Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Una mirada desde la patología quirúrgica. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 26(4), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.reper.2017.08.009>
- Schultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. In *Cells* (Vol. 9, Issue 8). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Shapiro, H., Kolodziejczyk, A. A., Halstuch, D., & Elinav, E. (2018). Bile acids in glucose metabolism in health and disease. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 215, Issue 2, pp. 383–396). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20171965>
- Simbrunner, B., Caparrós, E., Neuwirth, T., Schwabl, P., Königshofer, P., Bauer, D., Marculescu, R., Trauner, M., Scheiner, B., Stary, G., Mandorfer, M., Reiberger, T., & Francés, R. (2023a). Bacterial translocation occurs early in cirrhosis and triggers a selective inflammatory response. *Hepatology International*, 17(4), 1045–1056. <https://doi.org/10.1007/s12072-023-10496-y>
- Simbrunner, B., Caparrós, E., Neuwirth, T., Schwabl, P., Königshofer, P., Bauer, D., Marculescu, R., Trauner, M., Scheiner, B., Stary, G., Mandorfer, M., Reiberger, T., & Francés, R. (2023b). Bacterial translocation occurs early in cirrhosis and triggers a selective inflammatory response. *Hepatology International*, 17(4), 1045–1056. <https://doi.org/10.1007/s12072-023-10496-y>
- Sumeet K. Asrani, Harshad Devarbhavi, John Eaton, & Patrick S. Kamath. (2019, January). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 151–171.
- Tilg, H., Adolph, T. E., & Trauner, M. (2022). Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications. In *Cell Metabolism* (Vol. 34, Issue 11, pp. 1700–1718). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.09.017>
- Zhou, W. C., Zhang, Q. B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7312–7324. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7312>