

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía
Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales



**Efecto de Triglicéridos de Cadena Media en el Hígado Graso No
Alcohólico Inducido en un Modelo Murino**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

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

Presenta:

L.N. Edith Julianna Urías García

Directores de Tesis:

Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez
Dra. Diana Angelina Urías Lugo

Culiacán, Sinaloa

Noviembre, 2020

APROBACIÓN

Título de la tesis

Efecto de Triglicéridos de Cadena Media en el Hígado Graso No Alcohólico Inducido en un Modelo Murino

Autor

Edith Julianna Urías García

Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez
Directora de tesis

Dra. Diana Angelina Urías Lugo
Directora de tesis

MONICA CASTRO ACOSTA

Dra. Mónica Lizzette Castro Acosta
Miembro del Comité de tesis

Dra. Perla Yareli Gutiérrez Arzapalo
Miembro del Comité de tesis

Alicia Ochoa

Firmado digitalmente por
M.C. Dora Alicia Ochoa
Acosta
Fecha: 2020.11.17
09:23:07 -07'00'

MC. Dora Alicia Ochoa Acosta
Miembro del Comité de tesis

DERECHOS DE AUTOR



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa el día 13 del mes noviembre del año 2020, la que suscribe la C. Edith Julianna Urías García alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales con número de cuenta 0361878-1, de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez y la Dra. Diana Angelina Urías Lugo y cede los derechos del trabajo titulado "Efecto de Triglicéridos de Cadena Media en el Hígado Graso No Alcohólico Inducido en un Modelo Murino", 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.



Edith Julianna Urías García

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Sinaloa por ser parte de mis estudios académicos, principalmente a la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, en donde concluí mis estudios universitarios y ahora de posgrado. De igual manera, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su financiamiento económico durante dos años de posgrado.

Agradezco enormemente a mis directoras de tesis, la Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez y la Dra. Diana Angelina Urías Lugo, quienes siempre estuvieron al pendiente en este proyecto, gracias por sus enseñanzas, apoyo y comprensión durante esta trayectoria, sin ellas no habría sido posible la realización de este proyecto.

Al Dr. Francisco Cabrera Chávez, primero que nada, por haberme compartido un espacio en su laboratorio, tanto para el resguardo de los animales, así como para utilización de materiales y equipo. Gracias por su paciencia, por impulsarme a seguir adelante y compartir sus experiencias.

A mis asesoras de tesis, la Dra. Mónica Lizzette Castro Acosta, la Dra. Perla Yareli Gutiérrez Arzapalo y la MC. Dora Alicia Ochoa Acosta, les agradezco por estar al pendiente del proyecto, así como por compartir sus experiencias y valiosas asesorías.

Quiero darles un especial agradecimiento a la MC. Melissa Vega, MC. Carolina Plazas, MC. Gilberto Aramburo, MC. Jesús Espinoza, Dr. Giovanni Ramírez y Dr. Feliznando Cárdenas, quienes siempre estuvieron disponibles para resolver alguna duda, apoyar en alguna técnica y brindar sus experiencias, todos ellos aportaron su granito de arena en este proyecto.

Quiero agradecer a mi equipo de investigación, Alexmy, Daniela, Rosabel, Kirenia, Anett, Francisco, Melissa, Carolina, Alicia, de quienes obtuve un gran apoyo durante

la realización del proyecto, apoyándome y participando en actividades indispensables al proyecto, dejando de lado la hora, el día o el lugar para brindarme una mano. Así como a mis compañeros de posgrado, Jesús Espinoza, Aristeo López, y a mis amigas Daniela Salinas, Ana Isabel Amaral y Marce Inzunza, quienes han formado parte importante de mi vida y siempre han estado ahí para apoyarme tanto en cuestiones de investigación como personales.

Al Dr. Edith Torres de la Facultad de Biología, de quien obtuvimos apoyo para la preparación del tejido hepático para su posterior análisis histopatológico en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas con el apoyo del Dr. Ulises Osuna.

A mi familia, a mis padres, gracias por impulsarme a salir adelante, por estar ahí en mis mejores momentos, así como de estrés y crisis existenciales, a mi esposo y a mi hijo, por tenerme paciencia cuando me necesitaban, pero comprendían porque sabían que estaba ocupada, jamás me alcanzarían las palabras para agradecerles, pero sé lo afortunada que soy por tenerlos en mi vida. A mis hermanos y cuñados, gracias por despejar mi mente del estrés, siempre con bromas, risas y momentos inolvidables.

Agradezco infinitamente a Dios, por todo lo que me ha dado, por las bendiciones que me rodean y las personas que amo y me aman.

ÍNDICE

DERECHOS DE AUTOR.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico.....	4
Definición	4
Lipogénesis de Novo	5
Alteraciones metabólicas	7
Colesterol	7
Lipoproteínas.....	8
Triglicéridos	9
Resistencia a la insulina	10
Enzimas Transaminasas	10
Prevalencia	11
Factores de riesgo	11
Diagnóstico	12
Tratamiento.....	12
Triglicéridos de Cadena Media.....	13
Metabolismo de TCM.....	14

Modelos Murinos Experimentales de HGNA	15
Dieta Alta en Sacarosa	16
Metabolismo de la sacarosa	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Diseño del Experimento	21
Descripción de las Metodologías de las Variables de Estudio	23
Peso Corporal	23
Colesterol Total (CT).....	23
Colesterol HDL (c-HDL)	23
Triglicéridos (TG)	24
Glucosa.....	24
Insulina	24
Resistencia a la Insulina (HOMA-IR)	25
Enzima Alanino Aminotransferasa (ALT)	25
Enzima Aspartato Aminotransferasa (AST)	26
Triglicéridos hepáticos	26
Histología Hepática.....	27
Análisis histopatológico de tejido hepático	28
Determinación de grado de esteatohepatitis no alcohólica.....	29
Análisis Estadístico	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31

Peso corporal.....	31
Diferencias de peso corporal entre los grupos.....	33
Colesterol Total (CT).....	35
Colesterol HDL (c-HDL)	38
Triglicéridos en suero.....	41
Glucosa sérica	43
Insulina sérica	45
Resistencia a la Insulina, HOMA-IR.....	47
Enzima Alanino aminotransferasa (ALT)	49
Enzima Aspartato aminotransferasa (AST).....	51
Peso de hígado.....	53
Triglicéridos hepáticos	55
Análisis histopatológico de tejido hepático.....	57
Determinación de grado de EHNA.....	57
Grupo control.....	59
Grupo sacarosa.....	61
Grupo TCM.....	63
Grupo sacarosa + TCM	65
CONCLUSIONES.....	67
REFERENCIAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferencia de peso corporal entre los grupos.	34
Figura 4. Triglicéridos en suero, en tiempo basal y final.	42
Figura 5. Glucosa en suero, en tiempo basal y final.	44
Figura 6. Insulina en suero, tiempo basal y final.	46
Figura 7. Cálculo de evaluación HOMA-IR, tiempo basal y final.	48
Figura 8. Enzima ALT en suero, en tiempo basal y final.	50
Figura 9. Enzima AST en suero, en tiempo basal y final del tratamiento.	52
Figura 10. Peso de hígado de los grupos de tratamiento.	54
Figura 11. TG hepáticos.	56
Figura 12. Histología grupo control.	60
Figura 13. Histología grupo sacarosa.	62
Figura 14. Histología grupo TCM.	64
Figura 15. Histología grupo sacarosa + TCM.	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de Puntuación Histológica de la Red de Investigación Clínica sobre EHNA.	30
Tabla 2. Resultados de peso corporal de los ratones.	32
Tabla 3. Resultados de grado de actividad de EHNA, en los diferentes grupos de tratamiento.	58

RESUMEN

El Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) involucra un mecanismo multifactorial en el que la alteración en el metabolismo de lípidos causa daño hepático. Numerosos estudios han demostrado que la administración de Triglicéridos de Cadena Media (TCM), en la enfermedad de HGNA, contribuyen en la mejora de la esteatosis hepática.

Objetivo general: Evaluar el efecto de los TCM en el HGNA, inducido por sacarosa, en ratones de la cepa C57BL/6n. **Metodología:** Se utilizaron 40 ratones macho C57BL/6n, a los que se les indujo el HGNA. Los ratones con HGNA sobrevivientes se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n=6) y fueron intervenidos por 10 semanas con dieta estándar o con la adición de TCM *ad libitum*: grupo 1: control, (dieta estándar y agua); grupo 2: TCM, (TCM); grupo 3: sacarosa, (alta en sacarosa); y grupo 4: sacarosa con TCM, (dieta alta en sacarosa y TCM). El peso corporal se registró semanalmente. Al inicio y al final de la intervención se analizó: Colesterol Total (CT), Colesterol HDL (c-HDL), Triglicéridos (TG), glucosa, insulina, Alanino Aminotransferasa (ALT) y Aspartato Aminotransferasa (AST) y se calculó el Modelo de Homeostasis de Resistencia a la Insulina (HOMA-IR). Al término de la intervención, se recolectó el hígado, se analizó su peso, se cuantificaron TG, y se analizó la histología hepática. **Resultados:** Se encontró una disminución significativa de peso corporal en el grupo TCM comparado con el grupo control (p=0.0361). El CT, aumentó significativamente al final de la intervención en el grupo TCM comparado con el grupo control (p=0.0014). El c-HDL aumentó significativamente en el grupo TCM en tiempo final comparado con el tiempo basal (p<0.0001). Se encontró una disminución significativa en la glucosa, en el tiempo final, en el grupo TCM comparado con el grupo sacarosa (p=0.0253). ALT y AST aumentaron significativamente en el tiempo final del grupo TCM comparado con el grupo control (ALT, p=0.0365; AST, p=0.0040). El grupo TCM disminuyó significativamente en los TG hepáticos comparado con el grupo control (p=0.0084). En el análisis histopatológico del hígado el grupo control desarrolló grado 4 de Esteatohepatitis No Alcohólica (EHNA), el grupo sacarosa grado 2, el grupo TCM grado 3 y el grupo sacarosa + TCM grado 6. **Conclusiones:** el tratamiento con 25

mL/kg/día de TCM, durante 10 semanas, redujo la EHNA en ratones C57BL/6n con HGNA en el grupo TCM en comparación con el grupo control, así como la administración de TCM mejoró significativamente los niveles de c-HDL, glucosa en suero, TG hepáticos, aumentaron significativamente el CT, ALT y AST. Se encontró una mejoría en los resultados tras el consumo de TCM, tanto en suero como en tejido hepático, sin embargo, las concentraciones de las transaminasas se elevaron al final de la intervención, por lo que consideramos importante que para recomendar ampliamente el consumo de TCM se necesitan realizar más estudios de investigación.

Palabras clave: sacarosa, hígado graso no alcohólico, triglicéridos de cadena media, ácidos grasos de cadena media, esteatosis hepática, ratones C57BL/6n, resistencia a la insulina, enzimas hepáticas.

INTRODUCCIÓN

El Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) es una manifestación hepática del Síndrome Metabólico (SM) y afecta al 25-30% de la población en general, siendo los factores de riesgo casi idénticos a los del SM. El desarrollo natural de la enfermedad implica progresión a cirrosis y cáncer hepatocelular. El aumento en la aparición de HGNA por encima de otras enfermedades hepáticas han inspirado a la ciencia a cambiar el enfoque clínico de la enfermedad, ya que la enfermedad ha entrado en conjunto con cirrosis y cáncer hepatocelular como la segunda causa de trasplante de hígado en Estados Unidos (Bellentani, 2017).

Actualmente, ha surgido la controversia acerca de la ingesta de Hidratos de Carbono (HCO) dietarios en los efectos metabólicos a nivel hepático. Específicamente, se habla de la fructosa, ya que se ha demostrado su relación con el aumento en la concentración de Triglicéridos (TG) en plasma y estimula la Lipogénesis de Novo (LDN) a nivel hepático (Riveros, Parada, & Pettinelli, 2014). Dicho lo anterior, los Triglicéridos de Cadena Media (TCM) han creado gran interés en especial por su posible papel en el tratamiento y prevención en enfermedades relacionadas al metabolismo lipídico, ya que se ha reportado que los TCM no participan directamente en la LDN (Sáyago-Ayerdi, Vaquero, Schultz-Moreira, Bastida, & Sánchez-Muniz, 2008).

Es por esto, que la justificación del proyecto de investigación se basa, en que el hígado graso no alcohólico es un problema de salud que afecta a la población, y al ser una enfermedad generalmente asintomática pasa desapercibida durante su fase inicial, lo cual permite que progrese la enfermedad y pueda causar graves daños en la funcionalidad hepática.

Según lo reportado por la ENSANUT, 2018, en México, el 75.2% de la población adulta padece obesidad, y el 10.3% cuenta con diagnóstico de diabetes. El hígado graso al estar asociado a desarrollarse en estas enfermedades, y derivado a la alta incidencia a nivel nacional, presenta una probabilidad elevada de existir sin diagnóstico. Aunado a esto, un consumo elevado de hidratos de carbono, principalmente simples,

contribuyen en su desarrollo, y la dieta mexicana está basada principalmente por este macronutriente. En ese contexto, el presente proyecto de investigación se concentró en inducir el HGNA en ratones de la cepa C57BL/6n con una solución de sacarosa al 50%, simulando lo que pudiera ocurrir en casos clínicos, para posteriormente desarrollar una intervención con TCM y evaluar sus efectos en parámetros bioquímicos en suero, así como en el tejido hepático.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El hígado es uno de los principales órganos del cuerpo humano, ya que es responsable de realizar múltiples funciones. Es un órgano de fisiología compleja, y se destacan sus funciones vasculares, metabólicas, secretoras y excretoras (Manterola, del Sol, Ottone, & Otzen, 2017), por lo que cualquier deterioro o afección en dicho órgano, también afectaría a todo el organismo, provocando un significativo desajuste de su funcionalidad e inclusive la muerte (Alwahsh & Gebhardt, 2017). Se localiza principalmente en el cuadrante superior derecho del abdomen, y se encuentra protegido por la caja torácica y el diafragma. El hígado se divide en 4 lóbulos, derecho, izquierdo, caudado y cuadrado. Los lóbulos derecho e izquierdo son los más grandes, mientras que los lóbulos caudado y cuadrado son más pequeños y se encuentran en la parte posterior del órgano. En la parte inferior del lóbulo caudado, se encuentra la porta hepática, donde la vena porta hepática y la arteria hepática ingresan al hígado (Wakim, 2017).

Las estructuras primarias que se encuentran en el lóbulo hepático son:

- Hepatocitos, que forman la mayor parte del lóbulo
- Triadas portales, en cada esquina del hexágono
- Vena central
- Macrófagos hepáticos (células de Kupffer)
- Sinusoides hepáticos, que van desde la vena central hasta las estructuras porta hepática
- Canalículos biliares, que se forman en las paredes de los hepatocitos adyacentes
- Espacio de Disse, entre los sinusoides y los hepatocitos se encuentra este pequeño espacio

Las triadas portales o estructura porta hepática están compuestas de una arteria hepática, una vena porta hepática y un conducto biliar (Kanel, 2009; Manterola et al., 2017; Wakim, 2017). A medida que la sangre fluye a través de los sinusoides y el espacio de Disse, los hepatocitos almacenan los nutrimentos contenidos en la sangre

y las células de Kupffer atrapan y degluten las células sanguíneas desgastadas y las bacterias (Wakim, 2017).

Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico

Definición

Una afectación muy común en el hígado es la enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico (HGNA), el cual ha sido considerado como una manifestación hepática del Síndrome Metabólico (SM) (Lonardo, Ballestri, Marchesini, Angulo, & Loria, 2015; Takahashi, Sugimoto, Inui, & Fukusato, 2015), en donde su característica principal es la acumulación de triglicéridos en el hígado en personas que no presentan un excesivo consumo de alcohol, cuya ingesta sea inferior a 30 g por día para hombres y 20 g por día para mujeres (Softic, Cohen, & Kahn, 2016; Velarde-Ruiz Velasco et al., 2019), por lo que la enfermedad no está asociada a la ingesta del mismo (Takahashi et al., 2015). El término de HGNA ha sido utilizado para denominar diferentes afecciones hepáticas, que van desde una esteatosis simple, esteatohepatitis, fibrosis y finalmente cirrosis hepática, que incluso puede progresar a carcinoma hepatocelular (Caro-Sabido & Larrosa-Haro, 2019; Kucera & Cervinkova, 2014; Loza-Medrano, Baiza-Gutman, Ibáñez-Hernández, Cruz-López, & Díaz-Flores, 2019).

La hipótesis que ha sido más aceptada para explicar el desarrollo de HGNA es la “teoría de los dos impactos”, en donde el primer impacto está relacionado con los ácidos grasos provenientes de la dieta, la lipólisis y la lipogénesis de novo (Loza-Medrano et al., 2019; Takaki et al., 2014). De la síntesis de ácidos grasos, además de los provenientes de circulación, son esterificados para formar Triglicéridos (TG), que encontrándose en sobreproducción, son acumulados en los hepatocitos, lo cual genera una lipoperoxidación, y en conjunto con las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), generan un estrés oxidativo, provocando un daño hepático

importante. Este daño hepático conlleva a la liberación de enzimas transaminasas e inflamación en el hígado. Tanto la inflamación como el estrés oxidativo son el segundo impacto del HGNA, favoreciendo la progresión hacia Esteatohepatitis No Alcohólica (EHNA) con o sin presencia de fibrosis hepática, siendo el tercer estímulo que se encuentra asociado a la progresión de cirrosis hepática. En esta etapa el daño al hígado es irreversible y con gran margen de progresar hacia cáncer hepatocelular (Loza-Medrano et al., 2019).

