



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**“Caracterización de un modelo dietario de esteatosis hepática no  
alcohólica en ratones”.**

**Tesis**

**Que para obtener el título de:**

**Licenciado en Farmacia**

**P r e s e n t a:**

**José Antonio Montes Martínez**

**ASESOR:**

**Dr. Salvador Fonseca Coronado**

**COASESORES**

**L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez**

**Dra. Emma Isabel Hidalgo Pérez Tejada**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

UNAM

CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO

DE TITULACIÓN

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDEZ RAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis y Examen Profesional

Caracterización de un modelo dietario de esteatosis hepática no alcohólica en ratones.

Que presenta el pasante: José Antonio Montes Martínez  
Con número de cuenta: 312092656 para obtener el título de: Licenciado en Farmacia.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Agosto de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

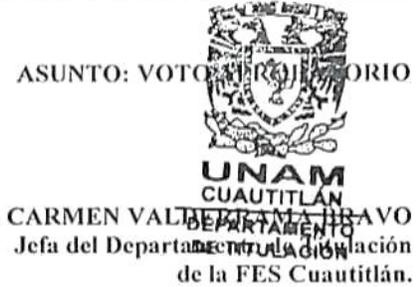
	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en F.C. Cecilia Hernández Barba	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Daniel Raygoza Trejo	
2do. SUPLENTE	M. en C. Diana Ramírez Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/cga\*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**



**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERAMA BRAVO**  
Jefa del Departamento de Titulación de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis y Examen Profesional**

**Caracterización de un modelo dietario de esteatosis hepática no alcohólica en ratones.**

Que presenta el pasante: **José Antonio Montes Martínez**  
Con número de cuenta: **312092656** para obtener el título de: **Licenciado en Farmacia.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Agosto de 2023.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en F.C. Cecilia Hernández Barba	
<b>VOCAL</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Daniel Raygoza Trejo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Diana Ramírez Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/cga\*

### **Dedicatoria.**

Para toda la gente que me ha acompañado durante mis años vividos. A todos mis amigos aquellos que guardo mucho cariño. A toda mi familia por estar en momentos de dicha y dolor, mostrarme el camino en momentos de oscuridad y siempre brindarme un lugar cálido en el cual descansar. A la Dra. Isabel por ser parte importante de este proyecto y en mi vida, por ser una excelente mujer y amiga, por ser una persona que deja huella en el alma. A mis asesores por darme la oportunidad y compartir sus años de experiencia, su amistad y su calidez. Gracias a todos mis amigos de la Superior de Medicina por su ayuda, sus buenos deseos y sus enseñanzas, los aprecio mucho. Gracias a todos mis compañeros de laboratorio a los cuales admiro y respeto.

Llevo con gran amor a todas las personas que conocí durante mis años universitarios, me guardo en el corazón esta etapa maravillosa.

Gracias a todos los que me brindaron su ayuda, sus palabras de aliento y su tiempo. Sin duda alguna conocí personas maravillosas en este proceso, a la Dra. Norma Laura que me instruyó y a la cual mando un abrazo a donde este.

Gracias a la vida por permitirme gozar de compañías excelsas en cualidades.

**“Cada hombre es absolutamente para sí mismo el sendero, la verdad y la vida. Los que pidan obtendrán. Los que deseen aprender, aprenderán. La palabra sólo viene con el conocimiento. Alcanza el conocimiento y alcanzarás la vida”.**

## ÍNDICE.

<b>1. Introducción.</b>	<b>10</b>
<b>2. Generalidades.</b>	<b>11</b>
<b>Anatomía y fisiología del hígado.</b>	<b>11</b>
Funciones del hígado.	15
<b>Generalidades del metabolismo de lípidos.</b>	<b>16</b>
Metabolismo exógeno.	16
Metabolismo endógeno.	16
<b>Células de Kupffer.</b>	<b>18</b>
<b>Células endoteliales sinusoidales.</b>	<b>18</b>
<b>Células estrelladas.</b>	<b>18</b>
Desarrollo de fibrosis.	19
<b>Enfermedad de Hígado graso no alcohólico.</b>	<b>21</b>
Definición.	21
Prevalencia.	21
Causas asociadas a la EHGNA.	22
Obesidad.	23
Resistencia a la insulina y su relación con la Diabetes Mellitus tipo 2.	23
Síndrome Metabólico.	25
Dislipidemias.	26
<b>Fisiopatología.</b>	<b>26</b>
Teoría de los dos golpes.	26
Teoría de los múltiples golpes.	28
Métodos de detección de EHGNA.	31
Tratamiento para la EHGNA.	32
<b>Modelos animales de inducción de EHGNA.</b>	<b>34</b>
Uso de ratones C57BL/6.	35
Dieta alta en grasas para inducción de EHGNA (HFD).	35
Dieta alta en colesterol.	35
Uso de fructosa para la generación de EHGNA.	36

Dieta aterogénica. Paigen. _____	36
<b>Técnicas de tinción. _____</b>	<b>37</b>
Hematoxilina - Eosina. _____	37
Tricrómica de Masson. _____	38
Rojo oleoso. _____	38
<b>Pruebas para determinación de perfil lipídico. _____</b>	<b>38</b>
Colesterol. _____	38
Triglicéridos. _____	39
HDL. _____	39
LDL. _____	40
<b>3. Justificación. _____</b>	<b>41</b>
<b>4. Objetivos. _____</b>	<b>42</b>
General _____	42
Particulares. _____	42
<b>5. Hipótesis. _____</b>	<b>42</b>
<b>6. Metodología. _____</b>	<b>42</b>
Diseño experimental _____	42
Condiciones de alojamiento y limpieza _____	43
Implementación del modelo de EHGNA inducida por dieta. _____	43
Grupos experimentales. _____	43
Composición de las dietas. _____	44
Preparación de la dieta Paigen. _____	45
Eutanasia y extracción de tejidos. _____	45
Determinación de perfil lipídico. _____	46
Determinación de Colesterol. _____	46
Determinación de triglicéridos. _____	46
Determinación de HDL. _____	47
Determinación de LDL. _____	47
Determinación de índice aterogénico. _____	48
Proceso de histología. _____	48
Tren de deshidratado. _____	48
Obtención de cortes histológicos. _____	49
Tinción Hematoxilina-Eosina. _____	50
Tinción Tricrómica de Masson. _____	51
Tinción Rojo Oleoso. _____	51
Determinación de urea. _____	52
Determinación de carbonilos. _____	53

<b>Resumen de Metodología.</b>	<b>54</b>
<b>7. Resultados.</b>	<b>56</b>
Perfil lipídico.	56
Cortes histológicos.	65
Urea.	74
Carbonilos	75
<b>8. Resumen de resultados.</b>	<b>76</b>
<b>9. Discusión.</b>	<b>77</b>
<b>10. Conclusiones.</b>	<b>86</b>
<b>11. Referencias.</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Anatomía del hígado (Sibulensky, 2013).</b> .....	12
<b>Figura 2. Vista anterior (izquierda) y posteroinferior (derecha) del hígado (Alvarado, 2023).</b> .....	13
<b>Figura 3. Segmentación del hígado basado en sus divisiones principales de la vena porta y la arteria hepática (Alvarado, 2023).</b> .....	14
<b>Figura 4. Estructura del Hepatocito (Ríos, 2020).</b> .....	15
<b>Figura 5. Metabolismo de lipoproteínas vía endógena y exógena (Real &amp; Ascaso, 2021).</b> .....	17
<b>Figura 6. Mecanismo de fibrogénesis hepática. Odena, G., &amp; Bataller, R. (2012). Fibrogénesis hepática: fisiopatología.</b> .....	20
<b>Figura 7. Inflamación y resistencia a la insulina. (Gutiérrez-Rodelo, C. 2017).</b> .....	24
<b>Figura 8. Desarrollo de EHGNA por teoría de los dos golpes (Martin V, 2013).</b> .....	28
<b>Figura 9. Vías patogénicas involucradas en la EHGNA (Pathophysiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease, 2016).</b> .....	29
<b>Figura 10. Potenciales Fármacos usados en la EHGNA (Ampuero, et al. 2018).</b> .....	34
<b>Figura 11. Representación gráfica: determinación de Colesterol en plasma.</b> .....	56
<b>Figura 12. Representación gráfica: determinación de triglicéridos en plasma.</b> .....	57
<b>Figura 13. Representación gráfica: determinación de LDL en plasma.</b> .....	58
<b>Figura 14. Representación gráfica: determinación de HDL en plasma.</b> .....	59
<b>Figura 15. Representación gráfica: determinación de índice aterogénico.</b> .....	60
<b>Figura 16. Representación gráfica: determinación de glucosa en plasma.</b> .....	61
<b>Figura 17. Representación gráfica: peso corporal de ratones.</b> .....	62
<b>Figura 18. Representación gráfica: peso de hígado.</b> .....	63
<b>Figura 19. Representación gráfica: peso relativo.</b> .....	64
<b>Figura 20. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo control. Tinción H&amp;E observado: a) 10x, b)40x y c)100x. Flecha naranja: núcleo. Flecha azul: citoplasma. Flecha verde: sinusoide. Flecha amarilla: macrófagos.</b> .....	65
<b>Figura 21. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo alimentado con dieta Paigen. Tinción H&amp;E observado: a) 10x, b)40x y c)100x. Flecha azul: núcleo. Flecha verde: macrovesículas ocupando casi la totalidad del citoplasma. Flecha naranja: infiltración leucocitaria rodeando los hepatocitos balonizados.</b> .....	66
<b>Figura 22. Campimetría de laminillas teñidas con H&amp;E, donde se muestra el porcentaje de células normales y anormales en tejido hepático.</b> .....	67
<b>Figura 23. Porcentaje de células hepáticas que presentan macrovesículas y microvesículas.</b> .....	68
<b>Figura 24. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo control. Tinción Tricrómica de Masson observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: vena porta. Flecha azul claro: arteria hepática. Flecha Azul grisáceo: ducto biliar. Flecha amarillo oscuro: Tejido fibroso propio de la arteria.</b> .....	69
<b>Figura 25. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo alimentado con dieta Paigen. Tinción Tricrómica de Masson observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: fibroblastos. Flecha roja: fibras de colágeno.</b> .....	70
<b>Figura 26. Campimetría de laminillas teñidas con Tricrómica de Masson, donde se representa el grado de fibrosis en tejido hepático.</b> .....	71

Figura 27. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo control. Tinción Rojo Oleoso observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: núcleo. Flecha roja: citoplasma con pequeñas gotas lipídicas. ....	72
Figura 28. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo alimentado con la dieta Paigen. Tinción Rojo Oleoso observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: núcleo. Flecha azul oscuro: gotas lipídicas presentes en el citoplasma. ....	73
Figura 29. Porcentaje de células hepáticas con gotas lipídicas. ....	74
Figura 30. Representación gráfica: determinación de urea en plasma. ....	74
Figura 31. Representación gráfica: determinación de carbonilos en tejido hepático. ....	75

#### INDICE DE DIAGRAMAS.

Diagrama 1. Esquema de la distribución de grupos. ....	44
Diagrama 2. Metodología experimental. ....	54
Diagrama 3. Metodología experimental. ....	55

#### INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición de las dietas. ....	44
Tabla 2. Tren de deshidratado para cortes histológicos. ....	48
Tabla 3. Tren de tinción H&E. ....	50
Tabla 4. Tren de tinción Tricrómica de Masson. ....	51
Tabla 5. Tren de tinción rojo oleoso. ....	52

## **1. Introducción.**

La Enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) o esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) es actualmente la enfermedad hepática crónica más común a nivel mundial, con una prevalencia estimada de 25.24%, de la cual Oriente Medio y América del Sur ocupan una mayor incidencia en la patología y la más baja en África (Younossi et al., 2016). En México, un estudio en población derecho habiente de compañías aseguradoras que acudió a una revisión clínica reportó una prevalencia de EHGNA del 14.4% (J. Lizardi Cervera. 2006).

La patología se caracteriza por la acumulación de vacuolas de grasa en el citoplasma de los hepatocitos y por la presencia de lesiones hepáticas similares a las producidas por el alcohol en sujetos que no consumen cantidades tóxicas de éste (Caballería Rovira et al., 2008). La EHGNA engloba un espectro de entidades histopatológicas que se correlacionan directamente con la historia natural de la enfermedad, siendo las primeras etapas no detectables de forma clínica hasta que el daño es considerable y se hace evidente la elevación de las transaminasas como el primer indicio de la enfermedad, el cual está asociado con el síndrome metabólico, caracterizado por obesidad, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e hipertensión (Morales Carrasco., et al 2020). Es así como la detección oportuna de la enfermedad permite incidir en factores asociados y evitar su evolución hacia formas más graves, por lo que su estudio tanto a nivel clínico como en modelos animales es muy importante para la búsqueda de marcadores de inicio y progresión (Caballería Rovira et al., 2008).

En un estudio publicado por el Dr. Henry Cohen, se menciona que el examen histológico (biopsia hepática) es el patrón de oro en el diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, la biopsia hepática constituye un procedimiento de alto riesgo, por lo tanto, no puede ser realizado con la frecuencia necesaria para dar el seguimiento a la progresión, de tal manera que se han descrito diversos abordajes para evaluar la evolución de la EHGNA, siendo los modelos animales los que más información ofrece en este sentido. Según el porcentaje de hepatocitos afectados la EHGNA se puede clasificar en: leve (25% de hepatocitos afectados), moderada (25

a 50% de hepatocitos afectados) y severa (50% de hepatocitos afectados) (Cohen et al., 1997).

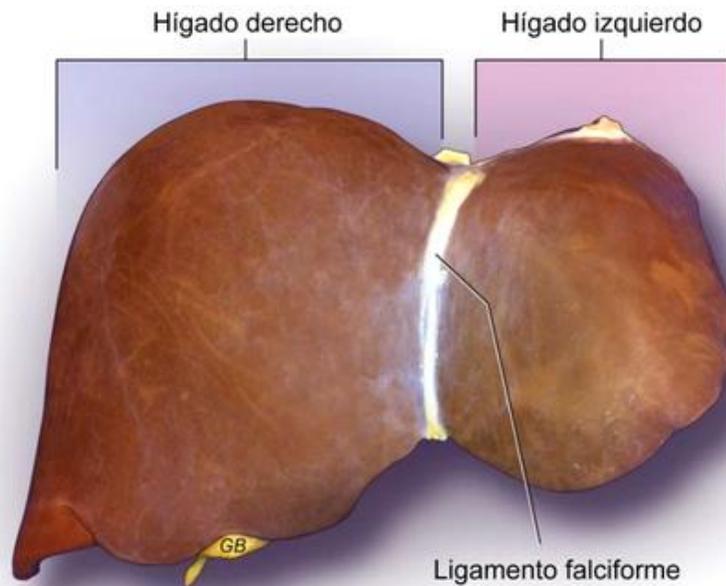
En esta tesis se presentan los resultados de la implementación de un modelo murino en el que se llevó a cabo la inducción de EHGNA a través de una dieta alta en grasas, favoreciendo el desarrollo de esta enfermedad con características clínicas similares a las reportadas en humanos. Este modelo facilitará el estudio de la fisiopatología e histología de la enfermedad para entender a nivel celular, serológico y molecular las vías de patológicas; contribuyendo con la generación de nuevas estrategias, intervenciones, tratamientos y medidas que puedan prevenir o revertir esta patología.

