

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía**

**Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales**



**Efecto Del Ejercicio Aeróbico En Modelos Murinos Con  
Hígado Graso No Alcohólico Inducido Con Sacarosa**

**TESIS**

Como requisito para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y ALIMENTOS  
MEDICINALES**

Presenta

**LN. Tania Daniela Salinas Garza**

Director de Tesis

**Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez**

**Dr. Giovanni Isaí Ramírez torres**

Culiacán, Sinaloa, México

Febrero 2021

# APROBACIÓN

## Titulo de la tesis

**Efecto Del Ejercicio Aeróbico En Modelos Murinos Con Hígado Graso No Alcohólico Inducido Con Sacarosa**

**Tania Daniela Salinas Garza**



---

Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez



---

Dr. Giovanni Isaí Ramírez Torres



---

Dr. Francisco Cabrera Chávez  
Miembro del Comité de Tesis



---

Dra. Mónica Lizzette Castro Acosta  
Miembro del Comité de Tesis



Firmado digitalmente por  
M.C. Dora Alicia Ochoa Acosta  
Fecha: 2020.12.07 09:13:20  
-07'00'

---

MC. Dora Alicia Ochoa Acosta  
Miembro del Comité de Tesis

# CESIÓN DE DERECHOS



Enero 2021

## **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

### *CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa el día 18 del mes Enero del año 2021, el (la) que suscribe el C. Tania Daniela Salinas Garza alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales con número de cuenta 17705010, de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez y Dr. Giovanni Isaí Ramírez Torres y cede los derechos del trabajo titulado "Efecto del ejercicio aeróbico en modelos murinos con hígado graso no alcohólico inducido con sacarosa", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

**Tania Daniela Salinas Garza**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía y al CONACyT por el financiamiento de la beca. Agradezco a la Dra. Marcela Vergara por la oportunidad que me brindó al elegirme como su tesista, le agradezco todo lo que me ha apoyado y enseñado durante este camino. Agradezco a todo el Equipo de investigación de la Dra. Marcela, quiénes fueron de mucha ayuda en el trabajo del laboratorio. Agradezco a la M.C. Melissa Vega por su apoyo incondicional en el trabajo experimental durante la contingencia y a Alexmy Vega porque durante mi ausencia en el *post parto* él me apoyó en continuar mi experimental hasta que tuve la oportunidad en regresar al terminar mi cuarentena. Le agradezco a mi codirector el Dr. Giovanni Ramírez por su apoyo con las asesorías y correcciones que me brindó. Gracias al equipo del Laboratorio #2 de la facultad encabezado por el Dr. Francisco Cabrera y sus estudiantes el M.C. Gilberto Aramburo y el Dr. Feliznando Cárdenas por los consejos y la ayuda que me brindaron en todo este proceso. También deseo agradecer al Dr. Edith Torres y Dr. Marcial de la Facultad de Biología por su apoyo en la elaboración de las laminillas de tejido hepático y al Dr. Ulises Osuna de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas por su apoyo en la interpretación de la histología de tejido hepático de los grupos experimentales.

A lo largo de esta trayectoria he sido muy bendecida, porque a pesar de los tiempos difíciles durante el proceso de mi formación pude salir adelante gracias a la ayuda que me brindaron. Me embaracé, tuve un bebé, apareció la contingencia del COVID-19 y al mismo tiempo me encontraba en medio de mi proyecto. Sucedieron cosas inesperadas, pero salí adelante con mucha ayuda. Y quiero agradecer primeramente a Dios por todas las oportunidades y bendiciones que me ha dado, porque le pedí sabiduría y Él me la concedió (*Santiago 1:5 NVI*). Mi esposo Elí Velarde, agradezco su gran paciencia y amor, por recordarme todos los días que aunque el trabajo es

duro, la recompensa es mayor. Sin él, no hubiera podido tener los ánimos para realizar todo el trabajo, siempre fue un buen consejero. Mi hijo Alesandro Velarde, porque me amó a pesar de los momentos de ausencia, aunque no comprendía que sucedía o porque me ausentaba, cuando nos volvíamos a encontrar siempre me recibía con mucho amor. También agradezco a mis suegros Elizabeth Moreno y Oscar Velarde, porque sin ellos, todo el trabajo que tenía por realizar, hubiese sido más duro. Ellos han sido de gran apoyo para mí, cuidando a mi hijo Alessandro con mucho amor, no tengo palabras para expresar la tranquilidad que mi corazón sentía cuando tenía que ausentarme sin preocuparme por nada, porque sabía que mi hijo estaba en excelentes manos. A mis padres, Miguel Salinas y Tania Garza que siempre me alentaron a continuar con mis estudios y perseguir mis sueños. Agradezco a mi Mamá, porque durante este año 2020 ha viajado desde Monterrey para ayudarme a cuidar a mi pequeño Alessandro, cuidándolo con mucho amor y esto me permitió continuar con mi trabajo en el laboratorio y en el escrito de la tesis.

Y por último pero no menos importante, a mis amigos. Mis compañeras y amigas de la maestría Ana Isabel, Marce Inzunza y Juliana Urías. Yo era nueva en la ciudad, no conocía a nadie, ellas me hicieron sentir bienvenida y muy querida. Les agradezco todos sus consejos y que siempre me acompañaron en todo este proceso, aunque fue difícil para todas, salimos adelante juntas. También agradezco a mis amistades de Monterrey, gracias a Denise Corpus y Caleb Salinas porque siempre me animaron a que yo podía lograr lo que me propusiera y podía dar más de lo que creía. Agradezco a mis amigas Aydé Guajardo, Keren Alemán, Vale Armenta y Diana Mellado por todo su apoyo incondicional y sus palabras de aliento. Y a mis amores, Fernanda Luna, Fernando Banda, Anahí Montelongo y Fernanda Ríos porque siempre estuvieron allí cuando los necesitaba y estar con ellos para mí siempre ha sido una bendición, gracias por siempre apoyarme en todo. ¡Los quiero mucho a todos!

## RESUMEN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) se caracteriza por una acumulación anormal de lípidos en los hepatocitos. El alto consumo de azúcar se asocia con la obesidad, diabetes y resistencia a la insulina. Estudios sugieren que el ejercicio aeróbico podría tener efectos positivos para mejorar HGNA debido a que el ejercicio induce al metabolismo oxidativo que promueven el suministro de combustible a los músculos, estimulando la captación y oxidación de la ácidos grasos. **Objetivo.** Evaluar el efecto del ejercicio aeróbico a 75%  $VO_{2max}$  sobre ratones de la cepa C57BL/6N con hígado graso no alcohólico inducido con una solución de sacarosa al 50%. **Metodología.** Al concluir las 20 semanas de inducción con sacarosa, aleatoriamente se escogieron los grupos para el tratamiento de ejercicio. Los grupos elegidos para realizar el tratamiento con ejercicio aeróbico se colocaron en una cinta rodante motorizada durante 8 semanas a una velocidad de 12 m/min, 60 minutos alcanzando el 75%  $VO_{2max}$ , 5 veces por semana. **Resultados.** En el peso corporal de la semana 20 a la 30 se encontraron diferencias estadísticamente significativa entre los grupos sacarosa sin ejercicio (17.28 [1.160-18.44] g) y sacarosa con ejercicio (13.16 [-12.97-0.1900] g)  $p < 0.01$ . Se encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles de glucosa en suero en el grupo sacarosa sin ejercicio en la semana 20 (160 [128-288] mg/dL) vs. 30 (137.8 [177.9-315.7] mg/dL)  $*p = 0.0218$ . También se encontró diferencia significativa entre el grupo control con ejercicio (a) (83.90 [120.7-204.6] mg/dL) vs. grupo control sin ejercicio (a) (173.5 [131.5-305.0] mg/dL)  $p = 0.0196$  y entre el grupo control con ejercicio (b) (83.90 [120.7-204.6] mg/dL) vs. grupo sacarosa sin ejercicio (b) (137.8 [177.9-315.7] mg/dL)  $p = 0.0297$ . Se encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles de colesterol total en suero en en el grupo control con ejercicio en la semana 20 (61.60 [133.1-194.7] mg/dL) vs. semana 30 (56 [103.7-159.7] mg/dL)  $*p = 0.0156$  y en el grupo sacarosa con ejercicio en la semana 20 (114 [141.3-255.6] mg/dL) vs. semana 30 (88.75 [112.8-201.6] mg/dL)  $*p = 0.0156$ . Se encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles

de colesterol-HDL en suero en el grupo sacarosa con ejercicio en la semana 20 (50.75 mg/dL  $\pm$  6.336) vs. la semana 30 (80.07mg/dL $\pm$  18.77) \*\* $p= 0.0050$  y en el grupo control sin ejercicio (48.63 mg/dL  $\pm$  9.494) vs. grupo sacarosa con ejercicio (80.07 mg/dL  $\pm$  18.77) \* $p=0.0174$ . Diferencias estadísticamente significativas en los triglicéridos hepáticos entre el grupo control con ejercicio (906.0 mg/g [29.49-935.5] g) vs. el grupo sacarosa sin ejercicio (1052 mg/g [611.9-1664])  $p=0.0044$ . Según el sistema de puntuación histológica de la red de investigación clínica de EHNA la puntuación en el grupo de sacarosa sin ejercicio fue el más alto de EHNA a comparación de los demás grupos. **Conclusión.** El ejercicio aeróbico previene los efectos del consumo de sacarosa, debido a que promueve el aumento en el gasto energético, mejora el metabolismo de las grasas y carbohidratos. Reflejando cambios positivos en el peso corporal, niveles de glucosa plasmática, perfil de lípidos, acumulación de triglicéridos hepáticos y en la disminución de esteatosis hepática.

# CONTENIDO

<b>APROBACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>CESIÓN DE DERECHOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>vi</b>
<b>CONTENIDO.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>REVISION DE LA LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
<b>Definición y patogénesis del hígado graso no alcohólico .....</b>	<b>2</b>
<b>Prevalencia .....</b>	<b>7</b>
<b>Factores de riesgo .....</b>	<b>8</b>
Factores ambientales.....	8
Factores genéticos.....	8
<b>Evaluación diagnóstica .....</b>	<b>10</b>
Diagnóstico no invasivo .....	11
Diagnóstico invasivo .....	12
<b>Patologías asociadas al hígado graso no alcohólico .....</b>	<b>13</b>
Asociación de Hígado graso no alcohólico y Obesidad .....	13
Asociación de Hígado graso no alcohólico y Resistencia a la insulina.....	14
Asociación de Hígado graso no alcohólico y Diabetes Mellitus Tipo 2.....	15
Asociación de Hígado graso no alcohólico y Síndrome metabólico .....	16
<b>Consumo de carbohidratos y su relación con el hígado graso.....</b>	<b>17</b>
<b>Tratamiento para el hígado graso no alcohólico .....</b>	<b>20</b>

Modificación del estilo de vida .....	20
Alimentos funcionales .....	21
Farmacoterapia .....	24
<b>Efecto del ejercicio aeróbico en el hígado graso no alcohólico.....</b>	<b>26</b>
Ejercicio aeróbico como tratamiento para HGNA .....	26
Volumen máximo de oxígeno.....	28
Posibles mecanismos implicados en el ejercicio .....	29
<b>Modelo murino cepa C57BL/6 para estudio del hígado graso no alcohólico.....</b>	<b>30</b>
Modelo subcepa C57BL/6N .....	31
<b><i>HIPÓTESIS</i> .....</b>	<b>32</b>
<b><i>OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS</i> .....</b>	<b>32</b>
General .....	32
Específicos .....	32
<b><i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....</b>	<b>33</b>
Diseño del experimento.....	33
Protocolo de ejercicio.....	34
Peso corporal y consumo de alimento. ....	36
Toma de muestras.....	36
<b><i>MEDICIONES DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, HORMONALES Y</i></b>	
<b><i>ENZIMÁTICOS</i>.....</b>	<b>37</b>
Colesterol Total .....	37
Lipoproteína de alta densidad (HDL).....	37
Triglicéridos.....	38
Glucosa .....	38
Insulina.....	39
<b><i>Cálculo de Evaluación del Modelo de Homeostasis de Resistencia a la insulina</i></b>	
<b><i>(HOMA-IR)</i> .....</b>	<b>39</b>

Enzima Alanina aminotransferasa (ALT) .....	40
Enzima Aspartato aminotransferasa (AST) .....	40
<b>ANALISIS DE TEJIDO HEPÁTICO .....</b>	<b>41</b>
<b>Histología .....</b>	<b>41</b>
Prueba histológica para determinar esteatosis .....	41
Análisis histopatológico de tejido hepático.....	43
Determinación de grado de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) .....	43
<b>Triglicéridos hepáticos .....</b>	<b>45</b>
<b>Diseño estadístico.....</b>	<b>46</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>Consumo de alimento.....</b>	<b>47</b>
<b>Consumo de bebida .....</b>	<b>49</b>
<b>Peso corporal por grupos durante la etapa de inducción.....</b>	<b>51</b>
<b>Peso corporal por grupos durante el tratamiento.....</b>	<b>52</b>
<b>Diferencia del peso corporal entre grupo .....</b>	<b>54</b>
<b>Niveles de Glucosa, Insulina y HOMA-IR .....</b>	<b>57</b>
Glucosa .....	57
Insulina y HOMA-RI .....	59
<b>Perfil de lípidos.....</b>	<b>61</b>
Colesterol total .....	61
Colesterol-HDL.....	63
Triglicéridos.....	64
<b>Aminotransferasas .....</b>	<b>67</b>
<b>Peso del hígado y triglicéridos hepáticos .....</b>	<b>69</b>
<b>Cambios histopatológicos del hígado .....</b>	<b>71</b>
<b>Grado de actividad .....</b>	<b>72</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>75</b>

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** La teoría de los dos impactos ..... 4

**Figura 2.** Protocolo de ejercicio ..... 35

**Figura 3.** Consumo de alimento durante las 30 semanas del experimental..... 48

**Figura 4.** Consumo de bebida (agua o sacarosa) durante las 30 semanas del experimental..... 50

**Figura 5.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el peso corporal por grupo experimental de la semana 0 a la 20. .... 51

**Figura 6.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el peso corporal por grupo experimental de la semana 20 a la semana 30. .... 52

**Figura 7.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el peso corporal entre los grupos experimentales. .... 54

**Figura 8.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de glucosa en suero. .... 57

**Figura 9.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de insulina en suero y el cálculo de HOMA-RI. .... 59

**Figura 10.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el nivel de colesterol total en suero..... 61

**Figura 11.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el nivel de colesterol-HDL en suero. .... 63

**Figura 12.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de triglicéridos en suero. .... 65

**Figura 13.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de alanina (A) y aspartato aminotransferasa ..... 67

**Figura 14.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de triglicéridos hepáticos y en el peso del hígado..... 69

**Figura 15.** Histología hepática..... 71

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros para la evaluación inicial de HGNA.....	10
<b>Tabla 2.</b> Componentes bioquímicos, clínicos y metabólicos del síndrome metabólico. .....	16
<b>Tabla 3.</b> Tratamiento farmacológico .....	25
<b>Tabla 4</b> Sistema de Puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre EHNA .....	44
<b>Tabla 5.</b> Resultados de grado de actividad EHNA.....	72

## INTRODUCCIÓN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es la terminología que abarca un amplio espectro de trastornos metabólicos caracterizados predominantemente por esteatosis hepática macrovesicular que ocurre en ausencia del consumo de alcohol en cantidades consideradas perjudiciales para el hígado. Esta enfermedad puede conducir a esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular. La acumulación hepática de grasa, principalmente en forma de triglicéridos, refleja un desequilibrio entre las vías de suministro de ácidos grasos y la eliminación de ácidos grasos del hígado. El alto consumo de carbohidratos promueve la conversión de carbohidrato a grasa por medio de la lipogénesis *de novo*. Los cambios en el estilo de vida como el ejercicio aeróbico se considera una estrategia importante para el tratamiento no farmacológico del HGNA.

En México, el hígado graso no alcohólico es la causa más frecuente de hepatopatía crónica. Actualmente es considerado un problema de Salud Pública reportándose un 17.1% de la población mexicana que padece esta enfermedad e incrementa conjuntamente con la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico. Entre los principales factores que desencadena el desarrollo de la enfermedad, se encuentran una dieta alta en carbohidratos simples como lo son la frutosa y sacarosa las cuales componen la dieta mexicana y el sedentarismo. Se han encontrado estudios los cuales prueban que el ejercicio aeróbico mejora esta enfermedad sin embargo no se ha descrito a la intensidad y el tiempo de ejercicio que potencian la mejor respuesta a esta enfermedad.

Por ello, es importante seguir realizando estudios experimentales en modelos animales para analizar el efecto del ejercicio aeróbico en el hígado graso no alcohólico y determinar las condiciones, tipo de ejercicio, el tiempo y duración que se debe cumplir para poder lograr una disminución de la esteatosis hepática, independientemente de la pérdida de peso y restricción calórica. Así, basados en

evidencias, puede resultar mucho más factible recomendar el ejercicio como una alternativa de tratamiento no farmacológico para prevenir, controlar y revertir la enfermedad de hígado graso.

## REVISION DE LA LITERATURA

### Definición y patogénesis del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA) se define como la acumulación de grasa en el hígado, comúnmente conocida como esteatosis (> 5 - 10% de los hepatocitos grasos) (Ordoñez *et al.*, 2015; Yki-Järvinen, 2014), que no se debe al consumo excesivo de alcohol (> 20 gr/día mujeres y >30 gr/día hombres) (Yki-Järvinen, 2014). El HGNA es la terminología utilizada para un amplio espectro de trastornos que van desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con presencia de inflamación y cambios en las características histológicas, en casos más graves progresa a fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Shamsoddini *et al.*, 2015; Ordoñez *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2014; De Jesús Acosta-Cota *et al.*, 2019).

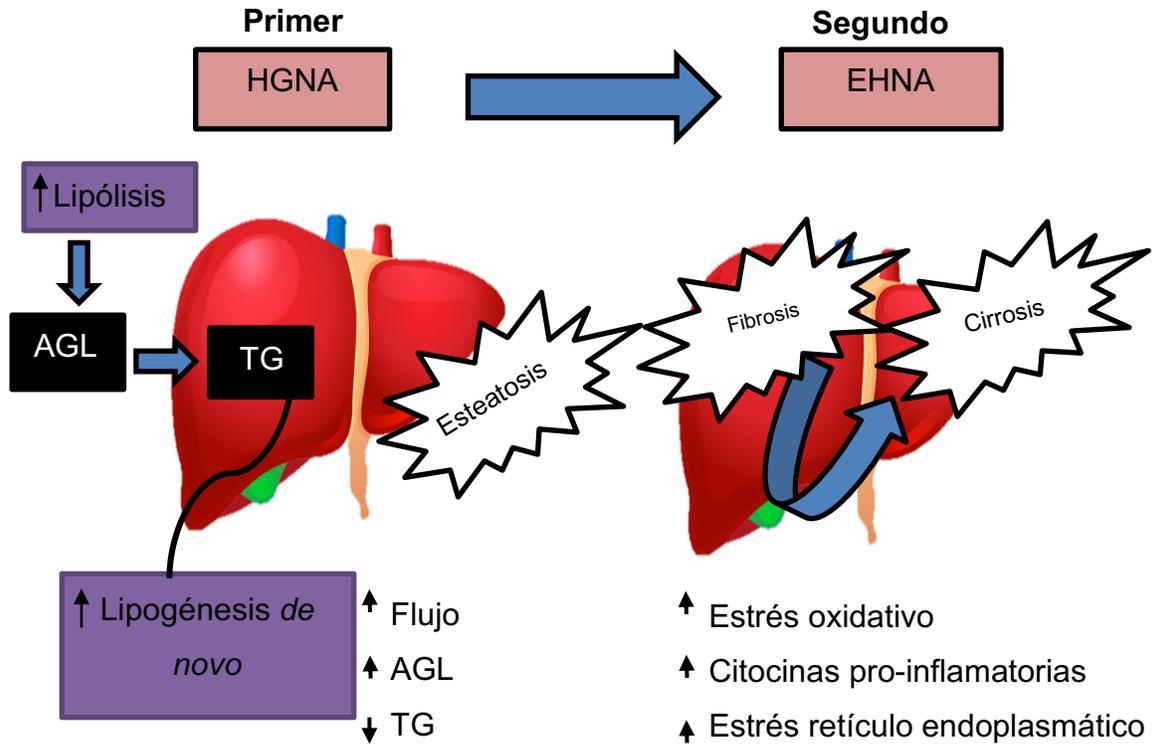
El HGNA es la manifestación hepática del síndrome metabólico, ya que esta enfermedad está relacionada con la presencia de diabetes, resistencia a la insulina, obesidad y alteración en el perfil lipídico (Ryu *et al.*, 2015; Fazel *et al.*, 2016; Cicero *et al.*, 2020; Romero-Gómez *et al.*, 2017; Croci *et al.*, 2019). Una de sus características es el almacenamiento de triaciglicerol (TAG) en los hepatocitos, el cuál se encuentra en forma de macro y micro vesículas lipídicas; como consecuencia el hígado sufre de un desequilibrio entre las vías de suministro y la eliminación de los ácidos grasos (Schultz *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2014). Esta enfermedad es asintomática y la mayoría de los pacientes reportan en ensayos bioquímicos las enzimas hepáticas elevadas como la alanina aminotransferasa (ALT) >55 UI/L y asparato aminotranferasa (AST) >34 UI/L (Yki-Järvinen, 2014; Carlino *et al.*, 2017), en otras ocasiones, se debe recurrir a pruebas de imagen para identificar su

presencia y existen ocasiones en que ambas formas de diagnóstico son utilizadas para confirmar la presencia de la enfermedad.

Para describir la patogénesis del HGNA, Day y James en 1998 (Day & James, 1998) formularon la teoría de los dos impactos que describe la patogénesis del hígado graso no alcohólico. En el primer impacto, debido a la resistencia a la insulina se produce un aumento de flujo de ácidos grasos libres en el cual dentro del hígado se esterifica con glicerol formando triglicéridos mediante la lipogénesis *de novo*, como consecuencia se acumulan los triglicéridos en el hígado y esto es conocido como esteatosis (Ordonez *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2017; Alwahsh & Gebhardt., 2017). La acumulación de los triglicéridos en los hepatocitos hace más vulnerable al hígado a eventos que constituyen el segundo impacto, donde se produce estrés oxidativo, aumento de citosinas pro-inflamatorias y estrés del retículo endoplasmático, dando como resultado daño hepatocelular, inflamación y fibrosis (**Figura 1**) (Ordonez *et al.*, 2015; Friedman *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2016).

La acumulación excesiva de los ácidos grasos libres se dirigen hacia la mitocondria de los hepatocitos para oxidarse mediante la  $\beta$ -oxidación promoviendo disfunción mitocondrial debido al déficit del mecanismo de la fosforilación oxidativa y producción de adenosín trifosfato (ATP) provocando lesión hepática (Oliveira *et al.*, 2016; Basaranoglu *et al.*, 2015) y sobreproducción de ROS (Especies Reactivas de oxígeno) como consecuencia aumenta el estrés oxidativo hepático (Oliveira *et al.*, 2016).