En la histología del hígado, la concentración normal de grasa en los hepatocitos debe ser inferior al 5%, y las cantidades que sobrepasan este valor se clasifican como esteatosis. Además, la acumulación excesiva de TG en los hepatocitos demuestra la formación de HGNA (Loza-Medrano et al., 2019). La característica más importante en la histología del HGNA es la esteatosis en los hepatocitos, la cual es clasificada como macrovesicular y microvesicular. La esteatosis macrovesicular se caracteriza por la formación de grandes vacuolas que ocupan casi todo el citoplasma de los hepatocitos, empujando el núcleo hacia la periferia de la célula; en cambio, la esteatosis microvesicular, se caracteriza por la formación de múltiples vacuolas pequeñas que permiten que el núcleo permanezca en el centro de la célula. Estas vacuolas o gotas de lípidos, comúnmente se presentan en el citosol, y están compuestas de TG envueltos por una monocapa de fosfolípidos. En condiciones fisiológicas, estos lípidos ayudan a la generación de energía que puede ser utilizada como sustrato para la síntesis de la membrana celular, pero en exceso, puede ocasionar daño hepatocelular (Willebrords et al., 2015).

Lipogénesis de Novo

El mecanismo más investigado del metabolismo de los lípidos hepáticos en relación con el desarrollo de HGNA ha sido la lipogénesis de novo.

Como consecuencia de la ingesta de alimentos, los HCO captados del alimento, se utilizan preferentemente para la formación de ATP, pero cuando la ingesta de HCO es

excesiva, la vía de lipogénesis de novo los convierte en Ácidos Grasos (AG), que al mismo tiempo, pueden ser esterificados en TG en el hígado. De igual manera, el aumento de insulina y glucosa en sangre, que derivan de la Resistencia a la Insulina (RI), favorecen la conversión de glucosa en AG, al aumentar la expresión de enzimas glucolíticas y lipogénicas, por medio de la activación de los factores de transcripción, SREBP-1c (proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides), ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) y LXR (receptor X hepático). LXR es un receptor nuclear y el principal regulador de la lipogénesis de novo, capaz de controlar a los genes que codifican los factores de transcripción SREBP-1c y ChREBP. Al mismo tiempo, SREBP-1c también responde a los altos niveles de insulina en sangre, y los metabolitos de glucosa, que se encuentran en exceso en los hepatocitos, inducen la expresión de ChREBP. Una vez activados estos factores de transcripción y el receptor nuclear LXR, incrementan la expresión de genes que codifican enzimas que se encuentran implicadas en la glucólisis, en la síntesis de AG y en la síntesis de TG, dando como resultado un aumento en el depósito de grasa, y conjunto con los AG libres que son captados por el hígado, da lugar a la esteatosis hepática. La conversión de glucosa en AG incluye la entrada del piruvato procedente de la glucólisis al ciclo de Krebs dentro de la mitocondria. El citrato resultante es transportado al citosol, en donde se convierte a acetil-CoA por la ATP citrato-liasas (ACL). Al mismo tiempo, la acetil-CoA-carboxilasa (ACC1), la cual es la primer enzima limitante de la lipogénesis de novo, convierte el acetil-CoA en malonil-CoA, y se transforma en palmitoil-CoA, por acción del ácido graso-sintasa (FAS). La desaturación del ácido palmítico puede ser mediante la acción de las enzimas elongasa de larga cadena 6 (ELOLV6) y estearil-CoA-desaturasa-1 (SCD1), para finalmente, las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (GPAT), 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas (AGPATs), la lipina 1 y la DGAT2, que catalizan la esterificación de los acil-CoA sobre los carbonos 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato respectivamente, sintetizan glicerolípidos. Así como LXR, SREBP-1c y ChREBP son inductores de la expresión de los genes lipogénicos y glucolíticos que participan en la lipogénesis de novo (López-Oliva Muñoz & Muñoz Martínez, 2014).

Alteraciones metabólicas

Colesterol

El colesterol es un esteroide que se encuentra en las membranas de las células, en donde participa modulando la fluidez, permeabilidad y función de la misma, siendo el elemento estructural básico del esqueleto de las membranas celulares. Las dos principales fuentes de colesterol celular provienen de la síntesis de novo y la captación de lipoproteínas plasmáticas. El colesterol se sintetiza a partir de la acetil-CoA, por medio de un proceso de más de 30 reacciones enzimáticas. La enzima Hidroximetilglutaril Co-A Reductasa (HMGCR) es la enzima reguladora de la síntesis de colesterol, y diversos estudios han demostrado que la expresión y actividad de esta enzima se incrementa en el hígado en personas con EHNA, y también se ha demostrado que la expresión de la enzima presenta una correlación directa con la acumulación de colesterol y daño hepático en HGNA, dejando a la HMGCR como una posible pieza clave para el desarrollo de EHNA, por medio de la acumulación de colesterol. Actualmente, se ha considerado al Colesterol Libre (CL) como clave en la progresión de HGNA, ya que se ha reportado que el CL puede causar disfunción mitocondrial, al modificar la permeabilidad de las membranas, así como activar las Células de Kupffer (CK) y Células Estrelladas Hepáticas (CEH), induciendo inflamación y fibrosis, y que dichas características son representativas de EHNA. La activación de estas células junto con la producción de citocinas pro-inflamatorias es derivada de la formación de cristales de colesterol presentes en las gotas de lípidos. Una propuesta del mecanismo de los cristales de colesterol en el desarrollo de EHNA está basada en que la cristalización del colesterol ocurre en los hepatocitos en la periferia de las gotas grandes de lípidos, lo cual provoca la activación del inflamasoma NLRP3 y en consecuencia aumenta la producción de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias. En respuesta de señales quimiostáticas que producen los hepatocitos, las CK se van agregando a los hepatocitos necróticos que contienen cristales de colesterol, formando estructuras tipo corona. La exposición de las CK a los cristales de colesterol provoca

la activación del inflamasoma NLRP3 en las CK, conduciendo a la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, promoviendo la inflamación crónica. Las CK que están expuestas a CL se transforman a células espumosas activadas cargadas de lípidos. Las señales quimiostáticas que se produce por la activación de las CK atrae infiltrado inflamatorio adicional de otras CK y neutrófilos, así como la transformación de las células estrelladas en miofibroblastos productoras de colágeno, lo cual ocasiona fibrosis y posteriormente progresando hacia cirrosis hepática. La activación de las células estrelladas participa en varios procesos relacionados con la formación de fibrosis en el desarrollo del HGNA. Como se mencionó anteriormente, el CL intracelular que se encuentra en acumulación en los hepatocitos, activa directamente las CEH, volviéndolas sensibles a la inducción por el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β , por sus siglas en inglés). Como consecuencia, se inician procesos fibrogénicos mediados por el Receptor Tipo Toll-4 (TLR4, por sus siglas en inglés), ocasionando un incremento en la fibrosis en la EHNA (Vega-Badillo, 2017).

Lipoproteínas

Se ha relacionado al HGNA con un alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Diversos estudios han reportado que la presencia de HGNA de gravedad, eleva el riesgo cardiovascular (Yang, Sung, & Gwak, 2016).

Las lipoproteínas son estructuras esféricas encargadas del transporte de lípidos insolubles en el torrente sanguíneo, están compuestas por apolipoproteínas, fosfolípidos, CL y, en el núcleo se encuentran elementos hidrofóbicos como TG y ésteres de colesterol (Argüeso Armesto et al., 2011). Existen cuatro clases mayores de lipoproteínas en sangre: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés). Las principales funciones de los quilomicrones son el transporte de TG a tejidos vitales, como el corazón, músculo esquelético y tejido adiposo). Las VLDL son secretadas por el

hígado y se encargan de excretar TG al tejido adiposo, corazón y músculo esquelético. Las LDL se encargan de transportar colesterol hacia las células y las HDL de retirar el colesterol de las células y regresarlo al hígado, este proceso de retirar el colesterol y llevarlo al hígado es conocido como transporte reverso de colesterol (Carvajal, 2014).

También podemos encontrar apolipoproteínas, las cuales son proteínas específicas que tienen diversos comportamientos (Zavala, 2000), la apolipoproteína B (apoB) se encuentra en LDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus siglas en inglés) y en VLDL. Por otro lado, la apolipoproteína A1 (apoA1) es la principal lipoproteína de las HDL (Yang et al., 2016). Las apolipoproteínas pueden unir los lípidos en las lipoproteínas (apo-AI, apo-AII, apo-B48 y apo-B100), realizan funciones de ligandos para unir lipoproteínas a sus receptores (apo-AI, apo-B100 y apo-E), actúan como inhibidores para evitar interacciones con receptores de lipoproteínas (apo-CI y apo-CIII), pueden modular la actividad enzimática en el metabolismo de las lipoproteínas (familias apo-AI, AII y apo-CI y CII), y tienen funciones como cofactores para el transporte de lípidos entre las lipoproteínas (apo-A IV) (Zavala, 2000).

Triglicéridos

En HGNA, los principales lípidos almacenados en el hígado son los TG (Pedro-Botet & Pedragosa, 2011). Además de la oxidación de ácidos grasos, la exportación de TG por medio de lipoproteínas VLDL, es la única forma de reducir el contenido de lípidos hepáticos (Ipsen, Lykkesfeldt, & Tveden-Nyborg, 2018), por lo que la acumulación de lípidos en el hígado es debido a que la síntesis de TG hepáticos supera el catabolismo hepático de los mismos (Perla, Prelati, Lavorato, Visicchio, & Anania, 2017).

Resistencia a la insulina

El HGNA es característico de la presencia de una infiltración grasa, en los hepatocitos, asociado a Resistencia a la Insulina (RI), encontrándose como factor de riesgo al SM. Se ha reportado que la RI es el primer acontecimiento que ocasiona un elevado flujo de Ácidos Grasos Libres (AGL) al hígado, por la reducción del efecto supresor de la lipólisis en el tejido adiposo por insulina.

Los reguladores fundamentales de la homeostasis glucídica y lipídica son los factores de transcripción SREBP-1c, ChREBP y LXR, en donde la activación de dichos factores de transcripción regula el aumento de genes implicados en la síntesis de novo de los AG en respuesta a glucosa, insulina y oxisteroles. La RI ha sido considerada como un inductor de daño hepático, por su capacidad de aumentar mediadores inflamatorios y tener efectos directos sobre las células estrelladas hepáticas (López-Oliva Muñoz & Muñoz Martínez, 2014).

Aunque la fisiopatología exacta de la RI no es muy clara, la RI presente en los hepatocitos ocasiona un aumento en la glucosa plasmática debido a la reducción en la síntesis de glucógeno (Yaribeygi, Farrokhi, Butler, & Sahebkar, 2019).

Enzimas Transaminasas

Las lesiones hepáticas comúnmente pueden ser diagnosticadas mediante la medición de las enzimas aminotransferasas, Alanino Aminotransferasa (ALT) y Aspartato Aminotransferasa (AST), en donde se encuentren concentraciones séricas muy elevadas (500-20,000 U/l), moderadamente elevadas (120-500 U/l) y elevaciones leves (<120 U/l). El HGNA y la EHNA se pueden diagnosticar por mediciones de elevaciones leves de enzimas aminotransferasas en suero. Las concentraciones que llegan a alcanzar las enzimas aminotransferasas en suero, están determinadas por la concentración intracelular y localización de la enzima, la cantidad liberada por la célula, y el grado de depuración de la circulación (to Barba Evia, 2008).

Prevalencia

En la actualidad, la prevalencia de HGNA es de mil millones de personas a nivel mundial (Perumpail et al., 2017), y se estima que el 25% de la población adulta se encuentra afectada por esta enfermedad (Stefan, Häring, & Cusi, 2019); en México, se ha estimado una prevalencia de HGNA del 17.1% de la población (López-Velázquez et al., 2014), mientras que en Sinaloa aún no hay registros de la prevalencia. Sin embargo estos datos pueden estar subestimando la realidad, ya que la enfermedad corre asintomática y en muchas ocasiones las personas desconocen tenerla o simplemente no acuden para valorar su diagnóstico.

En México, Estados Unidos y en diferentes países de Latinoamérica, han encontrado que la prevalencia de HGNA presenta una relación lineal con la prevalencia de obesidad, en donde concluyen que a mayor prevalencia de obesidad, existe la posibilidad de mayor prevalencia de HGNA (Caro-Sabido & Larrosa-Haro, 2019).

Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo del desarrollo de HGNA son similares a los componentes del Síndrome Metabólico (SM), en donde se incluye la obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemias y RI (Bellentani, 2017; Perumpail et al., 2017; Takahashi, Soejima, & Fukusato, 2012). La obesidad y la DM2 son consideradas como la expresión hepática del SM, por lo que la prevalencia de HGNA aumenta en paralelo con el de dichas enfermedades (Martín Domínguez, González Casas, Mendoza Jiménez-Ridruejo, García Buey, & Moreno-Otero, 2013).

El hígado graso puede tener diferentes etiologías, como los hábitos nutricionales, inactividad física, estrés crónico, estilo de vida, consumo de alcohol o fármacos, alteración en el metabolismo de los lípidos, entre otros, siendo al parecer, los factores no genéticos los que determinan la manifestación y severidad de la enfermedad (Takahashi et al., 2015). La causa más común del desarrollo de HGNA ha sido

atribuida al aumento en la ingesta calórica, que excede el gasto calórico, por lo que el estilo de vida continúa siendo el principal tratamiento en pacientes con HGNA (Alwahsh & Gebhardt, 2017), de igual manera, se ha demostrado que el HGNA se encuentra asociado principalmente con la obesidad (Alwahsh & Gebhardt, 2017).

Diagnóstico

El diagnóstico de HGNA se puede hacer mediante técnicas no invasivas, como ultrasonidos, ecografía abdominal, resonancia magnética, tomografía computarizada, entre otros, también puede realizarse mediante la medición de enzimas aminotransferasas (ALT y AST), sin embargo, hasta el momento, la biopsia hepática es la única técnica, aunque invasiva, que demuestra el cuadro histopatológico real y el grado de avance de la enfermedad (López-Oliva Muñoz & Muñoz Martínez, 2014).

Tratamiento

Los cambios en los hábitos nutricionales de las personas que padecen HGNA, han demostrado tener resultados favorables en el tratamiento y control de enfermedades metabólicas, ayudando a mejorar la recuperación y en general, la calidad de vida de quienes transitan por la enfermedad (Loza-Medrano et al., 2019). Sin embargo, el tratamiento involucra la combinación de una suma de alternativas, donde el tratamiento farmacológico continúa siendo indispensable, ya que las personas que lo padecen a menudo tienen dificultades de seguimiento y apego en los cambios del comportamiento y estilo de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad. Otro de los tratamientos para el HGNA, es el manejo terapéutico de los factores asociados con el desarrollo del SM, de DM2, de hipertensión arterial y así como de las dislipidemias presentes en personas con HGNA (Dyson, Anstee, & McPherson, 2014; Perumpail et al., 2017).

Triglicéridos de Cadena Media

Los Triglicéridos de Cadena Media (TCM), son ésteres de glicerol con Ácidos Grasos de Cadena Media (AGCM) de 6 a 12 carbonos, y han presentado varios beneficios fisiológicos debido a sus procesos de absorción y transporte gastrointestinal. La esterificación de AGCM es baja, y la mayoría de estos Ácidos Grasos (AG) se pueden absorber directamente debido a su mayor solubilidad en agua en comparación de los Triglicéridos de Cadena Larga (TGL). Los TCM pueden entrar directamente en los enterocitos y ser tomados y oxidados dentro de las células, además, los AGCM atraviesan la doble membrana mitocondrial muy rápidamente, y no necesitan de la presencia de carnitina, como en el caso de los Ácidos Grasos de Cadena Larga (AGCL) (L. L. Zhang, Zhang, Li, & Wang, 2017).

Los TCM están formados de una mezcla de ácido caproico (C6:0 0.1-2%), ácido caprílico (C8:0 50-80%), ácido cáprico (C10:0 20-50%) y ácido láurico (C12:0 0.1-2%), los cuales son AGCM que son esterificados con glicerol (Zhou, Wang, Jiang, et al., 2017) y, fueron introducidos por primera vez en 1950 para tratar desórdenes en la absorción de lípidos (Bach & Babayan, 2018; Seaton, Welle, Warenko, & Campbell, 1986). Además, se ha reportado, que los TCM reducen las concentraciones séricas de TG, CT, colesterol LDL y ácidos grasos libres (AGL) (Liu et al., 2011), y se ha sugerido que los TCM poseen efectos protectores sobre lesiones alcohólicas hepáticas, en donde se reportan aumentos en degradación de AG, disminución de la peroxidación de lípidos, reducción de la permeabilidad intestinal y la inhibición de la activación de las células de Kupffer inducida por endotoxinas. Aunado a esto, tomando en cuenta que las patologías del hígado graso alcohólico / esteatohepatitis alcohólica y EHNA / HGNA son similares, se ha sugerido que la suplementación dietética con TCM podría tener un efecto benéfico similar en las enfermedades de HGNA / EHNA (Ronis et al., 2013). La ingesta recomendada de TCM para humanos se encuentra alrededor de 30-100 g (Sáyago-Ayerdi et al., 2008) y, en un estudio de revisión de propiedades toxicológicas de TCM publicado por Traul y colaboradores, en 2000,

recomendaron dosis de TCM no mayores a 25 mL/kg para ratones y 36 mL/kg para ratas (Traul, Driedger, Ingle, & Nakhasi, 2000).