## **2. Generalidades.**

### **Anatomía y fisiología del hígado.**

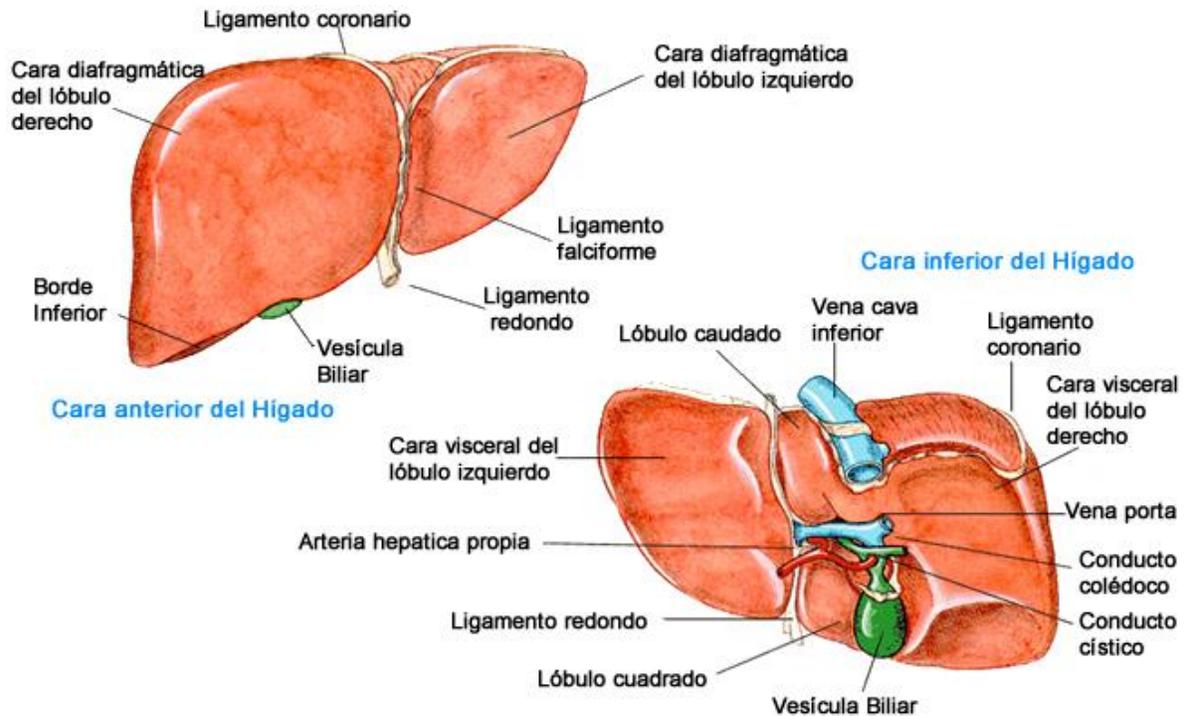
El hígado es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano. Se encuentra separado de manera incompleta en dos lóbulos, cubiertos en sus superficies externas por una fina capsula de tejido conjuntivo y su peso en adultos sanos es de 1500 g, aproximadamente (McCuskey, R. 2012).

A nivel externo, el hígado está dividido por el ligamento falciforme, que forma un lóbulo derecho mayor y un lóbulo izquierdo más pequeño (Figura 1).



**Figura 1. Anatomía del hígado (Sibulensky, 2013).**

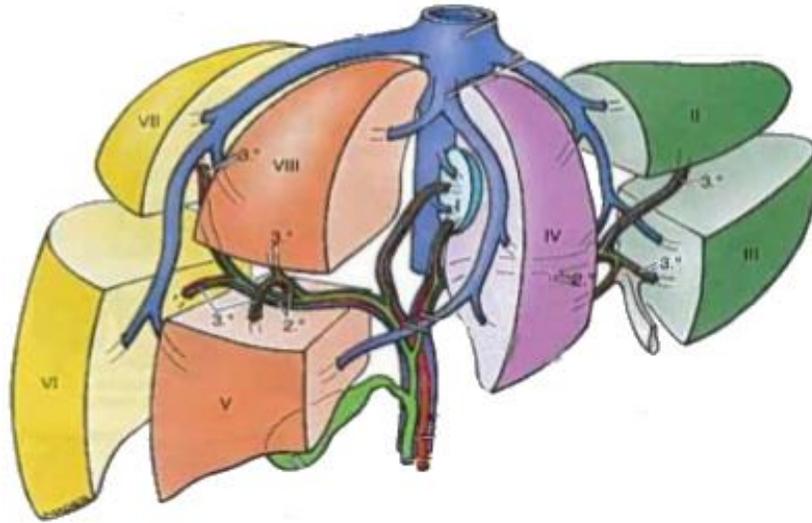
Se ubica en la región hipocondriaca y epigástrica derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma. El suministro de sangre dual del hígado ingresa al órgano en el hilo (porta hepatis) acompañado por el conducto biliar hepático, los vasos linfáticos y los nervios. Aproximadamente el 80% de la sangre que ingresa al hígado está pobremente oxigenada y es suministrada por la vena porta, esta es la sangre venosa que fluye en los intestinos, páncreas, el bazo y la vesícula biliar. El 20% restante del suministro de sangre está bien oxigenada y es entregada por la arteria hepática (Sibulesky, 2013). Las principales vías sanguíneas de salida del hígado son las venas hepáticas: derecha, media e izquierda; las cuales entran en la vena cava inferior (Figura 2), (Manterola, et al. 2017).



**Figura 2. Vista anterior (izquierda) y posteroinferior (derecha) del hígado (Alvarado, 2023).**

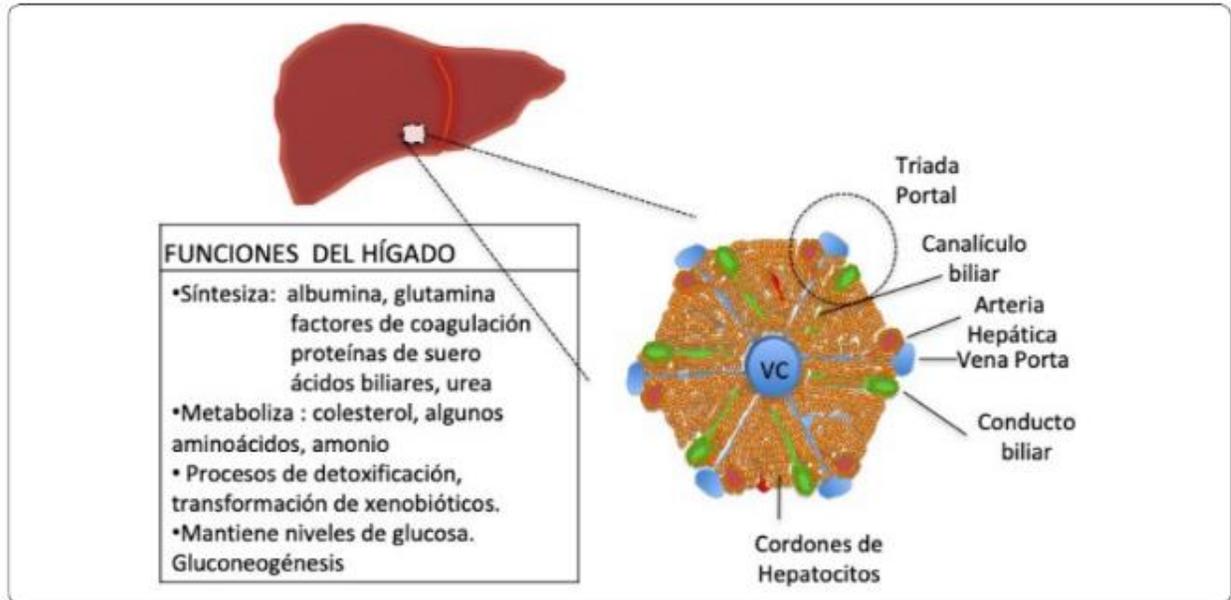
El hígado está encapsulado por una fina capa de tejido conectivo (capsula de Glisson) que consiste principalmente en fibras de colágeno tipo I, fibras dispersas tipo III, fibroblastos, mastocitos y pequeños vasos sanguíneos (McCuskey, R. 2012).

Los 8 segmentos del hígado se delimitan por la distribución del sistema venoso hepático y el sistema venoso portal; cada segmento tiene un flujo vascular y drenaje biliar independiente. El hígado se divide en 4 secciones: la sección anterior (segmentos V y VIII), sección posterior derecha (segmentos VI y VII), sección medial izquierda (segmento IV) y sección lateral izquierda (segmentos II y III) (Manterola, et al. 2017). como se muestra en la figura 3.



**Figura 3. Segmentación del hígado basado en sus divisiones principales de la vena porta y la arteria hepática (Alvarado, 2023).**

La célula funcional del hígado es el hepatocito, que representa el 60% de la población celular total y el 80% del volumen del órgano (Figura 4), (Ríos López, et al. 2020). Los hepatocitos son células de morfología poligonal con bordes celulares bien definidos y pueden contener uno o más núcleos de diverso tamaño (Lefkowitz, 2021). Se encuentran organizados en placas interconectadas que forman una red tridimensional continua. Entre las placas de los hepatocitos hay espacios llamados sinusoides hepáticos, los capilares fenestrados de gran calibre del hígado que nutren cada célula parenquimatosa en varios lados. El espacio sinusoidal y las células no parenquimatosas comprenden la mayor parte del volumen hepático restante. Las células no parenquimatosas incluyen células endoteliales sinusoidales, células estrelladas perisinusoidales (células de Ito que almacenan grasas) y células de Kupffer intraluminales. Una red interconectada de diminutos canales intercelulares forma los canalículos biliares, que transcurren entre los hepatocitos adyacentes. Estos reciben la bilis secretada por los hepatocitos y luego drenan a través de conductos biliares cortos parcialmente revestidos por células epiteliales cuboidales hacia los conductos biliares (McCuskey, R. 2012).



**Figura 4. Estructura del Hepatocito (Ríos, 2020).**

**Funciones del hígado.**

El hígado, es un órgano esencial en la regulación y mantenimiento de la homeostasis metabólica. Las funciones hepáticas son muy amplias y variadas, son llevadas a cabo por el hepatocito. Algunas de las funciones que el hígado realiza va desde metabolismo de fármacos, degradación de lípidos, almacenamiento de vitaminas y minerales, producción de bilis, síntesis de proteínas. (Kalra A, et al. 2022). También se relaciona con la regulación de los niveles de glucosa (McCuskey, R. 2012).

## **Generalidades del metabolismo de lípidos.**

Existen dos vías por las cuales los lípidos son metabolizados, que se muestran en la Figura 5. La vía de los quilomicrones que se lleva a cabo por metabolismo exógeno y la vía endógena de VLDL, LDL y HDL (Real & Ascaso, 2021).

### **Metabolismo exógeno.**

Esta vía metabólica se refiere al transporte de lípidos desde tubo intestinal, procedentes de la dieta y de los excretados por vía biliar, al hígado y al tejido adiposo.

Los triglicéridos que son ingeridos en la dieta son hidrolizados por las lipasas pancreáticas dentro de la luz intestinal, donde se emulsionan y forman micelas que son captadas por los receptores de las células intestinales a través del transportador específico FAT/CD36. El colesterol es captado por la proteína Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1). Posteriormente, en los enterocitos, el colesterol sufre una reacción de esterificación mediante la acil-CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT). Una vez sintetizados se unen a la ApoB84 por la acción de la proteína de transferencia macrosómica (MTP) formando quilomicrones, donde son transportados al aparato de Golgi por acción de las proteínas de grupo coatomero II (COPII) como SSR1-a y SAR1b (Real & Ascaso 2021).

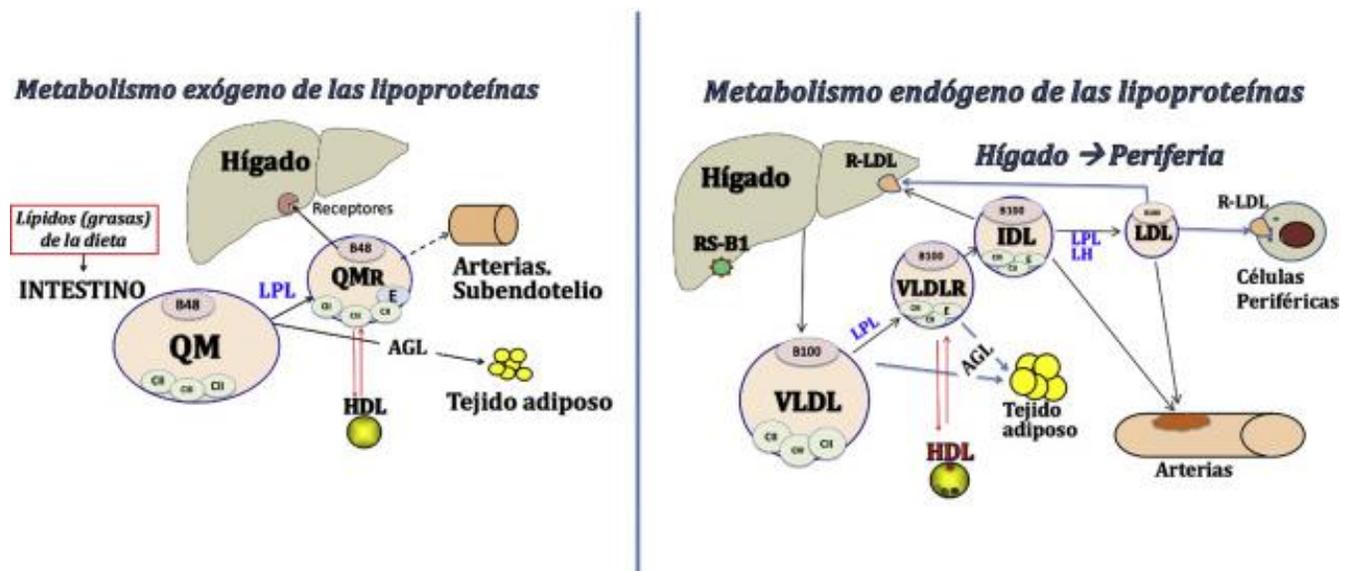
Los quilomicrones formados son secretados hacia la linfa intestinal y después a circulación general. La lipoproteína-lipasa (LPL) hidroliza los triglicéridos (encontrados en el interior de los quilomicrones) generando ácidos grasos libres los cuales son captados por el tejido adiposo y muscular estriado, en donde a través de una reacción de oxidación producirán energía (Carvajal, C. 2014).

### **Metabolismo endógeno.**

Este proceso inicia con el paso de las VLDL ricas en triglicéridos unidas a apoB100, a IDL y finalmente a LDL (Teresa L. Errico: 2013). Las VLDL se componen por triglicéridos y por apoB100 (sintetizada en el hígado). La formación de VLDL se caracteriza por la acción de la enzima proteína MTP, empaquetando triglicéridos hepáticos, esteres de colesterol, colesterol libre, fosfolípidos y apoB100. Una vez sintetizadas, las VLDL, son liberadas en el plasma donde son hidrolizadas por la

lipoproteína lipasa (LPL) originando el remanente de VLDL que es IDL. La IDL tiene dos fines metabólicos, uno es ser catabolizada por el hígado y el otro es permanecer en circulación y dar origen a las LDL por acción de las enzimas lipasa hepática (LH) y la proteína transferidora de esteres de colesterol (CETP) permitiéndole captar esteres de colesterol a partir de HDL (Carvajal, C. 2014).