## “La Teoría de los Dos Impactos”



**Figura 1.** La teoría de los dos impactos

**La teoría de los dos impactos.** En 1998, Day & James formularon la teoría de los dos impactos que describe la patogénesis del hígado graso no alcohólico. *HGNA*: Hígado graso no alcohólico; *EHNA*: Esteatohepatitis no alcohólica; *AGL*: Ácidos grasos libres; *TG*: Triglicéridos; *VLDL*: Lipoproteínas de muy baja densidad.

Los carbohidratos, los lípidos y las proteínas de la dieta pueden usarse como sustratos para la lipogénesis *de novo*. Los carbohidratos consumidos como almidón (polímero de glucosa) o azúcar de mesa (sacarosa, un disacárido de glucosa-fructosa), se descomponen en seis monosacáridos de carbono, glucosa o fructosa, cuyo metabolismo converge en la producción de tres intermedios de carbono, el gliceraldehído-3 fosfato (GA3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Estos intermedios GAP y DHAP pueden ser metabolizados a piruvato el cual entra a las mitocondrias para ser utilizado para producción de energía convirtiéndose en acetil-CoA, para ser usado en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Softic *et al.*, 2016). Cuando hay abundantes reservas de energía el acetil-CoA se une al oxaloacetato para formar citrato y este se transporta de nuevo al citoplasma y se convierte en acetil-CoA por la enzima ATP citrato liasa (ACL) . El acetil-CoA se convierte en malonil-CoA por medio de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). El malonil-CoA se convierte en palmitato (16:0) por medio de la sintasa de ácidos grasos (FAS), es el primer producto de la síntesis de los ácidos grasos (Softic *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2016). El palmitato puede alargarse aún más a estearato o ácidos grasos más largos por la acción del alargamiento de los ácidos grasos de cadena muy larga (ELOVL6). La acción del estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1), convierte los ácidos grasos saturados en ácidos grasos monoinsaturados. La glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) agrega acil-CoA al fosfato de glicerol-3 (G3P) para formar ácido lisofosfatídico (LPA). La acción enzimática de la 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT) agrega el segundo acil-CoA para producir ácido fosfatídico (PA), que luego es desfosforilada por la lipina1 (LPIN1) para formar 1,2-diacilglicerol (DAG). La diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) convierte los diacilgliceroles en triglicéridos (TG), que pueden almacenarse en el hígado o ensamblarse en VLDL y exportarse para circular en la sangre (Softic *et al.*, 2016). Se ha reportado que el alto consumo de carbohidratos como la fructosa aumenta la lipogénesis *de novo* y las actividades de las enzimas lipogénicas (Alwahsh & Gebhardt., 2017).

Las grasas provenientes de la dieta suministran ácidos grasos libres o por la lipólisis de los triglicéridos almacenados en el hígado. Cuando son provenientes de la dieta se transportan en quilomicrones al tejido adiposo, donde se liberan los ácidos grasos por la acción de la lipoproteína lipasa, lo que permite su almacenamiento en los adipocitos. Los restos de quilomicrones son transportados al hígado para su metabolización. En los hepatocitos se reesterifican a triglicéridos y se exportan en VLDL (Softic *et al.*, 2016; Ordonez *et al.*, 2015).

Según diversos estudios, reportan que los ácidos grasos libres promueven lesiones hepáticas, obesidad y la resistencia a la insulina debido a un incremento en la captación de ácidos grasos libres en hígado, incremento de la lipogénesis *de novo*, una disminución en la  $\beta$ -oxidación hepática y una disminución en la liberación de ácidos grasos como VLDL (Ordonez *et al.*, 2015; Dongiovanni *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016). En el caso de las proteínas, se degradan a aminoácidos, algunos de los cuales pueden usarse para la gluconeogénesis y / o la cetogénesis (Softic *et al.*, 2016).

La lipogénesis *de novo* depende de la actividad y regulación de tres diferentes proteínas como: 1. El receptor hepático  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), 2. Proteína reguladora del elemento esteroide 1-c (SREBP-1c); y 3. Proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos (ChREBP), así como a tres enzimas claves: acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), ácido graso sintasa (FASN), y esteroil-coenzima A desaturasa 1 (SCD-1). Las alteraciones desfavorables en la expresión de estas proteínas se asocian con una mayor concentración de lípidos hepáticos por que inducen a la expresión de las enzimas lipogénicas que provocan una disminución a la  $\beta$ -oxidación y favorecen el almacenamiento de grasa en hígado (Ordonez *et al.*, 2015; Wooten *et al.*, 2016). Por lo mencionado anteriormente, las proteínas (LXR $\alpha$ , SREBP-1c y ChREBP) inducen la expresión de las enzimas lipogénicas (ACC1, FAS y SCD-1).

## Prevalencia

Actualmente, el HGNA es considerado la enfermedad hepática más prevalente en países industrializados, que afecta hasta al 30% de la población adulta y más del 65% de las personas obesas (Crocì *et al.*, 2019). En México se ha reportado una prevalencia del 17.1 % en población general asintomática (Delgado Cortés *et al.*, 2018; López-Velázquez *et al.*, 2014); sin embargo, un meta análisis realizado en el 2016 se observó la prevalencia mundial de 25.24% con los índices más altos en Medio Oriente y Sudamérica (Delgado Cortés *et al.*, 2018; Lonardo *et al.*, 2016).

En un estudio de cohorte de 2,503 expedientes de pacientes mexicanos se detectó una frecuencia de HGNA en 359 pacientes (14.3%), de los cuales 57 (15.87%) eran mujeres y 302 (84.12%) eran hombres. De los 359 pacientes, 13 (3.62%) pacientes presentaron diabetes mellitus y 49 (13.64%) hipertensión arterial sistémica. De estos expedientes clínicos se reportaron 131 (36.49%) pacientes con obesidad, hipercolesterolemia en 227 (63.23%) pacientes e hipertrigliceridemia en 157 (43.73%) pacientes (Lizardi-Cervera *et al.*, 2006). Otros estudios sugieren que, la prevalencia del HGNA aumenta con la edad, siendo más alta en el rango de 40 – 65 años (López-Velázquez *et al.*, 2014).

## **Factores de riesgo**

Actualmente algunos estudios han sugerido que la presencia de obesidad, diabetes y síndrome metabólico aumenta el riesgo de desarrollar HGNA (Augustin *et al.*, 2017; Martín-Domínguez *et al.*, 2013; Idilman *et al.*, 2016).

### **Factores ambientales**

Los factores ambientales son los que están relacionados al estilo de vida (Younossi *et al.*, 2018; López-Velázquez *et al.*, 2014; Montes & Arias, 2020) como el consumo excesivo de alimento ricos en grasas saturadas, colesterol y carbohidratos (Montes & Arias, 2020), la baja actividad física puede predisponer a los individuos a desarrollar HGNA (López-Velázquez *et al.*, 2014; Montes & Arias, 2020). El HGNA es conocido como la manifestación hepática del síndrome metabólico (López-Velázquez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018; Softic *et al.*, 2016), se asocia principalmente con factores de riesgo metabólicos como la obesidad, diabetes, hiperlipidemia, resistencia a la insulina (Lizardi-Cervera *et al.*, 2006; López-Velázquez *et al.*, 2014).

### **Factores genéticos**

El HGNA se trata de una enfermedad poligénica implicado en algunos genes involucrados en la lipogénesis, el cual está relacionado a la alteración del contenido lipídico en el hígado y su progresión a esteatohepatitis no alcohólica y/o fibrosis (Montes & Arias, 2020; López-Velázquez *et al.*, 2014). El polimorfismo en el gen PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene) es el gen más investigado con relación al HGNA, se encuentra implicado en la lipogénesis (esteatosis hepática), estado celular redox y la inflamación (Friedman *et al.*, 2018; Montes & Arias, 2020). La asociación entre el HGNA y el polimorfismo en el gen PNPLA3 (rs738409) se descubrió en un estudio de Romeo y colaboradores (Romeo *et al.*, 2008) donde se realizó una asociación genética (n=2,111), el cual midieron 9,222 variantes de ADN no sinónimo.

Además, este polimorfismo se asoció con el contenido de grasa en el hígado e inhibe la hidrólisis de triglicéridos, lo que resulta en depósitos de grasa en el hígado (Houghton-Rahrig *et al.*, 2019). El receptor 120 es otro gen relacionado a la progresión de HGNA a EHNA y está acoplado a la proteína G (*GPR120*) el cual induce la presencia de niveles patológicos de ALT, debido a una lesión hepática por el estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y sobreproducción de las citocinas proinflamatorias (Montes & Arias, 2020).

## Evaluación diagnóstica

Los pacientes con HGNA no suelen presentar síntomas y el diagnóstico se sospecha a partir del hallazgo casual de alteración hepática (Augustin *et al.*, 2017). La evaluación inicial de los pacientes en quienes se sospecha la presencia del HGNA, debe ser individualizada (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Parámetros para la evaluación inicial de HGNA.

	Parámetro	Referencia
Interrogatorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Consumo de alcohol &lt;20 gr/día mujeres y &lt;30 gr/día hombres.</li><li>• Historia personal y familiar: presencia de enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares.</li><li>• Infección por hepatitis B y/o hepatitis C.</li><li>• Ingesta de fármacos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Graffigna <i>et al.</i>, 2017.</li><li>• EASL &amp; EASD, 2016.</li></ul>
Examen físico	<ul style="list-style-type: none"><li>• Medición de peso y talla<sup>2</sup> para determinar el IMC</li><li>• Medición de circunferencia de cintura</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Graffigna <i>et al.</i>, 2017</li></ul>

---

Exámenes de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzimas hepáticas</li> <li>• Glucemia en ayuno, HBA1c, PTOG, insulina de ayuno, índice HOMA</li> <li>• Hemograma</li> <li>• Colesterol total, HDL, triglicéridos, ácido úrico</li> <li>• Ecografía hepática</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Graffigna <i>et al.</i>, 2017</li> <li>• EASL &amp; EASD, 2016</li> <li>• Stefan <i>et al.</i>, 2019</li> <li>• Augustin <i>et al.</i>, 2017</li> </ul>
-------------------------	---	--

---

### Diagnóstico no invasivo

Existen diversos métodos no invasivos para evaluar la presencia de esteatosis, necroinflamación y fibrosis.

1. **Pruebas de imagen:** Permiten la evaluación cualitativa y cuantitativa de la grasa hepática. Las más utilizadas son la Ecografía, Ultrasonografía, Tomografía Axial Computarizada (TC), Resonancia Magnética (RMN) y Espectroscopia por resonancia magnética de protones (ERM) (Martín-Dominguez *et al.*, 2013; Graffigna *et al.*, 2017; Stefan *et al.*, 2019).
2. **Índice de esteatosis hepática:** Modelos predictivos que combinan parámetros clínicos y de laboratorio para diagnosticar HGNA. Los más utilizados son *SteatoTest*, *Fatty Liver Index (FLI)*, *NAFLD Liver Fat Score*, *Lipid Accumulation Product (LAP)* y *Hepatic Steatosis Index (HSI)* (Graffigna *et al.*, 2017; Fazel *et al.*, 2016; Augustin *et al.*, 2017).

## Diagnóstico invasivo

- 3. Biopsia hepática:** Es el “**Gold Standard**” para el diagnóstico y predicción de la evolución a esteatohepatitis no alcohólica. Es un método invasivo debido al procedimiento en el que se debe someter originando una serie de complicaciones como dolor, sangrado intraperitoneal, hematoma, infección y posibles lesiones a otros órganos (Martín-Dominguez *et al.*, 2013; Graffigna *et al.*, 2017; Fazel *et al.*, 2016; Stefan *et al.*, 2019; Augustin *et al.*, 2017).

## **Patologías asociadas al hígado graso no alcohólico**

### **Asociación de Hígado graso no alcohólico y Obesidad**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como la acumulación excesiva de grasa que podría perjudicar la salud y se diagnostica considerando el  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$  (Blüher, 2019). Se asocia con trastornos metabólicos como la dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2, resistencia a la insulina, enfermedades cardiovasculares, cáncer e hígado graso no alcohólico (Jung & Choi, 2014; Blüher, 2019). La incidencia del HGNA aumenta en paralelo al aumento de la incidencia de la obesidad (Jung & Choi, 2014). El aumento de circunferencia de cintura y/o la relación cintura-cadera se han demostrado ser predictores de la presencia de HGNA (Liu & Mc Caughan, 2018).

En personas que viven con obesidad, el tejido adiposo muestra cambios como hipoxia, mayor infiltración de macrófagos, expresión de citocinas proinflamatorias y deficiencia de adiponectina el cual contribuye a la acumulación de grasa al hígado. Una disfunción del tejido adiposo desempeña un rol en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la resistencia a la insulina (Yki-Järvinen, 2014; Jung & Choi, 2014) debido a que el tejido adiposo inflamado es resistente a la insulina y como consecuencia aumenta el flujo de ácidos grasos no esterificados al hígado (Yki-Järvinen, 2014). Alterando también el metabolismo de la glucosa y lípidos con riesgo a contribuir al desarrollo del síndrome metabólico (Jung & Choi, 2014).

Un metanálisis confirmó que los indicadores serológicos en pacientes con obesidad e HGNA fueron significativamente más altos que los pacientes con HGNA sin obesidad (Lu *et al.*, 2018). Sookoian y Pirola, descubrieron mediante una revisión sistemática que las personas con obesidad y HGNA tenían un puntaje de fibrosis más alto y riesgo a EHNA que las personas con HGNA sin obesidad (Sookoian & Pirola, 2017). Por lo que se sugiere que la obesidad es un factor de riesgo que desarrolla hígado graso no alcohólico y que además puede agravar la enfermedad.

El exceso de los ácidos grasos producidos mediante la lipogénesis *de novo*, circulan en los tejidos periféricos, como el hígado y el tejido adiposo, donde se acumulan y resulta la resistencia a la insulina, debido a una mayor síntesis de lípidos y gluconeogénesis (Kitade *et al.*, 2017; Jung & Choi, 2014).

### **Asociación de Hígado graso no alcohólico y Resistencia a la insulina**

La resistencia a la insulina (RI) se define como baja sensibilidad a la insulina en el tejido y células, una respuesta deficiente a la insulina, menor absorción y utilización de glucosa en hígado (Sheng *et al.*, 2018). Es la incapacidad de los tejidos para responder a la acción de la insulina (Jung & Choi, 2014). El incremento de la insulina y glucosa circulante está asociado con la resistencia a la insulina hepática y esto involucra la estimulación de la lipogénesis *de novo* hepático (Smith *et al.*, 2020). La resistencia a la insulina tiene un papel importante en la fisiopatología de HGNA y su progresión, debido a las asociaciones entre HGNA y diabetes (Liu & Mc Caughan, 2018).

La insulina suprime la lipólisis del tejido adiposo, provocando un aumento del flujo de ácidos grasos e inhibe la  $\beta$ -oxidación y como consecuencia se acumula grasa en el hígado (Gaggini *et al.*, 2013; Ordonez *et al.*, 2015; Jung & Choi, 2014; Yang *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018; Kitade *et al.*, 2017). La hiperinsulinemia causada por la RI produce esteatosis por el exceso de los ácidos grasos provenientes de la lipogénesis *de novo* que circulan en el hígado y son acumulados, disminuye la oxidación de los ácidos grasos, disminuye la secreción hepática de VLDL (Kitade *et al.*, 2017; Yki-Järvinen, 2014; Jung & Choi, 2014; Sheng *et al.*, 2018).

## **Asociación de Hígado graso no alcohólico y Diabetes Mellitus Tipo 2**

La definición de diabetes mellitus tipo 2, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la incapacidad del cuerpo para utilizar de manera eficaz la insulina a consecuencia del exceso de peso o la baja actividad física (OMS, 2016). Las células  $\beta$  no pueden mantener la secreción de insulina, lo que lleva a la falla de células  $\beta$  y desarrollo de diabetes tipo 2 (Yki-Järvinen, 2014).

El hígado graso no alcohólico predispone a la diabetes mellitus tipo 2 al aumentar la cantidad de insulina para mantener la producción de glucosa hepática (Yki-Järvinen, 2014). En un estudio se reportó que la presencia de HGNA podría predecir la presencia de diabetes mellitus tipo 2, siendo un factor de riesgo para su desarrollo. El grupo uno con sobrepeso + HGNA tuvo una tasa significativa de incidencia de diabetes mellitus tipo 2, pero el grupo dos sin sobrepeso + HGNA, tuvo mayor riesgo a diabetes mellitus tipo 2 a comparación del grupo uno, es decir, la presencia de HGNA tiene mayor impacto en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 que el sobrepeso (Facuda *et al.*, 2016).

La asociación entre HGNA y diabetes mellitus tipo 2 está bien establecida y es debido a la presencia de la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, en consecuencia, hay una alteración en el metabolismo de los lípidos provocando una acumulación de triglicéridos en el hígado y una disfunción en las células  $\beta$  (Dai *et al.*, 2017).

## **Asociación de Hígado graso no alcohólico y Síndrome metabólico**

El síndrome metabólico comprende a un grupo de factores bioquímicos, clínicos y metabólicos que aumentan directamente el riesgo de enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y mortalidad en la edad adulta (Grundy, 2016; Yki-Järvinen, 2014). Se define como la presencia de obesidad y dos o más de los siguientes factores de riesgo: obesidad abdominal, glucosa alterada, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia y disminución del colesterol HDL (**Tabla 2**).

El síndrome metabólico y el hígado graso no alcohólico comparten mecanismos fisiopatológicos similares y pueden ocurrir en individuos no obesos (Yki-Järvinen, 2014; Yang *et al.*, 2016). Las personas con síndrome metabólico con frecuencia tienen un aumento en la acumulación de grasa hepática y resistencia a la insulina (Yki-Järvinen, 2014). El hígado es el sitio de alteración de la glucosa plasmática en ayunas y VLDL, ambas alteraciones pertenecen a los componentes claves para el desarrollo del síndrome metabólico. Estas alteraciones afectan al contenido de grasa hepática, reflejando el desequilibrio entre el flujo de ácidos grasos libres a través de la lipólisis, la oxidación de ácidos grasos, lipogénesis *de novo* y la secreción de VLDL (Yki-Järvinen, 2014; Gaggini *et al.*, 2013), desencadenando como consecuencia el hígado graso no alcohólico.

**Tabla 2.** Componentes bioquímicos, clínicos y metabólicos del síndrome metabólico.

<b>Obesidad abdominal</b>	<b>Circunferencia de cintura &gt;90 cm</b>
Glucosa alterada	Glucosa en ayuno >100 mg/dL
Hipertensión arterial	Sistólica >130 mmHg, Diastólica >85 mmHg
Hipertrigliceridemia	Triglicéridos >150 mg/dL
Colesterol HDL	< 40 mg/dL

## Consumo de carbohidratos y su relación con el hígado graso

Los malos hábitos alimenticios, en especial el alto consumo de carbohidratos simples como fructosa y sacarosa se asocia con el desarrollo de diversas complicaciones metabólicas como la obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo II (Schultz *et al.*, 2015; Softic *et al.*, 2019; Ordonez *et al.*, 2015). La fructosa es un monosacárido, se encuentra de forma natural en las frutas, algunas verduras y en la miel (Basaranoglu *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2018). La sacarosa es un disacárido compuesto de fructosa y glucosa, tiene efectos adversos en el perfil lipídico, en el desarrollo de obesidad e hiperglucemia. Es absorbida con facilidad y metabolizado por la enzima sacarasa obteniendo seis monosacáridos de carbono (fructosa y glucosa) (Schultz *et al.*, 2015; Plazas Guerrero *et al.*, 2019), cuyo metabolismo se dirige a la producción de tres intermedios de carbono, en el gliceraldehído-3 fosfato (GA3P) y fosfato dihidroxiacetona (DHAP); estos intermedios se dirigen para ser metabolizados a piruvato (Softic *et al.*, 2016). La glucosa es transportada por el GLUT-4 y la fructosa por el GLUT-5 a las células. La fructosa al ser metabolizada en el hígado estimula la actividad metabólica de la lipogénesis *de novo* (Plazas Guerrero *et al.*, 2019; Basaranoglu *et al.*, 2015). La ingesta de azúcares en la dieta aumenta niveles del malonyl-CoA hepático (intermediario en la lipogénesis *de novo*) y grasa hepática (Softic *et al.*, 2019; Chiu *et al.*, 2018). La lipogénesis *de novo* no solo afecta en la afluencia de grasa sino también en el flujo de salida, debido a una disminución de oxidación de grasas hepática por el aumento de las concentraciones de malonyl-CoA (Chiu *et al.*, 2018).

La fructosa tiene mayor dulzura a comparación de otros azúcares y se encuentra principalmente en los dos edulcorantes más utilizados en la industria alimentaria: la sacarosa y el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF), especialmente en las bebidas azucaradas (Jensen *et al.*, 2018; Alwahsh & Gebhardt, 2017; Basaranoglu *et al.*, 2015; Marjot *et al.*, 2020). Se recomienda limitar los azúcares agregados en la dieta a no más del 5-10% de las calorías diarias (Chiu *et al.*, 2018; Ordonez *et al.*, 2015).

Debido a que el consumo en exceso de fructosa y sacarosa está relacionado con la obesidad, acumulación de grasa visceral, dislipidemias, enfermedad cardiovascular, aumenta la producción de ROS y citosinas proinflamatorias, aumenta la síntesis hepática de triglicéridos y desarrolla el hígado graso no alcohólico (Ordóñez *et al.*, 2015; Romero-Gómez *et al.*, 2017; Dongiovanni *et al.*, 2016; Anstee & Goldin, 2006; Oliveira *et al.*, 2016; Basaranoglu *et al.*, 2015; Ferolla *et al.*, 2015; Schultz *et al.*, 2015; Softic *et al.*, 2016).

Plazas Guerrero y colaboradores han reportado que el consumo de azúcar aumenta la grasa intraabdominal y esto está asociado a diferentes mecanismos biológicos como:

- (i) La ingesta de bebidas azucaradas aumenta el consumo de calorías.
- (ii) Las bebidas azucaradas disminuyen la termogénesis aumentando el balance energético positivo promoviendo la acumulación de grasa en el tejido adiposo.
- (iii) La ingesta de bebidas azucaradas puede desarrollar también:
  - a. Resistencia a la insulina, promoviendo un aumento de peso corporal y circunferencia de cintura.
  - b. Afectar de manera negativa el equilibrio de producción de radicales libres y antioxidantes. Lo que podría haber mayor susceptibilidad a peroxidación lipídica.

Se ha utilizado el consumo de carbohidratos simples en diferentes combinaciones y cantidades en estudios con roedores para inducir hígado graso no alcohólico. En el estudio de Acosta-Cota y colaboradores (Acosta-Cota *et al.*, 2019) probaron si la ingesta del 50% de sacarosa permitía el desarrollo del hígado graso no alcohólico en ratas Wistar machos. Por lo que se determinó que la ingesta del 50% de sacarosa durante 20 semanas permite el desarrollo de HGNA con esteatosis micro/macrovesicular y fibrosis y esto se confirma en lo reportado en el estudio de Plazas Guerrero y colaboradores (Plazas Guerrero *et al.*, 2019), el cuál utilizaron ratas Wistar machos alimentados con una dieta enriquecida con sacarosa durante 25

semanas concluyendo que el consumo de sacarosa es un factor de riesgo que está asociado con el desarrollo de diabetes tipo II, aterosclerosis e hígado graso no alcohólico.