Metabolismo de TCM

Los AGCM existen en forma de TCM en la comida y aceites, estos TCM son hidrolizados a AGCM y glicerol por medio de la lipasa lingual o gástrica y la lipasa pancreática. A diferencia de los AGCL, los TCM son absorbidos directamente de la dieta en la vena porta hepática, y se cree que ingresan a las células hepáticas y mitocondrias por medio de difusión o por sistemas normales de transporte de AG, donde son degradados rápidamente para aumentar la termogénesis (Ronis et al., 2013). Por otro lado, los AGCL, con más de 12 carbonos, son unidos a quilomicrones que evitan el hígado a través del sistema linfático y se envían principalmente a tejidos extrahepáticos (Liu et al., 2011; Seaton et al., 1986; Zhou, Wang, Jacoby, Jiang, Zhang, Yu, et al., 2017).

Después de la absorción y transporte al hígado de los AGCM, pasan preferentemente a β -oxidación en las mitocondrias, y una gran parte del acetil-CoA producido en la oxidación de estos AG son sometidos a la formación de cuerpos cetónicos y en una pequeña proporción a los TG y fosfolípidos del hígado (Sáyago-Ayerdi et al., 2008).

Modelos Murinos Experimentales de HGNA

Los estudios en modelos animales han sido de gran utilidad para la investigación del HGNA, ya que han permitido la comprensión de procesos fisiopatológicos asociados a la enfermedad, sus características histológicas y el ensayo de nuevos tratamientos y terapias. Los modelos se pueden clasificar en dos grupos: los inducidos por agentes externos, como la dieta, fármacos o toxinas, y, los que son resultado de modificaciones genéticas, ya sean espontáneas o artificiales (Ayala et al., 2008).

Los roedores son los modelos *in vivo* más usados comúnmente en los estudios de esteatosis hepática, aunque existen diferencias mayores en el desarrollo de la lesión mitocondrial, la progresión de la esteatosis hepática y la producción de marcadores inflamatorios y TG entre especies, cepas y géneros (Willebrords et al., 2015). Los trabajos desarrollados en roedores, han utilizado principalmente ratones y ratas, por su similitud biológica con el humano y el conocimiento actual que se tiene acerca de estas especies (Ayala et al., 2008).

Los ratones de la cepa C57BL/6 han sido considerados útiles en la investigación del SM, ya que con la edad, estos ratones, son genéticamente propensos a desarrollar obesidad, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa, independientemente de la dieta que consuman (Anstee & Goldin, 2006). Las dietas con contenido elevado de HCO, han sido utilizadas para inducir esteatosis en modelos roedores. Diversos estudios han demostrado que concentraciones elevadas de sacarosa (más del 50%) durante 8 o más semanas, desarrollan obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis macrovesicular (Acosta-Cota et al., 2019; Anstee & Goldin, 2006).

Dieta Alta en Sacarosa

Actualmente, los malos hábitos nutricionales han aumentado en frecuencia y han estado apareciendo en edades más tempranas. Diversos estudios han demostrado que la ingesta en exceso de grasas y azúcares produce efectos nocivos en la salud. La investigación del consumo de azúcar adicional en los alimentos ha incrementado, debido al aumento del desarrollo de enfermedades metabólicas, y se ha encontrado una relación tanto directa como indirectamente. Directamente, la fructosa proveniente del azúcar es la causante de la desregulación en el metabolismo de lípidos e HCO. Indirectamente, el peso corporal, específicamente el aumento de grasa, también causa una desregulación en el metabolismo de estos macronutrientes, ya que el azúcar podría ser causante del equilibrio energético positivo, cuando su consumo es en exceso (Stanhope, 2016).

Es importante tomar en cuenta la forma en que se consuma el azúcar, ya sea en forma líquida o sólida. El azúcar en bebidas se digiere y se metaboliza en el hígado más rápidamente que el azúcar en alimentos sólidos, ya que tardaría un poco más en metabolizarse en comparación con los líquidos (Burke et al., 2018; Stanhope, 2016).

La sacarosa, es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa, ha sido considerada un estímulo que mejora el estado de alerta para muchos organismos, lo que ha ocasionado el aumento de su consumo. Durante los últimos 50 años, este aumento, se ha debido al incremento considerable en la ingesta de bebidas que contienen sacarosa (Burke et al., 2018), la cual representa una fuente secundaria de consumo de fructosa, ya que la ingesta de fructosa, ha ido en aumento en los últimos años, principalmente en industrias alimentarias, bajo la forma de jarabe de maíz alto en fructosa, gracias a su alto poder edulcorante. La fructosa es un monosacárido de 6 carbonos, con fórmula química $C_6H_{12}O_6$, que se encuentra presente de forma natural en frutas, verduras, miel y que, en la actualidad se utiliza para endulzar alimentos o bebidas light, néctares, etcétera. La glucosa y fructosa tienen una nomenclatura

similar, pero presenta diferencias en su metabolismo, ya que la fructosa, se absorbe más lentamente que la glucosa, pero es captada y metabolizada más rápidamente por el hígado (Riveros et al., 2014).

El incremento en el consumo de jarabe de maíz alto en fructosa se ha asociado con el desarrollo de ciertas patologías, como obesidad, hipertensión, HGNA, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Esto es gracias a su rápida absorción a nivel gastrointestinal, favoreciendo el incremento de las concentraciones de ácidos grasos, hiperuricemia, RI y estrés oxidativo por glucolipotoxicidad, que en conjunto favorecen el desarrollo de enfermedades metabólicas (Loza-Medrano et al., 2019).

Metabolismo de la sacarosa

Como se mencionó anteriormente, la sacarosa, es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa. Para que estos monosacáridos puedan ser captados por la célula, es necesaria la presencia de proteínas transportadoras dependientes de sodio (SGLT) o por difusión facilitada dependiente o no de insulina (GLUT). En el intestino delgado, el transportador SGLT-1, capta la glucosa presente, transportando una molécula de glucosa por dos moléculas de sodio, en cambio, la fructosa es captada por GLUT-2 y GLUT-5. Una vez que la glucosa captada pasa a circulación, es distribuida al hígado y posteriormente a otros tejidos y órganos, que cuenten con transportadores GLUT-1, 2 o 4, mientras que la fructosa, es ingresada al hígado a través de la vena porta hepática. Aproximadamente el 80% de la fructosa es metabolizada en el hígado, y es absorbida por GLUT-2, GLUT-5 y GLUT-8, en la superficie de los hepatocitos (Alwahsh & Gebhardt, 2017; Loza-Medrano et al., 2019). Posteriormente, la fructosa es convertida en fructosa-1-fosfato por medio de la enzima fructoquinasa, la fructosa-1-fosfato es convertida por la aldolasa en triosas fosfato, dihidroxiacetona fosfato (DHA-P) y gliceraldehído. La DHA-P participa de manera directa en la glucólisis, mientras que el gliceraldehído debe ser fosforilado, por medio de la triocinasa, para formar gliceraldehído-3-fosfato y entrar en la vía de la glucólisis. De esta manera, la fructosa participa en diversas vías metabólicas como la glucólisis, gluconeogénesis y

lipogénesis que, en caso de exceso energético a causa de una alta ingesta de fructosa, la DHA-P y el gliceraldehído participarán en la síntesis de ácidos grasos, por medio de la formación de acetyl-CoA. La DHA-P también puede ser convertida en gliceraldehído-3-fosfato y formar triglicéridos o glicerofosfolípidos (Loza-Medrano et al., 2019). En el caso del metabolismo de la glucosa, éste es regulado por medio de los niveles de citrato y de adenosin-5-trifosfato (ATP), los cuales inhiben a la fosfofructoquinasa para evitar la conversión de la fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bisfosfato. Además de la ingesta de fructosa, el principal precursor lipogénico son las triosas fosfato, las cuales pueden ser convertidas en piruvato, para entrar en el ciclo de Krebs y ser oxidado en la mitocondria a nivel hepático (Riveros et al., 2014).

HIPÓTESIS

La ingesta de 25 mL/kg/día de triglicéridos de cadena media, durante 10 semanas consecutivas, disminuye esteatosis hepática, triglicéridos hepáticos, colesterol total, glucosa, insulina, enzimas hepáticas ALT y AST, mejora colesterol HDL y el estado de resistencia a la insulina, en ratones de la cepa C57BL/6n con hígado graso no alcohólico inducido por una solución de sacarosa.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los Triglicéridos de Cadena Media (TCM) en el hígado graso no alcohólico, inducido por sacarosa, en ratones de la cepa C57BL/6n.

Objetivos Específicos

1. Generar el modelo murino de hígado graso no alcohólico, utilizando una solución de sacarosa al 50% durante 20 semanas.
2. Desarrollar intervención en ratones de la cepa C57BL/6n con hígado graso no alcohólico inducido, utilizando 25 mg/kg/día de TCM durante 10 semanas.
3. Analizar el efecto de los TCM en el peso corporal, perfil de lípidos, glucosa, insulina, HOMA-IR, enzimas transaminasas (ALT y AST) en suero, y triglicéridos en el tejido hepático.
4. Analizar el efecto de los TCM en la esteatosis hepática en ratones de la cepa C57BL/6n.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de este proyecto de investigación, se trabajó con ratones de la cepa C57BL/6n, dieta estándar, sacarosa, jaulas con rejillas, aserrín, biberones para agua, instalaciones de bioterio, balanza, kits bioquímicos de la marca RANDOX para el análisis de muestras en suero (CT, c-HDL, TG, glucosa), placas de ensayo ELISA para ratones de la marca ALPCO para análisis de insulina, material para análisis de TG hepáticos, tinciones especiales para tejido (hematoxilina y eosina), microscopio para el análisis de las histologías hepáticas, material y equipos correspondientes para el trabajo de laboratorio descrito para cada análisis, ordenador con software para recolección de datos y su procesamiento estadístico (Microsoft Office y GraphPad Prism V. 6). Los TCM que se utilizaron en la intervención del presente estudio fueron donados por la empresa CHEMREZ Technologies, cuyo contenido se basó en una mezcla de ácido caproico (2% máx.), ácido caprílico (55-70%), ácido cáprico (29-45%) y ácido láurico (3% máx.).

Diseño del Experimento

Se realizó un estudio experimental con 40 ratones macho de la cepa C57BL/6n, de 4 a 6 semanas de edad y fueron comprados a BIOINVERT, los cuales fueron resguardados en un bioterio, con control luz/oscuridad de 12 horas cada uno, así como control de temperatura de 22 ± 2 °C. Los ratones fueron divididos en jaulas con aserrín y tapaderas tipo rejillas, alimentación y bebida *ad libitum* por un periodo de adaptación de dos semanas. El alimento estándar administrado a los ratones fue Rodent Laboratory Chow 5001 de la marca Purina.

Para la inducción de HGNA, se utilizó una dieta alta en sacarosa, en forma de azúcar estándar de la marca LEY, administrada en una solución al 50% de sacarosa disuelta en agua simple, la cual bebieron *ad libitum* durante 20 semanas consecutivas. Se

realizó la inducción en este período de tiempo a base de publicaciones recientes que utilizaron el mismo método durante diferentes tiempos y demostraron que el mayor grado de HGNA se desarrolló en 20 semanas (Acosta-Cota et al., 2019; Plazas Guerrero et al., 2019).

Concluidas las 20 semanas de inducción de HGNA, los ratones sobrevivientes fueron divididos al azar en 4 grupos, con 6 ratones por grupo. Posteriormente se llevó a cabo la intervención la cual tuvo una duración de 10 semanas donde todos los ratones se alimentaron *ad libitum*. La elección de llevar a cabo 10 semanas de intervención se tomó a base de publicaciones recientes, que realizaron intervenciones con TCM de 8 a 12 semanas (Carlson et al., 2015; Geng et al., 2016; Guimarães, Bargut, Mandarim-de-Lacerda, & Aguila, 2019; Terada, Yamamoto, Sekine, & Aoyama, 2012; Zhou, Wang, Jiang, et al., 2017), por lo que se decidió utilizar el promedio de estos tiempos. El primer grupo, fue el grupo control, el cual consumió dieta estándar y agua; el segundo grupo, fue el grupo TCM, a los cuales se les administraron TCM en su dieta y agua *ad libitum*; el tercer grupo, fue el grupo sacarosa, el cual continuó con la dieta alta en sacarosa en el agua; y el cuarto grupo, fue el grupo sacarosa con TCM, el cual continuó con dieta alta en sacarosa en el agua y TCM.

Al inicio del tratamiento, se tomó una muestra de sangre de todos los ratones con previo ayuno de 12 horas, por medio de la cola. Las muestras de suero fueron resguardadas en un ultra congelador marca Thermo Scientific (USA) a -80°C , para posteriormente realizar las mediciones bioquímicas basales que incluían CT, c-HDL, TG, glucosa, insulina y enzimas transaminasas ALT y AST. Al término de la intervención, los ratones fueron anestesiados y sacrificados por punción intracardiaca para analizar el efecto del tratamiento en las variables bioquímicas antes mencionadas, el cálculo de HOMA-IR, así como las mediciones de TG en el tejido hepático y el análisis histopatológico de las muestras de hígado de los ratones de los diferentes grupos que participaron en el estudio.

Descripción de las Metodologías de las Variables de Estudio

Peso Corporal

Los ratones fueron pesados semanalmente desde el día cero hasta el último día del período de intervención.

Colesterol Total (CT)

Para la determinación de CT en suero se utilizaron kits de la marca RANDOX de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se analizaron mediante un espectrofotómetro modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific (USA) a una longitud de onda de 500 nm. En el procedimiento, se colocó en un tubo de ensayo un reactivo blanco, con 10 µL de agua destilada y 1000 µL del reactivo, en otro tubo de ensayo, 10 µL del patrón y 1000 µL del reactivo, y en un tercer tubo, 10 µL de la muestra y 1000 µL del reactivo. Se mezclaron e incubaron durante 10 minutos a una temperatura de 20-25 °C. Una vez pasado el tiempo de incubación, el contenido de los tubos se pasó a celdillas para medir la absorbancia directa en el espectrofotómetro antes de los primeros 60 minutos.

Colesterol HDL (c-HDL)

Para la determinación de c-HDL en suero, se utilizaron kits de la marca RANDOX, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y se analizaron mediante un espectrofotómetro modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific (USA) a una longitud de onda de 500 nm. El procedimiento consiste en un proceso de 2 etapas, en la primera etapa se realizó un precipitado de las moléculas de las lipoproteínas de alta densidad, en la cual se colocaron 500 µL de suero y 200 µL de reactivo precipitante en microtubos, se mezclaron e incubaron por 10 minutos a 20-25 °C, pasado el tiempo, se centrifugaron las muestras por 2 minutos a 12,000 rpm. En la segunda etapa, se

colocaron 100 μL del sobrenadante obtenido de la precipitación y 1000 μL de reactivo en un microtubo, se mezclaron e incubaron durante 10 minutos a 20-25 °C. Una vez pasado el tiempo de incubación, el contenido de los tubos se pasó a celdillas para medir la absorbancia directa en el espectrofotómetro antes de los primeros 60 minutos.

Triglicéridos (TG)

Para la determinación de TG en suero se utilizaron kits de la marca RANDOX de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se analizaron mediante un espectrofotómetro modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific (USA) a una longitud de onda de 500 nm. En el procedimiento se colocaron en un tubo de ensayo 1000 μL del reactivo, en otro tubo de ensayo, 10 μL del estándar y 1000 μL del reactivo, y en un tercer tubo 10 μL de la muestra y 1000 μL del reactivo. Se mezclaron e incubaron durante 10 minutos a 20-25 °C. Pasado el tiempo de incubación, se pasó el contenido de los tubos a celdillas para medir la absorbancia directa en el espectrofotómetro antes de los primeros 60 minutos.

Glucosa

Para la determinación de glucosa en suero se utilizaron kits de la marca RANDOX de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se analizaron mediante un espectrofotómetro modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific (USA) a una longitud de onda de 500 nm. En el procedimiento se colocaron en un tubo de ensayo 1000 μL del reactivo, y en otro tubo de ensayo 10 μL de la muestra y 1000 μL del reactivo. Se mezclaron e incubaron durante 10 minutos a 20-25°C. Pasado el tiempo de incubación, se pasó el contenido de los tubos a celdillas para medir la absorbancia directa en el espectrofotómetro antes de los primeros 60 minutos.

Insulina

Para la determinación de insulina, se utilizaron kits para ratones de la marca ALPCO, por el ensayo ELISA tipo sándwich. La microplaca de 96 pocillos está recubierta con un anticuerpo monoclonal específico para la insulina. Los estándares, controles y muestras se agregaron a los pocillos de la microplaca con el conjugado. Después, la microplaca se incubó 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. Posteriormente, se añadió el sustrato TMB, y la microplaca se incubó por segunda vez a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 700-900 rpm. Una vez que se completó la segunda incubación, se agregó la solución “stop” y se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro a 450 nm. La intensidad del color generado es directamente proporcional a la cantidad de insulina en la muestra. Los cálculos de la concentración de insulina se realizaron mediante una ecuación lineal, en donde se creó una curva estándar en el programa GraphPad Prism V.6, integrando en la misma los valores de los estándares incluidos en el kit y los valores de las muestras arrojados en el espectrofotómetro, en donde el programa generó el resultado.

Resistencia a la Insulina (HOMA-IR)

La evaluación del Modelo de Homeostasis de Resistencia a la Insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Schultz, Barbosa-Da-Silva, Aguila, & Mandarim-De-Lacerda, 2015):

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucosa en ayuno (mg/dL)} \times \text{insulina en ayuno (\mu IU/mL)} / 405.$$

Enzima Alanino Aminotransferasa (ALT)

Para la determinación de ALT en suero, se utilizaron kits de la marca RANDOX de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y se analizaron por medio de un

espectrofotómetro modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific (USA) a una longitud de onda de 340 nm. En el procedimiento se colocó, en un tubo de ensayo, 0.1 mL de la muestra y 1 mL del reactivo. Se mezclaron y se leyó la absorbancia al cabo de 1 minuto. Se leyó de nuevo la absorbancia al cabo de 1, 2 y 3 minutos. La variación de la absorbancia por minuto debe situarse entre 0.11 y 0.16, y para el cálculo se utilizaron solo los valores obtenidos durante los 2 primeros minutos. Para calcular la actividad de ALT se utilizó la siguiente fórmula: $U/I = 1746 \times$ la absorbancia de la muestra.