Las HDL se caracterizan por su contenido de apo A-I y de esteres de colesterol, su síntesis es dependiente de catabolismo de VLDL rica en triglicéridos y por la síntesis de apo A-I (Teresa L. Errico: 2013). Una de las principales funciones de HDL es la captación de colesterol para mantener la homeostasis de este evitando la aterosclerosis, este proceso de captación se realiza a través de un casete proteico de unión a ATP AI (ATP-binding cassette protein AI, [ABCA1]) y G1 (ABCG1) situado en la membrana celular. El colesterol incorporado se esterifica por la lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT), de esta manera se enriquecen en colesterol y apolipoproteínas para ser captadas por los hepatocitos a través del receptor SR-B1. El colesterol hepático que llega gracias a HDL será reutilizado en la síntesis de nuevas VLDL y el resto será excretado desde los hepatocitos por vía biliar a través de los cotransportadores ABCG5/G8 (Real & Ascaso. 2021).



**Figura 5. Metabolismo de lipoproteínas vía endógena y exógena (Real & Ascaso, 2021).**

Clària & Titos (2004), mencionan que las células de Kupffer juegan un papel importante en el metabolismo de lipoproteínas. Las LDL son captadas y metabolizadas en el hígado por acción de las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales. Las LDL se unen a las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales a través del receptor scavenger que llevan a las lipoproteínas a su interior y las hacen susceptibles a la degradación endosomal.

### **Células de Kupffer.**

Las células de Kupffer se caracterizan por ser uno de los tipos celulares hepáticos más activos. Estos macrófagos se encargan de eliminar todo tipo de sustancias innecesarias del organismo mediante fagocitosis. Las funciones que estas células realizan son vitales para el organismo ya que secretan mediadores biológicamente activos que se encargan de regular la respuesta inflamatoria e inmunitaria. La activación de estas células se relaciona con estímulos que desencadenan la patogénesis hepática, una vez activadas liberan cantidades masivas de citocinas como: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ; radicales libres de oxígeno, aniones superóxido, IFN- $\alpha$  y eicosanoides. Por otra parte, también se ven involucradas en el metabolismo de lipoproteínas (Clària & Titos, 2004).

### **Células endoteliales sinusoidales.**

Estas células forman una barrera con pequeños agujeros entre las células parenquimatosas y la sangre que fluye en las sinusoides. La morfología fenestrada de las células endoteliales actúa como un tamiz que evita que los glóbulos rojos y otros componentes celulares interactúen con los hepatocitos y permite un acceso rápido de los hepatocitos para seleccionar sustancias de la sangre (McCuskey, R. 2012).

### **Células estrelladas.**

Las células estrelladas se ubican a lo largo de las sinusoides hepáticos denominado espacio perisinusoidal de Disse. En condiciones normales cumplen diversas

funciones como, por ejemplo: las células estrelladas guardan la vitamina A y otras vitaminas liposolubles. Controlan la comunicación intercelular a través de la liberación de mediadores intercelulares. Y controlan la homeostasis tisular manteniendo un equilibrio fisiológico entre la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular (Sarem et al., 2006).

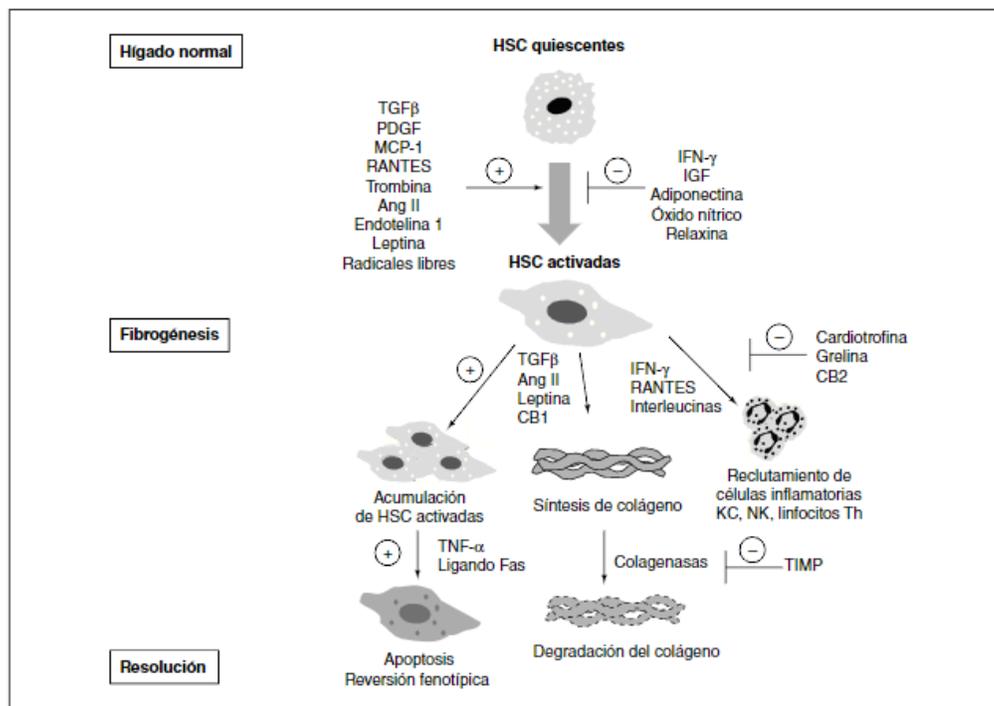
### **Desarrollo de fibrosis.**

Las células estrelladas son las principales responsables de la fibrogénesis y son el objetivo principal de las citocinas en la fibrosis hepática. Las citocinas proinflamatorias liberadas por las células de Kupffer estimulan a las células estrelladas. (Harrison, 2002). Estas células fueron identificadas en los años 90's como una importante fuente de colágeno dentro del hígado (Páramo et al., 2010).

En un artículo publicado por Páramo y colaboradores en el 2010, menciona que la fibrosis es un proceso que se desarrolla por varios pasos que llevan al aumento de la producción en la matriz extracelular. El colágeno tipo I constituye la matriz de tipo fibrilar; el estímulo más potente para aumentar la producción de colágeno tipo I es el Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), considerada una citocina fibrogénica clásica. Otra vía por la que TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de colágeno es a través de peróxido de hidrógeno y un mecanismo dependiente del factor de transcripción C/EBP $\beta$  (Páramo et al., 2010).

G. Odena y R. Bataller en su artículo "Fibrogénesis hepática: fisiopatología", mencionan que la activación de las células estrelladas es consecuente a un daño hepático, provocando el acúmulo de estas células. Generando una gran cantidad de matriz extracelular (generalmente compuesto por colágeno fibrilar, fibronectina, etc.) que se depositan en el parénquima hepático alterando su arquitectura y promoviendo la migración de células inflamatorias (Figura 6). Algunas sustancias promotoras de la activación de las células estrelladas pueden ser algunos factores de crecimiento (TGF $\beta$ , PDGF), también sustancias vasoactivas (trombina, angiotensina II y endotelina-1), citocinas (MCP-1) y adipocinas (leptina). Por otro lado, algunas citocinas (IFN- $\alpha$ , IGF, adiponectina) y sustancias vasodilatadoras

(óxido nítrico, relaxina) son potentes inhibidores de la activación de las células estrelladas. La activación y proliferación de las células estrelladas están reguladas por diversos mecanismos moleculares que a su vez incluyen diversas vías de señalización (MAP cinasas, PI3-cinasa/AKT, PPAR- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B, TLR), también puede ser regulado por canales de transporte iónico (canales de calcio, intercambio sodio/potasio). El factor TGF $\beta$  es el mediador más importante de la fibrosis humana. Una vez que el factor TGF $\beta$  se encuentra activado se une a receptores de la membrana de las células estrelladas, activando diversas cascadas intracelulares como el sistema de las proteínas SMAD, que promueve la expresión genética de proteínas en la matriz extracelular (síntesis de procolágeno I y III). Las células estrelladas activadas secretan grandes cantidades de inhibidores tisulares de las colagenasas (TIMP), que se encargan de regular la actividad de las colagenasas, estas últimas encargadas del proceso de degradación de fibras de colágeno. Durante el proceso de la fibrogénesis hepática hay un incremento en la expresión de TIMP, inhibiendo la actividad de las colagenasas.



**Figura 6. Mecanismo de fibrogénesis hepática. Odena, G., & Bataller, R. (2012). Fibrogénesis hepática: fisiopatología.**

### **Enfermedad de Hígado graso no alcohólico.**

La EHGNA es la manifestación clínica del síndrome metabólico, la cual se caracteriza por el acúmulo de lípidos en el hígado de personas que no consumen alcohol, que puede progresar a esteatohepatitis caracterizada por la aparición de inflamación hepática y fibrosis. Esta patología está relacionada con la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 e hiperlipidemia (Prasomthong et al., 2022)

#### **Definición.**

La organización mundial de Gastroenterología define a esta enfermedad como una condición generada por la acumulación excesiva de grasa en forma de triglicéridos en el hígado. En donde los pacientes muestran lesiones e inflamación de las células hepáticas además de exceso de grasa (World Gastroenterology Organisation [WGO]).

En la actualidad han surgido diversos términos para nombrar a esta patología, de acuerdo con el consenso para la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), publicado en el año 2019; el Dr. Raúl Bernal establece que dicha patología se encuentra estrechamente relacionada con el síndrome metabólico. Siendo un dato de relevancia la formación de macro vesículas de grasa en los hepatocitos, aunque en algunas ocasiones también pueden presentarse micro vesículas. Su espectro patológico puede evolucionar de la esteatosis no alcohólica a la esteatohepatitis, a la cirrosis y al carcinoma hepatocelular. Siendo el último la primera indicación de trasplante hepático (Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico, 2019).

#### **Prevalencia.**

Según un estudio epidemiológico realizado por la Dra. Younossi, se estima que esta patología afecta al 25% de la población mundial (Younossi et al., 2016). En México, se ha observado un aumento en la prevalencia de esta enfermedad ya que el estilo de vida es cada vez más nocivo. Se caracteriza por el consumo excesivo de

alimentos y bebidas con alto contenido de azúcares añadidos y grasas saturadas; a esto se agrega el sedentarismo extremo.

Con base en los reportes de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Pública publicados en el año 2016, la encuesta reportó que en México más del 70% de los adultos presentan sobrepeso y obesidad, en algunos casos presentando obesidad visceral, la cual está asociada con el síndrome metabólico y riesgo cardiovascular.

Por otra parte, la prevalencia nacional de enfermedades crónicas como la DM (7.2% en 2006 y 9.4% en 2016)<sup>7</sup>, la HTA (25.5%)<sup>8</sup> y el hipercolesterolemia (28%) va en aumento (Campos et al., 2016).

Recientemente la asociación mexicana de gastroenterología hizo un proyecto epidemiológico en donde determinaron la prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. En dicho estudio determinaron que el incremento en la prevalencia de la EHGNA está estrechamente relacionado con la obesidad, la Diabetes Mellitus 2 y el síndrome metabólico; concluyendo que el 41.3% de la población mexicana desarrolla patologías hepáticas a causa de la disfunción metabólica (Prevalencia y características clínico-epidemiológicas de una población mexicana con enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica: un estudio en población abierta, 2021).

### **Causas asociadas a la EHGNA.**

De acuerdo con la revista española de enfermedades digestivas, algunas de las causas asociadas con la generación de la EHGNA se desarrollan principalmente por la aparición de enfermedades genéricas y metabólicas, tal es el caso de la obesidad, la diabetes mellitus, hiperlipidemia, lipodistrofia y enfermedades relacionadas con el almacenamiento de esteres de colesterol. Además, algunas condiciones nutricionales juegan un papel importante de la aparición de EHGNA, el ayuno prolongado, un desequilibrio en la ingesta de azúcares refinados y una dieta rica en carbohidratos pueden contribuir a la afección del hígado (Martín et al., 2013).

Por otra parte, Mirmiran et al. (2017) menciona que la dieta juega un papel importante en la aparición de EHGNA, un patrón dietario alto en carnes rojas, azúcar refinado, confitería y bebidas carbonatadas tienen una gran repercusión en la salud hepática.

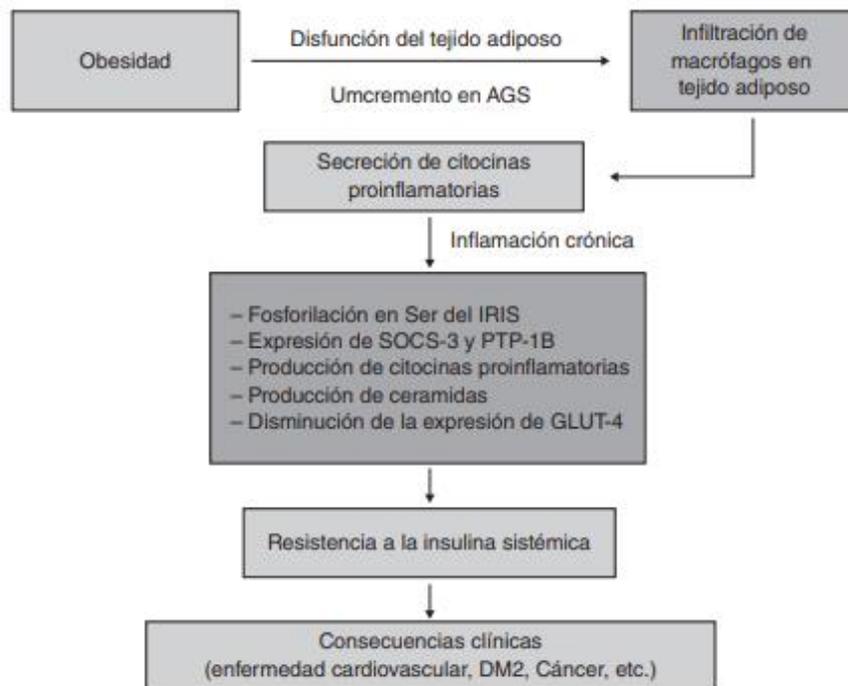
### **Obesidad.**

La obesidad es definida por la OMS como una acumulación anormal o excesiva de grasa que es perjudicial para la salud (Obesidad y sobrepeso, 2021) Se vincula con un gran espectro de patologías que repercuten en el hígado, dentro de ellas la EHGNA que se caracteriza por un aumento en los niveles hepáticos de triglicéridos, acompañada de inflamación y fibrosis (Fabbrini et al., 2010). Algunas de las complicaciones más comunes de la obesidad es la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo II (Kaplan, 1998). El tejido adiposo es una fuente importante de señales moleculares, las adipocinas que regulan estas señales son el TNF- $\alpha$ , la IL-6, la resistina, la leptina, la adiponectina (Buqué et al., 2008). Un ejemplo del efecto de una adipocina es la leptina quien se encarga de la regulación del peso corporal y el metabolismo energético. En los hepatocitos, la leptina regula la respuesta a la insulina. Estimula el transporte y el recambio de glucosa, también inhibe la fosforilación estimulada por la insulina de varias proteínas de señalización intracelular como IRS-1. En las personas con obesidad se ha encontrado que los niveles de leptina circulantes son elevados lo cual lleva a generar EHGNA de dos maneras: promoviendo la resistencia a la insulina y niveles elevados de insulina circulante y alterando la señalización de insulina en los hepatocitos para promover un aumento de ácidos grasos circulantes (Kaplan, 1998).