En el estudio de Schultz y colaboradores (Schultz *et al.*, 2015), mostraron que la ingesta de fructosa y sacarosa tienen efectos adversos en el organismo. Utilizaron 30 ratones machos de la cepa C57BL/6, durante 15 semanas fueron alimentados con dieta estándar, fructosa o sacarosa según en el grupo que correspondían. Los animales alimentados con fructosa y sacarosa mostraron hiperglucemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, niveles de adipocinas inflamatorias, baja adiponectina, alto nivel de colesterol total, triglicéridos y enzimas hepáticas y en el hígado se observó infiltración de grasa y necroinflamación comparado con el grupo alimentado con dieta estándar. Los hallazgos demostraron efectos adversos sobre el metabolismo de los carbohidratos, perfil inflamatorio y desequilibrio antioxidante y el desarrollo del HGNA.

En otro estudio reportado según Pompili y colaboradores (Pompili *et al.*, 2020), deseaban demostrar si los carbohidratos podían desencadenar degeneración hepática grave como las dietas altas en grasas que se utilizan comúnmente en los estudios. Para esto evaluaron la influencia a largo plazo de una dieta baja en grasa y alta en carbohidratos (LF-HCD) (azúcar 61.2 gr.) y una dieta alta en grasas (HFD). Utilizaron 25 ratones de la cepa C57BL/6 machos el cual fueron divididos en grupos LF-HCD y HFD. Concluyendo que el consumo de carbohidratos simples como el azúcar puede ser tan grave como el consumo alto en grasas. Destacando que la sustitución de grasas por carbohidratos no es una estrategia comercial adecuada para prevenir o mitigar la progresión del hígado graso no alcohólico.

## Tratamiento para el hígado graso no alcohólico

### Modificación del estilo de vida

Debido a que no se ha establecido un tratamiento definitivo para el HGNA, la intervención en el estilo de vida incluyendo la modificación de la dieta, suplementación y el ejercicio son los tratamientos más utilizados (Ordonez *et al.*, 2015; Delgado-Cortés *et al.*, 2018; EASL & EASD, 2016; Augustin *et al.*, 2017). Ya se ha establecido que el alto consumo de carbohidratos y grasas se han asociado con el desarrollo de HGNA, alterando funciones metabólicas. En general las recomendaciones dietéticas son las mismas que para el tratamiento con obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo II, el cual se requiere una pérdida de peso ayudando a reducir la cantidad de grasa hepática y atenuando la inflamación (Oliveira *et al.*, 2016; Delgado-Cortés *et al.*, 2018; Augustin *et al.*, 2017).

La dieta debe ser modificada y personalizada según el requerimiento nutricional de cada individuo. Las recomendaciones dietéticas para los pacientes con HGNA deben considerar una reducción de 600-800 kcal de ingesta diaria habitual o restricción calórica de 25-30 kcal/kg por día del peso corporal ideal (Brea *et al.*, 2017). La dieta debe contener carbohidratos (<45% ingesta total) como frutas, verduras, cereales grano entero y legumbres, proteína (20-25% ingesta total) proveniente del huevo, carnes magras, leguminosas y grasas (20-35% ingesta total) provenientes de alimentos ricos en ácidos grasos mono/poliinsaturados y ácidos grasos n-3 de cadena larga, la proporción de grasas saturadas no debe superar el 10% del contenido energético total de grasas (Oliveira *et al.*, 2016; Dongiovanni *et al.*, 2016).

## **Alimentos funcionales**

Las recomendaciones actuales alientan a el consumo de suplementos alimenticios como la vitamina E, polifenoles y carotenoides, que contienen componentes bioactivos con efectos beneficiosos debido a sus propiedades antiinflamatorias (Dongiovanni *et al.*, 2016). Los antioxidantes tienen efectos terapéuticos en el HGNA debido al rol que desempeña el estrés oxidativo en la enfermedad (Pillon Barcelos *et al.*, 2017).

### i. Vitaminas con actividad antioxidantes

La vitamina E es el nombre genérico de ocho isoformas lipofílicas: cuatro tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -Toc) y cuatro tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -T3) (Dongiovanni *et al.*, 2016). Estudios recientes muestran la actividad antioxidante de la vitamina E para tratar la HGNA (Eslamparast *et al.*, 2015), reduciendo la esteatosis, niveles séricos de ALT, inflamación, pero no la fibrosis (Ordonez *et al.*, 2015). El estrés oxidativo es uno de los mediadores principales del daño hepático y basándonos en la hipótesis de la patogénesis del "segundo impacto", es uno de los principales contribuyentes a la progresión de la esteatosis simple a la esteatohepatitis.

Una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede inducir la peroxidación de lípidos, lo que lleva a la inflamación y la fibrogénesis a través de la activación de las células estrelladas, aumentando el riesgo a desarrollar HGNA (Del Ben *et al.*, 2017). Dosis altas de vitamina E (800 UI/día) redujeron la necroinflamación hepática (Dongiovanni *et al.*, 2016).

En un estudio hecho con un modelo de ratones genéticamente obesos Lep *ob/ob* se suplementó durante 5 semanas con  $\alpha$ -tocoferol, disminuyó la peroxidación lipídica, la inflamación y el daño hepático. Además, la vitamina E inhibió la expresión del gen hepático TGF- $\beta$ 1 y protegió contra la fibrosis hepática en ratas (Dongiovanni *et al.*, 2016). La vitamina C es un antioxidante soluble en agua que actúa como eliminador de radicales libres (Del Ben *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016).

El estrés oxidativo es uno de los factores involucrados en la patogénesis de la HGNA, se considera que los agentes antioxidantes podrían ser beneficiosos en su tratamiento. Se ha considerado la vitamina C como una de las principales fuentes dietéticas de antioxidantes para tratar la HGNA (Eslamparast *et al.*, 2015). Se ha evidenciado que puede reducir los niveles de estrés oxidativo en HGNA al suplementar con vitamina C a ratas con intolerancia a la glucosa inducida por dexametasona, los animales mejoraron la sensibilidad a la insulina (Li *et al.*, 2016).

## ii. Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de fitoquímicos investigados principalmente por su papel potencial en la prevención, el tratamiento del estrés oxidativo y la inflamación. Se caracterizan por la presencia de al menos un anillo aromático en su estructura, unido a diferentes grupos químicos como grupos fenólicos, hidroxilo o carbono. Se pueden clasificar según su fuente, función biológica y estructura química. Los polifenoles generalmente se subdividen en flavonoides y no flavonoides dependiendo de su estructura química (Dongiovanni *et al.*, 2016; Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2016). Los flavonoides tienen una estructura básica común de quince carbonos (C6– C3– C6) con dos anillos de carbono aromático (anillos A y B) conectados por un puente de tres carbonos (anillo C) y los no flavonoides pueden subclasificarse en ácidos fenólicos y estilbenos. El ácido fenólico incluye ácidos hidroxibenzoicos (C6 – C1) y ácidos hidroxicinámicos (C6 – C3) (Rodriguez-Ramiro *et al.*, 2016). Los efectos de los polifenoles son beneficiosos en la prevención y el tratamiento de la esteatosis hepática (Aguirre *et al.*, 2014). Pueden controlar la lipogénesis de novo, inhibiendo la actividad de las enzimas lipogénicas (ACC, SREBP-1, FAS, LXR $\alpha$ ) y aumentando la actividad de las enzimas lipolíticas (AMPK, PPAR $\alpha$ , CPT-1) (Dongiovanni *et al.*, 2016).

El resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxistilbeno) es un estilbeno que se produce naturalmente en varias plantas y se proporciona en la dieta a través de diversos alimentos como uvas, bayas, vino tinto y nueces. Las pruebas han demostrado sus beneficios para la salud, como la mejora de la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, la reducción de los lípidos en suero y la supresión de la inflamación y el estrés oxidativo. Además, el resveratrol puede modificar el metabolismo de los lípidos y, más específicamente, inducir una reducción en el contenido de triglicéridos en el hígado. Estudios recientes en ratones alimentados con una dieta alta en grasas mostraron que el resveratrol protegía al hígado de la acumulación de grasa al activar Sirt1. Sirt1, una desacetilasa dependiente de NAD, estimula la actividad de FOXO1, que a su vez puede inhibir indirectamente la expresión de SREBP1, lo que sugiere que el eje AMPK / Sirt1 podría regular a la baja los genes de las vías lipogénicas (FAS, ACC) y regular los genes de vía lipolítica (PPAR $\alpha$ , CPT-1) (Dongiovanni *et al.*, 2016; Aguirre *et al.*, 2014; Eslamparast *et al.*, 2015; Ordonez *et al.*, 2015).

### iii. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos solubles en grasa que dan color amarillo, rojo y naranja a las frutas y verduras. Los carotenoides se pueden separar en carotenoides de provitamina A (p. Ej., B-caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina) y en no-provitamina A (licopeno, luteína y zeaxantina). Solo pueden ser sintetizados por plantas y microorganismos, por lo tanto, sus fuentes son principalmente de frutas y verduras. Estos compuestos juegan un papel importante sobre el estrés oxidativo y la inflamación. Los carotenoides pueden actuar como potentes antioxidantes y proteger las células contra el daño oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yilmaz *et al.*, 2015). Los carotenoides se acumulan principalmente en el hígado y se incorporan a las lipoproteínas para su liberación a la circulación. Los carotenoides ingeridos pueden participar en un sistema de defensa antioxidante cuando los radicales libres se encuentran presentes en el hígado en altas concentraciones, y estas funciones fisiológicas de los carotenoides podrían inhibir el desarrollo de la disfunción hepática (Ni *et al.*, 2016).

El  $\beta$ -caroteno tiene la mayor actividad de provitamina A porque se convierte en parte en vitamina A, tiene un fuerte efecto antioxidante al eliminar los radicales libres y extinguir físicamente el oxígeno singlete. Como potente antioxidante, el  $\beta$ -caroteno se ha estudiado como un agente protector potencial en NAFLD (Yilmaz *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2016). La astaxantina es otro carotenoide de xantofila que se encuentra en varios microorganismos y animales marinos, como el salmón, los cangrejos y los crustáceos. La astaxantina es conocida por su fuerte capacidad antioxidante. Es 100 a 500 veces más efectivo que la vitamina E para prevenir la peroxidación lipídica. Tiene efectos hepatoprotectores y puede proteger contra la inflamación, úlceras, cáncer, neurodegeneración, diabetes, ataques del sistema inmunitario y enfermedades cardiovasculares (Yilmaz *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2016). Se ha reportado que la astaxantina en la obesidad inducida por la dieta y la acumulación de triglicéridos hepáticos y la esteatosis en ratones, siendo efectiva como tratamiento para la disminución de la esteatosis (Ni *et al.*, 2016).

### **Farmacoterapia**

El tratamiento farmacológico debe estar indicado para EHNA en etapa temprana (fibrosis) y etapa progresiva (fibrosis y cirrosis). No se puede recomendar con certeza ningún medicamento en específico, debe ser indicado por el médico. La seguridad y tolerancia son requisitos esenciales para el tratamiento farmacológico, debido a las comorbilidades y la polifarmacia asociadas con EHNA (**Tabla 3**) (EASL & EASD, 2016).

**Tabla 3.** Tratamiento farmacológico

<b>Medicamento</b>	<b>Efectos</b>	<b>Referencias</b>
Agentes sensibilizadores de insulina	Metformina, Tiazolidinedionas	Mejora de la resistencia a la insulina, los niveles séricos de ALT y la histología hepática y mejora en la esteatosis hepática y la fibrosis.
Agentes Hipolipemiantes	Atorvastatina, Estatinas	Mejora de la inflamación hepática y reducción de la esteatosis hepática.
Inhibidor de TNF-a	Pentoxifilina	Reducción de esteatosis, inflamación y fibrosis.

## **Efecto del ejercicio aeróbico en el hígado graso no alcohólico**

La actividad física es definida como cualquier movimiento corporal generado por la contracción de los músculos esqueléticos que aumenta el gasto de energía por encima de la tasa metabólica. Se caracteriza por la modalidad, frecuencia, intensidad, duración, estructura y repeticiones. El ejercicio es una subcategoría de actividad física planificada, estructurada y repetitiva que favorece el mantenimiento o desarrollo de la condición física (Marjot *et al.*, 2020). Las recomendaciones canadienses y de la OMS de actividad física indican que los adultos 18-64 años deben acumular al menos 150 minutos de actividad física aeróbica de intensidad moderada por semana (Da Silva *et al.*, 2014; OMS, s.f.).

American Heart Association recomienda realizar 150 minutos – 300 minutos de actividad física de intensidad moderada por semana en adultos (Sullivan *et al.*, 2012). Y las recomendaciones del Departamento de Salud y Servicios Humanos, y el Departamento de Agricultura de EE. UU. Recomiendan 150 minutos de actividad física por semana (Kwak *et al.*, 2015).

### **Ejercicio aeróbico como tratamiento para HGNA**

El ejercicio aeróbico es bien reconocido por reducir la incidencia y mortalidad de diversas enfermedades crónicas como obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo II e HGNA (Ryu *et al.*, 2015). El ejercicio es un elemento muy importante para la prevención y tratamiento del HGNA (Ordóñez *et al.*, 2015; Kwak *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015), debido a que mejora la sensibilidad muscular de la insulina (Yki-Järvinen, 2014; Johnson & George, 2010), produciendo una mejora en la acción de la insulina, reduciendo la actividad de la lipogénesis de *ново* (Romero-Gómez *et al.*, 2017; Kwak *et al.*, 2015). El ejercicio mejora la histología hepática, debido a que reduce el contenido de grasa intrahepática, disminución al estrés oxidativo, inhibición de mediadores proinflamatorios y valores bioquímicos en los individuos con HGNA (Cho *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2017; Dongiovanni *et al.*, 2016).

Uno de los efectos positivos del ejercicio aeróbico es la utilización de grasas por el aumento de oxidación lipídica durante el entrenamiento (Marques *et al.*, 2010) y está relacionado con la activación/inactivación de algunas enzimas hepáticas que se asocian a la oxidación de ácidos grasos y formación de los triglicéridos (Cintra *et al.*, 2012; Pillon Barcelos *et al.*, 2017). Algunos ejemplos de ejercicio aeróbico de intensidad moderada a vigorosa es trotar, andar en bicicleta, nadar, esquiar y jugar con pelota, como fútbol o básquet (Johnson & George, 2010).

En diversos estudios han reportado que el ejercicio aeróbico *per se* reduce los lípidos hepáticos independientemente de la pérdida de peso corporal (Ordonez *et al.*, 2015; Dongiovanni *et al.*, 2016; Cintra *et al.*, 2012; Cuthbertson *et al.*, 2016; Jonhson & George, 2010; Whitsett & Vanwagner, 2015; Montesi *et al.*, 2014). En el estudio de Cintra y colaboradores (Cintra *et al.*, 2012), demostraron que el ejercicio en ratones machos suizos de 1 km/h, 5 veces a la semana, 50 minutos disminuyó la expresión de la proteína SREBP-1c y enzimas lipogénicas como FAS y SCD1. En otro estudio publicado por Cho y colaboradores (Cho *et al.*, 2014), indicaron que el ejercicio aeróbico en roedores a 10m/min con una inclinación de 5°, durante 55 min/día, 5 veces por semana, por 8 semanas, es eficaz para disminuir la acumulación de grasa hepática y sus complicaciones metabólicas.

Schultz y colaboradores (Schultz *et al.*, 2012), mostraron en ratones machos de la cepa C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasas que el ejercicio aerobico alcanzando 40-60% VO<sub>2</sub>max, 60 min/día durante 10 semanas, fue suficiente para disminuir masa corporal total, mejorar sensibilidad a la insulina e inactivación de genes lipogénicos. Alex y colaboradores (Alex *et al.*, 2015), utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 alimentados con una dieta deficiente en colina enriquecida con sacarosa (SECDD) durante 5 semanas. Al terminar la semana dos, colocó un grupo de ratones alimentados con SECDD en una cinta rodante motorizada. En la semana tres realizaron 14 m/min y en la semana cuatro y cinco realizaron a 16 m/min con una inclinación de 2°. Como resultado obtuvieron disminución de las vesículas de lípidos y triglicéridos hepáticos. Sugieren que la disminución de esteatosis por el ejercicio

probablemente se deba a la activación de vías de oxidación de combustible en el hígado.

En un estudio desarrollado por Yuan y colaboradores (Yuan *et al.*, 2013), sometieron a ratones de la cepa C57BL/6 a una cinta motorizada alcanzando 75% VO<sub>2</sub>max de ejercicio de intensidad alta, equivalente a 12 m/min, 60 minutos, 5 veces por semana durante 6 semanas en total. Como resultados observaron una disminución de grasa hepática, el cuál reportan que el ejercicio aeróbico a un 75% VO<sub>2</sub>max tiene un efecto sobre la resistencia a la insulina.

En el estudio de Zheng & Cai, realizaron 12 semanas de intervención con el ejercicio utilizando veinte ratones machos knockout ApoE el cual se dividieron aleatoriamente en dos grupos: grupo HFD (n = 10) alimentado con una dieta alta en grasas, grupo HFDE (n = 10) alimentado con una dieta alta en grasas con ejercicio y grupo control (n = 10). Como resultados obtuvieron que niveles de triglicéridos, colesterol total, LDL en el grupo HFD fueron significativamente más altos que en el grupo control, mientras que estos valores disminuyeron significativamente en el grupo HFDE en comparación con el grupo HFD. Los resultados de histología hepática confirmó el efecto del ejercicio sobre el cambio de la deposición de lípidos en el hígado. El ejercicio alivió los trastornos del metabolismo de los lípidos de resistencia a la insulina y HGNA (Zheng & Cai, 2019).

### **Volumen máximo de oxígeno**

Las actividades diarias como caminar, trotar, correr, nadar, limpiar la casa, subir escaleras, etc. Utilizan energía por el sistema oxidativo aeróbico, el cuál depende del oxígeno para producir energía. El 90% del oxígeno en el cuerpo se consume en las mitocondrias en la célula muscular. A medida que aumenta el consumo de ATP muscular, la demanda de oxígeno (O<sub>2</sub>) es proporcional. El músculo esquelético demanda oxígeno durante el ejercicio aeróbico esto es resultado del aumento de ventilación y absorción del oxígeno en la sangre, aumento de gasto cardíaco y una

extracción de O<sub>2</sub> por el músculo. La respiración es una función limitada, y el límite de la tasa máxima de oxígeno que se puede consumir para producir energía en el músculo se denomina volumen máximo de oxígeno (VO<sub>2</sub>max) (Wells *et al.*, 2009).

El VO<sub>2</sub>max es un parámetro indicador de la capacidad funcional de los individuos o de su potencia aeróbica. Es la cantidad máxima de O<sub>2</sub> que el organismo es capaz de absorber, transportar y consumir por unidad de tiempo. Se expresa como VO<sub>2</sub> (ml/min) por kg de masa corporal (ml/ min/ kg) (Kantartzis *et al.*, 2009).

La oxidación de la grasa de todo el cuerpo aumenta durante el ejercicio y se ha establecido que está relacionado con la duración e intensidad, el cuál se ha reportado en diferentes estudios que se logra la oxidación de grasa alcanzando un 50-70% VO<sub>2</sub>max en el ejercicio (Ordonez *et al.*, 2015; Jonhson & George, 2010; Oliveira *et al.*, 2016). Se ha establecido el VO<sub>2</sub>max como un predictor independiente de reducción de grasa hepática en individuos con HGNA (Ordonez *et al.*, 2015).

En un estudio de Schefer y Talan determinaron el consumo de oxígeno máximo en ratones machos C57BL/6J. El VO<sub>2</sub> se midió antes, durante y después del ejercicio por medio de calorimetría indirecta en cámaras metabólicas. Establecieron que una velocidad de carrera de 12m/min produjo un VO<sub>2</sub> equivalente al 76% (Schefer & Talan, 1996).

### **Posibles mecanismos implicados en el ejercicio**

Los mecanismos por los cuales el ejercicio disminuye la acumulación de grasa en el hígado aún no son muy claros. Sin embargo, en algunos estudios se ha reportado que el ejercicio activa las vías del metabolismo de los lípidos reguladas por AMPK en el hígado, suprime la acción de ACC, FAS y SREBP-1 lo cuál permite que mejore la acción de la enzima carnitina acil transferasa 1, mejorando la oxidación mitocondrial, el transporte de los ácidos grasos y promoviendo la β-oxidación (Zheng & Cai, 2019; Oliveira *et al.*, 2016; Berzigotti *et al.*, 2016; Hashida *et al.*, 2017).

## **Modelo murino cepa C57BL/6 para estudio del hígado graso no alcohólico**

Existen numerosos estudios que indican que, una dieta alta en calorías proveniente tanto de fructosa y como de grasa, influyen en el desarrollo de obesidad e HGNA. Algunos de esos estudios han evidenciado que, la utilización de diversos modelos animales, entre ellos los ratones de la cepa C57BL/6, alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa influyen de manera importante en la progresión de deposición de grasa hepática y fibrosis, observando que los ratones aumentaban de peso, de grasa corporal, desarrollaban resistencia a la insulina, así como esteatosis hepática (Lau *et al.*, 2017; Chyau *et al.*, 2020). Se ha sugerido que el consumo de fructosa juega un papel fundamental en el desarrollo y progresión del hígado graso no alcohólico. Un estudio desarrollado por Santhekadur y colaboradores (Santhekadur *et al.*, 2018), demostró que, cuando los ratones de la cepa C57BL/6 consumían una dieta alta en fructosa observaban mayor inflamación hepática, mayor estrés oxidativo y mayor fibrosis en comparación con los ratones que consumían una dieta alta en grasa.

Se ha reportado que los ratones de la cepa C57BL/6 son considerados como un modelo muy conveniente para estudiar el hígado graso, ya que su respuesta a la dieta que induce a su desarrollo es muy similar a la respuesta que presentan los humanos (Zhao *et al.*, 2019). Además, esa cepa de ratones son considerados como una herramienta valiosa para estudiar el síndrome metabólico, ya que este modelo tiene una tendencia genética a adquirir obesidad, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hígado graso no alcohólico y diabetes mellitus tipo 2 (Anstee & Goldin, 2006; Sanchez *et al.*, 2015; Van Herck *et al.*, 2017; Recena *et al.*, 2019; da Silva Filomeno *et al.*, 2020), acentuándose aún más todo el cuadro clínico cuando son inducidos mediante una dieta alta en grasa o carbohidratos, provocando resistencia a la insulina y esteatosis similar al humano (Sanchez *et al.*, 2015).