Enzima Aspartato Aminotransferasa (AST)

Para la determinación de AST en suero, se utilizaron kits de la marca RANDOX de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y se analizaron por medio de un espectrofotómetro modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific (USA) a una longitud de onda de 340 nm. En el procedimiento se colocó, en un tubo de ensayo, 0.1 mL de la muestra y 1 mL del reactivo. Se mezclaron y se leyó la absorbancia al cabo de 1 minuto. Se leyó de nuevo la absorbancia al cabo de 1, 2 y 3 minutos. La variación de la absorbancia por minuto debe situarse entre 0.11 y 0.16, y para el cálculo se utilizaron solo los valores obtenidos durante los 2 primeros minutos. Para calcular la actividad de AST se utilizó la siguiente fórmula: $U/I = 1746 \times$ la absorbancia de la muestra.

Triglicéridos hepáticos

Al finalizar la etapa de intervención, después de 10 semanas, todos los ratones fueron anestesiados de forma profunda utilizando una inyección intraperitoneal de pentobarbital y posteriormente fueron sacrificados por exanguinación por punción intracardiaca. Se recolectó la sangre y se centrifugó a 12,000 rpm, para la separación del suero. De igual manera, se realizó la extracción de hígado, se tomó su peso y se dividió para que una parte fuese almacenada en fresco y otra parte en formaldehído al 10%, para posteriormente realizar el análisis de histología. Tanto las muestras de

suero, como las de tejido hepático fresco fueron resguardadas en un ultra congelador marca Thermo Scientific (USA) a -80°C .

Para realizar la cuantificación de TG hepáticos, se pesaron 0.15 g de hígado, posteriormente fue picado y se les realizó una extracción de lípidos utilizando 3 mL de solución cloroformo:metanol (2:1). La mezcla fue homogeneizada por 2 minutos, sonicada por 30 segundos y sometida a agitación durante 2 horas. Posterior a la agitación, se añadió a la mezcla 1 mL de agua bidestilada y las muestras fueron centrifugadas por 20 minutos a 3,500 rpm. Se separó la fase lipídica y se incubó toda la noche por 12 horas. Al siguiente día, los lípidos fueron disueltos en etanol absoluto y filtrados en un filtro de $0.22\ \mu\text{m}$ (Zhou, Wang, Jacoby, Jiang, Zhang, & Yu, 2017). Finalmente, los niveles de TG fueron medidos con kits de la marca RANDOX, número de referencia TR1697, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las muestras se analizaron de manera directa mediante un espectrofotómetro modelo Genesys 10 UV, Thermo Scientific (USA) a una longitud de onda de 500 nm.

Histología Hepática

La histología hepática es un procedimiento necesario para la determinación y estado del tejido hepático y de los hepatocitos. Para realizarlo, se necesitan varias etapas y mantener en previo almacenamiento un trozo de tejido hepático en solución de formaldehído al 10%. Al momento de comenzar con el procedimiento, los tejidos hepáticos se colocan en cassettes especiales para este procedimiento y se dejan en formaldehído puro durante 72 h para lograr que se impregne el tejido y se fije adecuadamente. Pasado el tiempo, se comienza con la deshidratación del tejido, el cual es expuesto a diferentes concentraciones de alcohol durante 1 hora cada concentración (alcohol al 70%, nuevamente al 70%, 80%, 95%, 100% y de nuevo 100%), posteriormente, se colocaron las muestras en una solución de xileno:etanol 1:1 y en 2 ocasiones xileno puro (1 hora cada uno), después se realizaron 2 baños de parafina de 1 hora cada baño, al terminar, comienza la siguiente etapa, la cual es la

formación de bloques de parafina. En un molde se colocó un poco de parafina líquida e inmediatamente se colocó el tejido en el mismo, se cubrió con la parte rotulada del cassette y se añadió más parafina. Posteriormente, se colocó en una plancha fría para que se solidificara y se dejó aproximadamente durante 15 minutos. Una vez solidificado, se separaron los bloques de parafina de los moldes y se almacenaron hasta su posterior uso. La siguiente etapa es la realización del corte del tejido, en donde se realizaron cortes de 7 μm y se colocaron en portaobjetos. La siguiente etapa es la desparafinización, en donde se colocaron las laminillas en xilol durante 5 minutos, posteriormente se realizaron inmersiones de 15 a 20 veces en diferentes soluciones, xilol, etanol al 100%, etanol al 95% y agua. Para realizar la tinción se utilizó Hematoxilina & Eosina (H&E). Primero, se dejaron las laminillas en hematoxilina de Harris y se dejaron de 3 a 5 minutos, posteriormente, se realizaron de 15 a 20 inmersiones en agua destilada, y de 1 a 2 inmersiones en alcohol ácido, después se realizó un lavado nuevamente con agua destilada y se dejó en agua carbonatada durante 1 minuto, se lavó nuevamente con agua destilada y se pasó a etanol al 95% en 2 ocasiones, con 10 inmersiones cada uno, después, en etanol al 100% en 2 ocasiones, con 10 inmersiones, posteriormente, se sumergieron las laminillas en xilol por 10 inmersiones y de nuevo en xilol de 15 a 20 inmersiones. Al finalizar, se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos y se almacenaron las laminillas para ser observadas y fotografiadas posteriormente bajo el microscopio (Prophet, 1992).

Análisis histopatológico de tejido hepático

El análisis histopatológico se realizó mediante la observación de 25 campos de cada una de las muestras de los grupos experimentales teñidos con H&E. Se presentaron las imágenes más representativas de cada grupo experimental, mostrando parénquima, vena central y estructura 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 y 40X, utilizando un microscopio ZEISS Primo Star LED (Carl Zeiss Gottingen, Alemania).

Determinación de grado de esteatohepatitis no alcohólica

La determinación del grado de actividad de Esteatohepatitis No Alcohólica (EHNA) se realizó de acuerdo al sistema de puntuación histológica de la red de investigación clínica sobre EHNA (LaBrecque et al., 2012), para lo cual 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 experimentales. Los criterios de análisis se presentan en la **Tabla 1**, 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.

Análisis Estadístico

Para analizar la normalidad de los datos, se utilizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Los datos normales fueron diferencia de peso corporal de los ratones, CT, TG séricos, c-HDL, glucosa, insulina, HOMA-IR, TG hepáticos y peso del tejido hepático, se presentaron en forma de media \pm desviación estándar (DE) y se utilizó ANOVA de dos vías, seguida de la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Holm Sidak para analizar las diferencias de los grupos. Los datos no paramétricos fueron peso corporal, enzimas ALT y AST, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn, los cuales se presentaron como medianas y rangos. Fueron consideradas diferencias estadísticamente significativas si $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.

Tabla 1. 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	
>66%	3	>4	3	balonadas	2

S= steatosis (esteatosis), L= lobular inflammation (inflamación lobular), B= ballooned cells (células balonadas), EHNA= Esteatohepatitis No Alcohólica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso corporal

El peso corporal de cada grupo de los ratones fue reportado en gramos (g), en forma de medianas y rangos, los cuales se pueden observar en la **Tabla 2**, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en los grupos durante el período de intervención.

Tabla 2. Resultados de peso corporal de los ratones.

GRUPO (n)	Peso inicial (g)	Semana 3 (g)	Semana 6 (g)	Semana 9 (g)	Peso final (g)
Control (6)	39.24 (36.73-47.0)	40.44 (37.23-47.89)	41.22 (38.71-50.42)	41.61 (38.84-49.07)	41.91 (39.0-50.9)
Sacarosa (6)	44.68 (33.43-70.87)	44.6 (30.45-64.04)	45.34 (33.87-67.2)	44.37 (31.88-70.46)	46.63 (30.22-75.59)
TCM (6)	45.44 (39.27-49.31)	40.57 (37.45-42.67)	42.25 (39.5-46.18)	40.92 (39.8-45.73)	39.65 (38.11-43.92)
Sacarosa + TCM (6)	46.04 (34.31-56.93)	37.66 (34.79-42.8)	39.68 (32.13-46.8)	43.73 (34.27-52.19)	42.51 (32.74-51.95)

TCM= Triglicéridos de Cadena Media. Los datos se presentan como medianas y rango intercuartil de los grupos en tiempo inicial, semanas 3, 6, 9 y tiempo final. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn. No se mostraron diferencias estadísticamente significativas de los grupos en los diferentes tiempos ($p < 0.05$).

Diferencias de peso corporal entre los grupos

Los datos de diferencias de peso corporal entre los grupos están reportados en g, se presentan en forma de medias \pm DE, encontrándose diferencia estadísticamente significativa en el grupo TCM (-4.14 g \pm 3.91) comparado con el grupo control (2.37 g \pm 1.29), con un valor de $p=0.0361$, lo cual se muestra en la **Figura 1**.

En los resultados podemos observar una disminución significativa del peso en los ratones del grupo TCM, ésta se puede atribuir a la disminución de consumo de alimento, muy probablemente debido a la saciedad que pudo provocar el consumo de TCM. Algunos estudios muestran que, el incremento de AG libres y cuerpos cetónicos producidos por la oxidación de AGCM, están asociados con el incremento de la saciedad y disminución del consumo de alimento (Sáyago-Ayerdi et al., 2008). El consumo de TCM ha sido asociado con un aumento en la saciedad en animales que han presentado una disminución en el peso corporal (Guimarães et al., 2019) y, resultados similares han sido reportados en diferentes estudios, en donde encuentran una disminución del peso corporal de sus modelos murinos, basados en ratas y ratones, que les fueron administrados TCM y ello lo atribuyen a la disminución del consumo de alimento (Ronis et al., 2013; Terada, Sekine, & Aoyama, 2015; Terada et al., 2012; X. Zhang et al., 2016; Zhou, Wang, Jacoby, Jiang, Zhang, & Yu, 2017). Por otro lado, el aumento de peso en el grupo sacarosa puede deberse al efecto de la fructosa, ya que se ha reportado que su alto consumo disminuye la secreción de leptina, impidiendo con ello que se manifieste la sensación de saciedad, aumentando el consumo de alimento y provocando el aumento del peso corporal (Stanhope, 2016).

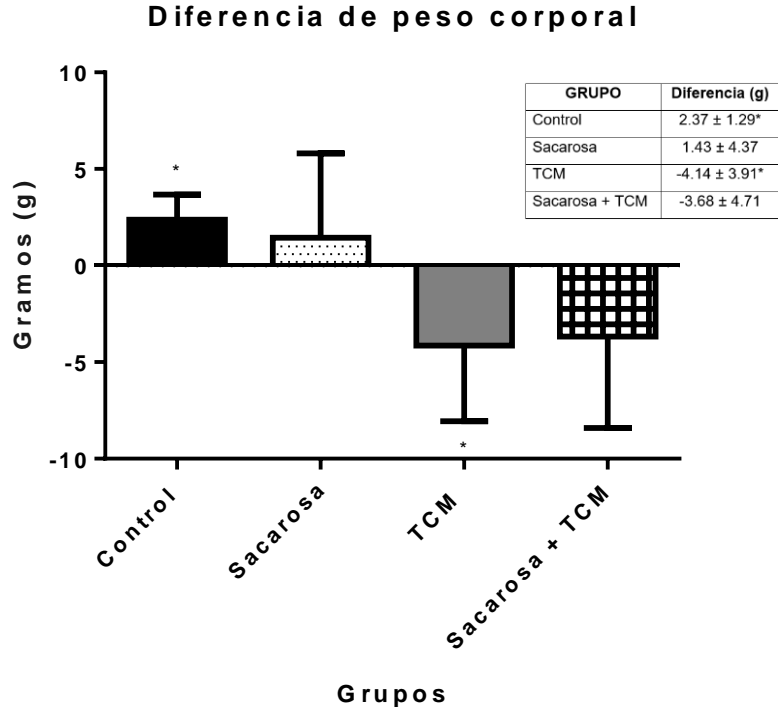


Figura 1. Diferencia de peso corporal entre los grupos.

*: Diferencia estadísticamente significativa en el grupo TCM (-4.14 g ± 3.91) comparado con el grupo control (2.37 g ± 1.29), p=0.0361.

Colesterol Total (CT)

Los resultados de CT de los grupos se reportaron en mg/dL y se expresaron en forma de medias \pm DE. El análisis de CT mostró diferencia estadísticamente significativa en el grupo control, con una media de 158.81 mg/dL \pm 13.82, en tiempo basal, y una media de 113.03 mg/dL \pm 16.12, en tiempo final, con una $p < 0.0001$. De igual manera, se observó significancia estadística en el tiempo final, entre el grupo control, con una media de 113.03 mg/dL \pm 16.12, y grupo TCM, con una media de 157.64 mg/dL \pm 13.91, con un valor de $p = 0.0014$, las cuales se muestran en la **Figura 2**.

Los resultados obtenidos muestran niveles de CT más elevados en el grupo TCM con significancia estadística en comparación del grupo control. Resultados similares han sido reportados por Guimarães y colaboradores, en el 2019, en donde dichos autores utilizaron ratones de la cepa C57BL/6, con una duración de 12 semanas de tratamiento, en donde el grupo TCM de su estudio, resultó con niveles de CT más elevados que el grupo control (Guimarães et al., 2019). Aunque diferentes estudios han reportado que el consumo de TCM disminuye las concentraciones de CT, también está reportado que cuando se ingieren TCM de manera excesiva o crónica puede aumentar de forma moderada las concentraciones de CT en sangre (Sáyago-Ayerdi et al., 2008), en este mismo artículo, también se menciona que los AGCM se absorben directamente por la circulación portal, por lo que no contribuyen a la formación de quilomicrones, no obstante estudios a largo plazo han reportado que cuando el consumo de TCM es crónico, pueden incorporarse hasta un 10%. Si bien, los AGCM pueden reducir la secreción de TG cuando son usados en pequeñas cantidades, en situaciones de una ingesta excesiva de energía respecto a la que requiere el individuo, el consumo de AGCM puede favorecer la lipogénesis, que en situaciones interprandiales, puede incrementar la secreción de TG y los niveles de TG plasmáticos. El incremento de secreción de TG como VLDL, puede aumentar a su vez de forma moderada los niveles plasmáticos de colesterol.

A pesar de encontrar una significancia estadística en los resultados de este proyecto, es importante destacar, que los niveles de colesterol obtenidos, se encuentran dentro del rango de normalidad, según los valores de referencia para ratones que oscilan entre 51.9 a 170.3 mg/dL (Kusmeirczyk, Kling, Kier, Milligan, & Heatley, 2020).

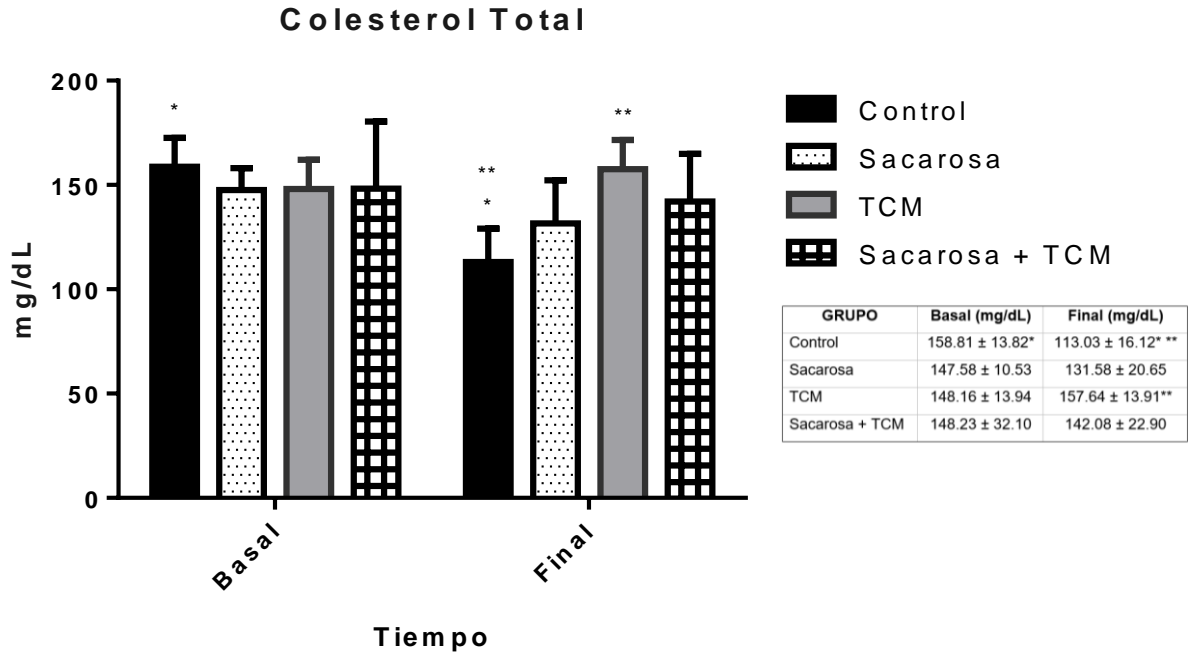


Figura 2. Colesterol total sérico, tomado en tiempos basal y final del tratamiento.