### **Resistencia a la insulina y su relación con la Diabetes Mellitus tipo 2.**

La patogenia de la EHGNA comparte una serie de mecanismos con la DM2, las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, de los lípidos, resistencia a la insulina, así como factores genéticos forman parte de las similitudes entre ambos mecanismos (Caballería & Caballería 2016). Uno de los principales mecanismos característicos que comparte la EHGNA y la DM2 es la resistencia a la insulina; en

la figura 7 se muestra la relación de la resistencia a la insulina con diversas patológicas. La resistencia a la insulina es caracterizada por un aumento en los niveles de insulina circulante, reducción en la eliminación de la insulina y deficiencia en absorción de glucosa por parte del músculo. En el tejido adiposo esto conduce a la liberación de ácidos grasos libres y citocinas proinflamatorias. Al momento de generarse la resistencia a la insulina no se suprime la producción de glucosa. Las concentraciones de glucosa plasmática son elevadas y promueven la lipogénesis de Novo, la cual se lleva a cabo directamente al aumentar la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico y la síntesis de acil CoA, que actúa como sustrato para la lipogénesis de Novo. Otro mecanismo, es por la expresión de ChREBP y el receptor LXR $\alpha$  del hígado, que también promoverán la transcripción genética de adenosina trifosfato-citrato liasa (ACL), el receptor FAS y Esteroil-CoA Desaturasa-1 (SCD-1). Estas alteraciones metabólicas resultan en el aumento de ácidos grasos libres y triglicéridos plasmáticos lo que conduce a la alteración de la señalización de la insulina (Saponaro et al., 2015).



**Figura 7. Inflamación y resistencia a la insulina. (Gutiérrez-Rodelo, C. 2017).**

## **Síndrome Metabólico.**

El síndrome metabólico es una de las patologías que desencadenan sobre el cuerpo humano un cúmulo de afectaciones que están estrechamente relacionadas con la aparición de la Enfermedad de Hígado Graso no Alcohólico. La obesidad promueve el estado de inflamación crónica; la respuesta inflamatoria se presenta como una manera de controlar los daños generados en el organismo por agresiones físicas, químicas o biológicas, a través de la liberación de citocinas proinflamatorias lo cual lleva a la aparición de la resistencia a la insulina (Petta et al., 2016).

El síndrome metabólico también es conocido como síndrome de resistencia a la insulina y algunas de las anormalidades que desencadena en el organismo son: 1) hiperinsulinemia; 2) hiperglicemia; 3) hipertensión; 4) disminución de los niveles de HDL en plasma; 5) y un incremento en los niveles de LDL en plasma, triglicéridos, glucosa y obesidad (Keltikangas, 2007).

La EHGNA es una representación hepática del síndrome metabólico, cerca del 90% de los pacientes con EHGNA presentan más de una manifestación de síndrome metabólico; el riesgo de presentar EHGNA aumenta con la gravedad de la obesidad y a su vez se asocia con resistencia a la insulina. La lipotoxicidad se asocia con ambas enfermedades que afecta directamente al hígado (Almeda et al., 2009).

Según una investigación, Gutiérrez Rodelo menciona que cuando existe un estado de obesidad se desarrolla un incremento en el tejido adiposo que se relaciona con el incremento en la acumulación de lípidos afectando la morfología de los adipocitos, alterando la secreción de adipocinas y citocinas proinflamatorias, así como la liberación excesiva de ácidos grasos libres. Algunas citocinas proinflamatorias secretadas son: el TNF- $\alpha$ , la IL-6, la IL-18, la IL-1 $\beta$  y la Ang II. Estas citocinas influyen sistémicamente con la resistencia a la insulina, en el caso de TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , se induce la resistencia a la insulina por la activación de cinasas de Ser/Thr, la disminución de la expresión de IRS-1, GLUT-4 y receptor Gamma activado por proliferación de peroxisomas, o la expresión y activación de SOCS-3 (Gutiérrez, 2017).

Otro mecanismo de inflamación ocurre con la activación de receptores tipo toll (TLR) como TLR-2 y TLR-4, que inducen inflamación a través del factor nuclear kappa beta (NF-κB). Los receptores TLR-4 son activados por ácidos grasos libres promoviendo la síntesis de citocinas proinflamatorias (Kim & Sears, 2010).

### **Dislipidemias.**

Una dislipidemia es un desorden en la concentración de lípidos en la sangre. Este trastorno se clasifica de acuerdo con la concentración de lípidos, de manera general se mencionan dos de mayor importancia el hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia que llevan a la aparición de aterosclerosis (Lozano, 2005). Los mecanismos patológicos de la aterosclerosis se asemejan a los de la obesidad que conducen a la aparición de un estado inflamatorio crónico; la presencia de inflamación y obesidad llevan a desarrollar resistencia a la insulina, diabetes, aterosclerosis y con ello EHGNA (Piñeiro & Fernández 2013).

### **Fisiopatología.**

Dentro de las teorías que se enfocan en el mecanismo de inducción de la EHGNA, existen dos teorías que se aceptan como una propuesta para explicar la respuesta del avance de la enfermedad en el hígado. Una es la teoría de los dos golpes (figura 8) y la otra es la teoría de múltiples golpes (figura 9) que es un modelo que se enfoca más a múltiples influencias patogénicas paralelas en el organismo.

### **Teoría de los dos golpes.**

Esta teoría fue propuesta por Day & James en el año de 1998 y como su nombre lo indica propone la aparición de la enfermedad a través de dos etapas que generan el daño propio de la patología (Day & James, 1998).

Dentro de esta teoría encontramos que el primer golpe, está más relacionado con la aparición de esteatosis. Éste ocurre cuando disminuye la capacidad celular para responder a la insulina circulante. En el tejido adiposo actúa sobre la lipasa sensible a hormonas (LSH) favoreciendo a la lipólisis, lo cual libera ácidos grasos libres al hígado. El primer impacto resulta de diversos factores como la resistencia a la insulina, la resistencia a la leptina, la reducción de los niveles de adiponectina, entre otros (Martín et al., 2013).

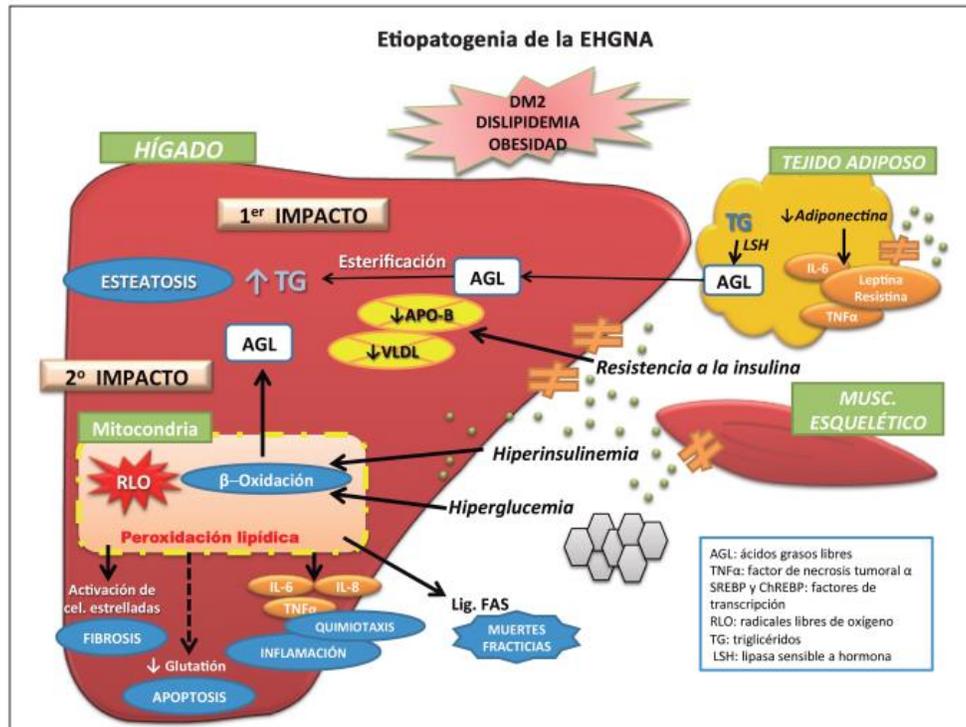
Los principales factores que se ven involucrados en el desbalance de la homeostasis de las grasas es el aumento de ácidos grasos en el hígado; la disminución en la síntesis de ácidos grasos; la B-oxidación de ácidos grasos en el hígado (Harrison, 2002).

Cuando los niveles de insulina aumentan, afectan a los adipocitos con lo cual disminuye la oxidación de ácidos grasos. Los hepatocitos también se ven afectados aumentando la síntesis de ácidos grasos. Este incremento en los niveles de insulina también afecta la degradación de la apolipoproteína B100, un componente de las VLDL, disminuyendo así su producción. La leptina es una hormona expresada en los adipocitos que regula la homeostasis energética, también se ve afectada por el aumento de la insulina (Harrison, 2002). Otros receptores que se ven afectados son los PPAR, que se encargan de metabolizar los ácidos grasos, el aumento en los niveles de insulina provocará un polimorfismo en PPAR- $\alpha$  lo cual inhibirá su capacidad catabólica de ácidos grasos (Vázquez & Laguna, 2000).

El segundo golpe se relaciona más con la esteatohepatitis. Esta parte se ve desarrollada mayormente por un estrés oxidativo de los ácidos grasos libres dentro de la mitocondria, microsomas y peroxisomas del hepatocito. Este proceso de oxidación genera especies reactivas de oxígeno que en exceso agotan los antioxidantes naturales, como el glutatión. Los subproductos de la reacción de oxidación es el peróxido de hidrogeno que pasa a formar grupos hidroxilos; cuando aumentan estos radicales libres se desencadenan: la peroxidación lipídica de membranas, activación del factor de necrosis tumoral, TNF- $\alpha$ , proinflamatoria (Harrison, 2002).

El TNF- $\alpha$  juega un papel muy importante en la resistencia a la insulina ya que disminuye la señalización intracelular del receptor de la insulina en los adipocitos, también aumenta la cantidad de ácidos grasos libres. (Ramírez & Sánchez, 2012).

Las células de Kupffer secretan citocinas que modulan la actividad del TNF- $\alpha$  como el interferón  $\gamma$ , IL-10 y IL-12, así como prostaglandina E2. La obesidad causa el deterioro de las células de Kupffer.



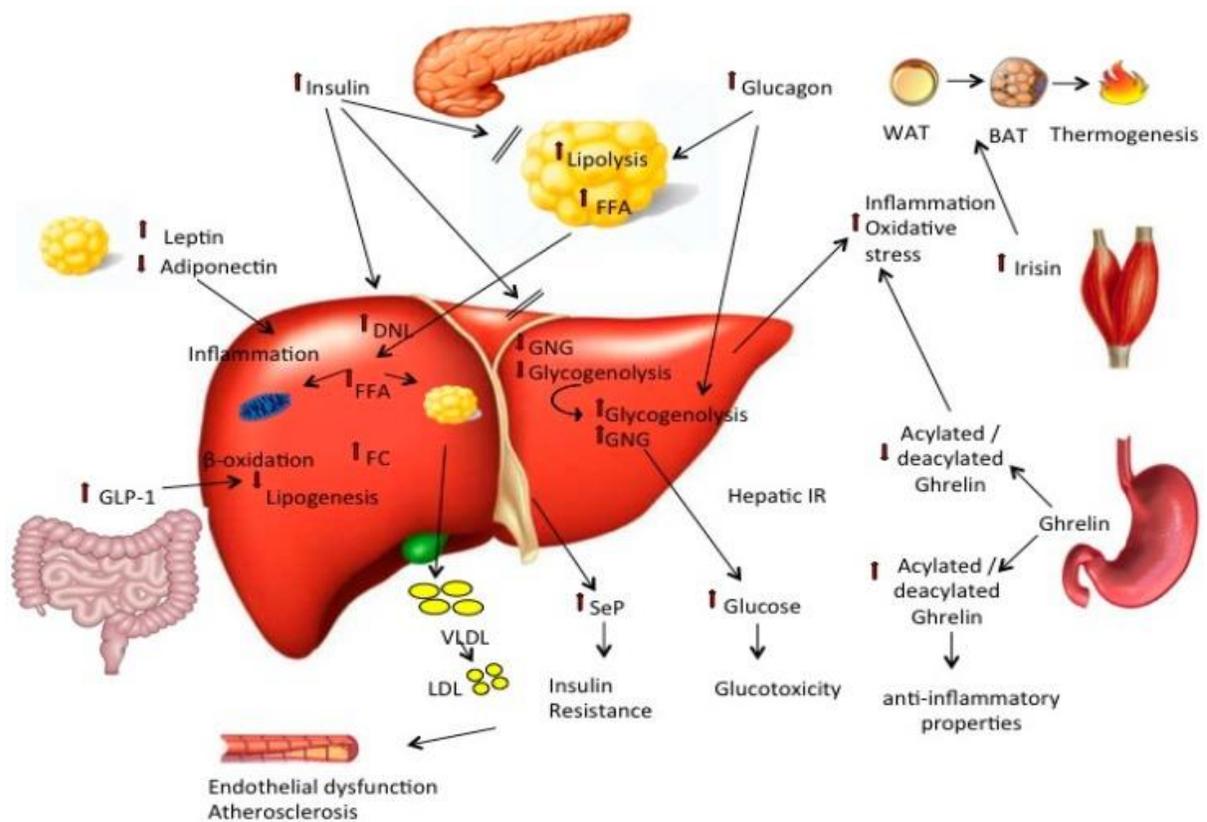
**Figura 8. Desarrollo de EHGNA por teoría de los dos golpes (Martin V, 2013).**

### Teoría de los múltiples golpes.

En la actualidad la teoría de los “dos golpes” se halla obsoleta para explicar la patogenia de la EHGNA. La teoría del “múltiples golpes” es más actual y considera que para la inducción de dicha patología se presentan una serie de “golpes” sistémicos que afectan directamente al hígado. Algunos factores que se presentan son la resistencia a la insulina, hormonas secretadas por el tejido adiposo, factores nutricionales, microbiota intestinal, entre otros (Buzzetti, 2016).

En la explicación para el desarrollo de EHGNA por la teoría de los múltiples golpes; se explica que el hígado graso es uno de los precursores para el síndrome metabólico. Cuando se produce una resistencia sistémica a la insulina y los niveles se encuentran altos, en el tejido adiposo se reducen los niveles de adiponectina y se aumentan los de leptina, ambas están implicadas en la modulación de la inflamación, la oxidación de ácidos grasos, el gasto energético, resistencia a la insulina y la secreción de insulina. La lipólisis no se inhibe aun cuando los niveles de insulina son altos. Los niveles de ácidos grasos libres aumentan. Los niveles de glucagón también se ven elevados y esto promueve la lipogénesis de Novo

generando ácidos grasos, promueve la glucogenólisis y gluconeogénesis. El GLP-1, una hormona intestinal es secretada con la finalidad de regular el metabolismo de glucosa y lípidos. Los niveles de GLP-1 se ven afectados en la presencia de EHGNA. En el estómago, la grelina es secretada, encargándose de la regulación del apetito y la secreción de insulina viéndose también involucrada en procesos inflamatorios o antiinflamatorios, dependiendo de su concentración. El hígado secreta diversas hepatocinas incluyendo la Selenoproteína P, esta aumenta la resistencia a la insulina y aumenta la producción de LDL que induce a la aterosclerosis. En el musculo también son secretadas ciertas sustancias que se involucran dentro de este proceso como las miocinas, que pueden afectar el metabolismo de la glucosa y los lípidos, por ejemplo, la irisina, cuya secreción es estimulada por el ejercicio e induce la termogénesis (Petta et al., 2016).