## **Modelo subcepa C57BL/6N**

El ratón de la cepa C57BL/6 es la cepa endogámica más utilizada en la investigación biomédica. Los ratones se crían y se distribuyen desde muchas instalaciones diferentes en todo el mundo, y por ello han surgido varias subcepas diferentes como la C57BL/6J y C57BL/6N. Las designaciones 6J y 6N en la nomenclatura de las subcepas C57BL/6 se refieren a que se derivan de colonias C57BL/6 del Laboratorio Jackson (6J) en 1948 y del Instituto Nacional de Salud (NIH) (6N) en 1951. Los modelos genéticos de ratones han enriquecido la información sobre nuestra comprensión de los mecanismos de las enfermedades. La subcepa C57BL6/N se está volviendo cada vez de mayor uso debido a que, grandes iniciativas como el International Knockout Mouse Consortium, los han considerado como modelos adecuados para el estudio de enfermedades humanas, estudios farmacológicos, así como para el desarrollo de fármacos (Kang *et al.*, 2019). Los ratones de la cepa C57BL/6N son más susceptibles a daño hepático en comparación con la cepa C57BL/6J determinado bioquímicamente mediante la medición de las actividades de ALT en suero; la lesión hepática inducida podría conducir a la identificación de factores de riesgo potenciales, no solo para la lesión hepática inducida por fármacos, sino también para la lesión hepática causada por otras patologías. El estrés oxidativo mitocondrial juega un papel patológico de lesión hepática en ambas subcepas, sin embargo, la mutación *Nnt* en ratones C57BL/6J codifica una forma inactiva de *Nnt* mitocondrial "C57BL/6J (*Nnt* -/-)" que normalmente cataliza la interconversión de NADH en NADPH, el cual tiene un papel antioxidante importante en la regeneración del glutatión reducido, por ello la cepa C57BL/6N (*Nnt* +/+) es más susceptible a daño hepático en comparación que el C57BL/6J (Bourdi *et al.*, 2011). Por otro lado también se ha reportado que los ratones de la cepa C57BL6/N tienden a subir de peso corporal con una dieta rica en grasas, de igual manera muestran una alteración en las pruebas de tolerancia a la glucosa, reflejando niveles altos de glucosa en plasma (Enríquez, 2019; Simon *et al.*, 2013). Por todo lo mencionado anteriormente, este modelo murino de la cepa C57BL/6N fue utilizado en este proyecto de investigación.

## **HIPÓTESIS**

Sesenta minutos de ejercicio aeróbico a 75%  $VO_2$ max 5 veces por semana durante 8 semanas reduce la esteatosis hepática inducida por sacarosa en ratones de la cepa C57BL/6N

## **OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS**

### **General**

Evaluar el efecto del ejercicio aeróbico a 75%  $VO_2$ max en el hígado graso no alcohólico inducido con sacarosa en ratones de la cepa C57BL/6N.

### **Específicos**

1. Generar el modelo murino con hígado graso no alcohólico inducido con una dieta alta sacarosa durante 20 semanas.
2. Desarrollar la intervención con ejercicio aeróbico al 75%  $VO_2$ max durante 8 semanas consecutivas con una frecuencia de 5 veces por semana.
3. Analizar el perfil de lípidos, glucosa, insulina, y enzimas alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en suero, y triglicéridos en hígado.
4. Analizar las concentraciones de triglicéridos en tejido hepático, y revisar mediante pruebas histológicas el efecto del ejercicio aeróbico en el tejido hepático.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del experimento

Para la realización de este estudio se utilizaron 40 ratones machos de la cepa C57BL/6N, los cuales se alojaron en una habitación a una temperatura controlada de 20 – 23° C, con control del ciclo de luz de día y noche de 12/12 h. El protocolo fue aprobado por un comité de ética de la Facultad de Ciencias Nutrición y Gastronomía (CE-UACNyG-2015-AGO-001).

El proyecto se desarrolló en dos etapas, la de inducción del hígado graso con una solución de sacarosa al 50% y la de intervención con ejercicio aeróbico. Para la primera etapa los ratones se dividieron en dos grupos: el grupo control (n=20) el cual se le alimentó con agua y dieta estándar *ad libitum* (contenido dieta estándar: proteína 23%, grasa 4.5%, fibra 6%, minerales añadidos 2.5%), y el grupo intervención (n=20), al que se le alimentó con una solución de sacarosa al 50% y dieta estándar *ad libitum*, durante 20 semanas, para inducir hígado graso no alcohólico.

Al concluir la inducción del hígado graso, se realizó la segunda etapa del proyecto en donde los animales fueron asignados para el tratamiento con el ejercicio aeróbico, los ratones del grupo control que consumieron agua y dieta estándar *ad libitum* se dividieron en dos grupos: 1) control con ejercicio aeróbico C+EA (n=10), 2) grupo control sin ejercicio aeróbico C-EA (n = 10), y el grupo que se le administraron una solución de sacarosa al 50% y dieta estándar se dividieron en dos grupos: 3) dieta sacarosa sin ejercicio aeróbico S-EA (n = 10) y 4) dieta sacarosa con ejercicio aeróbico S+EA (n = 10), teniendo en total cuatro grupos con diferentes intervenciones y tratamientos. Después de 8 semanas de intervención, los ratones fueron sacrificados mediante punción intracardíaca. Los sueros y tejido hepático fueron almacenados a -80°C para su posterior análisis.

## Protocolo de ejercicio

Los ratones de la cepa C57BL/6N de los grupos 1 y 4, correspondientes con ejercicio aeróbico se colocaron en una cinta rodante motorizada para roedores (PsymCon Modelo 35500, Lafayette Instrument, Lafayette, EE. UU.) Para el período de adaptación, los ratones realizaron 3 semanas de ejercicio con ajuste progresivo de tiempo y velocidad iniciando con 5 m/min en 10 minutos, progresando de 8 m/min en 12 minutos, 10 m/min en 20 minutos a 11 m/min en 25 min, alcanzando la velocidad deseada de 12 m/min en 30 minutos. Se continuó con la adaptación al ejercicio en la velocidad de 12 m/min progresando en el tiempo de 35, 45, 50 a 60 minutos. Una vez que los ratones fueron adaptados al ejercicio, se realizó la rutina establecida a 12m/min alcanzando el 75%  $VO_2$  por 60 minutos, 5 veces por semana durante 8 semanas en total (**Figura 2**). El protocolo del ejercicio está basado en el estudio de Yuan y colaboradores (Yuan *et al.*, 2013).

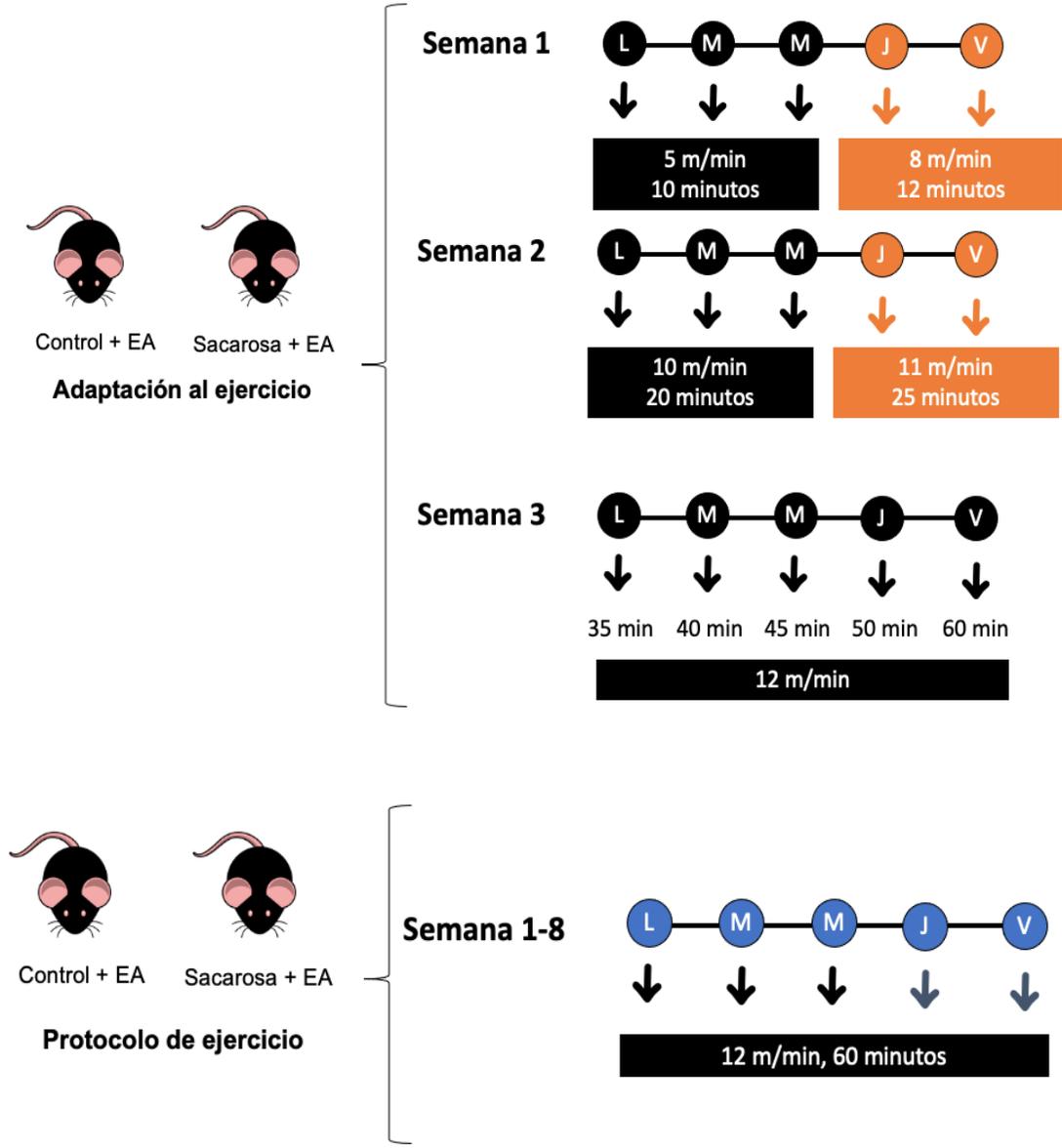


Figura 2. Protocolo de ejercicio

## **Peso corporal y consumo de alimento.**

Los ratones fueron pesados una vez por semana durante el período experimental hasta el día que fueron sacrificados utilizando una báscula adaptada para roedores (Sartorius Weighing balance). El consumo de alimento y bebida fueron registrados diariamente.

## **Toma de muestras**

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas en dos ocasiones distintas, la primera antes del tratamiento con el ejercicio por medio de una amputación en la cola y la segunda, al finalizar el tratamiento con el ejercicio por medio de la punción intracardíaca. En la semana 20, antes de iniciar el tratamiento se retiró el alimento y agua a los ratones para un ayuno de 12 horas, posteriormente se obtuvieron muestras sanguíneas por medio de la cola del ratón. El roedor fue suavemente sujetado y colocado en un tubo de centrifugación adaptado para que se mantuviera inmóvil y permitiera la respiración. Para aumentar el flujo sanguíneo de la cola fue calentada con una lámpara de calor. Después, la amputación fue realizada en la extremidad de la cola cortando aproximadamente 1.0 mm de longitud y se recolectaron las muestras en microtubos claros fabricados con polipropileno, para centrifuga. Las muestras de sangre, fueron centrifugadas para separar el suero y resguardarse en un ultracongelador a  $-80^{\circ}$  centígrados para su uso posterior. Transcurridas las 8 semanas de ejercicio físico, los ratones fueron anestesiados profundamente con pentobarbital en una dosis de 50 mg/kg de peso y posteriormente sacrificados mediante punción intracardiaca para obtener una muestra de sangre, misma que fue centrifugada y separada para obtener el suero, resguardarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

# **MEDICIONES DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, HORMONALES Y ENZIMÁTICOS**

## **Colesterol Total**

Para determinar colesterol total en suero se utilizó el método enzimático colorimétrico cuantificado por el espectrofotómetro. Se utilizó el kit de la marca RANDOX (ref CH201) para uso manual de acuerdo a las especificaciones establecidas por el fabricante. Se colocaron 10 µl de suero y 1000 µl de reactivo en un microtubo, se agitó suavemente y se dejó reposar 10 minutos a 20° centígrados. Pasado el tiempo el contenido se colocó en una cubeta con capacidad de 2 ml y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda 500 nm. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

## **Lipoproteína de alta densidad (HDL)**

Para determinar HDL en suero se utilizó el método enzimático colorimétrico cuantificado por un lector de placas. Se utilizó el kit de la marca RANDOX (ref: CH203) para uso manual de acuerdo a las especificaciones establecidas por el fabricante, con ligeras modificaciones. Para obtener el sobrenadante, se realizó el precipitado: en un microtubo se agregó 90.91 µl de precipitado (Reactivo I) y 36.36 µl de Reactivo CHOL para el estándar. Y para el suero en un microtubo se agregó 90.91 µl de precipitado (Reactivo I) y 36.36 µl de suero. Se mezcló, incubó 10 minutos y se centrifugó 2 minutos a 12 rpm. Al obtener el sobrenadante, se seleccionaron los pocillos de la microplaca para las diferentes determinaciones, en el pocillo del blanco se agregó 181.82 µl de Reactivo CHOL y 18.18 µl de agua destilada. Para el pocillo del estándar y los pocillos de los sueros se agregaron 181.82 µl de Reactivo CHOL y 18.18 µl del sobrenadante correspondiente. Se incubó 10 minutos, se colocó en el lector de placas, se agitó y por último se realizó la lectura a 500 nm.

## **Triglicéridos**

Para determinar los triglicéridos en suero se utilizó el método enzimático colorimétrico cuantificado por el espectrofotómetro. Se utilizó el kit de la marca RANDOX (ref: TR1697) para uso manual de acuerdo a las especificaciones establecidas por el fabricante. Se colocaron 10 µl de suero y 1000 µl de reactivo preparado (se transfirió el contenido de reactivo enzima R1b en el frasco amortiguador R1a) en un microtubo, se agitó suavemente y se dejó reposar 10 minutos a 20° centígrados. Pasado el tiempo el contenido se colocó en una cubeta con capacidad de 2 ml y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda 500 nm, posterior a calibrar el equipo con un blanco. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

## **Glucosa**

Para determinar glucosa en suero se utilizó el método enzimático colorimétrico cuantificado por el espectrofotómetro. Se utilizó el kit de la marca RANDOX (ref: GL2623) para uso manual de acuerdo a las especificaciones establecidas por el fabricante. Se colocaron 10 µl de suero y 1000 µl de reactivo en un microtubo, se agitó suavemente y se dejó reposar 10 minutos a 20° centígrados. Pasado el tiempo el contenido se colocó en una cubeta con capacidad de 2 ml y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda 500 nm, posterior a calibrar el equipo con un blanco y un estándar. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

## **Insulina**

Se realizó un inmunoensayo de ELISA tipo sándwich con el kit de ALPCO (ref: 80-INSHU-E01.1), siguiendo las especificaciones establecidas por el fabricante. La microplaca de 96 pocillos está recubierta con un anticuerpo monoclonal específico para insulina. Los estándares, controles y muestras se agregan a los pocillos de la microplaca con el conjugado. Posteriormente la microplaca se incuba a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 700-900 rpm. Una vez completada la primera incubación, los pocillos se lavan con tampón de lavado y se secan. Se agrega sustrato TMB, y la microplaca se incuba por segunda vez a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 700-900 rpm. Una vez que se completa la segunda incubación, se agrega la solución de parada y se mide la densidad óptica (OD) mediante un espectrofotómetro a 450 nm. La intensidad del color generado es directamente proporcional a la cantidad de insulina en la muestra.

## **Cálculo de Evaluación del Modelo de Homeostasis de Resistencia a la insulina (HOMA-IR)**

Para determinar la resistencia a la insulina se realizó la evaluación del HOMA-RI de acuerdo con la siguiente ecuación (Plazas Guerrero *et al.*, 2019):

$$\text{HOMA-RI} = [\text{glucemia ayuno (mg/dL)} \times \text{insulina en ayuno } (\mu\text{IU/mL}) / 405]$$

### **Enzima Alanina aminotransferasa (ALT)**

Para determinar ALT en suero se utilizó el método enzimático colorimétrico cuantificado por un lector de placas. Se utilizó el kit de la marca RANDOX (ref: AL1200) para uso manual de acuerdo a las especificaciones establecidas por el fabricante, con ligeras modificaciones. Se reconstituyó el vial R1b con 2 ml de R1a para obtener el reactivo preparado. Se pipetea en la microplaca 181.82  $\mu$ l del reactivo preparado y se pipetea 18.18  $\mu$ l de muestra. Posteriormente se agita y se realiza la lectura en el minuto 1, 2, 3 y 4 a 340 nm.

### **Enzima Aspartato aminotransferasa (AST)**

Para determinar AST en suero se utilizó el método enzimático colorimétrico cuantificado por un lector de placas. Se utilizó el kit de la marca RANDOX (ref: AS1202) para uso manual de acuerdo a las especificaciones establecidas por el fabricante, con ligeras modificaciones. Se reconstituyó el vial R1b con 2 ml de R1a para obtener el reactivo preparado. Se pipetea en la microplaca 181.82  $\mu$ l del reactivo preparado y se pipeteó 18.18  $\mu$ l de muestra. Posteriormente se agita y se realiza la lectura en el minuto 1, 2, 3 y 4 a 340 nm.

# ANALISIS DE TEJIDO HEPÁTICO

## Histología

Para la obtención del hígado se realizó un corte sagital separando piel y tejido muscular para extraer el tejido. El hígado fue dividido para ser almacenado una parte en tubo falcon con formaldehído al 10% para evaluar la esteatosis hepática y la otra parte fue almacenada en fresco a -80° centígrados para cuantificar triglicéridos hepáticos.

### Prueba histológica para determinar esteatosis

El hígado permaneció 72 h en formaldehído para su impregnación y fijación. Posteriormente se realizó la deshidratación, el tejido se colocó en un cassette de inclusión y en diferentes contenedores:

1. Alcohol 70% (1 h)
2. Alcohol 70% (1 h)
3. Alcohol 80% (1 h)
4. Alcohol 95% (1 h)
5. Alcohol absoluto (1 h)
6. Alcohol absoluto (1 h)
7. Xileno-Etanol 1:1 (1h)
8. Xileno puro (1 h)
9. Xileno puro (1 h)
10. Parafina (1h)
11. Parafina (1h)

Al concluir con la deshidratación, se continuó con la formación de bloques de parafina, fue realizado de la siguiente manera:

1. En un molde se colocó parafina e inmediatamente se agregó el tejido en el centro del molde.
2. Se colocó la parte del cassette rotulado encima del tejido con parafina y se agregó más parafina.

3. Se colocó con cuidado en una plancha fría para que se solidificara durante 15 minutos.
4. Una vez solidificado se separó del molde y se guardó el tejido para su posterior uso.

Para realizar el corte de los tejidos se colocaron los bloques de parafina en el congelador para posteriormente ser cortados utilizando un microtomo. El bloque de parafina se colocó en la faceta de la cuchilla y se la alineó entre la cara del bloque de parafina y el borde de la cuchilla, se realizó el corte de 7  $\mu\text{m}$ , se tomó con la mano la orilla del corte y con cuidado se colocó en porta objeto con etanol 50% entre el portaobjeto y el corte del tejido para permitir que se impregnara. Se colocó el tejido en el flotador (a 41-43°C con gelatina bacteriológica 1/2 cucharadita) y se recolectó con el portaobjeto los mejores cortes. Se dejó secar y se colocaron las laminillas en horno (10-15 min) a 65-70°C. Para realizar las tinciones con hematoxilina y eosina, se realizó primero un desparafinado.

Desparafinado:

1. Se colocaron los portaobjetos en xilol durante 5 min.
2. Se realizó baños de 20 inmersiones con xilol.
3. Se colocó el portaobjetos en etanol 100% (15-20 inmersiones).
4. Se realizó baños con etanol 95% (15-20 inmersiones).
5. Se agregó en agua (15-20 inmersiones).

Posteriormente se realizó la tinción con Hematoxilina-eosina:

1. Se tiñió con hematoxilina por durante 3 min.
2. Se lavó con agua destilada (15-20 inmersiones).
3. Alcohol ácido (1-2 inmersiones).
4. Se lavó con agua destilada nueva.
5. Se agregó bicarbonato de sodio al 0.1%.
6. Se lavó con agua destilada.
7. Se colocó en Etanol 96% (15-20 inmersiones).
8. Se tiñió con eosina (15-20 inmersiones).
9. Se colocó en etanol 96% (10 inmersiones)
10. Etanol 96% (10 inmersiones).

11. Etanol 100% (10 inmersiones).
12. Etanol 100% (10 inmersiones).
13. Xilol (10 inmersiones).
14. Xilol (15-20 inmersiones).
15. Se limpió el portaobjetos.
16. Se agregó entellan.
17. Y por último se cubrió con cubre objeto y se almanecó para analizarlo posteriormente al microscopio.

### **Análisis histopatológico de tejido hepático**

El análisis histopatológico del hígado se realizó mediante observación de 25 campos de cada una de las muestras de los grupos de experimentación teñidos con hematoxilina y eosina. Se presentarán en el apartado de resultados las imágenes más representativas de cada grupo experimental mostrando parénquima, vena central, triada porta para cada uno de ellos. Las imágenes fueron capturadas mediante el software Zeiss Zen Imaging blue edition (Carl Zeiss Gottingen, Alemania) a un aumento de 10X utilizando un microscopio ZEISS Primo Star LED (Carl Zeiss Gottingen, Alemania).

### **Determinación de grado de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)**

La determinación del grado de actividad de EHNA se realizó de acuerdo al sistema de puntuación histológica de la red de investigación clínica sobre EHNA (LaBrecque & UU, 2012) para lo cuál fue necesario determinar el porcentaje de esteatosis de la muestra, así como la presencia y cantidad de células balonadas e infiltrados inflamatorios presentes en 25 campos de cada una de las muestras de los grupos de experimentación teñidos con hematoxilina y eosina. Los criterios de análisis se presentan en la **Tabla 3**, los resultados se presentan como grado de actividad de EHNA de cada grupo experimental, el cual se obtuvo mediante la sumatoria de puntuación de esteatosis, inflamación lobular y balonamiento hepático.

**Tabla 4.** Sistema de Puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre EHNA

Grado de actividad de EHNA: grado = puntuación total: S + L + B (rango 0-8)					
Esteatosis	Puntuación S	Inflamación lobular	Puntuación L	Balonamiento hepatocítico	Puntuación B
<5%	0	No hay	0	No hay	0
5 a 33%	1	<2	1	Unas pocas células balonadas	1
34 a 66%	2	2-4	2	Muchas células balonadas	2
>66%	3	>4	3		

**Referencia Tabla:** LaBrecque *et al.*, 2012

## **Triglicéridos hepáticos**

La cuantificación de los triglicéridos hepáticos se realizó de acuerdo a la metodología de Zhou y colaboradores en un estudio (Zhou *et al.*, 2017) con ligeras modificaciones. Brevemente 0.15 g de hígado fueron pesados, picados y se realizó una extracción lipídica añadiendo 3 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v). La mezcla fue homogeneizada por 2 minutos, sonicada por 30 segundos y agitada por 2 horas. Posteriormente, se añadió 1 mL de agua bidestilada y las muestras fueron centrifugadas por 20 minutos a 3500 rpm. Al concluir la centrifugación, se separó la fase lipídica (fase del fondo) y se incubó durante 12 horas. Al pasar las 12 horas, los lípidos fueron disueltos con etanol absoluto. Finalmente los niveles de triglicéridos fueron medidos a través de un método enzimático colorimétrico con un kit comercial marca RANDOX (ref: TR1697). Los resultados se expresan como mg/g de hígado. Por lo que también se incluye el peso promedio del hígado de los grupos experimentales.