Diferencia estadísticamente significativa *: en el grupo control, en tiempo basal (158.81 mg/dL ± 13.82) y tiempo final (113.03 mg/dL ± 16.12), $p < 0.0001$; **: en el tiempo final, en el grupo control (113.03 mg/dL ± 16.12) con el grupo TCM (157.64 mg/dL ± 13.91), $p = 0.0014$.

Colesterol HDL (c-HDL)

Los resultados de c-HDL se reportaron en mg/dL y se expresaron en forma de media \pm DE. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 4**) en el grupo sacarosa, en el tiempo basal (50.72 mg/dL \pm 10.86) comparado con el tiempo final (74.48 mg/dL \pm 14.90) con un valor de $p=0.0235$; en el grupo TCM, en el tiempo basal (51.44 mg/dL \pm 6.12) comparado con el tiempo final (108.40 mg/dL \pm 21.83), con un valor de $p<0.0001$; en el grupo sacarosa + TCM, en el tiempo basal (56.01 mg/dL \pm 7.86) comparado con el tiempo final (78.32 mg/dL \pm 18.95), con un valor de $p=0.0357$. En el tiempo final, en las determinaciones de c-HDL, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control (52.31 mg/dL \pm 6.97) comparado con el grupo sacarosa (74.48 mg/dL \pm 14.90), con un valor de $p=0.0475$, con el grupo TCM (108.40 mg/dL \pm 21.83), con un valor de $p<0.0001$, y con el grupo sacarosa + TCM (78.32 mg/dL \pm 18.95), con un valor de $p=0.0132$. Se encontró diferencia con significancia estadística en el grupo TCM (108.40 mg/dL \pm 21.83) comparado con el grupo sacarosa (74.48 mg/dL \pm 14.90), con un valor de $p=0.0007$, y con el grupo sacarosa + TCM (78.32 mg/dL \pm 18.95), con un valor de $p=0.0031$.

Se considera importante resaltar que, los resultados basales que se muestran en este estudio, relacionado con todos los grupos, se encontraron por debajo de los valores normales de referencia establecidos para ratones al inicio de la intervención, los cuales oscilan entre 97 ± 4 mg/dL (Yin et al., 2012), muy probablemente como consecuencia del padecimiento de HGNA, ya que los niveles de c-HDL en sangre tienden a disminuir en esta enfermedad. Sin embargo, los grupos de TCM, sacarosa, y sacarosa + TCM mostraron un aumento de c-HDL que fue estadísticamente significativo en el tiempo final del tratamiento, y solamente el grupo TCM, mostró niveles elevados de c-HDL al final de la intervención. Este aumento de c-HDL podría deberse al mecanismo de protección del organismo para la eliminación de colesterol, en donde el c-HDL está ligado al sistema reverso del transporte de colesterol, mismo que una vez ubicado en el hígado, el exceso de colesterol pudiera ser excretado en forma de ácidos biliares o

colesterol libre como lo describe X. Zhang et al., (2016), y de esta manera regularizar concentraciones de CT en suero.

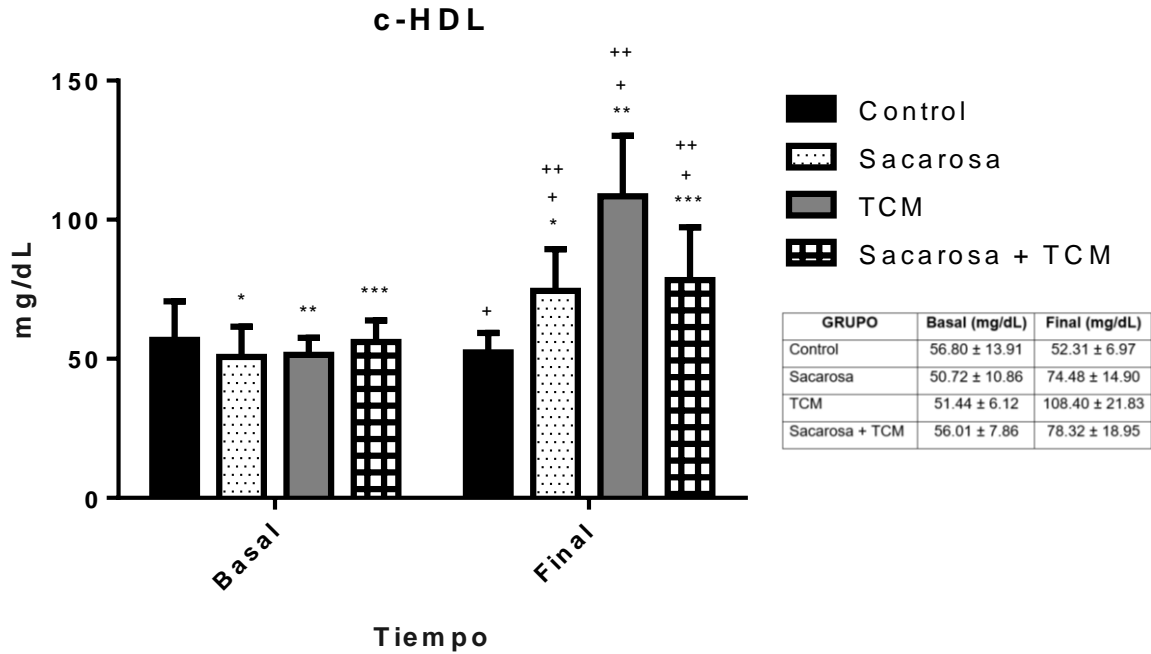


Figura 3. Colesterol HDL, en tiempos basal y final.

Diferencia estadísticamente significativa, *: en grupo sacarosa tiempo basal (50.72 mg/dL ± 10.86) contra tiempo final (74.48 mg/dL ± 14.90), valor de $p=0.0235$; **: en grupo TCM tiempo basal (51.44 mg/dL ± 6.12) contra tiempo final (108.40 mg/dL ± 21.83), valor de $p<0.0001$; ***: en grupo sacarosa + TCM tiempo basal (56.01 mg/dL ± 7.86) contra tiempo final (78.32 mg/dL ± 18.95), valor de $p=0.0357$; +: en tiempo final en el grupo control (52.31 mg/dL ± 6.97) contra grupo sacarosa (74.48 mg/dL ± 14.90), valor de $p=0.0475$, contra grupo TCM (108.40 mg/dL ± 21.83), valor de $p<0.0001$, contra grupo sacarosa + TCM (78.32 mg/dL ± 18.95), valor de $p=0.0132$; ++: en tiempo final, en el grupo TCM (108.40 mg/dL ± 21.83) contra grupo sacarosa (74.48 mg/dL ± 14.90), valor de $p=0.0007$, contra grupo sacarosa + TCM (78.32 mg/dL ± 18.95), valor de $p=0.0031$.

Triglicéridos en suero

Los resultados de TG en suero se reportaron en mg/dL y se presentan en la **Figura 4** en forma de medias \pm DE, sin diferencia estadísticamente significativa.

Estos resultados mostrados son diferentes a lo reportado por Zhang y col., en el 2015, en donde sus resultados de TG fueron más bajos en el grupo tratado con TCM, en comparación con el consumo de triglicéridos de cadena larga, utilizando como modelo animal ratones de la cepa C57BL/6J, con una duración de tratamiento de 12 semanas. En este estudio, los ratones consumieron de manera crónica TCM, y se ha reportado que el consumo crónico o en exceso de TCM pueden incrementar los niveles de TG plasmáticos, ya que dicho consumo crónico activa mecanismos implicados en la lipogénesis de novo (Sáyago-Ayerdi et al., 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio permanecen dentro de lo considerado como rango normal para ratones (29.4 a 149.5 mg/dL) (Kusmeirczyk et al., 2020; Y. Zhang et al., 2015).

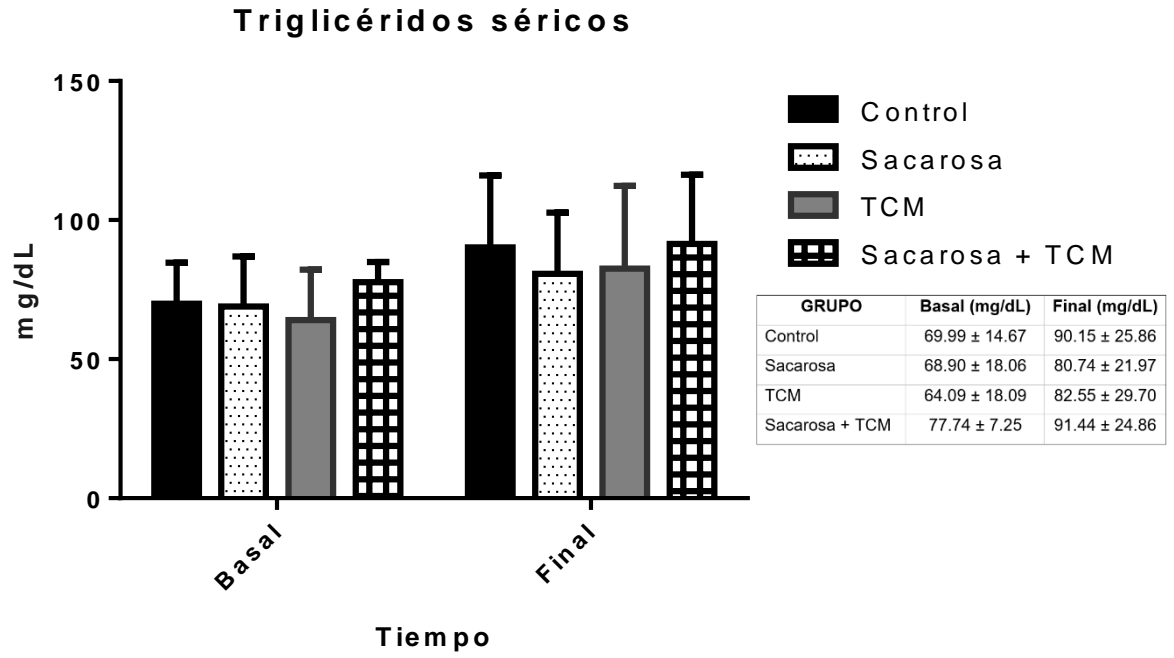


Figura 4. Triglicéridos en suero, en tiempo basal y final.

Sin diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Glucosa sérica

Los resultados de glucosa en suero fueron representados en mg/dL, se presentan en forma de media \pm DE, encontrando diferencia estadísticamente significativa, en el tiempo final, en el grupo TCM, con una media \pm DE, de 153.09 mg/dL \pm 62.55 en comparación con el grupo sacarosa, el cual mostró una media \pm DE, de 252.68 mg/dL \pm 56.30, $p=0.0253$ (**Figura 5**).

Zhou y col., 2017, reportaron resultados similares a los de este estudio, en donde utilizaron diversos grupos alimentados con dietas altas en grasa y con diferentes dosis de TCM, en ratones de la cepa C57BL/6J durante 12 semanas, y se pudo apreciar una significativa disminución en las concentraciones de glucosa comparado con el grupo de dieta alta en grasa sin TCM (Zhou, Wang, Jiang, et al., 2017). Estos autores, atribuyen estos resultados a los efectos de los TCM, sobre el metabolismo de la glucosa y su efecto sobre la inflamación celular, la cual asociaron con la supresión de la activación de MAPK p38, misma que representa a una de las vías de señalización que se consideran clave en el proceso de inflamación celular (Geng et al., 2016).

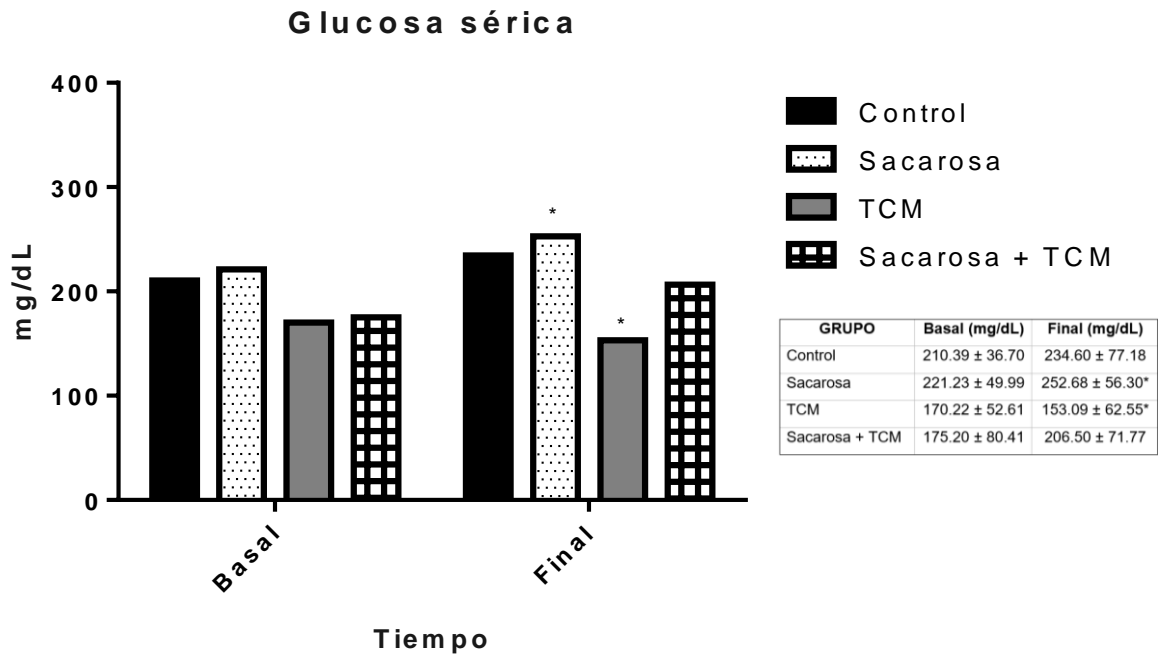


Figura 5. Glucosa en suero, en tiempo basal y final.

Diferencia estadísticamente significativa, *: en tiempo final del grupo TCM (153.09 mg/dL ± 62.55) en comparación con el grupo sacarosa (252.68 mg/dL ± 56.30), valor de $p=0.0253$.

Insulina sérica

Los resultados de insulina en suero se reportaron en $\mu\text{IU/mL}$ y se presentan en forma de medias \pm DE (**Figura 6**), no se observó diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados muestran una tendencia en aumento de las concentraciones de insulina en el tiempo final comparado con el tiempo inicial del tratamiento. La **Figura 7** muestra como el grupo sacarosa resultó con concentraciones más elevadas, sin significancia estadística, de insulina sérica comparado con cualquiera de los otros grupos. Además, el grupo TCM mostró niveles más bajos de insulina en el tiempo final en comparación con los otros grupos de tratamiento, aunque sin significancia estadística. Estos resultados coinciden con los reportados en otros estudios, en donde el tratamiento con TCM disminuyó las concentraciones de insulina en suero en ratones de la cepa C57BL/6J, durante 12 semanas y ratas Sprague Dawley, durante 6 semanas respectivamente (Geng et al., 2016; Terada et al., 2012).

De igual manera, los resultados de este estudio del grupo sacarosa coinciden con otros artículos publicados, en donde los grupos con contenido de algún tipo de HCO, en ratones de la cepa C57BL/6J y ratas Wistar, presentaron los niveles de insulina en suero más elevados en comparación de los demás grupos (Burke et al., 2018; Plazas Guerrero et al., 2019). El consumo excesivo de glucosa, en el caso de este proyecto por ser componente de la sacarosa, lleva a un aumento de glucosa en sangre, y por consiguiente, un aumento de insulina en sangre, lo cual afecta el metabolismo de carbohidratos y lípidos, pudiendo influir en el desarrollo de EHNA.

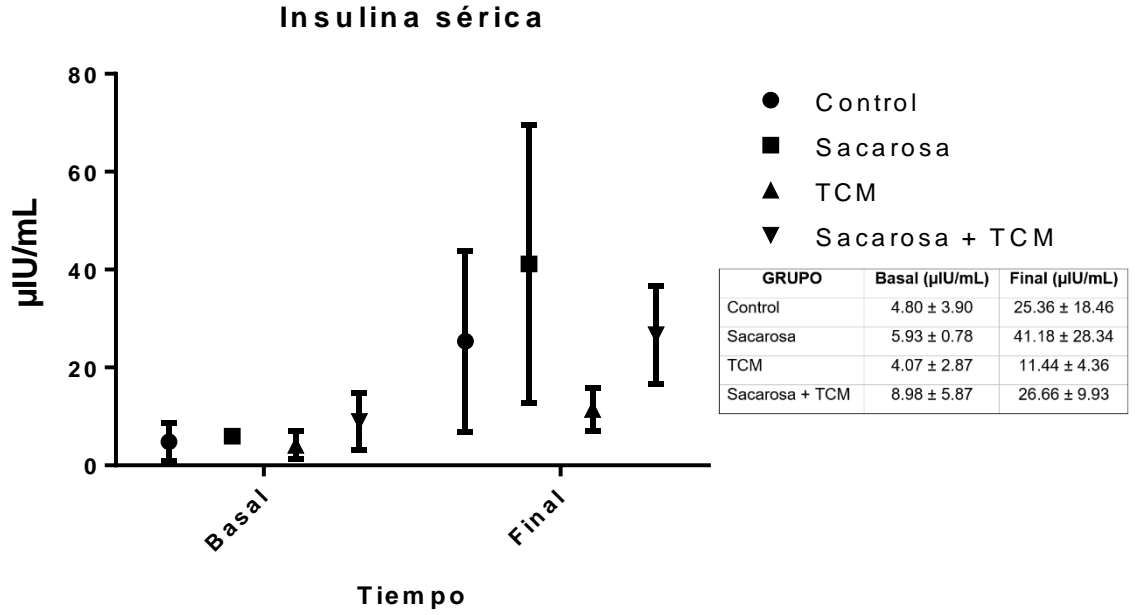


Figura 6. Insulina en suero, tiempo basal y final.
Sin diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Resistencia a la Insulina, HOMA-IR

Los resultados del cálculo de evaluación de HOMA-IR se presentaron en forma de medias \pm DE, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (**Figura 7**), en donde, de acuerdo a las medias de los tiempos, los grupos presentaron resistencia a la insulina (Buccini Graciela & Wolfthal, 2008; Mociños & Salazar, 2014), mostrando una ligera tendencia de disminución, aunque sin significancia estadística, en el grupo TCM, en comparación de los otros grupos, en el tiempo final del tratamiento.