**Figura 9. Vías patológicas involucradas en la EHGNA (Pathophysiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease, 2016).**

El sistema inmunológico juega un papel importante en el desarrollo de la EHGNA ya que puede generar cambios histológicos en el hígado, daño tisular y hallazgos clínicos importantes; dentro de las vías moleculares que se involucran se encuentra la lipotoxicidad, el estrés del retículo endoplásmico y la respuesta inmune (Moayedfard et al., 2021).

La lipotoxicidad comienza con la acumulación de ácidos grasos libres en el hígado lo cual conduce a la desregulación lipídica intracelular aumentando la cantidad de lípidos nocivos asociados a lesión celular y muerte, la lipotoxicidad también se asocia con inflamación crónica. Los lípidos tóxicos pueden generar daño celular a través de 3 mecanismos: (1) modificación de función del retículo endoplásmico; (2) modificación de vías de señalización intracelular; (3) interacción con cinasas celulares proinflamatorias (Pierantonelli & Svegliati-Baroni, 2019).

El retículo endoplásmico (RE) se encarga del ensamblaje proteico y puede ser afectado por factores estresantes. La producción y acumulación de proteínas por el RE se regula por la activación de la respuesta proteica desplegada (UPR), la cual se encarga de degradar las proteínas mal plegadas y de esta manera garantizar la supervivencia celular. Cuando el estrés del RE no puede ser bloqueado y dura mucho tiempo la UPR conduce a eventos patológicos. El estrés que recibe el RE surge de los niveles altos de lípidos hepáticos (diglicéridos, ceramidas, colesterol libre y ácidos grasos libres) que inhiben las vías de señalización de insulina hepática lo cual genera resistencia a la insulina y aparece el estrés del RE. Los lípidos pueden inducir estrés al RE a través de IRE1 y PERK (dos proteínas localizadas en la membrana del RE) activando la vía mitocondrial de la apoptosis que es inducida por 3 vías: (1) CHOP; (2) JNK y (3) alteración del calcio. PERK induce apoptosis a través de CHOP (Pierantonelli & Svegliati-Baroni, 2019). IRE1 induce apoptosis uniéndose a la proteína adaptadora de factor 2 (TRAF2) para promover la apoptosis a través de JNK (Urano et al., 2000).

Por otra parte, en algunos casos se menciona que algunos estudios en modelos animales han evidenciado que el estrés oxidativo/peroxidación lipídica, sobreproducción de TNF- $\alpha$ , la actividad de las enzimas Cyp2E1/ Cyp4A juegan un

papel importante en aparición y progresión de la EHGNA. La peroxidación lipídica puede aumentar la severidad de la EHGNA. El malondialdehído un producto de la peroxidación, activa a las células estrelladas estimulando la producción de colágeno y la fibrogénesis; el malondialdehído también contribuye a la inflamación al activar el NF-  $\kappa$ B el cual se encarga de recular la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF-  $\alpha$  e IL-8 (Angulo, 2002).

### **Métodos de detección de EHGNA.**

El IMSS en su guía de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, establece que las pruebas que se realizan para la detección de la EHGNA es el ultrasonido, como una alternativa de primera elección debido a su bajo costo y su practicidad, aunque esta no garantiza su detección (Guía de referencia práctica, IMSS-719-17). Según Marvin. V. la implementación de nuevos métodos de detección garantiza su correcta intervención. La evaluación clínica es una de las alternativas prácticas que ayudan a identificar si el paciente se encuentra predispuesto a desarrollar la patología; las pruebas bioquímicas también son funcionales para evaluar al hígado, los biomarcadores de inflamación y fibrosis se emplean para hallar cualquier daño hepático. Las pruebas de imagen son las menos indicadas, ya que no son precisas y no ofrecen un resultado certero para visualizar el estado del hígado. La biopsia hepática es el estudio clínico más empleado, éste resulta doloroso, costoso e invasivo para el paciente y su interpretación suele variar entre patólogos. (Martín et al., 2013).

La principal desventaja de los métodos de detección de la EHGNA se basa en que solo captan estados tardíos de la enfermedad dificultando su posterior tratamiento ya que se complica considerablemente la salud del paciente. Gran parte de estos métodos resultan costosos, invasivos y dolorosos para el paciente. Aunado, la terapia medicamentosa que se emplea resulta inespecífica, siendo usada para el tratamiento en particular de una de las causas de la EHGNA.

## **Tratamiento para la EHGNA.**

El tratamiento de la EHGNA abarca un amplio número de alternativas para ayudar a la reversión de ésta. La modificación del estilo de vida, la actividad física, la dieta y el deporte, forman parte de la primera opción de la que se echa mano. Sin embargo, estos no suelen ser efectivos ya que los pacientes tienen poco apego a ellos. Los tratamientos farmacológicos que se usan son inespecíficos ya que se emplean medicamentos diferentes para contrarrestar los efectos de la EHGNA, es decir las enfermedades asociadas; algunos fármacos que se usan son los antagonistas PPAR, FXR y GLP-1 sin embargo hasta el momento no existe ningún fármaco que sea específico y no cause efectos adversos (Ampuero et al., 2018).

## **Tratamiento no farmacológico.**

### **Dieta y ejercicio por 1 año.**

Una de las primeras alternativas para tratar la EHGNA es el cambio de la dieta. La reducción de la ingesta de calorías, una dieta baja en grasas, carbohidratos son la mejor alternativa. La dieta mediterránea que se basa en el consumo de hidratos de carbono y la reducción de consumo de azúcar es una opción para disminuir el acumulo de grasa en el hígado. Además, se debe evitar el consumo de refrescos o bebidas que tengan un alto contenido de carbohidratos complejos. Aunado a esto, evitar la ingesta de comida rápida, grasas saturadas y colesterol (Ampuero et al., 2018).

Como actividad física se recomienda mantener rutinas aeróbicas 3 veces a la semana y rutinas de resistencia 2 veces a la semana de tal manera de que se minimice el sedentarismo (Ampuero et al., 2018).

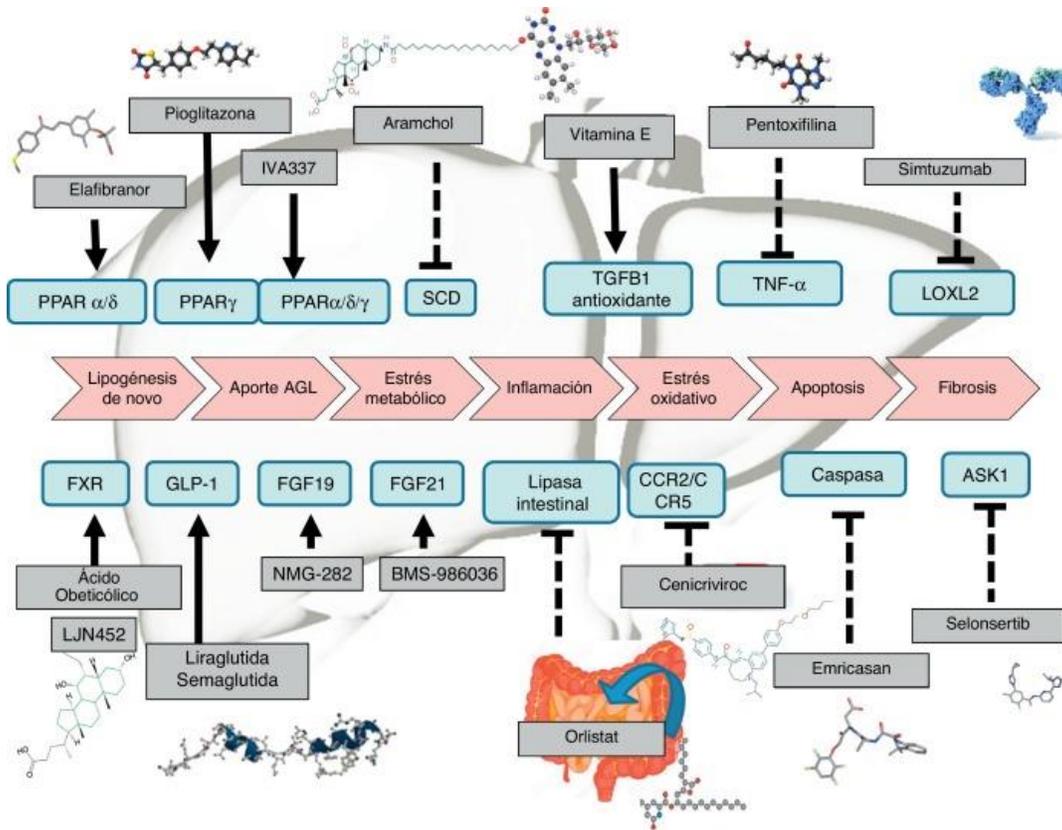
## **Tratamientos farmacológicos.**

Algunos de los tratamientos farmacológicos se mencionan en la figura 10, cada uno de los fármacos empleados son inespecíficos para el tratamiento de la patología.

Los agonistas PPAR es una de las alternativas farmacológicas que se usa en el tratamiento de la EHGNA, la **Pioglitazona** es uno de ellos, su mecanismo de acción es metabólico como un agonista de PPAR $\gamma$ ; reduce la escala de esteatosis junto con la disminución de balonización de las células (Sanyal et al., 2010).

El **ácido obeticólico**, es un agonista de FXR. Este fármaco es un potente activador del receptor nuclear farnesoide X que reduce la grasa hepática y la fibrosis. Aunque es un tratamiento que se ha usado en pruebas clínicas de fase II en pacientes con EHGNA y ha demostrado mejoramiento al evaluar el tejido de acuerdo con sus características histológicas, aun no se ha garantizado sus beneficios a largo plazo y su seguridad (Neuschwander-Tetri et al., 2015).

La **Liraglutida**, es un análogo del péptido-1-similar al glucagón (GLP-1) reducen la EHGNA, las concentraciones de enzimas hepáticas y la resistencia a la insulina en modelos murinos. Aunque es un medicamento que se usa para el control de la DM2, en un estudio clínico de fase II realizado en personas se demostró el mejoramiento de la morfología histológica del hígado tras su administración a corto plazo (Armstrong et al., 2016).



**Figura 10. Potenciales Fármacos usados en la EHGNA (Ampuero, et al. 2018).**

De acuerdo con lo mencionado, se requiere establecer modelos animales a corto plazo que desarrollen la patología en estadios tempranos lo más similar al humano. Garantizando las condiciones patológicas, histológicas y moleculares. Que sirvan como una nueva herramienta para hallar tratamientos nuevos.

### **Modelos animales de inducción de EHGNA.**

Con el paso de los años y el avance de las diversas patologías que afectan directamente a las personas, ha sido necesario implementar modelos animales que asemejen el proceso biológico de una enfermedad, haciendo posible su estudio (Modelo animal. NIH). El ratón es uno de los animales más usados en la actualidad para el desarrollo de investigaciones que favorecen a la humanidad, la ventaja de emplear a este animal como modelo biológico se basa en la facilidad con la que este

se puede manipular y adecuar a las condiciones deseadas siendo menos costosos y fáciles de reproducir, mejorando la efectividad del estudio (Yunta E. 2007).

### **Uso de ratones C57BL/6.**

Los ratones endogámicos, son una cepa de ratones que se emplean frecuentemente para la investigación ya que estos mejoran la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados del estudio. La cepa C57BL/6, es una cepa que por sus características inmunológicas es empleada en múltiples estudios ya que al proceder de generaciones consecutivas proporciona modelos animales estandarizados que permiten tener reproducibilidad en cuanto a resultados experimentales (Song, H. K., & Hwang, D. Y. 2017).

Un estudio realizado por R. S. Sellers, et al. Menciona que la cepa C57BL/6 presenta una mayor expresión de células inmunitarias frente a otros ratones, ya que esta cepa tiene proporciones mayores de células B y T (Sellers et al., 2012). En otro estudio se encontró que la cepa tiene una mayor probabilidad de desarrollar patologías relacionadas con el nivel de lípidos plasmáticos y hepáticos siendo más susceptibles al desarrollo de aterosclerosis. (Nishina et al., 1993). Por otra parte, también se ha evidenciado que desarrollan un grado de obesidad mayor cuando es inducido por dieta y en consecuencia el aumento de la hiperglucemia y la resistencia a la insulina (Rossmeisl et al., 2003).

### **Dieta alta en grasas para inducción de EHGNA (HFD).**

El consumo excesivo de grasas a través de la dieta es un factor de riesgo para el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina. Una dieta rica en grasa es una de las herramientas más útiles para inducción de alteraciones metabólicas ya que estas derivan de ácidos grasos saturados. En estudios realizados en roedores se ha demostrado que con la dieta HFD se presenta obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia, aumento en los reguladores de la lipogénesis y la expresión de citocinas proinflamatorias (Kanuri & Bergheim, 2013).

### **Dieta alta en colesterol.**

En un estudio realizado por J. E. Mells, se explica la influencia del colesterol en el desarrollo de la EHGNA en ratones C57BL/6. Se mezcló colesterol (0,2%) en

conjunto con una dieta HFD durante 16 semanas y se demostró que el colesterol conduce al daño hepático y una fibrosis más profunda que solo la dieta HFD (J. E. Mells et al. 2015).

### **Uso de fructosa para la generación de EHGNA.**

En un estudio comparativo en donde se probó una mezcla de fructosa al 30% en solución acuosa frente a una de glucosa al 30% en solución acuosa se encontró que cada una tiene diferentes efectos. La fructosa es mucho más efectiva para inducir obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina cuando se combina con dietas altas en grasas en ratones (Eng, JM & Estall, JL. 2021).

### **Dieta aterogénica. Paigen.**

Se ha demostrado en diversos estudios que una dieta rica en grasas mezclada con colesterol (1.25%), colato (0.5%) inducen fibrosis hepática leve y daño hepatocelular oxidativo en modelos murinos después de las 4 semanas de alimentación (Kanuri & Bergheim, 2013). Además, la dieta aterogénica induce genes asociados con el daño hepático, especialmente genes asociados con la activación del receptor X (LXR/RXR, FXR/RXR y VDR/RXR), señalización de interleucina (IL-6 e IL-10) (Shockley et al., 2009).

Una de las mejores maneras para evidenciar el daño causado por los diversos modelos dietarios que se han establecido para el desarrollo de la EHGNA es a través de la histología. Gracias a esto es posible caracterizar el modelo dietario ya que los cortes histológicos permiten visualizar el daño que se ha generado por el acúmulo de grasa dentro de los hepatocitos, la fibrosis y el daño estructural; para ello, es necesario realizar diversas técnicas de tinción que esclarecerá la morfología celular del hígado.