## **Diseño estadístico**

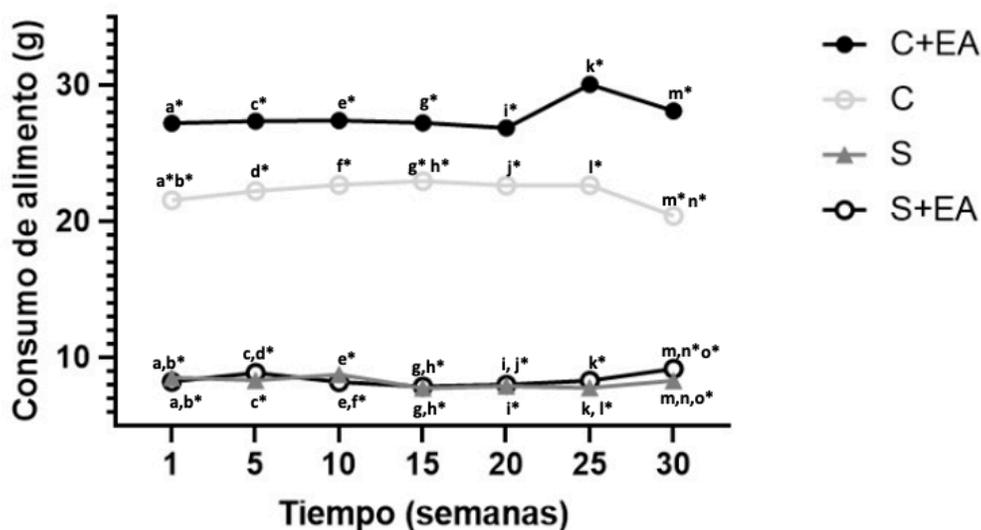
Los análisis estadísticos inferenciales y descriptivos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0. La normalidad de los datos fue determinada mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las variables numéricas se presentan como medias y desviación estándar, o como mediana y rango intercuartilico dependiendo de la normalidad de los datos. Las diferencias entre datos pareados (antes y después de un tratamiento) fueron determinadas mediante una prueba t de student para variables con distribución paramétrica o una prueba de Wilcoxon para variables con distribución no paramétrica. Para determinar las diferencias entre grupos se aplicó un ANOVA de una vía, con una prueba de Tukey para variables con distribución paramétrica, y una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba de Dunn para variables con una distribución no paramétrica. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Consumo de alimento

En la semana 1 del experimental se encontró en el grupo control con ejercicio (a\*) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control sin ejercicio ( $***p=0.0006$ ), grupo sacarosa sin ejercicio ( $****p<0.0001$ ) y grupo sacarosa con ejercicio ( $****p<0.0001$ ). Y también se encontró en el grupo control sin ejercicio (b\*) diferencias significativas contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $****p<0.0001$ ) y sacarosa con ejercicio ( $****p<0.0001$ ). En la semana 5 se encontró en el grupo control con ejercicio (c\*) diferencias significativas contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $***p=0.003$ ) y sacarosa con ejercicio ( $**p=0.0019$ ). En la misma semana se encontró también diferencias significativas en el grupo control sin ejercicio (d\*) contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $*p=0.0345$ ). En la semana 10 se encontró en el grupo control con ejercicio (e\*) diferencias significativas contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $**p=0.0030$ ) y el grupo sacarosa con ejercicio ( $****p<0.0001$ ). En la misma semana se encontró también diferencias significativas en el grupo control sin ejercicio (f\*) contra el grupo sacarosa con ejercicio ( $*p=0.0230$ ). En la semana 15 se encontró en el grupo control con ejercicio (g\*) diferencias significativas contra el grupo control sin ejercicio ( $****p<0.0001$ ), grupo sacarosa sin ejercicio ( $****p<0.0001$ ) y grupo sacarosa con ejercicio ( $****p<0.0001$ ). En la misma semana se encontró también diferencias significativas en el grupo control sin ejercicio (h\*) contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $****p<0.0001$ ) y grupo sacarosa con ejercicio ( $****p<0.0001$ ). En la semana 20 se encontró en el grupo control con ejercicio (i\*) diferencias significativas contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $****p<0.0001$ ) y grupo sacarosa con ejercicio ( $**p=0.0069$ ), también se encontró diferencias significativas con el grupo control sin ejercicio (j\*) contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $*p=0.0109$ ). En la semana 25 se encontró en el grupo control con ejercicio (k\*) diferencia significativa contra el grupo sacarosa sin ejercicio ( $**p=0.0014$ ) y sacarosa con ejercicio ( $***p=0.0006$ ), en la misma semana se encontró diferencias significativas en el grupo control sin ejercicio (l\*) contra el grupo sacarosa con ejercicio ( $*p=0.0420$ ) (**Figura 3**).

En la semana 30 se encontró en el grupo control con ejercicio (m\*) diferencia significativa contra el grupo control sin ejercicio (\*\*p=0.0009), grupo sacarosa sin ejercicio (\*\*\*\*p<0.0001) y grupo sacarosa con ejercicio (\*\*\*\*p<0.0001). En la misma semana se encontró también en el grupo control sin ejercicio (n\*) diferencias significativas contra el grupo sacarosa sin ejercicio (\*\*\*\*p<0.0001) y sacarosa con ejercicio (\*\*\*\*p<0.0001) y por último se encontró diferencias significativas en el grupo sacarosa sin ejercicio (o\*) contra el grupo sacarosa con ejercicio (\*\*\*\*p<0.0001) (Figura 3).



**Figura 3.** Consumo de alimento durante las 30 semanas del experimental.

Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el consumo de alimento por grupo experimental de la semana 1 a la 30. Las letras iguales minúscula en una misma semana muestran diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre los diferentes grupos.

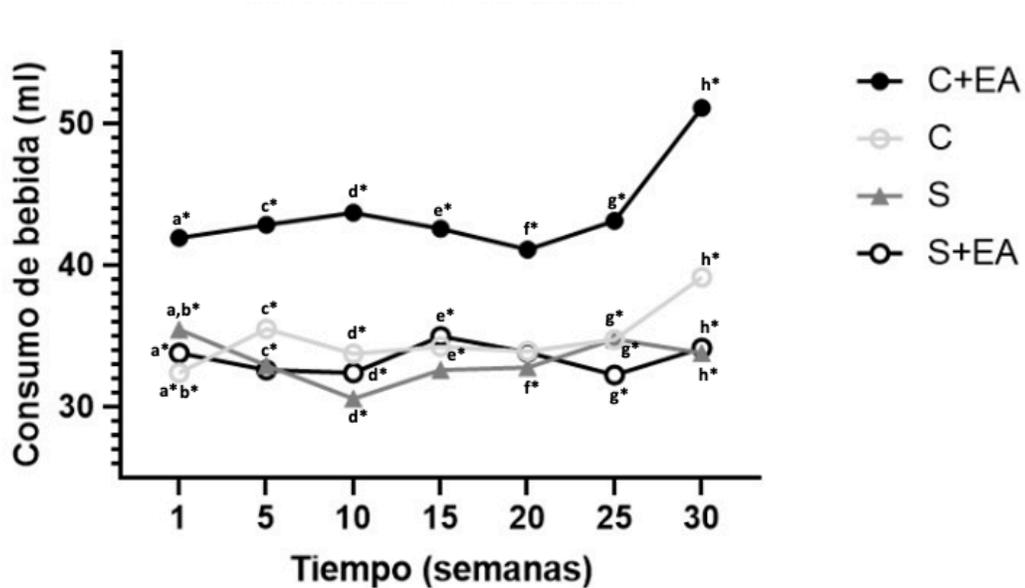
Similar a lo reportado en el estudio de Acosta-Cota y colaboradores (2019), determinaron que la ingesta de sacarosa durante 20 semanas disminuyó significativamente la ingesta de alimentos en comparación con su respectivo grupo de control (Acosta-Cota *et al.*, 2019).

El consumo de bebidas con alto contenido de sacarosa (50%) reduce significativamente el apetito y aumenta la saciedad (Kilpatrick *et al.*, 2014), lo que lleva a una disminución en la ingestión de otras fuentes nutricionales que se encuentran en los alimentos sólidos.

### Consumo de bebida

En la semana 1 del experimental se encontró en el grupo control con ejercicio (a\*) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control sin ejercicio (\*\* $p=0.0038$ ), grupo sacarosa sin ejercicio (\*\*\*\* $p<0.0001$ ) y grupo sacarosa con ejercicio (\*\*\*\* $p<0.0001$ ), en la misma semana se encontró también diferencias significativas en el grupo control sin ejercicio (b\*) contra el grupo sacarosa sin ejercicio (\* $p=0.0259$ ). En la semana 5 se encontró en el grupo control con ejercicio (c\*) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control sin ejercicio (\* $p=0.0121$ ) y grupo sacarosa sin ejercicio (\*\* $p=0.0062$ ). En la semana 10 se encontró en el grupo control con ejercicio (d\*) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control sin ejercicio (\*\* $p=0.0049$ ), grupo sacarosa sin ejercicio (\*\* $p=0.0055$ ) y grupo sacarosa con ejercicio (\* $p=0.0230$ ). En la semana 15 se encontró en el grupo control con ejercicio (e\*) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control sin ejercicio (\* $p=0.0275$ ) y grupo sacarosa sin ejercicio (\* $p=0.0195$ ). En la semana 20 se encontró en el grupo control con ejercicio (f\*) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo sacarosa sin ejercicio (\*\*\* $p=0.0010$ ). En la semana 25 se encontró en el grupo control con ejercicio (g\*) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control sin ejercicio (\*\*\* $p<0.0001$ ), grupo sacarosa sin ejercicio (\*\*\* $p=0.0008$ ) y grupo sacarosa con ejercicio (\*\*\* $p<0.0001$ ) (**Figura 4**).

Y por último, en la semana 30 se encontró en el grupo control con ejercicio ( $h^*$ ) diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control sin ejercicio ( $*p=0.0418$ ), grupo sacarosa sin ejercicio ( $*p=0.0329$ ) y grupo sacarosa con ejercicio ( $**p=0.0019$ ) (**Figura 4**).



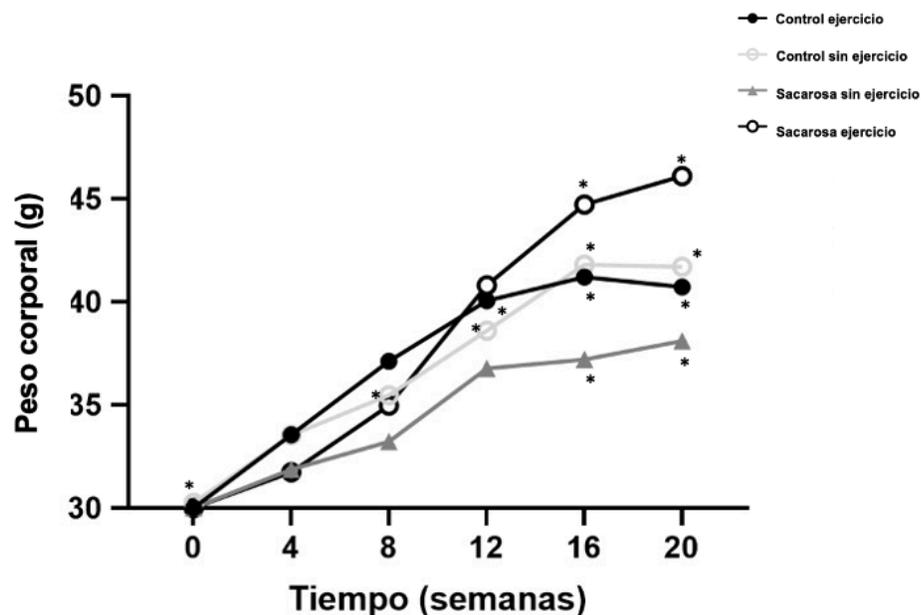
**Figura 4.** Consumo de bebida (agua o sacarosa) durante las 30 semanas del experimental

Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el consumo de bebidas por grupo experimental de la semana 1 a la 30. Las letras iguales minúscula en una misma semana muestran diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre los diferentes grupos.

Una posible explicación de porque el grupo control con ejercicio bebía más agua podría ser para prevenir la deshidratación por el ejercicio y por el alto consumo de alimento sólidos a comparación de los otros grupos (**Figura 3**), se necesitarían más estudios para explicar este resultado.

## Peso corporal por grupos durante la etapa de inducción

En la semana 0 antes de la inducción al HGNA el grupo control con ejercicio inició con un peso promedio de 29.92 g, control sin ejercicio 30.27 g, sacarosa sin ejercicio 29.61 g y sacarosa con ejercicio 28.90 g, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con los pesos iniciales ( $p>0.05$ ). En el grupo control con ejercicio se encontró un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal en la semana 0 y 12 (\*\* $p=0.0091$ ), semana 0 y 16 (\*\* $p=0.0003$ ) y semana 0 y 30 (\*\* $p=0.0010$ ). En el grupo control sin ejercicio se encontró un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal semana 0 y 8 (\* $p=0.0336$ ), semana 0 y 12 (\* $p=0.0440$ ), semana 0 y 16 (\*\* $p=0.0005$ ), semana 0 y 20 (\*\* $p=0.0035$ ). En el grupo sacarosa sin ejercicio se encontró un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal en la semana 0 y 16 (\*\* $p=0.0053$ ), semana 0 y 20 (\*\* $p=0.0003$ ). Y en el grupo sacarosa con ejercicio se encontró un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal en la semana 0 y 16 (\*\* $p=0.0053$ ), semana 0 y 20 (\*\* $p=0.0001$ ) (Figura 5).

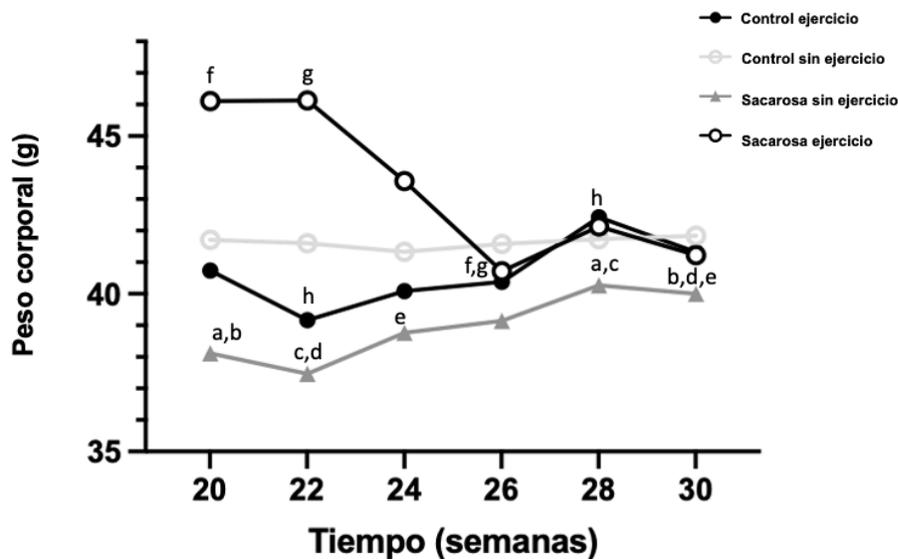


**Figura 5.** Efecto del consumo de sacarosa en el peso corporal por grupo experimental de la semana 0 a la 20.

Efecto del consumo de sacarosa en el peso corporal por grupo experimental de la semana 0 a la semana 20. Los asteriscos (\*) muestran diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre las diferentes semanas por grupo comparado con la semana 0.

## Peso corporal por grupos durante el tratamiento

En el grupo sacarosa sin ejercicio se encontró un aumento estadísticamente significativo en el peso corporal entre la semana 20 y 28 (a)(\* $p=0.0405$ ), semana 20 y 30 (b) (\*\* $p=0.0091$ ), semana 22 y 28 (c)(\*\* $p=0.0031$ ), semana 22 y 30 (d)(\*\*\* $p=0.0005$ ) y en la semana 24 y 30 (e)(\* $p=0.0405$ ). Y en el grupo sacarosa con ejercicio se encontró una disminución estadísticamente significativa en el peso corporal entre la semana 20 y 26 (f)(\* $p=0.0405$ ) y entre la semana 22 y 26 (g)(\* $p=0.0405$ ). Por otro lado, también se encontró significancia estadística en el peso corporal del grupo control con ejercicio entre la semana 22 y la 28 (h)(\*\* $p=0.0053$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el peso corporal por grupo experimental de la semana 20 a la semana 30.

Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el peso corporal por grupo experimental de la semana 20 a la semana 30. Las letras iguales minúscula en un mismo grupo muestran diferencia significativa ( $p<0.05$ ) entre las diferentes semanas.

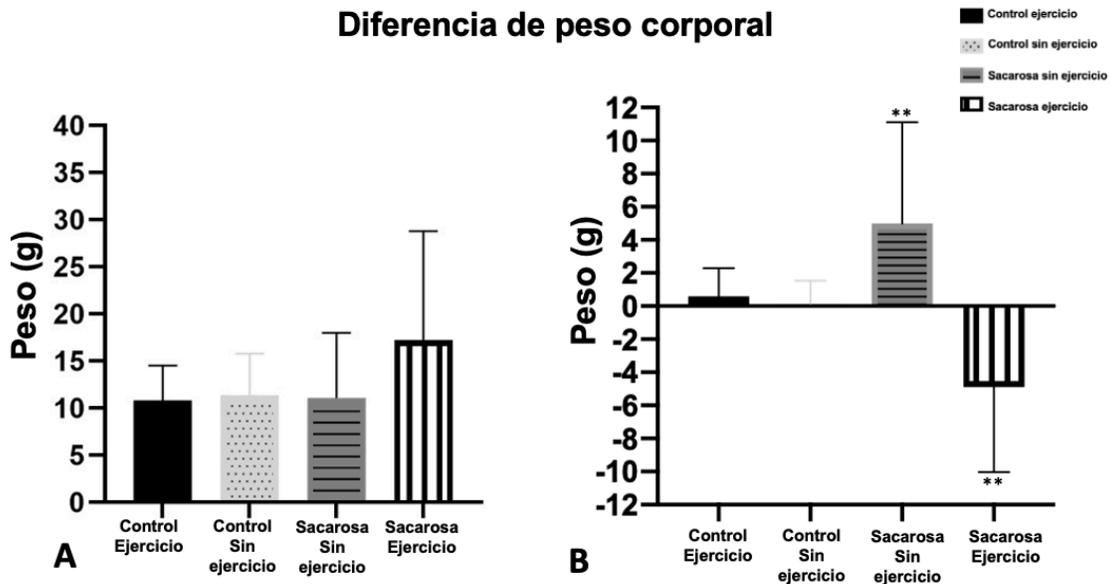
El aumento de peso del grupo control con ejercicio podría ser porque el consumo de alimento fue mayor durante el tratamiento con el ejercicio y además en este grupo no se observó grasa abdominal ni acumulación de grasa hepática al momento del sacrificio. Se necesitarían más estudios para comprobar si el aumento de peso podría ser derivado del aumento de la masa muscular ya que no hay evidencia científica actual que lo indique claramente.

Esto es consistente con investigaciones que indican que los ratones que realizan ejercicio y a pesar de consumir dieta alta en grasas, mantendrían un peso corporal más bajo que los ratones sedentarios como en el estudio de Marques y colaboradores (Marques *et al.*, 2010), intervinieron con ratones de la cepa C57BL/6 para evaluar los efectos del entrenamiento físico sobre la enfermedad del hígado graso no alcohólico en ratones. Se dividieron en dos grupos durante ocho semanas: grupo estándar y grupo con dieta alta en grasa. En este estudio concluyeron que el ejercicio permitió la disminución de peso corporal disminuyendo los efectos nocivos de una dieta alta en grasa. En el estudio de Harris y colaboradores (Harris *et al.*, 2016), determinaron el efecto del ejercicio en la prevención de la esteatosis hepática y la expresión de genes lipogénicos, utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 alimentados con una dieta 60% provenientes de grasa durante 10 semanas. Después del aumento de peso, se asignó aleatoriamente a los ratones a una dieta al 10% de grasas con ejercicio o sin ejercicio para inducir la pérdida de peso durante 8 semanas. Concluyeron que el ejercicio contrarrestó algunos de los efectos nocivos del aumento del peso corporal en el desarrollo de HGNA. En el estudio de Yuan y colaboradores (Yuan *et al.*, 2013), intervinieron con dieciocho ratones de la cepa C57BL/6 se dividieron en dos grupos: 6 ratones alimentados con dieta estándar (NC) y 12 ratones alimentados con dieta alta en grasas (HFD) durante 10 semanas para producir un modelo de resistencia a la insulina. El grupo de dieta alta en grasas se subdividió en grupos de control sedentario + HFD (n=6) y grupo con ejercicio + HFD (n=6). Los ratones del grupo con ejercicio se sometieron a 6 semanas de carrera en cinta. El peso corporal de los ratones eran los mismos al comienzo de este estudio; sin embargo, comenzaron a cambiar después de 4 semana, el peso corporal de los

ratones del grupo con ejercicio + HFD que se sometieron a un régimen de ejercicio aeróbico de 6 semanas disminuyó significativamente en comparación con el grupo control sedentario + HFD.

## Diferencia del peso corporal entre grupo

No se encontraron diferencias significativas en la diferencia del peso corporal durante las semanas inducción al hígado graso (**Figura 7A**). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre peso corporal del grupo sacarosa sin ejercicio contra el grupo sacarosa con ejercicio (\*\* $p=0.0012$ ) al finalizar las semanas del tratamiento (**Figura 7B**), en este grupo la pérdida de peso corporal es a consecuencia del tratamiento con el ejercicio y debido a que existe una fuerte asociación entre HGNA y obesidad, se ha demostrado que la pérdida de peso y el ejercicio tienen efectos positivos en los valores bioquímicos e histológicos (Ordóñez *et al.*, 2015).



**Figura 7.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el peso corporal entre los grupos experimentales.

Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el peso corporal entre los grupos experimentales, **A.** Inducción al hígado graso (semana 1-20), **B.** Tratamiento con el ejercicio (semana 20-30).

\*\*Diferencias estadísticamente significativa entre los grupos sacarosa sin ejercicio (17.28 [1.160-18.44] g) y sacarosa con ejercicio (13.16 [-12.97-0.1900] g)  $p=0.0012$ .