De manera similar a los resultados de esta investigación, en el estudio de Geng y colaboradores, en el 2016, el grupo con TCM mostró niveles más bajos del índice HOMA-IR en comparación del grupo con dieta alta en grasa, en donde en dicho estudio utilizaron como modelo experimental ratones de la cepa C57BL/6J, y la intervención tuvo una duración de 11 semanas. Los autores asociaron la disminución en el índice HOMA-IR a los efectos benéficos de los TCM, sobre el metabolismo de la glucosa y la inflamación, con la supresión de la activación de MAPK p38, una de las vías de señalización clave en el proceso inflamatorio (Geng et al., 2016).

Los resultados arrojados en la intervención de este proyecto con respecto al índice HOMA-IR, son similares a lo reportado por Plazas Guerrero y colaboradores, en el 2019, en donde el grupo sacarosa obtuvo un índice HOMA-IR mayor al grupo control sin sacarosa en la dieta, utilizando como modelo experimental ratas Wistar durante 20 semanas de intervención, considerando que, el estado crónico de hiperglucemia e hiperinsulinemia puede ocasionar que los niveles y la captación de AG libres sean más elevados, estimulando de esta manera la síntesis de lípidos hepáticos y al mismo tiempo afectando de manera negativa la β -oxidación. La insulina en exceso promueve la expresión de SREBP-1 y ChREBP en el hígado, estimulando las vías lipogénicas, que como consecuencia obtienen acumulación de lípidos (Plazas Guerrero et al., 2019).

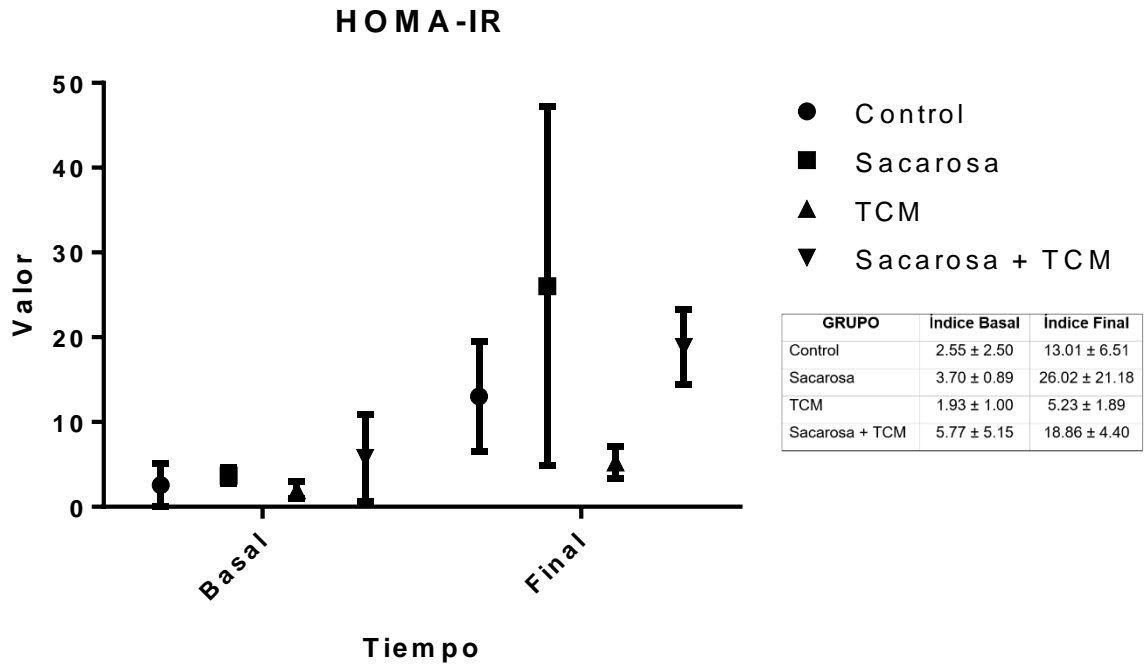


Figura 7. Cálculo de evaluación HOMA-IR, tiempo basal y final.

Sin diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Enzima Alanino aminotransferasa (ALT)

La **Figura 8** muestra los resultados de la enzima ALT en suero, reportadas en U/l y presentadas como medianas y rango intercuartil, encontrando diferencia estadísticamente significativa en el tiempo final, del grupo TCM (423.40 U/l [357.93-490.62]) comparado con el grupo control (232.65 U/l [203.40-384.12]), donde se obtuvo un valor de $p=0.0365$.

Resultados similares fueron reportados por Acosta-Cota y colaboradores, en el 2019, utilizando como modelo experimental ratas Wistar cursando una intervención con concentraciones diferentes de sacarosa durante 20 semanas, en donde obtuvieron una disminución de la enzima ALT en el grupo control. Sin embargo, según los valores de referencia para ratones, los niveles de ALT se encuentran elevados (Kusmeirczyk et al., 2020), lo que podría indicar que puede existir la presencia de necrosis en los hepatocitos, ya que la presencia de esteatosis hepática, ocasiona que estas enzimas sean liberadas a la circulación sanguínea, evidenciando la presencia de daño hepático (Acosta-Cota et al., 2019).

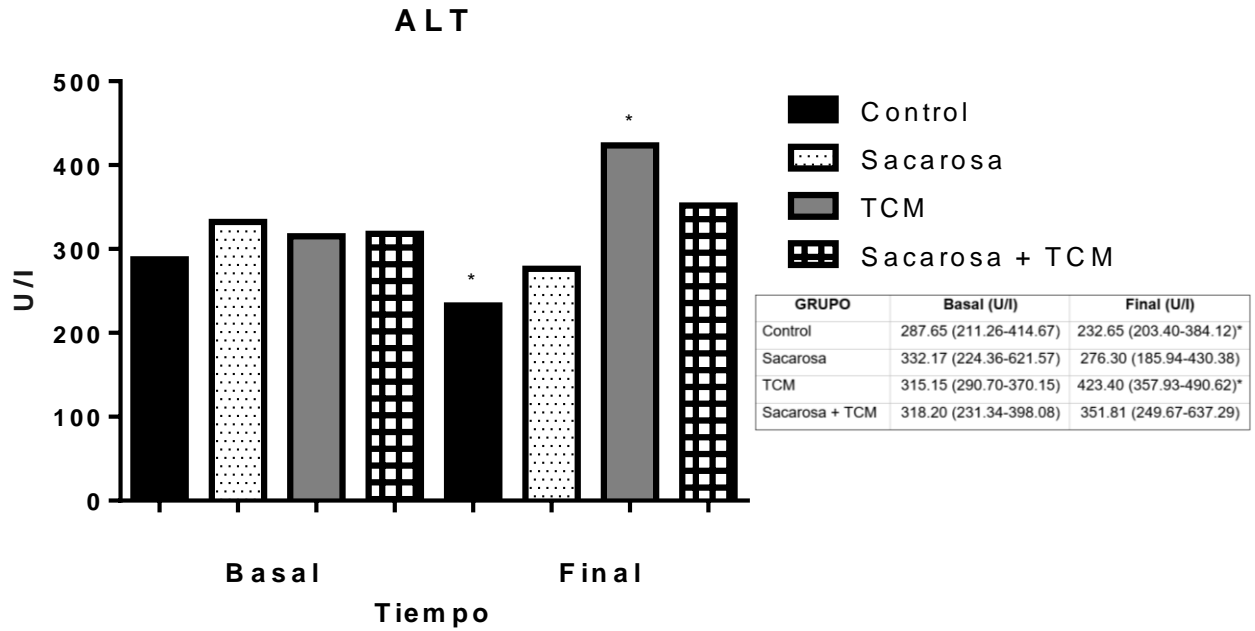


Figura 8. Enzima ALT en suero, en tiempo basal y final.

Diferencia estadísticamente significativa, *: en tiempo final, en el grupo TCM (423.40 U/I [357.93-490.62]) comparado con el grupo control (232.65 U/I [203.40-384.12]), valor de $p=0.0365$.

Enzima Aspartato aminotransferasa (AST)

Los resultados de la enzima AST en suero, se reportaron en U/l y se presentan como medianas y rango intercuartil, encontrando diferencia estadísticamente significativa en el tiempo final, en el grupo control (215.19 U/l [167.60-344.0]) comparado con el grupo sacarosa (505.46 U/l [316.90-628.60]), $p=0.0046$, y comparado con el grupo TCM (477.09 U/l [340.50-530.80]), con un valor de $p=0.0040$ (**Figura 9**).

Los resultados en los niveles de la enzima AST se encontraron elevados en los grupos sacarosa y TCM, según los valores de referencia reportados en una reciente publicación (Kusmeirczyk et al., 2020), lo cual podría indicar la presencia de necrosis en los hepatocitos, y la causa de la elevación de las enzimas transaminasas en suero sea debido a la liberación de dichas enzimas hacia circulación sanguínea (Acosta-Cota et al., 2019).

Resultados similares fueron reportados por Acosta-Cota y colaboradores, en el 2019, en donde utilizaron como modelo experimental ratas Wistar con una duración de tratamiento de 20 semanas, y el grupo control de su estudio se encontró con una disminución en los niveles de la enzima AST en comparación con los grupos con sacarosa, los autores argumentan que probablemente se encuentren influenciados por la edad debiéndose a alguna deficiencia de nutrientes, en donde se encuentra implicada la disminución de la actividad de las enzimas hepáticas.

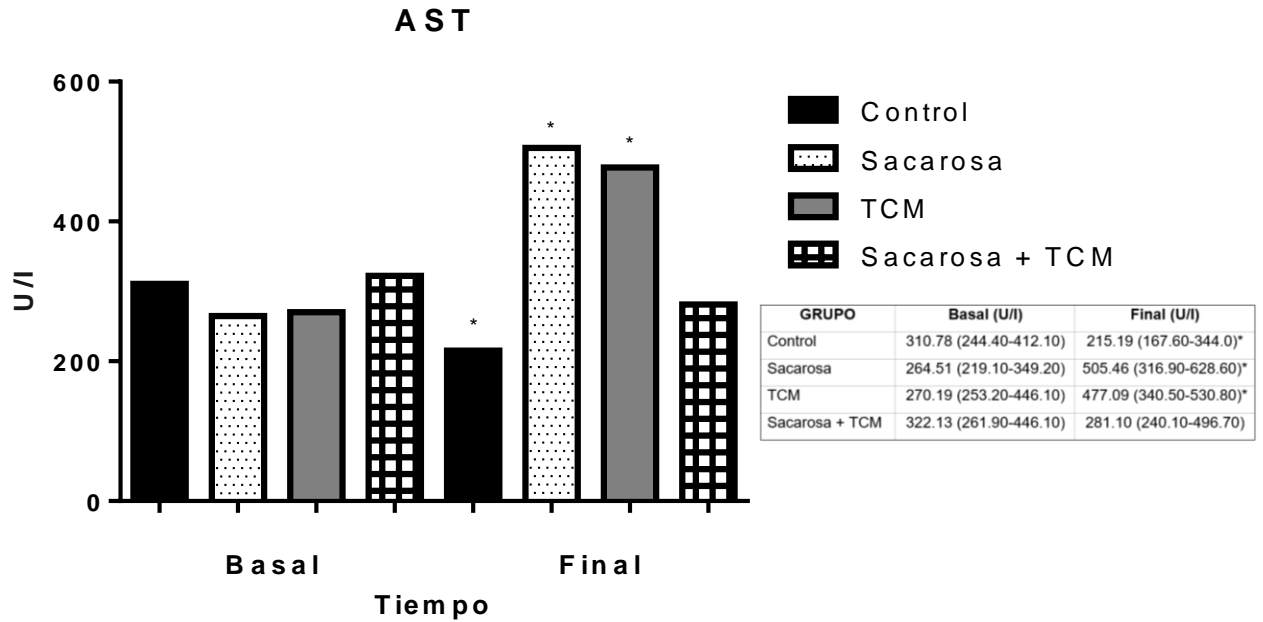


Figura 9. Enzima AST en suero, en tiempo basal y final del tratamiento.

*: Diferencia estadísticamente significativa en tiempo final, en el grupo control (215.19 U/I [167.60-344.0]) comparado con el grupo sacarosa (505.46 U/I [316.90-628.60]), $p=0.0046$, y comparado con el grupo TCM (477.09 U/I [340.50-530.80]), $p=0.0040$.

Peso de hígado

Los resultados de peso de hígado se reportaron en g y se presentan como medias \pm DE. En este estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos participantes, sin embargo, se puede observar una tendencia de aumento de peso en el hígado de los grupos que fueron alimentados con sacarosa (**Figura 10**). Resultados similares a los obtenidos en este proyecto, fueron reportados por Acosta-Cota y colaboradores, en el 2019, en donde obtuvieron un mayor peso hepático en el grupo al que le administraron mayor cantidad de sacarosa, reportando, que a mayor ingesta de sacarosa, mayor porcentaje en peso hepático (Acosta-Cota et al., 2019), esto puede deberse a que el consumo en exceso de fructosa produce mayor aumento en el tamaño del hígado, almacenamiento de glucógeno y ácidos grasos, pudiendo provocar mayor acumulación de tejido adiposo ectópico en el hígado (Carvallo, Carvallo, Barbosa-da-silva, Sol, & Nafld, 2017). Otros resultados similares a los de este proyecto de investigación han sido publicados, en donde los autores reportaron que el peso del tejido hepático fue igual en el grupo TCM y grupo control, y por otro lado, el grupo TCM resultó con peso de hígado menor que el grupo alto en grasa, utilizando como modelo experimental ratones de la cepa C57BL/6J y una duración de tratamiento de 16 semanas (Liu et al., 2011). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con otros artículos publicados, en donde el efecto del consumo de TCM en ratones de la cepa C57BL/6n impiden el aumento de peso del tejido hepático, posiblemente evitando el almacenamiento de glucógeno hepático, ácidos grasos y su vez, previniendo la acumulación de tejido adiposo ectópico en el hígado.

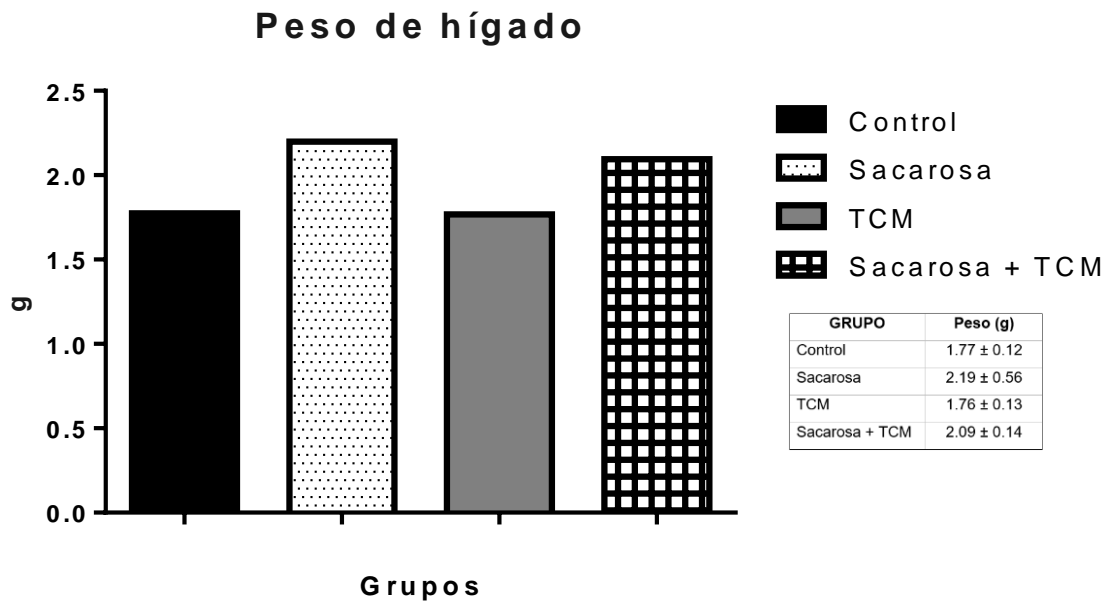


Figura 10. Peso de hígado de los grupos de tratamiento.

Sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$).

Triglicéridos hepáticos

Los resultados de TG hepáticos se reportaron en mg/dL y se encuentran en forma de medias \pm DE, encontrando una disminución estadísticamente significativa en el grupo TCM (42.48 mg/dL \pm 24.44) comparado con el grupo control (114.33 mg/dL \pm 35.64), con un valor de $p=0.0084$, al mismo tiempo en comparación con el grupo sacarosa (155.24 mg/dL \pm 49.62), con un valor de $p<0.0001$, y de igual manera, se encontró una disminución significativa en el grupo TCM comparado con el grupo sacarosa + TCM (113.37 mg/dL \pm 19.52), con un valor de $p=0.0094$ (**Figura 11**).