### **Técnicas de tinción.**

Un tejido, tratándose de histología, no presenta coloración que le permita evidenciar sus características morfológicas al ser observadas en el microscopio óptico. Dado lo anterior es indispensable el uso de colorantes que son capaces de unirse a estructuras específicas del tejido aportándoles color (Megías, s.f.). Un colorante se puede clasificar en iónico y no-iónico. Los colorantes iónicos se dividen en tres. Iónico ácido: el colorante principal contiene una carga negativa, teniendo afinidad a estructuras de carga positiva. Iónico básico: su colorante principal tiene carga positiva, por tanto, tiene afinidad a estructuras con carga negativa. Colorante neutro: su colorante principal es aniónico y catiónico (Verdín S. 2013).

### **Hematoxilina - Eosina.**

Una de las tinciones más usadas en histología es la de hematoxilina-eosina sobre cortes en parafina. Un colorante es de carácter básico (hematoxilina) y otro es de carácter ácido (eosina) para teñir estructuras básicas y ácidas de la célula. El núcleo se tiñe de un color violeta por acción de la hematoxilina y el citoplasma se tiñe de color rosado por acción de la eosina. (Megías, M. P. M).

Durante el proceso de tinción el tejido se expone a las siguientes etapas: desparafinado, hidratación, tinción, deshidratación/aclaramiento y montaje. El xileno cumple la función de desparafinado. El etanol a diferentes concentraciones se encarga de hidratar, finalmente debe sumergirse en agua. En la tinción primero se debe sumergir el corte en etanol 80° y pasa a la solución de hematoxilina; se sumerge en agua corriente para virar y pasa directamente a la eosina. En la deshidratación se sumerge en tres soluciones de etanol (69°, 100° y 100°), finalmente pasa a xilol. Finalmente se monta la muestra cubriéndola con un cubreobjetos, para ello generalmente se usa bálsamo de Canadá. Los tiempos para sumergir cada corte es relativo ya que depende del grosor de los cortes y la concentración de los colorantes (Tomasi 2013).

### **Tricrómica de Masson.**

La coloración de Masson nos permite diferenciar el tejido conectivo denso (fibroso) del tejido muscular. Con esta tinción los núcleos se tiñen de color violeta. El músculo se tiñe de color fucsia. El tejido conectivo se tiñe de color azul. Los glóbulos rojos se tiñen de color rojo (Tomasi 2013).

### **Rojo oleoso.**

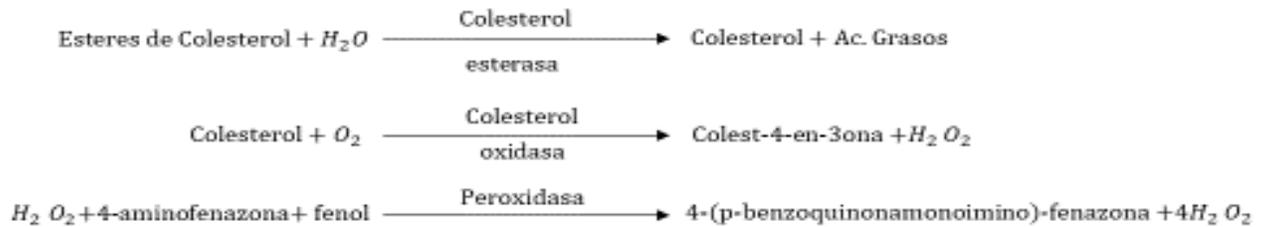
Rojo oleoso es un colorante liposoluble que se emplea para teñir lípidos neutros, ésteres de colesterol y lipoproteínas intracelulares, debido a su permeabilidad celular tiñe a las grasas neutras, principalmente triglicéridos, de un color rojo anaranjado (Du et al., 2023). Este colorante es insoluble en agua, pero solventes orgánicos como el etanol, benceno, cloroformo y otros solventes, logran disolverlo; también es soluble en grasas y lípidos, por lo que se usa para evidenciar su presencia en células y tejidos (Montalvo Arenas, 2010).

### **Pruebas para determinación de perfil lipídico.**

Las alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas en el organismo son unas de las principales causas que afectan sistémicamente la concentración de lípidos y proteínas, esto lleva a la aparición de diversas patologías que se relacionan principalmente con este desequilibrio (González, 2008). Su determinación generalmente se hace a través de métodos colorimétricos y enzimáticos con kits que contienen reactivos que generalmente vienen listos para su uso (Chaves et al., 1997).

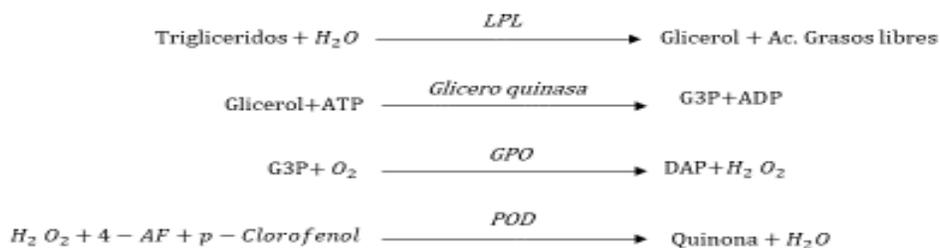
### **Colesterol.**

La prueba de colesterol es empleada clínicamente para la detección de dislipidemias, desordenes metabólicos y arterioesclerosis. El colesterol se determina tras una hidrólisis enzimática y una oxidación. El indicador quinoneimina se forma a partir de peróxido de hidrogeno y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y peroxidasa (Chaves et al., 1997). La reacción general se presenta a continuación:



### Triglicéridos.

Este kit se usa para cuantificar *in vitro* los triglicéridos en plasma o suero a través de una reacción colorimétrica. Los triglicéridos se determinan tras la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoneimina formada a partir de peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (Randox Laboratories Limited, Manual: triglicéridos).

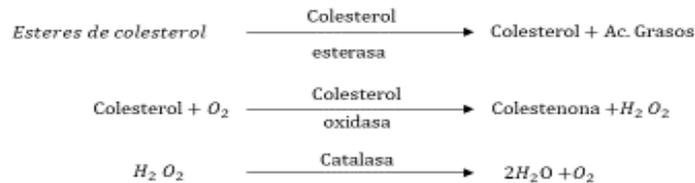


### HDL.

Las lipoproteínas de alta densidad es una de las más importantes ya que sirve para eliminar el colesterol de las células periféricas del hígado, donde el colesterol se convierte en ácidos biliares y eliminado en el intestino. El kit para la determinación de LDL consiste en dos reacciones distintas: (1) se eliminan los quilomicrones, colesterol VLDL y colesterol LDL por medio de colesterol esterasa, colesterol

oxidasa y catalasa. (2) la segunda reacción se basa en la medición específica de colesterol HDL (Randox Laboratories Limited, Manual: Colesterol HDL).

*Reacción 1*



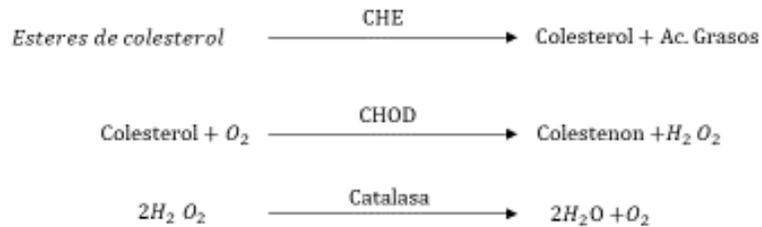
*Reacción 2*



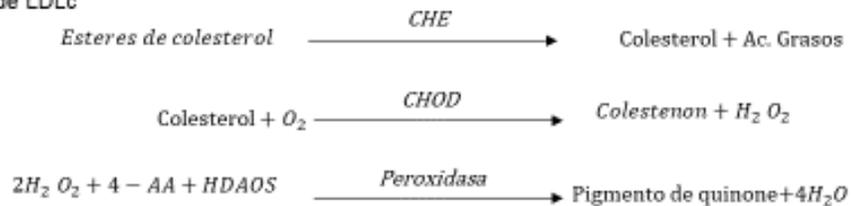
**LDL.**

El kit para determinación de colesterol LDL sirve para su cuantificación *in vitro* en suero y plasma. La concentración de LDL es considerado como un indicador clínico importante ya que estos pueden ser una causa de la aparición de diversas patologías relacionadas con el colesterol almacenado en las placas ateroscleróticas. El kit de la marca Randox se basa en una determinación de LDL por un método de eliminación sin pretratamiento de la muestra, el cual se correlaciona con los métodos de precipitación. La determinación de LDL se basa en dos reacciones distintas: (1) se elimina el quilomión, colesterol VLDL y colesterol HDL por medio de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y con catalasa. (2) la segunda reacción se basa en la medición específica de colesterol LDL tras la liberación de colesterol LDL por medio de detergentes (Randox Laboratories Limited, Manual: colesterol LDL).

Reacción 1. Eliminación de lipoproteínas no LDL



Reacción 2. Medición de LDLc



### 3. Justificación.

La esteatosis hepática no alcohólica, actualmente es una patología con mayor prevalencia y mortalidad a nivel mundial, y estrechamente vinculada con otras enfermedades crónicas que constituyen un problema grave de salud pública como es el síndrome metabólico, la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2.

Si bien hoy en día se emplean diversos modelos animales en el campo preclínico, aún existe un desafío continuo para identificar aquellos modelos que reflejen la patología humana lo más cercano posible y de esta manera permitir exacerbar los resultados en la investigación clínica. Éste estudio está destinado a desarrollar un modelo para la inducción de la esteatosis hepática no alcohólica mediante el uso de una dieta especializada y así poder generar una nueva herramienta que permita garantizar el desarrollo de la patología antes mencionada.

#### **4. Objetivos.**

##### **General**

- ✓ Implementar un modelo murino de EHGNA mediante la inducción por dieta hipercalórica para evaluar su idoneidad midiendo diversos parámetros clínicos e histológicos para proponerlo como un modelo adecuado para la obtención de conocimiento de la progresión de la enfermedad.

##### **Particulares.**

- ✓ Establecer el modelo de inducción de esteatosis hepática no alcohólica en ratones macho C57BL/6 mediante el consumo de una dieta alta en colesterol y colato de sodio, así como fructosa al 30%.
- ✓ Evaluar el perfil lipídico en plasma de los ratones con esteatosis hepática no alcohólica como a los ratones control.
- ✓ Analizar la histología de los hígados de los ratones con esteatosis hepática no alcohólica y control, mediante la tinción de H&E, Tricrómica de Masson y rojo oleoso.
- ✓ Evaluar el daño renal causado por la dieta mediante la prueba de urea.
- ✓ Determinar el estrés oxidativo hepático a través de la prueba de carbonilos.

#### **5. Hipótesis.**

La ingesta de una dieta rica en colesterol, colato de sodio y fructosa al 30%, propiciará el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica en ratones C57BL/6.

#### **6. Metodología.**

##### **Diseño experimental**

Se ocuparon ratones macho de la cepa C57BL/6 de un peso promedio de 20-25g, provenientes del Bioterio de Morelos, fueron alojados en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campus 4, bajo condiciones de alojamiento de humedad y temperatura constantes propias del bioterio; con ciclos de luz-oscuridad

de 12 horas. Los ratones tuvieron un periodo de acondicionamiento de 1 semana con agua y comida estándar ad libitum, previo a la experimentación.

### **Condiciones de alojamiento y limpieza**

- Se emplearon jaulas de policarbonato y bebederos de plástico de 500ml con pipeta de acero inoxidable para el suministro del agua. Se colocaron 6 ratones por jaula.
- Se emplearon camas sanitarias de aserrín esterilizado como material absorbente y se verificó que dicho material cubriera toda el área del piso de la jaula. El cambio de dicho material se realizó cada tercer día y el lavado y desinfección de las jaulas se realizó dos veces por semana.

Los animales fueron manejados de acuerdo con las guías institucionales y normas oficiales nacionales (NOM-062-ZOO-1999), así como las condiciones establecidas y autorizadas por el CICUAE con clave de registro: **CICUAE-FESC C22 01**.

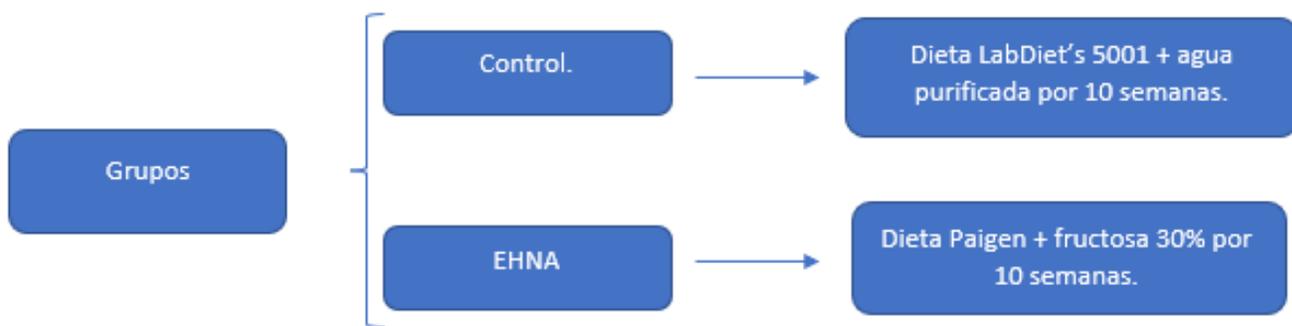
### **Implementación del modelo de EHGNA inducida por dieta.**

#### **Dieta Paigen más fructosa al 30%.**

El periodo de inducción se llevó a cabo durante 10 semanas y se realizó la eutanasia a los animales en la semana 10. Para lograr el modelo de esteatosis hepática no alcohólica se proporcionó diariamente  $5 \pm 2$  g de la dieta Paigen más 25 ml de fructosa 30% por ratón. Se realizó un registro semanal del peso corporal.

#### **Grupos experimentales.**

Los animales fueron organizados en dos grupos de 6 ratones macho cada uno, su distribución se realizó por el método de culebra japonesa, considerando el peso de cada animal. La distribución y alimentación se muestra en el diagrama 1.



**Diagrama 1. Esquema de la distribución de grupos.**

Se consideró una n=6 por grupo para completar el estudio con un total de 12 ratones que fueron usados en el protocolo.

### **Composición de las dietas.**

La dieta estándar fue provista por el bioterio de la FES Cuautitlán mientras que la dieta Paigen se elaboró en el laboratorio, las cuales aportaron el siguiente valor nutricional (tabla 1).

**Tabla 1. Composición de las dietas.**

<b>Dieta</b>	<b>Composición (% del peso total).</b>	<b>Valor nutricional (% del total de Kcal).</b>	<b>Densidad energética.</b>
<b>Estándar</b>	LabDiet's Mouse diet 5001.	Proteínas: 28.67 grasas: 13.38 carbohidratos:57.94	2.89 Kcal/g
<b>Paigen</b>	1% de colesterol 0.5% de colato de sodio 5% de mantequilla	Proteínas:23.10; grasas:20.93; carbohidratos:56.46	3.94 Kcal/g

	30% de azúcar glas		
	10% caseína		
	53.5 g Chow estándar		

### **Preparación de la dieta Paigen.**

Se mezcló el colesterol y colato de sodio, previamente colados para evitar gránulos grandes, posteriormente se adicionó la caseína y se mezcló nuevamente, después se adicionó la mantequilla derretida y se volvió a mezclar hasta su total incorporación, después se adicionó y mezcló el alimento normal el cual fue previamente molido y finalmente se adicionó el azúcar glas y se mezcló por al menos 30 min. Ya que quedaron totalmente incorporados todos los ingredientes, se le agregó un poco de agua hasta generar una pasta manipulable, con la cual se generaron pellets mediante moldes, los cuales una vez hechos se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en el congelador, dicha dieta se elaboró cada semana.