Algunos estudios mostraron hallazgos similares a los resultados de esta investigación. En el estudio de Mamikutty y colaboradores (2015), utilizaron como modelo experimental ratas macho Wistar el cual consumieron una solución de fructosa al 20% durante ocho semanas. Como resultado el modelo del estudio mostró diferencias significativas en el perfil metabólico que cumplen los criterios de síndrome metabólico, aumentaron de peso corporal, IMC, circunferencia abdominal y acumulación de tejido adiposo abdominal a comparación con el grupo control (Mamikutty *et al.*, 2015). En el estudio de Acosta-Cota y colaboradores (2019), determinaron la ingesta de sacarosa al 50% durante 20 semanas. El grupo con sacarosa disminuyó significativamente la ingesta de alimentos y tuvieron mayor peso corporal de la semana 16 a la 20 ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo control (Acosta-Cota *et al.*, 2019). En el estudio de Togo y colaboradores (2019), determinaron con la cepa C57BL/6 en diferentes grupos: en el grupo donde la sacarosa se administró en forma sólida (como parte de una comida para roedores) y en el grupo donde se proporcionó dieta estándar y sacarosa en una solución líquida (en agua potable) durante 8 semanas. Se monitorizó el peso corporal, la composición corporal, la ingesta y el gasto energético, así como las pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina. Como resultados obtuvieron que el consumo de agua endulzada con sacarosa condujo a un aumento de grasa corporal en ratones de la cepa C57BL/6, sugiriendo que el consumo de sacarosa líquida puede contribuir de manera importante a la desregulación del peso corporal y los síndromes metabólicos relacionados (Togo *et al.*, 2019).

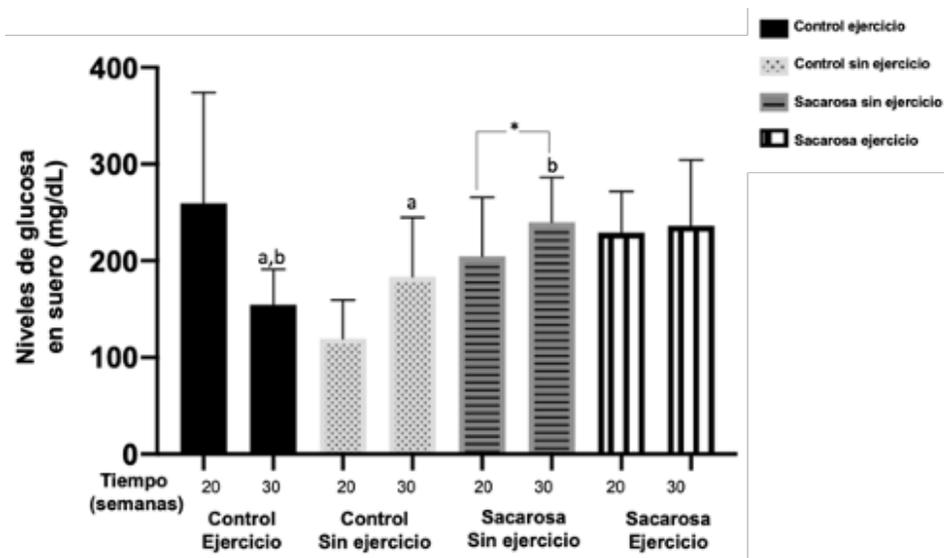
Lo contrario a estos hallazgos, Plazas-Guerrero reportó que en su estudio que tuvo como duración 20 semanas no hubo diferencia significativa en el peso corporal entre las semanas 0 y 2 y entre las semanas 15 y 24 de intervención entre los grupos experimentales: grupo control y grupo sacarosa. Sin embargo, el grupo de sacarosa tuvo un peso corporal significativamente menor desde la semana 3 hasta la semana 14 de intervención en comparación con el grupo de control ( $p < 0,05$ ) (Plazas-Guerrero *et al.*, 2019). Schultz y colaboradores (Schultz *et al.*, 2015), encontraron que en los ratones de la cepa C57BL/6 no encontraron diferencias relevantes en el

peso corporal en comparación con los animales alimentados con una dieta rica en sacarosa durante 15 semanas a comparación con en el grupo control, reportaron que ni la ingesta de alimentos ni la ingesta energética de los animales mostraron diferencias significativas durante el experimento. En consecuencia, la evolución del peso corporal no fue diferente entre los grupos. McCluskey y colaboradores (McCluskey *et al.*, 2020), intervinieron con ratas hembras Sprague Dawley durante 40 días con dos grupos diferentes: el primer grupo control con acceso a dieta estándar y agua *ad libitum*. Un segundo grupo alimento rico en sacarosa tuvo acceso libre a comida que contenía 66,6% de kcal provenientes de sacarosa y agua *ad libitum* y el tercer grupo tuvo acceso a dieta estándar y solución de sacarosa al 30%. El consumo de sacarosa por las ratas del grupo con solución de sacarosa al 30% aumentó gradualmente y el día 14 fue igual al de las ratas del grupo alimento rico en sacarosa. La ingesta de alimento disminuyó en las ratas del grupo con solución de sacarosa al 30%, pero su ingesta energética se mantuvo más alta que en las ratas de los grupos control o grupo alimento rico en sacarosa. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el aumento de peso entre los grupos durante el estudio. Los estudios mencionados anteriormente reportan lo contrario a los hallazgos del presente estudio, el peso corporal no se mantuvo igual en los grupos que fueron alimentados con sacarosa. Se encontró un incremento de peso corporal en los ratones que consumían sacarosa y eran sedentarios, esto puede ser debido al tiempo de exposición con la solución de sacarosa, el cual en la presente investigación fueron 30 semanas de exposición, podría ser que, entre una mayor exposición, mayor podría ser la alteración metabólica reflejado en el aumento de peso corporal. Por otro lado, el ejercicio disminuyó el peso corporal en el grupo de sacarosa con ejercicio y esto es porque se ha reportado que los ratones con ejercicio mantienen el peso corporal más bajo que los ratones sedentarios (Marques *et al.*, 2010), es decir, que el ejercicio puede contrarrestar algunos de los efectos nocivos del aumento del peso corporal en el desarrollo de HGNA (Harris *et al.*, 2016).

## Niveles de Glucosa, Insulina y HOMA-IR

### Glucosa

Se encontró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de glucosa comparando la semana 20 y la semana 30 en el grupo sacarosa sin ejercicio  $(^*p=0.0210)$ . Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control con ejercicio con el grupo control sin ejercicio (a)  $(^*p=0.0196)$  y el grupo sacarosa sin ejercicio (b)  $(^*p=0.0297)$  (Figura 8).



**Figura 8.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de glucosa en suero.

\*Diferencia estadísticamente significativa en el grupo sacarosa sin ejercicio en la semana 20 (160 [128-288] mg/dL) vs. 30 (137.8 [177.9-315.7] mg/dL)  $^*p=0.0218$ . También se encontró diferencia significativa entre el grupo control con ejercicio (a) (83.90 [120.7-204.6] mg/dL) vs. grupo control sin ejercicio (a) (173.5 [131.5-305.0] mg/dL)  $p=0.0196$  y entre el grupo control con ejercicio (b) (83.90 [120.7-204.6] mg/dL) vs. grupo sacarosa sin ejercicio (b) (137.8 [177.9-315.7] mg/dL)  $p=0.0297$ .

Este hallazgo concuerda con otros resultados reportados en la literatura, donde se indica que, el consumo crónico de sacarosa conduce a la hiperglucemia y al desarrollo de intolerancia a la glucosa (Acosta-Cota *et al.*, 2019; Plazas-Guerrero *et al.*, 2019; Van Herck *et al.*, 2017). Esto puede ser por el aumento de la gluconeogénesis que eleva los niveles de glucosa y a su vez aumenta la lipogénesis *de novo*. Ambas vías metabólicas producen un aumento de ácidos grasos libres que se esterifican como triglicéridos (Acosta-Cota *et al.*, 2019; Plazas-Guerrero *et al.*, 2019).

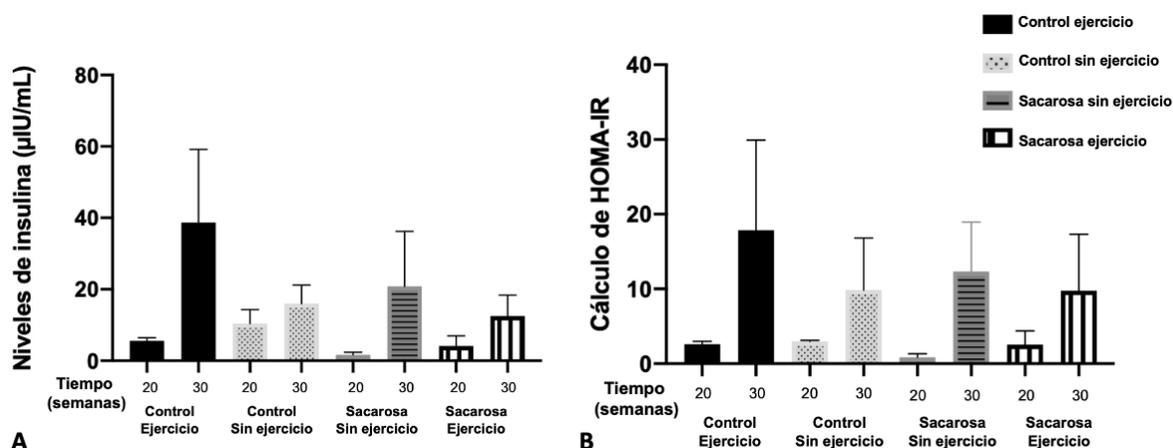
Una posible explicación del porque el grupo control con ejercicio aumentó los niveles de glucosa sanguínea es debido a que la cepa de los ratones C57BL/6N tiene una tendencia genética a adquirir hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 (Anstee & Goldin, 2006; Sanchez *et al.*, 2015; Van Herck *et al.*, 2017; Recena *et al.*, 2019; da Silva Filomeno *et al.*, 2020) este grupo era sedentario y comían a libre demanda.

Se ha reportado que el ejercicio promueve una disminución de la glucosa plasmática como el estudio de Cho y colaboradores (Cho *et al.*, 2014), concluyeron que los ratones que realizaron ejercicio de intensidad moderada mediante la cinta rodante motorizada mejoraron la tolerancia a la glucosa alterada y la resistencia a la insulina secundaria a una dieta alta en grasas. Rector y colaboradores (Rector *et al.*, 2011), observaron que un aumento de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y la supresión de la lipogénesis *de novo* hepática mejoró la tolerancia a la glucosa en el grupo que realizaba ejercicio de intensidad moderada en una cinta rodante. Nikroo y colaboradores (Nikroo *et al.*, 2020), utilizaron 37 ratas macho con hígado graso no alcohólico inducido con una dieta alta en grasas durante 12 semanas tenían como objetivo evaluar el efecto del ejercicio de intensidad moderada sobre el hígado graso no alcohólico y como resultado obtuvieron que el ejercicio tiene un efecto positivo sobre la homeostasis de la glucosa debido a que el ejercicio aumenta la capacidad de respuesta a la insulina mediante el aumento del transportado GLUT4, el aumento del IRS y el aumento de la masa muscular, confirmando que ejercicio aeróbico en la

mejora de la función de la insulina al reducir la acumulación de triglicéridos intracelulares y aumentar la oxidación de los ácidos grasos. También se ha reportado que el ejercicio requiere de oxígeno y una de las maneras en las que se obtiene la energía necesaria para distribuir oxígeno al músculo es mediante la oxidación de la glucosa (Berzigotti *et al.*, 2016).

## Insulina y HOMA-RI

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de insulina ni en el cálculo del HOMA-RI entre los grupos (**Figura 9 A y B**).



**Figura 9.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de insulina en suero y el cálculo de HOMA-RI.

Los resultados de la insulina (A) se expresan como medianas y rangos. Y los resultados de del HOMA-RI (B) se expresan como medias  $\pm$  desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas en los grupos.

Como se ha mencionado, la dieta rica en sacarosa se ha relacionado con obesidad mostrando hiperglucemia e hiperinsulinemia (Schultz *et al.*, 2015) y los hallazgos de este estudio muestran lo contrario a lo reportado en otros estudios sobre que el ejercicio aeróbico mejora la tolerancia a la glucosa alterada y la resistencia a la insulina secundaria a una dieta alta en grasas (Cho *et al.*, 2014; Nikroo *et al.*, 2020).

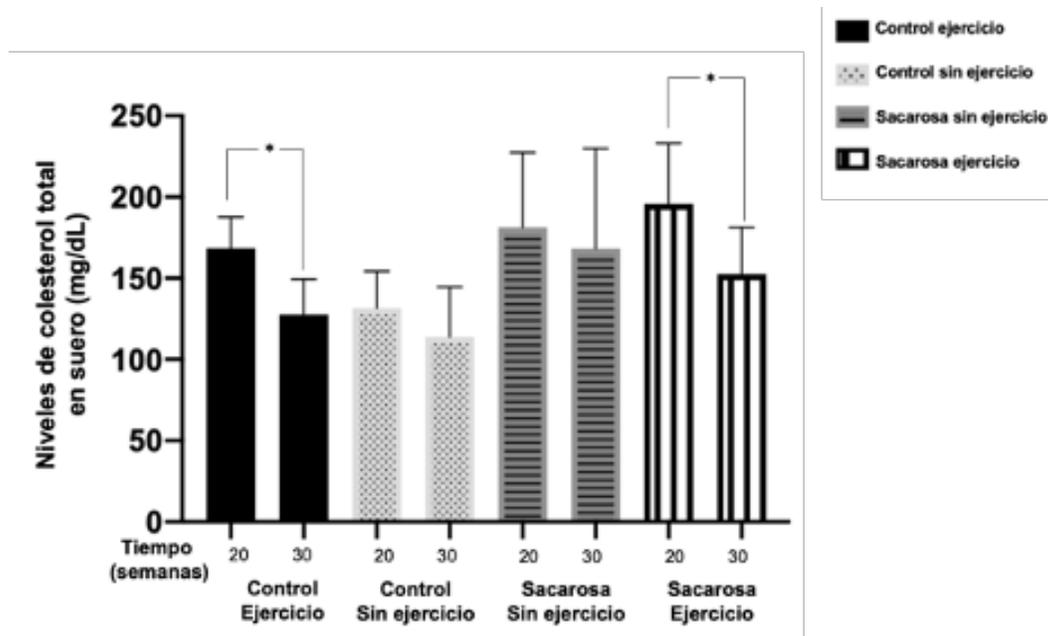
En el estudio de Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2018), intervinieron en 20 ratones db/db con diabetes mellitus tipo 2, el cual se dividieron aleatoriamente en dos grupos (n = 10 en cada grupo) un grupo recibió tratamiento con ejercicio aeróbico durante 30 días. El día 30, se utilizaron ratones para evaluar la tolerancia y resistencia a la glucosa e insulina. Concluyeron que el ejercicio aeróbico es beneficioso para la mejoría de la resistencia a la insulina y los lípidos en sangre a través de la vía de señalización ERK / AMPK mediada por TLR-4 en la progresión de la diabetes mellitus tipo 2.

En el estudio de Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2020), utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6J y los colocaron a ejercicios de natación (60 min/día, 5 días/semana durante 8 semanas), encontraron que el ejercicio de natación a largo plazo mejoró la sensibilidad a la insulina en comparación con los grupos sedentarios según lo indexado por la evaluación del modelo de homeostasis de prueba de resistencia a la insulina (HOMA-RI), glucosa e insulina.

## Perfil de lípidos

### Colesterol total

Se encontró una disminución estadísticamente significativa de los niveles de colesterol total en el grupo control con ejercicio entre la semana 20 y 30 ( $*p=0.0156$ ) y en el grupo sacarosa con ejercicio entre la semana 20 y 30 ( $*p=0.0156$ ) (**Figura 10**). En el estudio de Fernandes-Lima y colaboradores (2016) reportaron que en respuesta a la exposición de la dieta alta en sacarosa en ratones machos Swiss Webster mostraron cambios en los niveles séricos de colesterol (Fernandes-Lima *et al.*, 2016), sin embargo, a pesar del consumo crónico de una dieta alta en sacarosa el ejercicio aeróbico disminuye los niveles plasmáticos de colesterol total, elevando los niveles de colesterol-HDL y disminuyendo el colesterol-LDL (Aoi *et al.*, 2011; Rocco *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2005).



**Figura 10.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el nivel de colesterol total en suero.

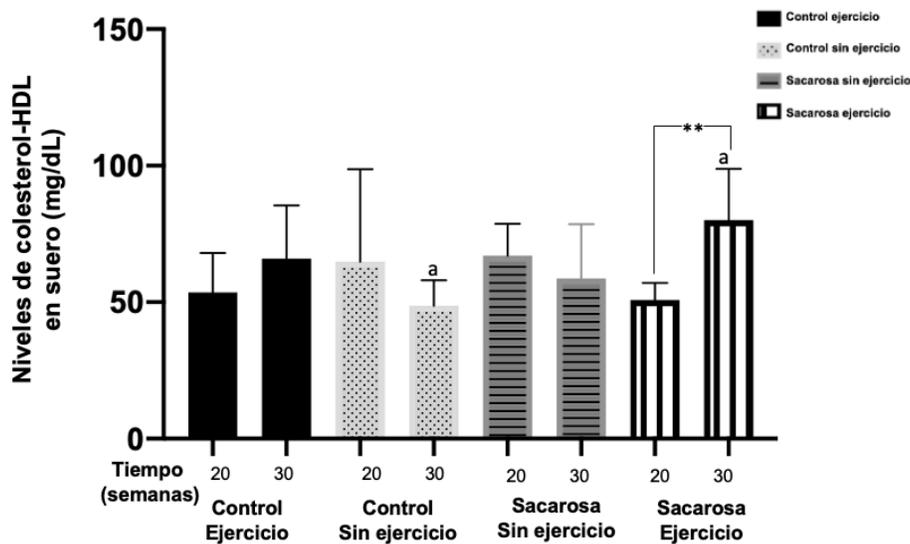
\*Diferencias estadísticamente significativas en el grupo control con ejercicio en la semana 20 (61.60 [133.1-194.7] mg/dL) vs. semana 30 (56 [103.7-159.7] mg/dL)  $*p= 0.0156$  y en el grupo sacarosa con ejercicio en la semana 20 (114 [141.3-255.6] mg/dL) vs. semana 30 (88.75 [112.8-201.6] mg/dL)  $*p=0.0156$ .

La ingesta crónica de carbohidratos combinada con la resistencia a la insulina periférica promueve la acumulación de glucosa en hígado, donde se convierte en ácidos grasos libres a través de la lipogénesis *de novo* lo que conduce a una sobreacumulación de triglicéridos y ésteres de colesterol en el hígado (Zivkovic *et al.*, 2007) desarrollando el HGNA. El ejercicio puede mejorar el metabolismo de los lípidos hepáticos al regular las enzimas que se relacionan con la oxidación y la lipogénesis de los ácidos grasos libres. El mecanismo subyacente al efecto inhibitor del ejercicio sobre el trastorno metabólico de los lípidos en el hígado aún no está claro, se necesitan más estudios al respecto (Aoi *et al.*, 2011). Sin embargo, lo que se menciona en la literatura es que se predice que el ejercicio mejora el HGNA a través de diferentes mecanismos: 1) la reducción del contenido de grasa intrahepática, 2) el aumento de la tasa de  $\beta$ -oxidación, 3) la autofagia hepática de los ácidos grasos, 4) la activación de PPAR- $\gamma$ , y 5) la disminución del nivel de estrés oxidativo inducido por la HGNA, la inflamación y la apoptosis inducida por mitocondrias (Farzanegi *et al.*, 2019).

Se reportó en el estudio de Cho y colaboradores (2014) que los ratones alimentados con una dieta alta en grasas con ejercicio de intensidad moderada tenían una concentración de colesterol total significativamente más baja ( $p < 0,05$ ) que los ratones con dieta alta en grasas sedentarios (Cho *et al.*, 2014), esto quiere decir que el ejercicio es capaz de reducir el colesterol sérico debido a la actividad de la lipoproteína lipasa que aumenta con el ejercicio, permitiendo la oxidación de los ácidos grasos (Marques *et al.*, 2010).

## Colesterol-HDL

Se presentó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de colesterol-HDL en el grupo control sin ejercicio en comparación con el grupo sacarosa con ejercicio (a)(\* $p=0.0174$ ). También se observó que en el grupo sacarosa con ejercicio aumentó significativamente en los niveles de colesterol-HDL entre la semana 20 y 30 (\*\* $p=0.0050$ ) (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en el nivel de colesterol-HDL en suero.

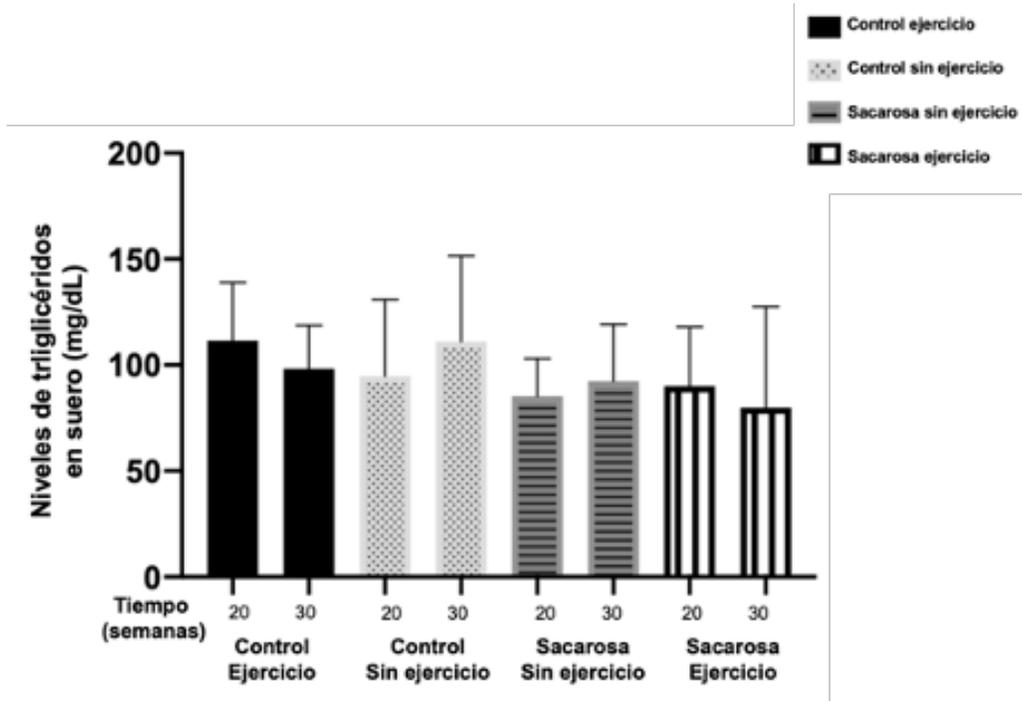
\*\*Diferencia estadísticamente significativa en el grupo sacarosa con ejercicio en la semana 20 ( $50.75 \pm 6.336$ ) vs. la semana 30 ( $80.07 \pm 18.77$ ) \*\* $p=0.0050$  y en el grupo control sin ejercicio (a)( $48.63 \pm 9.494$ ) vs. grupo sacarosa con ejercicio (a)( $80.07 \pm 18.77$ ) \* $p=0.0174$ .