Los resultados de este estudio mostraron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de TG hepáticos en el grupo con TCM en comparación con el resto de los grupos. Resultados similares fueron reportados por Zhou y colaboradores, en el 2017, en el que ratones C57BL/6J, fueron tratados con TCM y se pudo observar una disminución significativa en las concentraciones de TG hepáticos. Un estudio desarrollado por (Guimarães et al., 2019), mostraron que el grupo de ratones de la cepa C57BL/6 tratado solo con TCM, durante 12 semanas, tuvo menores concentraciones de TG hepáticos comparados con el grupo que combinaba TCM + fructosa, mostrando éste último niveles de TG hepáticos mayores que el resto de los grupos. Esta disminución en las concentraciones de TG hepáticos en el grupo TCM, se ha relacionado con el posible aumento en la producción de lipoproteínas VLDL, permitiendo la exportación de TG hacia circulación sanguínea, dejando como resultado una disminución en TG hepáticos y al mismo tiempo pudiendo provocar un aumento en TG plasmáticos (Sáyago-Ayerdi et al., 2008).

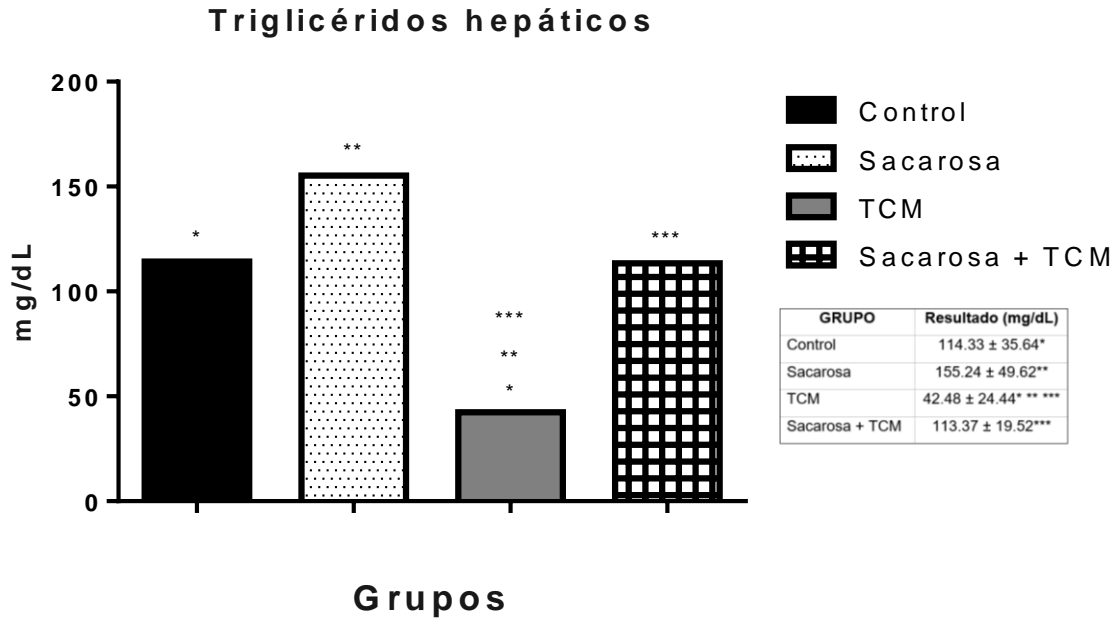


Figura 11. TG hepáticos.

Diferencias estadísticamente significativas en el grupo TCM (42.48 mg/dL ± 24.44), *: comparado con el grupo control (114.33 mg/dL ± 35.64), $p=0.0084$; **: con el grupo sacarosa (155.24 mg/dL ± 49.62), $p<0.0001$; ***: con el grupo sacarosa + TCM (113.37 mg/dL ± 19.52), $p=0.0094$.

Análisis histopatológico de tejido hepático

Determinación de grado de EHNA

La determinación del grado de EHNA se realizó de acuerdo con el sistema de puntuación histológica de la red de investigación clínica sobre EHNA, mencionada y detallada anteriormente.

En la **Tabla 3**, se puede observar el grado de EHNA obtenido de cada uno de los grupos experimentales, en donde se describen las características y grado de EHNA de cada uno. Como se observa, el grupo control desarrolló un grado 4 de EHNA, obteniendo 3 puntos en la categoría de esteatosis hepática, sin presencia de inflamación lobular y puntaje 1 de células balonadas. El grupo sacarosa desarrolló grado 2 de EHNA, obteniendo 1 punto en esteatosis hepática, 1 punto en inflamación lobular y sin presencia de células balonadas. Por su parte, el grupo TCM presentó grado 3 de EHNA, desarrollando un puntaje 2 de esteatosis hepática, 1 punto en inflamación lobular y sin presencia de células balonadas, finalmente el grupo sacarosa + TCM, desarrolló grado 6 de EHNA, presentando 2 puntos de esteatosis hepática, 3 puntos en inflamación lobular y 1 punto en células balonadas. Los resultados obtenidos de histología demuestran que el grupo TCM desarrolló un menor grado de EHNA en comparación con el grupo control, en donde se pudo observar una mejoría en el grado de esteatosis hepática, contrario a los resultados en el grupo sacarosa + TCM en donde esta combinación resultó perjudicar el estado del hígado, provocando un mayor daño hepático. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron reportados por Guimaraes y colaboradores, en el 2019, en donde utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 para una intervención con TCM con una duración de 12 semanas de tratamiento donde observaron presencia de esteatosis hepática en el grupo TCM y de igual manera con el grupo de fructosa, sin embargo, la esteatosis hepática fue más pronunciada en el grupo de fructosa + TCM.

Tabla 3. Resultados de grado de actividad de EHNA, en los diferentes grupos de tratamiento.

Grupo	Esteatosis	Inflamación lobular	Células balonadas	Grado EHNA (rango 0-8)
Control	3	0	1	4
Sacarosa	1	1	0	2
TCM	2	1	0	3
Sacarosa + TCM	2	3	1	6

EHNA= Esteatohepatitis No Alcohólica, TCM= Triglicéridos de Cadena Media.

Grupo control

En la histología hepática del grupo control (**Figura 12**), se encontró esteatosis macrovesicular, en mayor grado a los otros grupos, sin presencia de inflamación lobular. El grupo control desarrolló EHNA en grado 4, con presencia de esteatosis hepática de más del 66% y esto es derivado de que al igual que el resto de los animales divididos en los diferentes tratamientos, el grupo control también fue previamente sometido a la inducción de HGNA con solución de sacarosa, por lo que era de esperarse que el grado de esteatosis estuviera presente al final del tratamiento.

Un estudio realizado por Guimaraes y colaboradores, en el 2019, con ratones de la cepa C57BL/6, fueron expuestos a la administración de fructosa y a diferentes concentraciones de TCM durante 12 semanas, reportando un grupo control sin EHNA, esto debido a que no indujeron desde un inicio la EHNA en ese grupo (Guimarães et al., 2019).

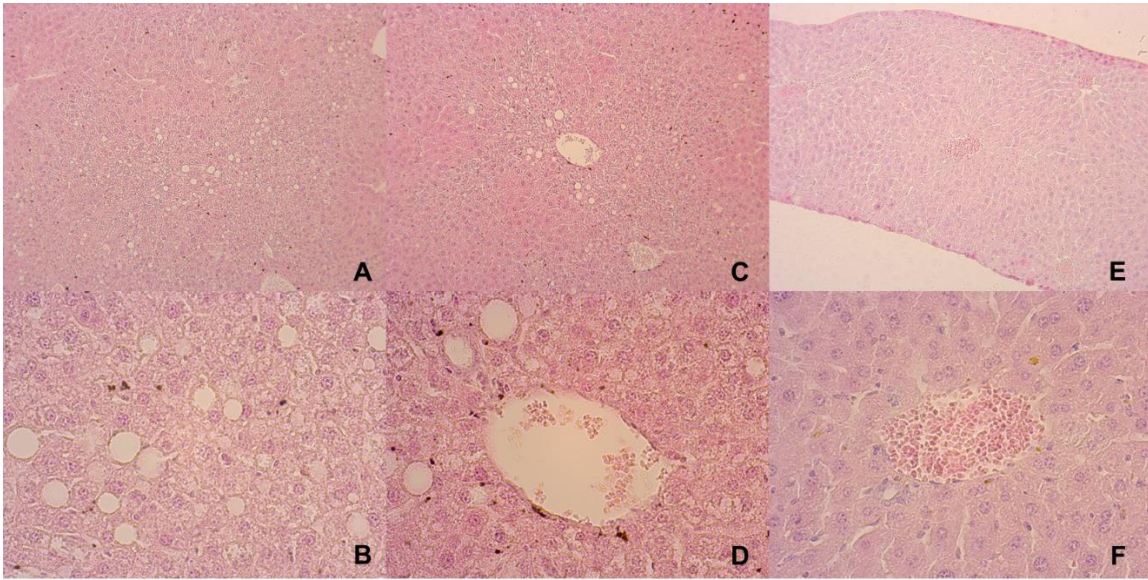


Figura 12. Histología grupo control.

Imágenes A y B parénquima, C y D vena central, E y F estructura porta. Imágenes A, C y E captadas a 10X, imágenes B, D y F captadas a 40X.

Grupo sacarosa

En la **Figura 13**, se puede observar que, el grupo sacarosa presentó una ligera esteatosis microvesicular y macrovesicular, en menor grado comparada con los otros grupos. El grupo sacarosa presentó un desarrollo de EHNA grado 2, en donde además se pudo encontrar esteatosis de 5 a 33%, estos resultados pueden deberse a que un elevado consumo de glucosa en la dieta promueve el desarrollo de hiperglicemia e hiperinsulinemia, a través de la secreción de insulina por las células β pancreáticas y que esta hiperinsulinemia a su vez, estimula la lipólisis en el tejido adiposo, ocasionando elevados AG libres en circulación sanguínea, mismos que son captados por otros tejidos, especialmente a nivel hepático (Plazas Guerrero et al., 2019), ocasionando una elevación en las concentraciones de lípidos hepáticos, lo cual se refleja en los resultados de histopatología del grupo sacarosa de este proyecto. Un estudio reciente reportó que la fructosa tiene la capacidad de activar algunos factores de transcripción, como el SREBP1-c, y éste al mismo tiempo, activar enzimas claves que participan en la síntesis de lípidos, como FAS y ACC (Guimarães et al., 2019). En el estudio antes mencionado, los autores obtienen resultados similares a los encontrados en este trabajo, en donde el grupo de fructosa, administrado durante 12 semanas en ratones de la cepa C57BL/6, presentó una notoria esteatosis de orden macrovesicular, principalmente. Otro estudio, donde utilizaron como modelo experimental ratas Wistar, administraron soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones durante 20 semanas y observaron de manera similar a los resultados obtenidos en este proyecto, esteatosis microvesicular y moderada esteatosis macrovesicular en el tejido hepático, destacando la significativa acumulación de lípidos en el hígado derivado de un elevado consumo de sacarosa en la dieta (Acosta-Cota et al., 2019).

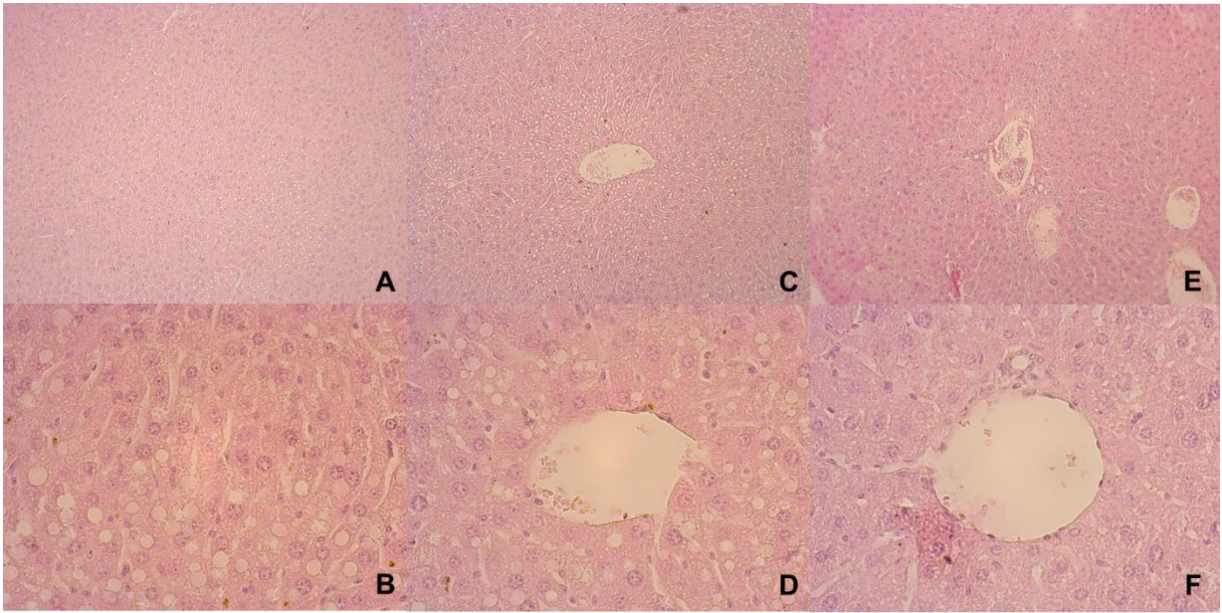


Figura 13. Histología grupo sacarosa.

Imágenes A y B parénquima, C y D vena central, E y F estructura porta. Imágenes A, C y E captadas a 10X, imágenes B, D y F captadas a 40X.

Grupo TCM

En la histología hepática del grupo TCM se encontró esteatosis microvesicular, en menor grado que el grupo control, casi equiparable a los del grupo sacarosa, el cual se puede observar en la **Figura 14**.

En los resultados, el grupo TCM desarrolló grado 3 de EHNA, con una presencia de esteatosis hepática de 34 a 66%.

Los resultados obtenidos, son muy similares a lo reportado por otros autores, en donde se ha observado una disminución casi completa del daño hepático, incluyendo una observable reducción de esteatosis hepática, en los grupos con mayor contenido de TCM en ratas Sprague Dawley (Ronis et al., 2013). De igual manera, se puede observar una apariencia del tejido hepático casi normal o sano en ratones de la cepa C57BL/6, en los grupos alimentados con TCM (Carlson et al., 2015).

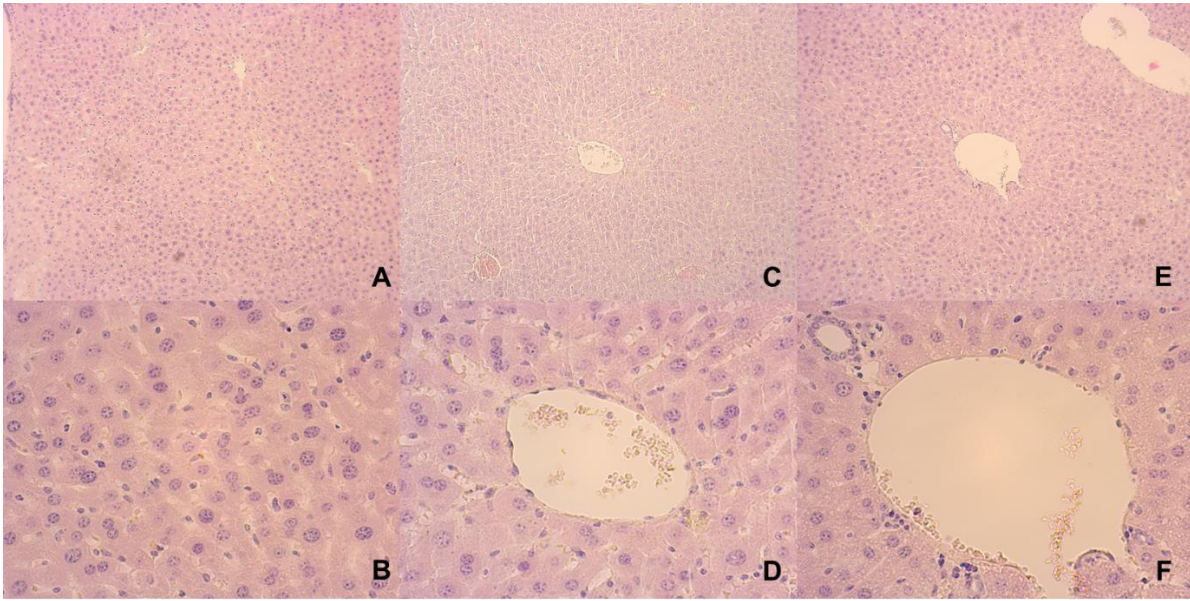


Figura 14. Histología grupo TCM.

Imágenes A y B parénquima, C y D vena central, E y F estructura porta. Imágenes A, C y E captadas a 10X, imágenes B, D y F captadas a 40X.

Grupo sacarosa + TCM

En la histología hepática del grupo sacarosa + TCM, se encontraron esteatosis microvesicular, infiltrado de células inflamatorias, así como una clara progresión a EHNA como se muestra en la **Figura 15**.

El grupo sacarosa + TCM, desarrolló una EHNA grado 6, con presencia de esteatosis hepática de 34 a 66%. El daño hepático que se presenta en este grupo puede deberse a que, además de la activación de la lipogénesis de novo, procedente de glucosa y fructosa de la sacarosa, los TCM, al ser oxidados rápidamente en el hígado, generan un exceso de acetil-CoA, y al encontrarse en exceso, pueden participar como sustrato para la lipogénesis de novo, provocando una acumulación de TG hepáticos (Guimarães et al., 2019) De igual manera, los AGCM incrementan la activación de marcadores que participan en la lipogénesis tales como SREBP1c y FAS (Shinohara, Ogawa, Kasai, & Aoyama, 2005). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, no se recomienda la combinación de sacarosa con TCM, debido a que el exceso en el consumo de esta mezcla resultó perjudicial para el tejido hepático con HGNA.