### **Eutanasia y extracción de tejidos.**

Al cumplir las 10 semanas destinadas a la ingesta de la dieta Paigen + fructosa al 30%, propias para la inducción de enfermedad de hígado graso no alcohólico, se llevó a cabo la recolección de muestras de interés (hígado y sangre). Para ello, el día de sacrificio se pusieron en previo ayuno de 4 horas. Se administró una mezcla de ketamina-xilacina (100/10 mg/Kg) vía intraperitoneal. Se realizó la disección de cada animal, exponiendo el tórax para obtener la muestra sanguínea por punción cardiaca, esta muestra se colocó en un tubo eppendorf que contenía EDTA y se centrifugó por 10 minutos a 3,000 RPM y se realizaron alícuotas del plasma. Una vez que el ratón se sacrificó, se procedió a extraer el hígado el cual se lavó con solución salina fisiológica y se pesó. Este proceso se hizo para ambos grupos.

Posterior a que el hígado fue pesado se tomó una muestra de él, la cual se guardó en paraformaldehído 4% para histología, almacenándolo en refrigeración a 4°; la muestra de plasma para determinación de perfil lipídico se almacenó a -80° en un ultracongelador.

### **Disposición de RPBI.**

Los cadáveres de los animales se colocaron en bolsas amarillas (recolección de residuos biológicos peligrosos), la bolsa fue colocada dentro del congelador de la FES Cuautitlán localizado en el bioterio donde posteriormente serán incinerados de acuerdo con la NOM-087-ECOL-1995. Los residuos de sangre fueron colocados en bolsas rojas (residuos biológico-infecciosos), fueron cerradas y se colocaron dentro de un contenedor para su disposición y manejo final. El material punzocortante se colocó en recipientes rígidos de color rojo.

### **Determinación de perfil lipídico.**

Se determinó colesterol total, triglicéridos, HDL mediante Kit colorimétrico de la marca Randox.

### **Determinación de Colesterol.**

Se colocaron 2 µl de plasma (muestra) en una placa de 96 pozos por triplicado. Consecutivamente se colocaron 200 µl de reactivo, agitándolo suavemente, se dejó reposar por 10 minutos a 20-25°C. Finalmente se leyó en el equipo Epoch BIOTEK (Agilent Technologies, Santa Clara: USA), a una longitud de onda de 500 nm en un plazo de 60 minutos. Para calcular la concentración de colesterol se empleó la siguiente formula:

$$\text{Conc de Colesterol} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia patrón}} * \text{Conc patrón} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)$$

### **Determinación de triglicéridos.**

Se colocaron 2 µl de plasma (muestra), 2 µl de solución patrón (calibrador) o agua (blanco) en una placa de 96 pozos. Cada una por triplicado. Una vez colocados los

2 µl de cada solución, se colocaron 200 µl de reactivo. El reactivo se preparó de la siguiente manera:

- Se colocaron 250 µl de R1b y 15 mL de R1a.

Seguidamente, se dejó reposar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al término del tiempo, se procedió a leer la placa en el equipo Epoch BIOTEK (Agilent Technologies, Santa Clara: USA), a una longitud de onda de 500 nm en un plazo de 60 minutos. Para calcular la concentración de triglicéridos se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Conc de Triglicéridos} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estándar}} * \text{Conc estándar} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right)$$

#### **Determinación de HDL.**

Para esta determinación, en una placa de 96 pozos se colocaron 2.5 µl de calibrador y 2.5 µl de las muestras. Posteriormente se adicionaron 188 µl de R1 para cada kit (HDL) y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente agitando la placa suavemente. Al término del tiempo, se procedió a tomar la primera lectura de la placa en el equipo Epoch BIOTEK (Agilent Technologies, Santa Clara: USA), a una longitud de onda de 600 nm.

Una vez tomada la primera lectura, se retira la placa de 96 pozos del Epoch y se adicionan 62 µl de reactivo R2 (HDL). Se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente agitando la placa suavemente. Al término del tiempo, se procedió a tomar la segunda lectura de la placa en el equipo Epoch BIOTEK (Agilent Technologies, Santa Clara: USA), a una longitud de onda de 600 nm. Para calcular la concentración de HDL se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{HDL} = \frac{(A2 - A1)_{\text{muestra}}}{(A2 - A1)_{\text{patrón}}} * \text{Conc del patrón.}$$

#### **Determinación de LDL.**

LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald que se muestra a continuación:

$$\text{LDL} = \text{CT} - \left(\frac{\text{HDLc} + \text{TG}}{5}\right)$$

### **Determinación de índice aterogénico.**

El índice aterogénico se calculó a través de la siguiente formula:

$$I.A = \left( \frac{Col\ total}{HDLc} \right)$$

### **Proceso de histología.**

#### **Tren de deshidratado.**

Los hígados que estaban previamente en paraformaldehído al 4% se les quito dicha solución, para posteriormente ser lavados 2 veces tanto en agua corriente como en agua destilada, finalmente los tejidos se pasaron a alcohol al 60% durante 48 horas. Transcurridas las 48 horas se extrajo el tejido y se cortó en 2 partes, tomándose una muestra de aprox. 1cm la cual se colocó en un casete de plástico y se etiquetó con lápiz, una vez colocado el tejido en el casete se procedió hacer el tren de deshidratado como se muestra a continuación:

**Tabla 2. Tren de deshidratado para cortes histológicos.**

Reactivo.	Temperatura.	Tiempo.
Alcohol I 70%	60°C	30 minutos.
Alcohol II 70%	60°C	30 minutos.
Alcohol I 80%	60°C	30 minutos.
Alcohol II 80%	60°C	30 minutos.
Alcohol I 90%	60°C	30 minutos.
Alcohol II 90%	60°C	30 minutos.
Alcohol I 96%	60°C	30 minutos.
Alcohol II 96%	60°C	30 minutos.
Alcohol I 100%	60°C	30 minutos.
Alcohol II 100%	60°C	30 minutos.
Alcohol III 100%	60°C	30 minutos.
Xilol Absoluto	60°C	15 minutos.
Xilol Absoluto	60°C	5 minutos.

Todos los tejidos de cada grupo contenidos en casetes fueron colocados en un frasco de vidrio y se fueron colocando cada una de las soluciones anteriormente mencionadas en la tabla 4.

Una vez que el tren de deshidratado se realizó, los tejidos fueron retirados y fueron colocados en Parafina I por 3 días. La Parafina nueva que fue usada para realizar los cubos histológicos (high purity) se calentó previamente por 48 horas.

Se emplearon placas de Levka para hacer los cubos de parafina. Se colocó una pequeña capa de parafina en el fondo del molde y se puso el tejido, posteriormente se rellena en su totalidad de forma lenta evitando la formación de burbujas, de inmediato se coloca la correspondiente etiqueta sobre uno de los extremos del cubo y se dejaron secar los cubos de parafina por al menos 1 hora a temperatura ambiente y después se pasaron a refrigeración por 24 horas para posteriormente hacer los cortes.

#### **Obtención de cortes histológicos.**

Una vez realizados los cubos de parafina. Estos fueron enfriados en refrigeración con objeto de facilitar la obtención de los cortes. Con una navaja se desgastaron los cubos en la parte frontal, formando una pirámide. Posteriormente, el cubo fue colocado en el microtomo y se desgastó hasta exponer el tejido, para corroborar que el tejido se encuentra expuesto se realizaron unos cortes muestra. A la vez, se preparó un baño maría con agua destilada a 42°C, al cual se le agregaron 2 porciones de grenetina para histología tomadas con una espátula. También se preparó una solución de etanol al 50%.

El cubo de parafina, previamente desgastado y con el tejido expuesto, se colocó el bloque en el microtomo. Una vez asegurado el cubo de parafina se le pasa hielo para facilitar la obtención del tejido y se comenzó a tomar los cortes. Con un pincel se recogió el corte y se colocó en un portaobjetos; se colocaron unas gotas de etanol al 50% en el portaobjetos asegurándose de que todo el tejido se cubrió por la solución, se pasó al baño maría y se dejó 40 segundos dentro; pasado este tiempo, el tejido debe ser tomado nuevamente con el portaobjetos. Se dejó escurrir por 1 minuto cada corte en el portaobjetos y se colocó en una plancha previamente calentada a 60°C y se dejó por 15 minutos. Finalmente, los cortes se pasaron a una caja de almacenaje.

### **Tinción Hematoxilina-Eosina.**

Las láminas que fueron almacenadas se tomaron y se colocaron en una canastilla para pasar por el proceso de tinción; para ello la canastilla se sumergió en diferentes soluciones a diferentes tiempos de acuerdo con la Tabla 3.

**Tabla 3. Tren de tinción H&E.**

Reactivo.	Tiempo.
Xilol absoluto	10 minutos.
Xilol – etanol	2 minutos.
Etanol 96%	2 minutos.
Etanol 80%	2 minutos.
Etanol 70%	2 minutos.
Etanol 60%	2 minutos.
Agua destilada	2 minutos.
Hematoxilina	20 minutos.
Agua corriente	2 minutos. Lavar hasta quitar el excedente.
Alcohol acido	Sumergir de 3 a 5 veces.
Eosina	15 minutos.
Etanol 96%	1 minuto.
Etanol absoluto	10 minutos.
Xilol absoluto	8 minutos.

Una vez que las laminillas fueron sumergidas en cada una de las soluciones a las condiciones especificadas, se colocaron unas gotas de resina sobre cada laminilla cubriendo el tejido y se pusieron cubreobjetos sobre ésta evitando la formación de burbujas. Finalmente, se colocaron durante 30 minutos en un horno a 40°C para facilitar su secado, posteriormente se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 semana.

### **Tinción Tricrómica de Masson.**

Las láminas que fueron almacenadas se tomaron y se colocaron en una canastilla para pasar por el proceso de tinción; para ello la canastilla se sumergió en diferentes soluciones a diferentes tiempos de acuerdo con la Tabla 4.

**Tabla 4. Tren de tinción Tricrómica de Masson.**

Reactivo.	Tiempo.
Xilol absoluto	10 minutos.
Etanol 100%	20 baños.
Etanol 96%	20 baños.
Etanol 80%	20 baños.
Etanol 70%	20 baños.
Etanol 50%	20 baños.
Solución de Bouin	1 hora en baño maría a 60°C.
Agua corriente	Lavados hasta quitar la coloración amarilla.
Agua destilada	20 baños.
Hematoxilina	10 minutos.
Agua corriente	10 minutos.
Agua destilada	20 baños.
Fucsina ácida escarlata de Biebrich	2 minutos.
Agua destilada	20 baños.
Ácido fosfotúngstico fosfomolibdico	10 minutos.
Azul de anilina	5 minutos.
Agua destilada	20 baños.
Acético glacial	3 minutos.
Etanol 96%	20 baños.
Etanol absoluto	20 baños.
Xilol absoluto	10 minutos.

Una vez completado el tren de tinción, se procedió a montar las laminillas. Para ello, se colocaron unas gotas de resina sobre las laminillas hasta cubrir el tejido; posteriormente se colocaron cubreobjetos sobre las muestras para así cubrirlas, cuidando la formación de burbujas al interior. Se dejaron secar en una platina durante 10 minutos aproximadamente y después a temperatura ambiente por 72 horas.

### **Tinción Rojo Oleoso.**

La tinción de rojo oleoso fue llevada a cabo en criostato, por lo que fue necesario preservar las muestras de hígado a -80°C en un ultra congelador. Los cortes congelados fueron tratados de acuerdo con la metodología mencionada en la tabla 5.

**Tabla 5. Tren de tinción rojo oleoso.**

Reactivo.	Tiempo.
Isopropanol 60%	Inmersiones.
Oil red	15 minutos.
Isopropanol	Inmersiones. Hasta que aparezca coloreado.
Agua destilada	Inmersiones.
Hematoxilina de Gill	2 a 3 minutos.
Agua corriente	2 minutos. Lavar hasta quitar el excedente.
Agua destilada	Sumergir de 3 a 5 veces.

Una vez completado el tren de tinción, se procedió a montar las laminillas que previamente habían sido tratadas con gelatina/glicerina. Después se colocaron unas gotas de resina sobre las laminillas hasta cubrir el tejido; posteriormente se colaron cubreobjetos sobre las muestras para así cubrirlas, cuidando la formación de burbujas al interior. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 semana.

#### **Determinación de urea.**

Se colocaron 4 µl de plasma (muestra) en una placa de 96 pozos por triplicado. Consecutivamente se colocaron 200 µl de reactivo, agitándolo suavemente, se dejó reposar por 15 minutos a 20-25°C. Finalmente se leyó en el equipo Epoch BIOTEK (Agilent Technologies, Santa Clara: USA), a una longitud de onda de 520 nm y 546 nm en un plazo de 15 minutos. Para obtener la concentración de urea se realizó el siguiente calculo:

$$\text{Conc. de ácido urico} = \frac{A \text{ muestra}}{A \text{ calibrador}} * \text{Conc. del calibrador}$$

Donde: A es absorbancia.