La dieta alta en sacarosa y el sedentarismo disminuye la concentración de HDL (Ordonez *et al.*, 2015) sin embargo, el ejercicio aeróbico aumenta las concentraciones de colesterol-HDL (Cho *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2014; Wang & Xu, 2017). En el estudio de Tiainen y colaboradores (2016), probaron que el ejercicio aeróbico durante 6 meses puede mejorar la capacidad de transporte de peróxido de lípidos de las HDL. El aumento de los niveles de HDL se correlacionó positivamente con el aumento del  $VO_2\text{max}$  durante la intervención en este estudio.

Rocco y colaboradores (2011), reportaron que el entrenamiento con ejercicio aeróbico mejora el transporte inverso de colesterol de macrófagos en ratones de la cepa CETP-tg al aumentar la concentración de HDL en plasma y al modular los niveles de proteína de los receptores hepáticos involucrados en la captación del colesterol esterificado.

### **Triglicéridos**

Se observó una disminución en los niveles triglicéridos en los grupos bajo el régimen del ejercicio aeróbico y un aumento en los niveles de triglicéridos en los grupos sedentarios, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) (**Figura 12**). Similar a lo reportado en otras revisiones (Cho *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2012) observándose niveles similares de triglicéridos entre los grupos en estos estudios. Aún no son muy claros los mecanismos involucrados del ejercicio en el metabolismo de las grasas, sin embargo, se ha reportado que el ejercicio podría mejorar la capacidad de los músculos esqueléticos para utilizar los lípidos (ácidos grasos o triglicéridos almacenados) en lugar del glucógeno muscular reduciendo los niveles bioquímicos en plasma del perfil de lípidos (Mann *et al.*, 2014). El hígado sintetiza las lipoproteínas que se encargan de distribuir los triglicéridos hacia la célula muscular y el tejido adiposo, como los quilomicrones y las VLDL que son los que transportan los ácidos grasos en forma de triglicéridos.



**Figura 12.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de triglicéridos en suero. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  y desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas en los grupos.

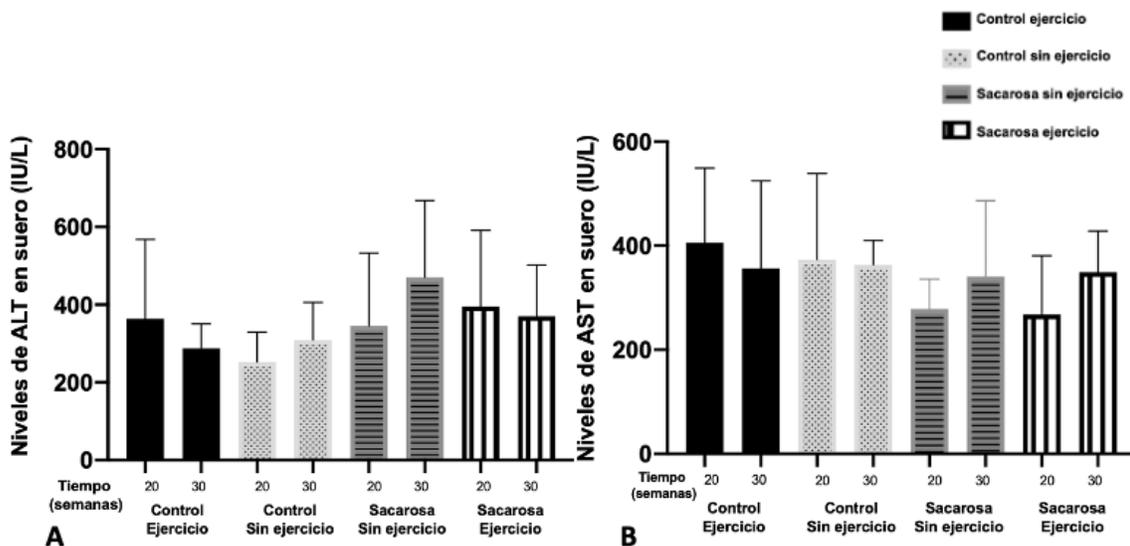
Se ha descrito que el ejercicio aeróbico aumenta la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), enzima que permite la entrada de las lipoproteínas a otros tejidos o células promoviendo la disminución de las concentraciones bioquímicas del perfil de lípidos (Wang & Xu, 2017). También se ha reportado en diferentes estudios que el ejercicio activa las vías del metabolismo de los lípidos reguladas por AMPK en el hígado, promoviendo una reducción de la actividad de malonyl-CoA, lo cual permite que mejore la acción de la enzima carnitina acil transferasa 1, mejorando la oxidación mitocondrial, el transporte de los ácidos grasos (Oliveira *et al.*, 2016; Berzigotti *et al.*, 2016) y promoviendo la  $\beta$ -oxidación.

El ejercicio inhibe la actividad hepática de esteraroil-Coa desaturasa 1 (SCD-1), ACC, FAS y de SREBP-1 disminuyendo la actividad metabólica de la lipogénesis *de novo* (Berzigotti *et al.*, 2016; Zheng & Cai, 2019; Farzanegi *et al.*, 2019), por lo que el ejercicio activa la lipólisis en varios tejidos incluyendo el adiposo, permitiendo la producción de acetil-CoA a través de la  $\beta$ -oxidación (Hashida *et al.*, 2017) y permitiendo el flujo en el ciclo de ácido tricarbóxico (TCA) en el músculo esquelético, por lo que se sugiere que el ejercicio puede mejorar la oxidación completa de los lípidos tanto en el hígado como en el músculo esquelético (Farzanegi *et al.*, 2019).

Se esperaba que en el grupo dieta alta en sacarosa sin ejercicio tuviera significancia estadística en el aumento de niveles de triglicéridos en suero comparando la semana 20 con la 30, sin embargo, no sucedió y esto podría ser debido a que se presentó una mayor acumulación de triglicéridos en el hígado (Yang *et al.*, 2012; Alex *et al.*, 2015). En la **Figura 14B** se podría demostrar lo mencionado anteriormente, afirmando que el consumo crónico de sacarosa sin actividad física permite la acumulación de triglicéridos en el tejido hepático aunque no se refleje de manera significativa en suero.

## Aminotransferasas

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los niveles de alanina y aspartato aminotransferasa (**Figura 13 A y B**). Estos hallazgos muestran lo contrario a la literatura revisada. En el estudio de Cho y colaboradores (2014) se utilizaron diferentes grupos de ratones macho de la cepa C57BL/6. Los ratones del grupo dieta alta en grasa con ejercicio tenían los valores significativamente más altos de niveles de ALT en suero que los ratones del grupo control sedentarios ( $p < 0.001$ ), sin embargo, los ratones del grupo dieta alta en grasa con ejercicio tenían valores significativamente más bajos ( $p < 0.001$ ) de niveles de ALT en suero que los ratones dieta alta en grasa sedentarios (Cho *et al.*, 2014) por lo que se ha evidenciado que el ejercicio mejora los valores bioquímicos de la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) (Schultz *et al.*, 2012; Alex *et al.*, 2015).



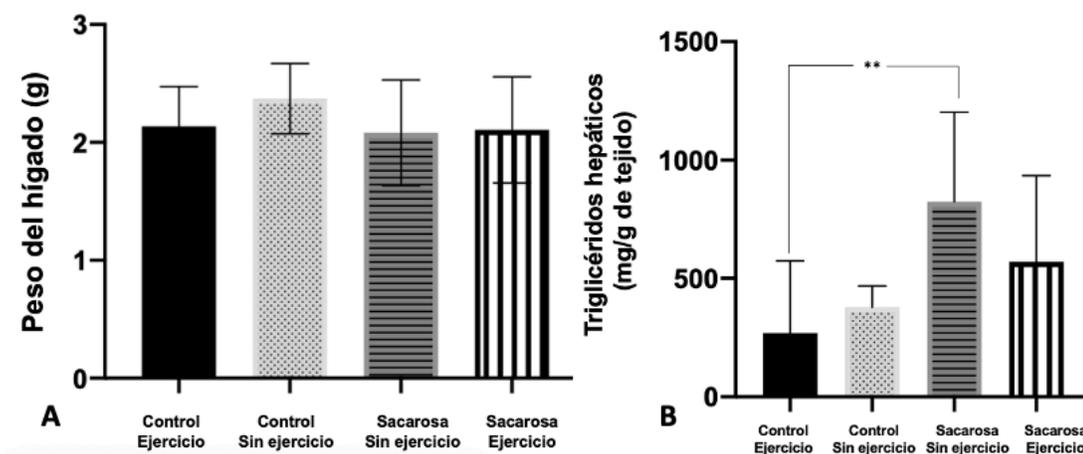
**Figura 13.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de alanina (A) y aspartato aminotransferasa

Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de alanina (A) y aspartato aminotransferasa (B). Los resultados se expresan como medianas y rangos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Sin embargo, en el presente estudio experimental no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los niveles de ALT y AST, una posible explicación sería que el reflejo de las enzimas transaminasas en los valores bioquímicos depende del tipo de muerte celular que surgió en los hepatocitos, es decir si fue por necrosis o por apoptosis. En ambas maneras se refleja un daño hepático en la histología pero si la muerte celular fue por apoptosis no se refleja en los valores bioquímicos de las transaminasas (Torres, 2006). La apoptosis de los hepatocitos es un proceso que se observa a menudo en pacientes con HGNA. Es una muerte celular programada que conduce a cambios morfológicos y muerte celular. El ejercicio atenúa la apoptosis tanto en el modelo humano como en el animal, en un estudio reciente de Hajighasem y colaboradores (2018) demostraron que los ejercicios continuos y por intervalos mejoran significativamente la apoptosis de las células hepáticas en ratas con HGNA (Hajighasem *et al.*, 2018).

## Peso del hígado y triglicéridos hepáticos

No se encontraron diferencias significativas en el peso del hígado entre los grupos ( $p>0.05$ ) (**Figura 14 A**). Estos resultados son lo contrario a lo reportado en la evidencia científica donde concluyen que, a mayor ingesta de sacarosa, mayor porcentaje en peso del hígado (Acosta-Cota *et al.*, 2019).



**Figura 14.** Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de triglicéridos hepáticos y en el peso del hígado.

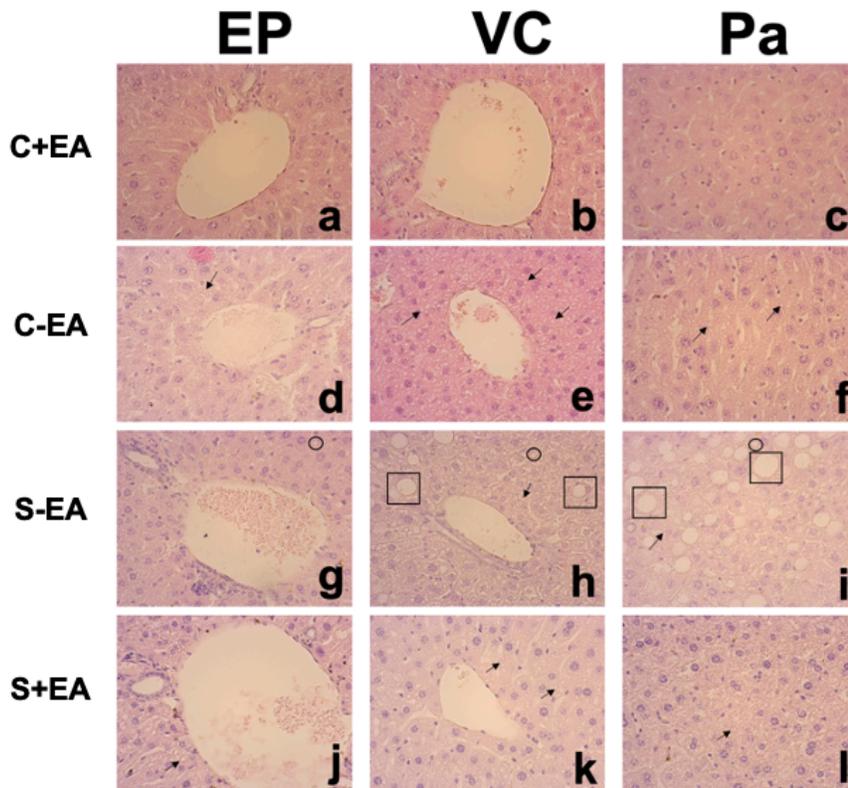
Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio en los niveles de triglicéridos hepáticos y en el peso del hígado. (A) No se presentaron diferencias significativas en el peso del hígado entre los grupos. (B) \*\*Diferencias estadísticamente significativas en los triglicéridos hepáticos entre el grupo control con ejercicio (906.0 [29.49-935.5] g) vs. el grupo sacarosa sin ejercicio (1052 [611.9-

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos hepáticos entre el grupo control con ejercicio y el grupo sacarosa sin ejercicio (\*\* $p=0.0044$ ) (**Figura 14 B**). En algunos artículos de revisión se ha reportado que el consumo crónico de sacarosa aumenta la acumulación de triglicéridos hepáticos (Romero-Gómez *et al.*, 2015; Basaranoglu *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2018). Y en estudios experimentales como el de Sun y colaboradores (2019) reportaron que el consumo crónico de sacarosa *ad libitum* en ratas macho Wistar aumentó la acumulación de lípidos hepáticos (Sun *et al.*, 2019). Cruz y colaboradores (2020) investigaron en un estudio experimental los efectos a largo plazo de la ingestión de una solución de sacarosa al 40% sobre los parámetros séricos y hepáticos en ratas

macho Wistar. Después de 180 días, el consumo crónico de sacarosa aumentó los niveles de triglicéridos en el hígado de los animales del grupo alimentados con sacarosa (Cruz *et al.*, 2020). Alex y colaboradores (2015) investigaron el efecto del ejercicio en ratones machos de la cepa C57BL/6 alimentados con una dieta deficiente en colina enriquecida con sacarosa durante 5 semanas. Los ratones después de las 5 semanas fueron divididos en dos grupos: grupo de ejercicio y grupo sedentario. La rutina de ejercicio fue durante 3 semanas, 5 veces por semana, 1 h/día en cinta rodante motorizada. Como resultado obtuvieron una disminución de los triglicéridos hepáticos el grupo de los ratones que realizaron ejercicio. La explicación según este estudio menciona que en cada sesión de ejercicio hay una disminución menor en la reserva de triglicéridos hepáticos, lo que lleva acumulativamente a una reducción del 30% en los niveles de triglicéridos hepáticos después de 3 semanas de ejercicio (Alex *et al.*, 2015). Ghareghani y colaboradores (2018) utilizaron en su estudio un total de 24 ratones machos de la cepa C 57 divididos en 3 grupos n = 8 (grupo 1: control, grupo 2 y 3 dieta alta en grasas). Los grupos 2 y 3 se alimentaron con una dieta rica en grasas durante 13 semanas. El grupo 3 fue sometido a una rutina de ejercicio durante 10 semanas. Los resultados de este estudio encontraron una reducción de los triglicéridos hepáticos después de la intervención con el ejercicio al final del experimental. Como posible explicación, predicen que se debe a una reducción de la absorción de ácidos grasos y una reducción de la actividad de la lipogénesis (Ghareghani *et al.*, 2018). Por ello, el ejercicio aeróbico se emplea como una estrategia para inhibir la progresión de la HGNA en sus primeras etapas, debido a que disminuye la captación de los ácidos grasos libres y estimula la hidrólisis de los triglicéridos (Stefan *et al.*, 2018).

## Cambios histopatológicos del hígado

En las muestras histológicas hepáticas del C+EA se observó una estructura porta, vena central y parénquima normal formado por hepatocitos con una arquitectura conservada, en el que se aprecia el citoplasma y el núcleo (**Figura 15 (a, b, c)**). En el análisis histopatológico del grupo C-EA mostró escasa presencia de esteatosis microvesicular (**Figura 15 (d, e, f)**). En el grupo S-EA se encontró presencia de esteatosis macro, microvesicular, células balonadas (**Figura 15 (g, h, i)**) y una ligera presencia de células inflamatorias (no mostrado). Y por último el grupo S+EA mostró una ligera presencia de esteatosis microvesicular.



**Figura 15.** Histología hepática.

Efecto del consumo de sacarosa y/o el ejercicio sobre la histopatología del hígado. C+EA: grupo control con ejercicio (a, b, c), C-EA: grupo control sin ejercicio (d, e, f), S-EA: grupo sacarosa sin ejercicio (g, h, i) y S+EA: grupo sacarosa con ejercicio (j, k, l). Se muestran la estructura porta (EP), las venas centrales (VC) y parénquima (Pa) en los cuatro grupos experimentales. La esteatosis microvesicular está indicada por flechas. La esteatosis macrovesicular se indica mediante círculos y las células balonadas en cuadrados. Hematoxilina y eosina, aumento 40X.

## Grado de actividad

En la **Tabla 5** se representa el grado de actividad de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) según el sistema de puntuación histológica de la red de investigación clínica de EHNA (**Tabla 4**). Mostrando el grupo de sacarosa sin ejercicio con el grado más alto de EHNA a comparación de los demás grupos.

**Tabla 5.** Resultados de grado de actividad EHNA

Grupo	Esteatosis	Inflamación lobular	Células balonadas	EHNA (grado)
Control con ejercicio	0	0	0	0
Control sin ejercicio	1	0	0	1
Sacarosa sin ejercicio	3	2	2	7
Sacarosa con ejercicio	2	1	1	4

Estos hallazgos son similares a lo reportado en la literatura donde encontraron esteatosis macrovesicular y microvesicular asociado al consumo crónico de sacarosa (Acosta-Cota *et al.*, 2019; Plazas-Guerrero *et al.*, 2019). Aoi y colaboradores (Aoi *et al.*, 2011), observaron cambios histológicos en los ratones KK / Ta, la acumulación de triglicéridos que tenían por la exposición a una dieta alta en sacarosa se redujo significativamente con el ejercicio. En el estudio de Cho y colaboradores (Cho *et al.*, 2014), el grupo con dieta alta en grasa tenía más esteatosis micro y macrovesicular que el grupo control. Sin embargo, 8 semanas de ejercicio aeróbico atenuaron la esteatosis hepática en el grupo de dieta alta en grasa con ejercicio a comparación del grupo sedentario. Por lo que concluyeron que el ejercicio aeróbico durante 8 semanas mejoró la esteatosis hepática a pesar del consumo de una dieta alta en grasas.

El consumo crónico de sacarosa presenta mayor porcentaje de esteatosis y mayor grado de EHNA según el sistema de puntuación (LaBrecque *et al.*, 2012). El ejercicio disminuye la progresión de la enfermedad a pesar del consumo crónico de una dieta alta en sacarosa.

## CONCLUSIONES

En modelos experimentales *in vivo*, el consumo de sacarosa durante 30 semanas conduce a una alteración en el peso corporal, incremento de la glucosa en suero, acumulación de triglicéridos hepáticos, esteatosis micro y macro vesicular, células balonadas e inflamación lobular.

En nuestro estudio se pudo apreciar que, el ejercicio previene los efectos negativos asociados al consumo de sacarosa, debido a que promueve el aumento en el gasto energético y mejora el metabolismo de las grasas y carbohidratos en los ratones intervenidos. Esos beneficios se pueden ver reflejados en las mejoras observadas en las variables como el peso corporal, los niveles de glucosa en suero, el perfil de lípidos, las concentraciones de triglicéridos hepáticos, así como en la evidente disminución de esteatosis hepática, de tal manera que con este estudio podríamos decir que, el ejercicio aeróbico a un 75%  $Vo_2max$  en un tiempo estimado de 8 semanas consecutivas con una frecuencia de 5 veces por semana, detiene el desarrollo del hígado graso no alcohólico relacionado con el consumo de altas concentraciones de sacarosa.

## REFERENCIAS

- Acosta-Cota, S. D. J., Aguilar-Medina, E. M., Ramos-Payán, R., Ruiz-Quiñónez, A. K., Romero-Quintana, J. G., Montes-Avila, J., ... & Osuna-Martínez, U. (2019). Histopathological and biochemical changes in the development of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-sucrose diet at different times. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 97(1), 23-36.
- Aguirre, L., Portillo, M. P., Hijona, E., & Bujanda, L. (2014). Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(23), 7366.
- Alex, S., Boss, A., Heerschap, A., & Kersten, S. (2015). Exercise training improves liver steatosis in mice. *Nutrition & metabolism*, 12(1), 29.
- Allen, A. M., Therneau, T. M., Larson, J. J., Coward, A., Somers, V. K., & Kamath, P. S. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: a 20 year-community study. *Hepatology*, 67(5), 1726-1736.
- Alwahsh, S. M., & Gebhardt, R. (2017). Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Archives of toxicology*, 91(4), 1545-1563.
- Anstee, Q. M., & Goldin, R. D. (2006). Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International journal of experimental pathology*, 87(1), 1-16.
- Aoi, W., Naito, Y., Hang, L. P., Uchiyama, K., Akagiri, S., Mizushima, K., & Yoshikawa, T. (2011). Regular exercise prevents high-sucrose diet-induced fatty liver via improvement of hepatic lipid metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 413(2), 330-335.
- Augustin, S., Graupera, I., & Caballeria, J. (2017). Hígado graso no alcohólico: una pandemia poco conocida. *Medicina Clínica*, 149(12), 542-548.
- Basaranoglu, M., Basaranoglu, G., & Bugianesi, E. (2015). Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 4(2), 109.
- Berzigotti, A., Saran, U., & Dufour, J. F. (2016). Physical activity and liver diseases. *Hepatology*, 63(3), 1026-1040.
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 288.

- Bourdi, M., Davies, J. S., & Pohl, L. R. (2011). Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A liver injury. *Chemical research in toxicology*, 24(6), 794-796.
- Brea, Á., Pintó, X., Ascaso, J. F., Blasco, M., Díaz, Á., González-Santos, P., ... & Pedro-Botet, J. (2017). Enfermedad del hígado graso no alcohólico, asociación con la enfermedad cardiovascular y tratamiento (II). Tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 29(4), 185-200.
- Carlino, B., Secchi, C. M., Rojas, H., & Varela, E. (2017). Consumo De Carbohidratos Y Valor De Transaminasas Hepáticas Carbohydrate Consumption and Value of Liver Transaminases. *Actualización En Nutrición*, 18(2), 49–57.
- Chen, Z., Qin, X., Zhang, X., Liu, B., & Chen, M. (2020). Upregulation of IL-4 signaling contributes to aerobic exercise-induced insulin sensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Chiu, S., Mulligan, K., & Schwarz, J. M. (2018). Dietary carbohydrates and fatty liver disease: de novo lipogenesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 21(4), 277-282.
- Cho, J., Lee, I., Kim, D., Koh, Y., Kong, J., Lee, S., & Kang, H. (2014). Effect of aerobic exercise training on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet in C57BL/6 mice. *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry*, 18(4), 339.
- Chyau, C. C., Wang, H. F., Zhang, W. J., Chen, C. C., Huang, S. H., Chang, C. C., & Peng, R. Y. (2020). Antrodan Alleviates High-Fat and High-Fructose Diet-Induced Fatty Liver Disease in C57BL/6 Mice Model via AMPK/Sirt1/SREBP-1c/PPAR $\gamma$  Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 360.
- Cicero, A. F., Sahebkar, A., Fogacci, F., Bove, M., Giovannini, M., & Borghi, C. (2020). Effects of phytosomal curcumin on anthropometric parameters, insulin resistance, cortisolemia and non-alcoholic fatty liver disease indices: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Nutrition*, 59(2), 477–483.
- Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Vitto, M. F., Luciano, T. F., Souza, D. R., Engelmann, J., ... & De Souza, C. T. (2012). RETRACTED: Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c.
- Croci, I., Coombes, J. S., Sandbakk, S. B., Keating, S. E., Nauman, J., Macdonald, G. A., & Wisloff, U. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease: Prevalence and all-

cause mortality according to sedentary behaviour and cardiorespiratory fitness. The HUNT Study. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 62(2), 127–134.