El análisis de histología hepática muestra resultados similares a los publicados recientemente por Guimaraes y colaboradores, en el 2019, en donde utilizaron fructosa en combinación con TCM en ratones de la cepa C57BL/6, durante 12 semanas, obteniendo como resultado un significativo daño hepático comparado con sus grupos control, grupo TCM y grupo fructosa, argumentando que la combinación de fructosa con TCM no atenuaba ni disminuía el daño hepático, obteniendo no obstante, esteatosis macrovesicular y microvesicular, lo cual fue similar a lo que pudimos observar en el presente estudio, en donde el grupo sacarosa + TCM, resultó con mayor grado de EHNA que los otros grupos de tratamiento.

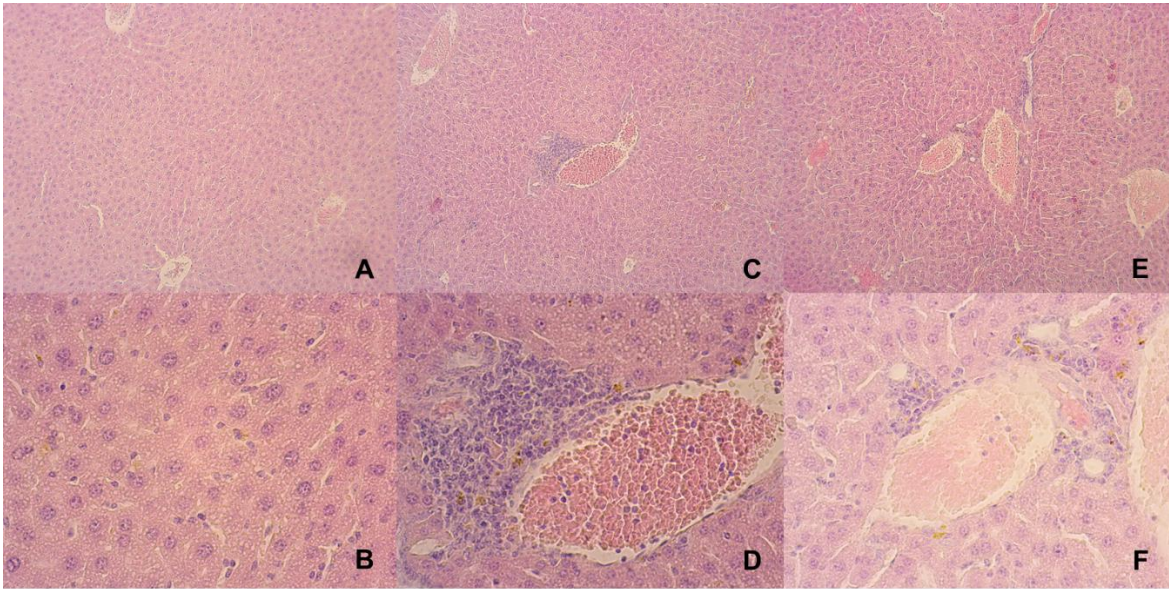


Figura 15. Histología grupo sacarosa + TCM.

Imágenes A y B parénquima, C y D vena central, E y F estructura porta. Imágenes A, C y E captadas a 10X, imágenes B, D y F captadas a 40X.

CONCLUSIONES

El tratamiento con 25 mL/kg/día de TCM, durante 10 semanas, redujo la esteatosis hepática y TG hepáticos en ratones de la cepa C57BL/6n con HGNA inducido con una solución al 50% de sacarosa, en el grupo TCM individual comparado con el grupo control, con esta disminución en la esteatosis hepática se obtuvo como consecuencia una mejoría en algunas variables en suero. Se pudo observar disminución significativa del peso corporal en el grupo TCM comparado con el grupo control, mientras que en los resultados en suero, se pudo observar una disminución significativa en las concentraciones de glucosa en el grupo TCM comparado con el grupo sacarosa, una tendencia de disminución sin significancia estadística en el grupo TCM en los resultados de insulina y HOMA-IR, y un aumento significativo en las concentraciones de c-HDL en el grupo TCM comparado al resto de los grupos de tratamiento. Por otro lado, el grupo TCM mostró un aumento significativo en las concentraciones de CT, enzimas ALT y AST comparado con el grupo control, por lo que el aumento de CT explicaría a su vez el aumento de c-HDL como medio de protección del organismo a la eliminación del exceso de colesterol, y el aumento de enzimas hepáticas explicaría la esteatosis aún presente en el hígado, aunque en menor grado en comparación con el grupo control. Sin embargo, combinando TCM con una dieta alta en sacarosa no redujo la esteatosis hepática, esto pudiera deberse a que los TCM pueden actuar de manera similar a los carbohidratos en el organismo, y al combinar con sacarosa en la dieta se pudo provocar un aumento en las vías lipogénicas, como la lipogénesis de novo, pudiéndose sintetizar mayor cantidad de lípidos en el hígado y al mismo tiempo, alterando las variables bioquímicas analizadas en este proyecto de investigación, por lo tanto no se observó, en los resultados en suero ni en el análisis de histología hepática, alguna mejoría en ese grupo.

Aunque el consumo de TCM de forma individual resultó ser una alternativa de tratamiento en ratones de la cepa C57BL/6n con HGNA inducido con sacarosa, no mostró la misma efectividad cuando se combinaban con una dieta alta en sacarosa.

En ese sentido, se recomienda desarrollar más estudios que analicen la posible interacción que puede representar el consumo de TCM combinados con carbohidratos u otros macronutrientes de la dieta en el desarrollo de EHNA, evaluar sus posibles mecanismos de acción y de esta manera, estar en mejores condiciones de poder recomendar ampliamente su consumo como alternativa nutricional para el tratamiento de esteatosis hepática no alcohólica.

REFERENCIAS

- Acosta-Cota, S. de 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. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0353>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1892-7>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>
- Argüeso Armesto, R., Díaz Díaz, J., Díaz Peromingo, J., Rodríguez González, A., Castro Mao, M., & Diz-Lois Martínez, F. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicia Clínica*, 72(1), 7–17.
- Ayala, I., Cámara, P., Flores, I., Cascales, A. I., Panizo, G., Valdés, M., ... B, G. P. (2008). Experimental animal models of fatty liver disease and metabolic syndrome. *An. Vet. (Murcia)* 24: 5-16 (2008)., 16, 5–16. Retrieved from <http://revistas.um.es/analesvet/article/view/68991/66421>
- Bach, A. C., & Babayan, K. (2018). *Medium-chain triglycerides*: (January), 950–962.
- Bellentani, S. (2017). The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 37(October 2016), 81–84. <https://doi.org/10.1111/liv.13299>
- Buccini Graciela, S., & Wolfthal, D. L. (2008). Valores de corte para índices de insulinoresistencia, insulinosensibilidad e insulinosecreción derivados de la fórmula HOMA y del programa HOMA2. Interpretación de los datos. 1er Premio al mejor Trabajo Clínico del XV Congreso SAEM 2007. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 45(1), 3–21.
- Burke, S. J., Batdorf, H. M., Martin, T. M., Burk, D. H., Noland, R. C., Cooley, C. R., ...

- Collier, J. J. (2018). Liquid Sucrose Consumption Promotes Obesity and Impairs Glucose Tolerance Without Altering Circulating Insulin Levels. *Obesity*, 26(7), 1188–1196. <https://doi.org/10.1002/oby.22217>
- Carlson, S. J., Nandivada, P., Chang, M. I., Mitchell, P. D., O'Loughlin, A., Cowan, E., ... Puder, M. (2015). The addition of medium-chain triglycerides to a purified fish oil-based diet alters inflammatory profiles in mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 64(2), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.005>
- Caro-Sabido, E. A., & Larrosa-Haro, A. (2019). Efficacy of dietary intervention and physical activity in children and adolescents with nonalcoholic fatty liver disease associated with obesity: A scoping review. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 84(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.02.001>
- Carvajal, C. (2014). Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. Revisión bibliográfica. *Medicina Legal de Costa Rica. Edición Virtual*, 31(2), 829–837. Retrieved from https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200010
- Carvalho, P., Carvalho, E., Barbosa-da-silva, S., Sol, D. E. L., & Nafld, M. (2017). *NAFLD e Ingesta de Fructosa en Altas concentraciones . Una Revisión de la Literatura*. 35(2), 676–683.
- Dyson, J. K., Anstee, Q. M., & McPherson, S. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: A practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterology*, 5(4), 277–286. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2013-100404>
- Geng, S., Zhu, W., Xie, C., Li, X., Wu, J., Liang, Z., ... Zhong, C. (2016). Medium-chain triglyceride ameliorates insulin resistance and inflammation in high fat diet-induced obese mice. *European Journal of Nutrition*, 55(3), 931–940. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0907-0>
- Guimarães, J., Bargut, T. C. L., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Aguila, M. B. (2019). Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 140(November 2018), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.11.005>
- Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and*

- Molecular Life Sciences*, 75(18), 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
- Kanel, G. C. (2009). Liver: Anatomy, Microscopic Structure, and Cell Types. *Textbook of Gastroenterology, Fifth Edition*, 2, 2057–2072. <https://doi.org/10.1002/9781444303254.ch79>
- Kucera, O., & Cervinkova, Z. (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 20(26), 8364–8376. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i26.8364>
- Kusmeirczyk, J., Kling, M., Kier, A. B., Milligan, S. M., & Heatley, J. J. (2020). Rats and Mice. *Exotic Animal Laboratory Diagnosis*, 81–112. <https://doi.org/10.1002/9781119108610.ch6>
- LaBrecque, D., Abbas, Z., Anania, F., Ferenci, P., Ghafor-Kjan, A., & Goh, K. L. (2012). Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica. *Guías De La Organización Mundial De Gastroenterología*, 1(1), 1–31.
- Liu, Y., Xue, C., Zhang, Y., Xu, Q., Yu, X., Zhang, X., ... Guo, C. (2011). Triglyceride with medium-chain fatty acids increases the activity and expression of hormone-sensitive lipase in white adipose tissue of C57BL/6J Mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(10), 1939–1944. <https://doi.org/10.1271/bbb.110321>
- Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P., & Loria, P. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome. *Digestive and Liver Disease*, 47(3), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.09.020>
- López-Oliva Muñoz, E., & Muñoz Martínez, E. (2014). SREBP-1c, ChREBP y LXR: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 80(1), 14–48.
- 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.
- Loza-Medrano, S. S., Baiza-Gutman, L. A., Ibáñez-Hernández, M. Á., Cruz-López, M., & Díaz-Flores, M. (2019). Molecular alterations induced by fructose and its impact

- on metabolic diseases. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 56(5), 491–504.
- Manterola, C., del Sol, M., Ottone, N., & Otzen, T. (2017). Anatomía quirúrgica y radiológica del hígado. Fundamentos para las resecciones hepáticas. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1525–1539. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401525>
- 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 Espanola de Enfermedades Digestivas*, 105(7), 409–420. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082013000700006>
- Mociños, C. A., & Salazar, J. (2014). *Estimación de los valores Resumen*. (August 2016).
- Pedro-Botet, J., & Pedragosa, À. (2011). Hígado graso no alcohólico: Conexiones entre los triglicéridos plasmáticos y su depósito hepático. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 23(2), 88–89. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.03.008>
- Perla, F., Prelati, M., Lavorato, M., Visicchio, D., & Anania, C. (2017). The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children*, 4(6), 46. <https://doi.org/10.3390/children4060046>
- Perumpail, B. J., Khan, M. A., Yoo, E. R., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2017). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(47), 8263–8276. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i47.8263>
- 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*, 00(00), 1–19. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1680817>
- Prophet, E. B. (1992). *Laboratory methods in histotechnology*. Amer Registry of Pathology.

- Riveros, M. J., Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutricion Hospitalaria*, 29(3), 491–499. <https://doi.org/10.3305/NH.2014.29.3.7178>
- Ronis, M. J. J., Baumgardner, J. N., Sharma, N., Vantrease, J., Ferguson, M., Tong, Y., ... Badger, T. M. (2013). Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental Biology and Medicine*, 238(2), 151–162. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012303>
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Vaquero, M. P., Schultz-Moreira, A., Bastida, S., & Sánchez-Muniz, F. J. (2008). Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutricion Hospitalaria*, 23(3), 191–202.
- 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 and Function*, 6(5), 1684–1691. <https://doi.org/10.1039/c5fo00251f>
- Seaton, T. B., Welle, S. L., Warenko, M. K., & Campbell, R. G. (1986). Thermic effect of medium-chain and long-chain triglycerides in man. *American Journal of Clinical Nutrition*, 44(5), 630–634. <https://doi.org/10.1093/ajcn/44.5.630>
- Shinohara, H., Ogawa, A., Kasai, M., & Aoyama, T. (2005). Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(10), 1811–1818. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1811>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>
- Stanhope, K. L. (2016). Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 53(1), 52–67. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1084990>
- Stefan, N., Häring, H. U., & Cusi, K. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease: causes,

- diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 7(4), 313–324. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30154-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30154-2)
- Takahashi, Y., Soejima, Y., & Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2300–2308. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i19.2300>
- Takahashi, Y., Sugimoto, K., Inui, H., & Fukusato, T. (2015). Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(13), 3777–3785. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i13.3777>
- Takaki, A., Kawai, D., Yamamoto, K., Paglialunga, S., Dehn, C. A., Lau, J. K. C., ... Stonehouse, W. (2014). Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: A systematic review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jpn.12030>
- Terada, S., Sekine, S., & Aoyama, T. (2015). Dietary intake of medium- and long-chain triacylglycerols prevents the progression of hyperglycemia in diabetic ob/ob mice. *Journal of Oleo Science*, 64(6), 683–688. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14287>
- Terada, S., Yamamoto, S., Sekine, S., & Aoyama, T. (2012). Dietary intake of medium- and long-chain triacylglycerols ameliorates insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Nutrition*, 28(1), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.04.008>
- to Barba Evia, J. R. (2008). Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 55(4), 216–232.
- Traul, K. A., Driedger, A., Ingle, D. L., & Nakhasi, D. (2000). Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food and Chemical Toxicology*, 38(1), 79–98. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00106-4)
- Vega-Badillo, J. (2017). Alteraciones En La Homeostasis Del Colesterol Hepático Y Sus Implicaciones En La Esteatohepatitis No Alcohólica. *Tip*, 20(1), 50–65. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.11.005>
- Velarde-Ruiz Velasco, J. A., García-Jiménez, E. S., García-Zermeño, K. R., Morel-Cerda, E. C., Aldana-Ledesma, J. M., Castro-Narro, G. E., ... Contreras-Omaña,

- R. (2019). Extrahepatic complications of non-alcoholic fatty liver disease: Its impact beyond the liver. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(4), 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.05.004>
- Wakim, K. G. (2017). Physiology of the liver. *The American Journal of Medicine*, 16(2), 256–271. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(54\)90342-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(54)90342-3)
- Willebrords, J., Pereira, I. V. A., Maes, M., Crespo Yanguas, S., Colle, I., Van Den Bossche, B., ... Cogliati, B. (2015). Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Progress in Lipid Research*, 59(June), 106–125. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.05.002>
- Yang, M. H., Sung, J., & Gwak, G. Y. (2016). The associations between apolipoprotein B, A1, and the B/A1 ratio and nonalcoholic fatty liver disease in both normal-weight and overweight Korean population. *Journal of Clinical Lipidology*, 10(2), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.11.017>
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8152–8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
- Yin, W., Carballo-Jane, E., McLaren, D. G., Mendoza, V. H., Gagen, K., Geoghagen, N. S., ... Strack, A. M. (2012). Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *Journal of Lipid Research*, 53(1), 51–65. <https://doi.org/10.1194/jlr.M019927>
- Zavala, C. (2000). *Metabolismo de las lipoproteínas y significado clínico*. 11(Figura 1), 4. Retrieved from http://www.clinicalascondes.cl/clcprod/media/contenidos/pdf/MED_11_1/Metabolismo.pdf
- Zhang, L. L., Zhang, H., Li, Y., & Wang, T. (2017). Effects of medium-chain triglycerides on intestinal morphology and energy metabolism of intrauterine growth retarded weanling piglets. *Archives of Animal Nutrition*, 71(3), 231–245. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2017.1312812>
- Zhang, X., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, J., Xu, Q., Yu, X., ... Xue, C. (2016). Medium-chain triglycerides promote macrophage reverse cholesterol transport and improve atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed a high-fat diet. *Nutrition Research*,

36(9), 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.06.004>

Zhang, Y., Xu, Q., Liu, Y. H., Zhang, X. S., Wang, J., Yu, X. M., ... Xue, C. Y. (2015). Medium-chain triglyceride activated brown adipose tissue and induced reduction of fat mass in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Biomedical and Environmental Sciences*, 28(2), 97–104. <https://doi.org/10.3967/bes2015.012>

Zhou, S., Wang, Y., Jacoby, J. J., Jiang, Y., Zhang, Y., & Yu, L. L. (2017). Effects of Medium- and Long-Chain Triacylglycerols on Lipid Metabolism and Gut Microbiota Composition in C57BL/6J Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6599–6607. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01803>

Zhou, S., Wang, Y., Jacoby, J. J., Jiang, Y., Zhang, Y., Yu, L. L., ... García, C. F. (2017). The addition of medium-chain triglycerides to a purified fish oil-based diet alters inflammatory profiles in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 1–12. <https://doi.org/10.3109/09637486.2016.1153611>

Zhou, S., Wang, Y., Jiang, Y., Zhang, Z., Sun, X., & Yu, L. 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. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13789>