- Cruz, E. M. S., de Morais, J. M. B., da Rosa, C. V. D., da Silva Simões, M., Comar, J. F., de Almeida Chuffa, L. G., & Seiva, F. R. F. (2020). Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic oxidative stress in Wistar rats. *Biology Open*, 9(3).
- Cuthbertson, D. J., Shojaee-Moradie, F., Sprung, V. S., Jones, H., Pugh, C. J., Richardson, P., ... & Bell, J. D. (2016). Dissociation between exercise-induced reduction in liver fat and changes in hepatic and peripheral glucose homeostasis in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical science*, 130(2), 93-104.
- Da Silva Filomeno, C. E., Costa-Silva, M., Corrêa, C. L., Neves, R. H., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Machado-Silva, J. R. (2020). The acute schistosomiasis mansoni ameliorates metabolic syndrome in the C57BL/6 mouse model. *Experimental Parasitology*, 107889.
- Da Silva, H. E., Arendt, B. M., Noureldin, S. A., Therapondos, G., Guindi, M., & Allard, J. P. (2014). A cross-sectional study assessing dietary intake and physical activity in Canadian patients with nonalcoholic fatty liver disease vs healthy controls. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(8), 1181-1194.
- Dai, W., Ye, L., Liu, A., Wen, S. W., Deng, J., Wu, X., & Lai, Z. (2017). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Medicine*, 96(39).
- Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"?
- De Jesús Acosta-Cota, S., Aguilar-Medina, E. M., Ramos-Payán, R., Maldonado, J. G. R., Romero-Quintana, J. G., Montes-Avila, J., ... & Centurión, D. (2019). Therapeutic effect of treatment with metformin and/or 4-hydroxychalcone in male Wistar rats with nonalcoholic fatty liver disease. *European Journal of Pharmacology*, 863, 172699.
- Del Ben, M., Polimeni, L., Baratta, F., Pastori, D., & Angelico, F. (2017). The role of nutraceuticals for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *British journal of clinical pharmacology*, 83(1), 88-95.
- Delgado-Cortés, H. M., García-Juárez, F. I., & García-Juárez, I. (2018). La enfermedad por hígado graso no alcohólico y el trabajo del internista. *Revista del Hospital Juárez de México*, 85(2), 86-93.

- Dongiovanni, P., Lanti, C., Riso, P., & Valenti, L. (2016). Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 29, 1-11.
- Enríquez, J. A. (2019). Mind your mouse strain. *Nature Metabolism*, 1(1), 5-7.
- Eslamparast, T., Eghtesad, S., Poustchi, H., & Hekmatdoost, A. (2015). Recent advances in dietary supplementation, in treating non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology*, 7(2), 204.
- European Association for the Study of The Liver, & European Association for the Study of Diabetes (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Obesity facts*, 9(2), 65-90.
- Farzanegi, P., Dana, A., Ebrahimipoor, Z., Asadi, M., & Azarbayjani, M. A. (2019). Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *European journal of sport science*, 19(7), 994-1003.
- Fazel, Y., Koenig, A. B., Sayiner, M., Goodman, Z. D., & Younossi, Z. M. (2016). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 65(8), 1017–1025.
- Fernandes-Lima, F., Monte, T. L. R. G., de Moraes Nascimento, F. A., & Gregório, B. M. (2016). Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First 'Hit' of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs*, 201(6), 464-472.
- Ferolla, S. M., Silva, L. C., Ferrari, M. D. L. A., da Cunha, A. S., dos Santos Martins, F., Couto, C. A., & Ferrari, T. C. A. (2015). Dietary approach in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 7(24), 2522.
- Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature medicine*, 24(7), 908-922.
- Fukuda, T., Hamaguchi, M., Kojima, T., Hashimoto, Y., Ohbora, A., Kato, T., ... & Fukui, M. (2016). The impact of non-alcoholic fatty liver disease on incident type 2 diabetes mellitus in non-overweight individuals. *Liver International*, 36(2), 275-283.
- Gaggini, M., Morelli, M., Buzzigoli, E., DeFronzo, R. A., Bugianesi, E., & Gastaldelli, A. (2013). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*, 5(5), 1544-1560.

- Ghareghani, P., Shanaki, M., Ahmadi, S., Khoshdel, A. R., Rezvan, N., Meshkani, R., ... & Gorgani-Firuzjaee, S. (2018). Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. *Obesity research & clinical practice*, 12(1), 80-89.
- Gonçalves, I. O., Martins, M. J., Beleza, J., Ascensão, A., & Magalhães, J. (2017). Exercise, liver steatosis, and free radicals. In *Liver Pathophysiology* (pp. 309-322). Academic Press.
- Graffigna, M., Catoira, N., Soutelo, J., Azpelicueta, A., Berg, G., Perel, C., ... & Farias, J. (2017). Diagnóstico de esteatosis hepática por métodos clínicos, bioquímicos y por imágenes. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*, 54(1), 37-46.
- Grundy, S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine*, 26(4), 364-373.
- Guo, R., Liang, E. C., So, K. F., Fung, M. L., & Tipoe, G. L. (2015). Beneficial mechanisms of aerobic exercise on hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 14(2), 139-144.
- Hajighasem, A., Farzanegi, P., & Mazaheri, Z. (2019). Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in the liver of old rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Archives of physiology and biochemistry*, 125(2), 142-149.
- Harris, M. P., Seija, A., Hartke, R. E., Breden, M., Poole, K., & Wooten, J. S. (2016). The Effects of Physical Activity on Markers of Hepatic Lipid Metabolism during Weight Cycling. In *International Journal of Exercise Science: Conference Proceedings* (Vol. 2, No. 8, p. 12).
- Hashida, R., Kawaguchi, T., Bekki, M., Omoto, M., Matsuse, H., Nago, T., ... & Shiba, N. (2017). Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *Journal of hepatology*, 66(1), 142-152.
- Houghton-Rahrig, L., Schutte, D., Fenton, J. I., & Awad, J. (2019). Nonalcoholic fatty liver disease and the PNPLA3 gene.
- Idilman, I. S., Ozdeniz, I., & Karcaaltincaba, M. (2016, December). Hepatic steatosis: etiology, patterns, and quantification. In *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* (Vol. 37, No. 6, pp. 501-510). WB Saunders.

- Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., ... & Tolan, D. R. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 68(5), 1063-1075.
- Johnson, N. A., & George, J. (2010). Fitness versus fatness: moving beyond weight loss in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 52(1), 370-380.
- Jung, U. J., & Choi, M. S. (2014). Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 6184-6223.
- Kang, S. K., Hawkins, N. A., & Kearney, J. A. (2019). C57BL/6J and C57BL/6N substrains differentially influence phenotype severity in the Scn1a<sup>+/-</sup> mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia Open*, 4(1), 164-169.
- Kantartzis, K., Thamer, C., Peter, A., Machann, J., Schick, F., Schraml, C., ... & Fritsche, A. (2009). High cardiorespiratory fitness is an independent predictor of the reduction in liver fat during a lifestyle intervention in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 58(9), 1281-1288.
- Kilpatrick, L.A., Coveleskie, K., Connolly, L., Labus, J.S., Ebrat, B., Stains, J., Jiang, Z., Suyenobu, B.Y., Raybould, H.E., Tillisch, K., and Mayer, E.A. 2014. Influence of sucrose ingestion on brainstem and hypothalamic intrinsic oscillations in lean and obese women. *Gastroenterology* **146**(5): 1212-1221. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.023.
- Kitade, H., Chen, G., Ni, Y., & Ota, T. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: new insights and potential new treatments. *Nutrients*, 9(4), 387.
- Kwak, M. S., Kim, D., Chung, G. E., Kim, W., Kim, Y. J., & Yoon, J. H. (2015). Role of physical activity in nonalcoholic fatty liver disease in terms of visceral obesity and insulin resistance. *Liver International*, 35(3), 944-952.
- LaBrecque D, Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Ghafor-Kjan A, Goh KL. 2012. Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica. *Guías De La Organización Mundial De Gastroenterología*. 1(1):1–31.
- Lau, J. K. C., Zhang, X., & Yu, J. (2017). Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of pathology*, 241(1), 36-44.

- Li, J., Cordero, P., Nguyen, V., & Oben, J. A. (2016). The role of vitamins in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Integrative medicine insights*, 11, IMI-S31451.
- Liu, K., & McCaughan, G. W. (2018). Epidemiology and etiologic associations of non-alcoholic fatty liver disease and associated HCC. In *Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer* (pp. 3-18). Springer, Singapore.
- Lizardi-Cervera, J., Laparra, I. B., Chávez-Tapia, N. C., Ostos, M. E. R., & Uribe Esquivel, M. (2006). Prevalencia de hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico en población asintomática. *Revista de Gastroenterología de México*, 71(4), 453–459.
- Lonardo, A., Byrne, C. D., Caldwell, S. H., Cortez-Pinto, H., & Targher, G. (2016). Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. *Hepatology*, 64(4), 1388-1389.
- López-Velázquez, J. A., Silva-Vidal, K. V., Ponciano-Rodríguez, G., Chávez-Tapia, N. C., Arrese, M., Uribe, M. & Méndez-Sánchez, N. (2014). The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Annals of Hepatology*, 13(2), 166–178.
- Lu, F. B., Hu, E. D., Xu, L. M., Chen, L., Wu, J. L., Li, H., ... & Chen, Y. P. (2018). The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 12(5), 491-502.
- Mamikutty, N., Thent, Z. C., & Haji Suhaimi, F. (2015). Fructose-Drinking Water Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Ultrastructural Alteration of Hepatocyte Mitochondria in Male Wistar Rat. *BioMed research international*, 2015, 895961.
- Mann, S., Beedie, C., & Jimenez, A. (2014). Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. *Sports Medicine*, 44(2), 211-221.
- Marjot, T., Moolla, A., Cobbold, J. F., Hodson, L., & Tomlinson, J. W. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults: Current Concepts in Etiology, Outcomes, and Management. *Endocrine reviews*, 41(1), bnz009.
- Marques, C. M. M., Motta, V. F., Torres, T. S., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2010). Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin

- resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Brazilian journal of medical and biological research*, 43(5), 467-475.
- Martín-Domínguez, V., González-Casas, R., Mendoza-Jiménez-Ridruejo, J., García-Buey, L., & Moreno-Otero, R. (2013). Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Revista española de enfermedades digestivas*, 105(7), 409-420.
- McCluskey, L. P., He, L., Dong, G., & Harris, R. (2020). Chronic exposure to liquid sucrose and dry sucrose diet have differential effects on peripheral taste responses in female rats. *Appetite*, 145, 104499.
- Montes, I. H., & Arias, M. M. (2020). Enfermedad del hígado graso no alcohólico. *PediatríaIntegral*, 7, 38.
- Montesi, L., Caselli, C., Centis, E., Nuccitelli, C., Moscatiello, S., Suppini, A., & Marchesini, G. (2014). Physical activity support or weight loss counseling for nonalcoholic fatty liver disease?. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(29), 10128.
- Ni, Y., Zhuge, F., Nagashimada, M., & Ota, T. (2016). Novel action of carotenoids on non-alcoholic fatty liver disease: macrophage polarization and liver homeostasis. *Nutrients*, 8(7), 391.
- Nikroo, H., Hosseini, S. R. A., Fathi, M., Sardar, M. A., & Khazaei, M. (2020). The effect of aerobic, resistance, and combined training on PPAR- $\alpha$ , SIRT1 gene expression, and insulin resistance in high-fat diet-induced NAFLD male rats. *Physiology & Behavior*, 113149.
- Oliveira, C. P., de Lima Sanches, P., de Abreu-Silva, E. O., & Marcadenti, A. (2016). Nutrition and physical activity in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of diabetes research*, 2016.
- Ordonez, R., Carbajo-Pescador, S., Mauriz, J. L., & Gonzalez-Gallego, J. (2015). Understanding Nutritional Interventions and Physical Exercise in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Current Molecular Medicine*, 15(1), 3–26.
- Organización Mundial de la Salud. (2016).OMS. Obtenido de [https://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/)
- Organización Mundial de la Salud. (s.f.).OMS. Obtenido de [https://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet\\_recommendations/es/](https://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_recommendations/es/)
- Pillon Barcelos, R., Freire Royes, L. F., Gonzalez-Gallego, J., & Bresciani, G. (2017). Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. *Free radical research*, 51(2), 222-236.

- Plazas Guerrero, C. G., Acosta Cota, S. D. J., Castro Sánchez, F. H., Vergara Jiménez, M. D. J., Ríos Burgueño, E. R., Sarmiento Sánchez, J. I., ... & Osuna Martínez, U. (2019). Evaluation of sucrose-enriched diet consumption in the development of risk factors associated to type 2 diabetes, atherosclerosis and non-alcoholic fatty liver disease in a murine model. *International journal of environmental health research*, 1-19.
- Pompili, S., Vetuschi, A., Gaudio, E., Tessitore, A., Capelli, R., Alesse, E., ... & Onori, P. (2020). Long-term abuse of high-carbohydrate diet is as harmful as high-fat diet for development and progression of liver injury in a mouse model of NAFLD/NASH: Chronic high-carbohydrate diet induced NAFLD/NASH. *Nutrition*, 110782.
- Recena Aydos, L., Aparecida do Amaral, L., Serafim de Souza, R., Jacobowski, A. C., Freitas dos Santos, E., & Rodrigues Macedo, M. L. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. *Nutrients*, 11(12), 3067.
- Rector, R. S., Uptergrove, G. M., Morris, E. M., Borengasser, S. J., Laughlin, M. H., Booth, F. W., ... & Ibdah, J. A. (2011). Daily exercise vs. caloric restriction for prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the OLETF rat model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), G874-G883.
- Rocco, D. D. F. M., Okuda, L. S., Pinto, R. S., Ferreira, F. D., Kubo, S. K., Nakandakare, E. R., ... & Passarelli, M. (2011). Aerobic exercise improves reverse cholesterol transport in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *Lipids*, 46(7), 617-625.
- Rodriguez-Ramiro, I., Vauzour, D., & Minihane, A. M. (2016). Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proceedings of the nutrition society*, 75(1), 47-60.
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L. A., ... & Hobbs, H. H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*, 40(12), 1461-1465.
- Romero-Gómez, M., Zelber-Sagi, S., & Trenell, M. (2017). Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *Journal of Hepatology*, 67(4), 829–846.
- Ruiz-Ramie, J. J., Barber, J. L., & Sarzynski, M. A. (2019). Effects of exercise on HDL functionality. *Current opinion in lipidology*, 30(1), 16.
- Ryu, S., Chang, Y., Jung, H. S., Yun, K. E., Kwon, M. J., Choi, Y. & Chung, E. C. (2015). Relationship of sitting time and physical activity with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 63(5), 1229–1237.

- Sanches, S. C. L., Ramalho, L. N. Z., Augusto, M. J., da Silva, D. M., & Ramalho, F. S. (2015). Nonalcoholic steatohepatitis: a search for factual animal models. *BioMed research international*, 2015.
- Santhekadur, P. K., Kumar, D. P., & Sanyal, A. J. (2018). Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 68(2), 230-237.
- Schefer, V., & Talan, M. I. (1996). Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Experimental gerontology*, 31(3), 387-392.
- Schultz, A., Barbosa-da-Silva, S., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2015). Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose. *Food & function*, 6(5), 1684-1691.
- Schultz, A., Mendonca, L. S., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2012). Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(4), 273–282.
- Shamsoddini, A., Sobhani, V., Chehreh, M. E. G., Alavian, S. M., & Zaree, A. (2015). Effect of aerobic and resistance exercise training on liver enzymes and hepatic fat in Iranian men with Nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatitis Monthly*, 15(10).
- Sheng, X., Che, H., Ji, Q., Yang, F., Lv, J., Wang, Y., ... & Wang, L. (2018). The relationship between liver enzymes and insulin resistance in type 2 diabetes patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hormone and Metabolic Research*, 50(05), 397-402.
- Simon, M. M., Greenaway, S., White, J. K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., ... & Dacquin, R. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome biology*, 14(7), R82.
- Smith, G. I., Shankaran, M., Yoshino, M., Schweitzer, G. G., Chondronikola, M., Beals, J. W., ... & Sirlin, C. B. (2020). Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(3).
- Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2016). Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Digestive diseases and sciences*, 61(5), 1282-1293.
- Softic, S., Meyer, J. G., Wang, G. X., Gupta, M. K., Batista, T. M., Lauritzen, H. P., ... & Fitzgerald, K. (2019). Dietary sugars alter hepatic fatty acid oxidation via

transcriptional and post-translational modifications of mitochondrial proteins. *Cell Metabolism*, 30(4), 735-753.

Sookoian, S., & Pirola, C. J. (2017). Systematic review with meta-analysis: risk factors for non-alcoholic fatty liver disease suggest a shared altered metabolic and cardiovascular profile between lean and obese patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 46(2), 85-95.

Stefan, N., Häring, H. U., & Cusi, K. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 7(4), 313-324.

Stefan, N., Häring, H., & Cusi, K. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease: Causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinology*, SS2213–SS2285.

Sullivan, S., Kirk, E. P., Mittendorfer, B., Patterson, B. W., & Klein, S. (2012). Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 55(6), 1738-1745.

Sun, S., Hanzawa, F., Umeki, M., Ikeda, S., Mochizuki, S., & Oda, H. (2018). Time-restricted feeding suppresses excess sucrose-induced plasma and liver lipid accumulation in rats. *PloS one*, 13(8), e0201261.

Takahashi, Y., Sugimoto, K., Inui, H., & Fukusato, T. (2015). Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(13), 3777.

Tiainen, S., Luoto, R., Ahotupa, M., Raitanen, J., & Vasankari, T. (2016). 6-mo aerobic exercise intervention enhances the lipid peroxide transport function of HDL. *Free radical research*, 50(11), 1279-1285.

Togo, J., Hu, S., Li, M., Niu, C., & Speakman, J. R. (2019). Impact of dietary sucrose on adiposity and glucose homeostasis in C57BL/6J mice depends on mode of ingestion: liquid or solid. *Molecular metabolism*, 27, 22-32.

Torres, J. C. F. C. (2006). Mecanismos de muerte celular y relevancia en hepatología. *Gastroenterología y hepatología*, 29(1), 81-88.

Van Herck, M. A., Vonghia, L., & Francque, S. M. (2017). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter's guide. *Nutrients*, 9(10), 1072.

Wang, M., Li, S., Wang, F., Zou, J., & Zhang, Y. (2018). Aerobic exercise regulates blood lipid and insulin resistance via the toll-like receptor 4-mediated extracellular

signal-regulated kinases/AMP-activated protein kinases signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 17(6), 8339-8348.

Wang, Y., & Xu, D. (2017). Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. *Lipids in health and disease*, 16(1), 1-8.

Wei, C., Penumetcha, M., Santanam, N., Liu, Y. G., Garelnabi, M., & Parthasarathy, S. (2005). Exercise might favor reverse cholesterol transport and lipoprotein clearance: potential mechanism for its anti-atherosclerotic effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1723(1-3), 124-127.

Wells, G. D., Selvadurai, H., & Tein, I. (2009). Bioenergetic provision of energy for muscular activity. *Paediatric respiratory reviews*, 10(3), 83-90.

Whitsett, M., & VanWagner, L. B. (2015). Physical activity as a treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *World journal of hepatology*, 7(16), 2041.

Wooten, J. S., Nick, T. N., Seija, A., Poole, K. E., & Stout, K. B. (2016). High-fructose intake impairs the hepatic hypolipidemic effects of a high-fat fish-oil diet in C57BL/6 mice. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 6(4), 265-274.

Yang, K. C., Hung, H. F., Lu, C. W., Chang, H. H., Lee, L. T., & Huang, K. C. (2016). Association of non-alcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome independently of central obesity and insulin resistance. *Scientific reports*, 6, 27034.

Yang, Z. H., Miyahara, H., Takeo, J., & Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & metabolic syndrome*, 4(1), 32.

Yilmaz, B., Sahin, K., Bilen, H., Bahcecioglu, I. H., Bilir, B., Ashraf, S., ... & Kucuk, O. (2015). Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 4(3), 161.

Yki-Järvinen, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 2(11), 901–910.

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L. & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84.

- Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., ... & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 15(1), 11.
- Yuan, H., Niu, Y., Liu, X., Yang, F., Niu, W., & Fu, L. (2013). Proteomic analysis of skeletal muscle in insulin-resistant mice: response to 6-week aerobic exercise. *PloS one*, 8(1).
- Zhao, M., Shen, X., Li, X., Chen, B., Fan, L., Xia, Q., & Zhao, L. (2019). Chitooligosaccharide supplementation prevents the development of high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice via the inhibition of cluster of differentiation 36 (CD36). *Journal of functional foods*, 57, 7-18.
- Zheng, F., & Cai, Y. (2019). Concurrent exercise improves insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease by upregulating PPAR- $\gamma$  and genes involved in the beta-oxidation of fatty acids in ApoE-KO mice fed a high-fat diet. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1-8.
- Zhou, S., Wang, Y., Jiang, Y., Zhang, Z., Sun, X., & Yu, L. (2017). Dietary intake of structured lipids with different contents of medium-chain fatty acids on obesity prevention in C57BL/6J mice. *Journal of food science*, 82(8), 1968-1977.
- Zivkovic, A. M., German, J. B., & Sanyal, A. J. (2007). Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *The American journal of clinical nutrition*, 86(2), 285-300.

## ANEXOS

Tuve la oportunidad de cursar una certificación del uso responsable de animales del laboratorio del 01 de abril al 29 de abril del 2019.



# Aula Virtual Bioterio



Formación Profesional para el Uso Responsable de los Animales de Laboratorio

Certifica que

**Tania Daniela Salinas Garza**

Ha aprobado el Curso Modalidad Virtual

**“Procedimientos Experimentales en ratas, ratones y conejos”**

Realizado del 1 de abril al 29 de abril de 2019.

Carga horaria: 40 horas

Calificación: 90/100

  
María Emiliana Herrero  
TUTORA

  
Micaela María Ricca  
TUTORA

  
Ana Carolina Mourelle  
COORDINADORA GENERAL

[www.labanimalstraing.com](http://www.labanimalstraing.com)