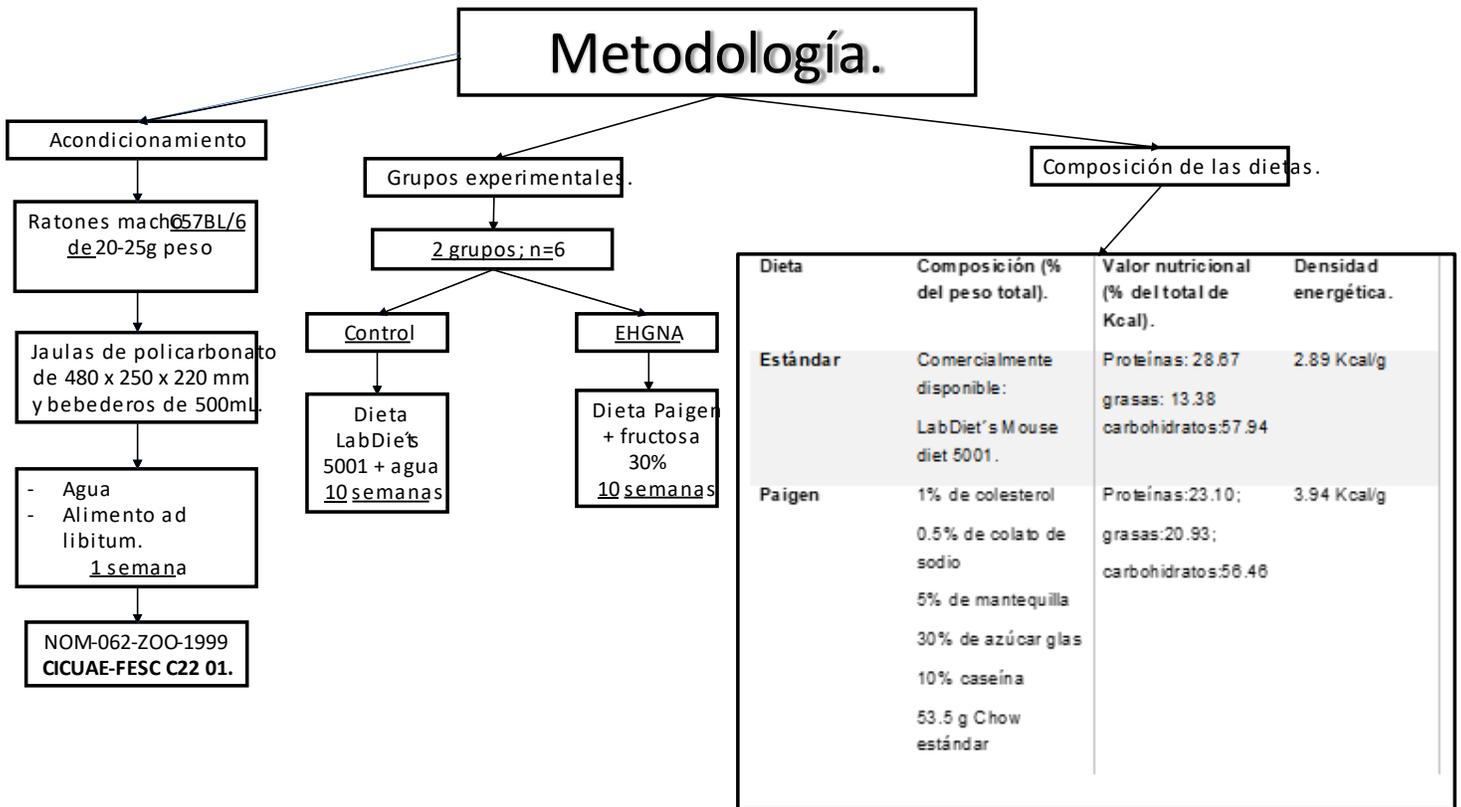
### **Determinación de carbonilos.**

Se pesó 200 mg de tejido hepático en un tubo eppendorf y se le agregó 1 ml de buffer de fosfatos a pH de 6.7 que contenía 1 mM de EDTA se homogenizo con pistilo, una vez disgregado el tejido se centrifugo a 10000 g por 15 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante. Del sobrenadante se transfirieron 200 µl a dos tubos eppendorf, un tubo correspondía a la muestra y el otro a control. Posteriormente, se añadieron 800 µl de DNPH a la muestra y 800 µl de HCl 2.5 M al tubo control. Se dejaron incubar ambos tubos en oscuridad a temperatura ambiente por 1 hora, mezclando cada 15 minutos. Al término de la incubación se agregó 1ml de TCA al 20% a cada tubo y se mezclaron, se colocaron los tubos el hielo y se incubaron por 5 minutos, se centrifugaron a 10000 g por 10 minutos a 4°C. Consecutivamente se deshecho el sobrenadante y se resuspendio el pellet en 1 ml de TCA al 10% y se mezcló por aproximadamente 5 minutos, nuevamente se colocó en hielo y se incubo por 5 minutos, se centrifugó a 10000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se deshecho y se resuspendio el pellet en 1ml de Etanol-Acetato de Etilo 1:1 y se mezcló por aproximadamente 2 minutos y se centrifugó a 10000 g por 10 minutos a 4°C, este paso se repitió dos veces más. Después del último centrifugado, se deshecho el sobrenadante y se resuspendio el pellet de proteínas en 500 µl de HCl-Guanidina, se mezcló con vortex y se centrifugo a 10000 g por 10 minutos a 4°C. Finalmente de este sobrenadante se transfirieron 220 µl del tubo control y del tubo muestra por duplicado a la placa de 96 pozos. Se midió la absorbancia en un rango de longitud de onda de entre 360-385 nm.

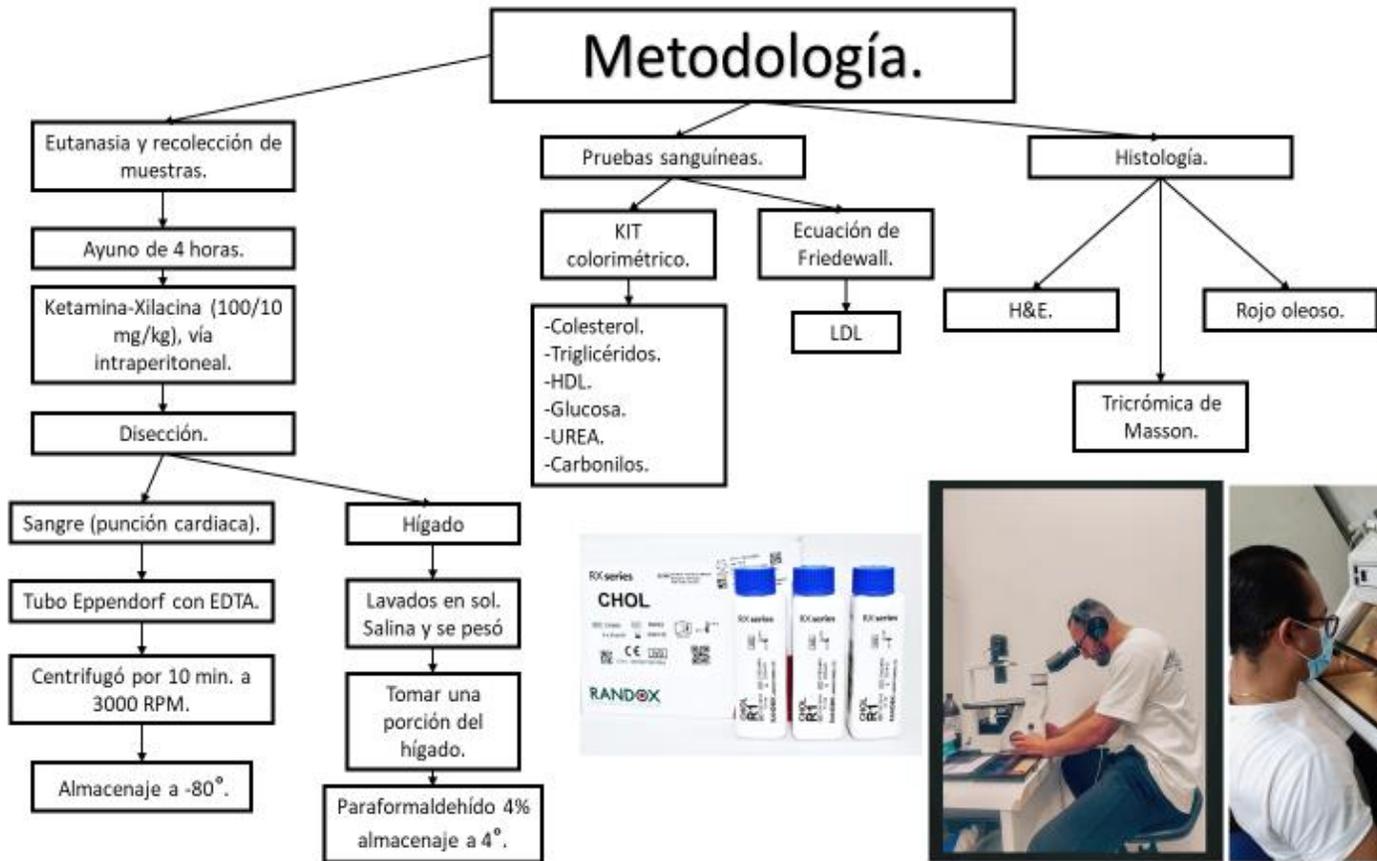
$$\text{Carbonilos} = \frac{\text{Abs corregida}}{0.011\mu\text{M}} * \frac{500\mu\text{l}}{200\mu\text{l}}$$

## Resumen de Metodología.

A continuación, se presenta la metodología en forma de diagrama para facilitar su comprensión. El diagrama 2, muestra la manera en la que se distribuyeron los animales, la dieta empleada y su acondicionamiento dentro del bioterio. En el diagrama 3 se



**Diagrama 2. Metodología experimental.**



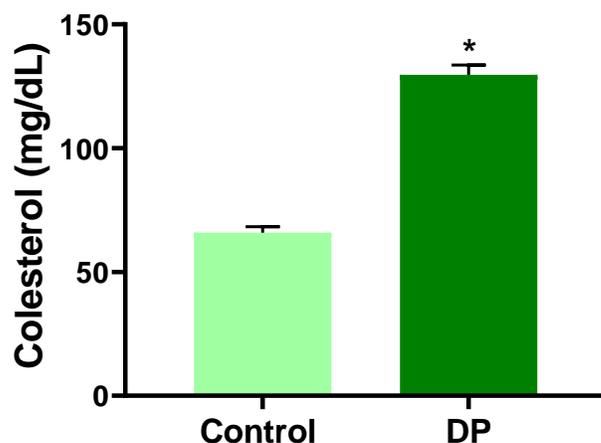
**Diagrama 3. Metodología experimental.**

## 7. Resultados.

### Perfil lipídico.

#### Colesterol.

En la figura 11 se observa que la concentración de colesterol en plasma incremento en un 97% comparado con el grupo control. Lo cual es característico de la patología (EHGNA), ya que los animales consumieron una dieta rica en colesterol y colato de sodio.

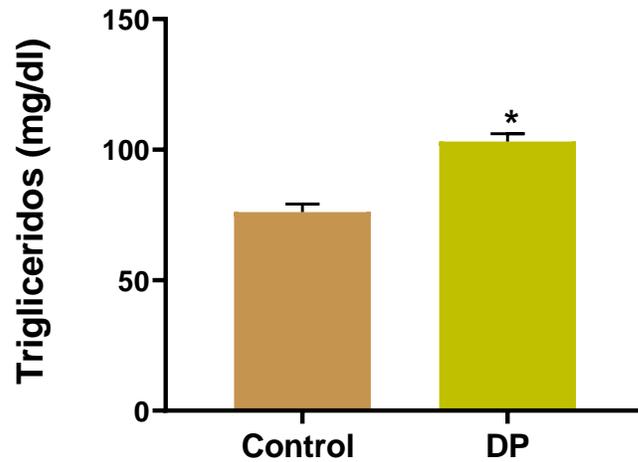


*Figura 11. Representación gráfica: determinación de Colesterol en plasma.*

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

#### Triglicéridos.

En la figura 12 se pudo observar que los ratones que consumieron la dieta Paigen más fructosa aumentaron en un 35% al ser comparado con el grupo que solo recibió la dieta chow.

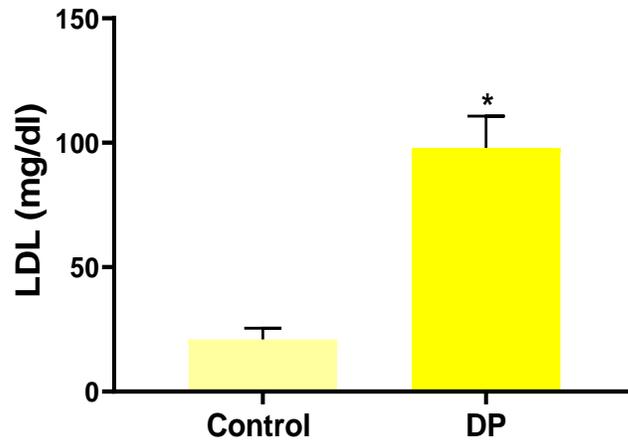


**Figura 12. Representación gráfica: determinación de triglicéridos en plasma.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

### **Lipoproteínas de baja densidad (LDL)**

En la figura 13 se observó un incremento sustancial de LDL del 366% en el grupo que fue alimentado con la dieta Paigen más fructosa comparado con el grupo control.

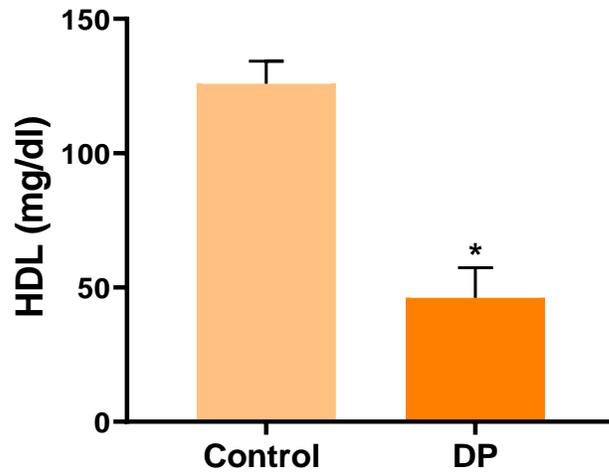


**Figura 13. Representación gráfica: determinación de LDL en plasma.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

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

En la figura 14 se ve claramente como HDL disminuye drásticamente en el grupo que fue alimentado con la dieta Paigen más fructosa en un 37% comparado con el grupo control.

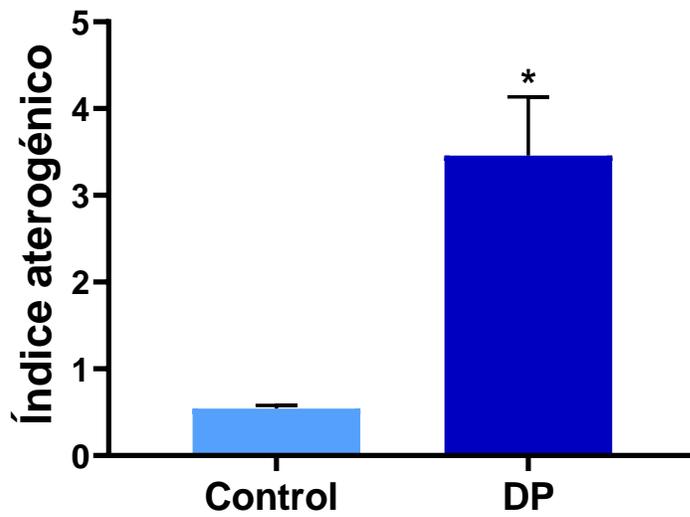


**Figura 14. Representación gráfica: determinación de HDL en plasma.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

### Índice aterogénico

En la figura 15 se observó que los ratones que consumieron la dieta Paigen más fructosa presentaron un incremento significativo del índice aterogénico de un 538% al ser comparado con el grupo control, que es la relación del colesterol total/HDL.

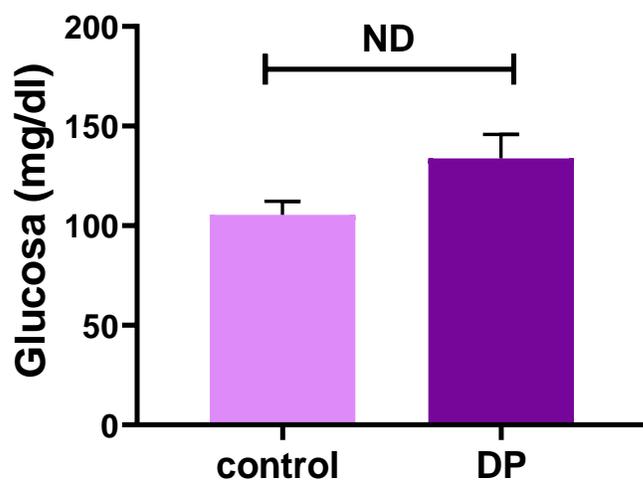


**Figura 15. Representación gráfica: determinación de índice aterogénico.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

### **Glucosa**

En la figura 16 se observó que la concentración de glucosa no sufrió afectación ya que no hubo diferencia significativa del grupo que consume la dieta Paigen más fructosa en comparación con el grupo control.

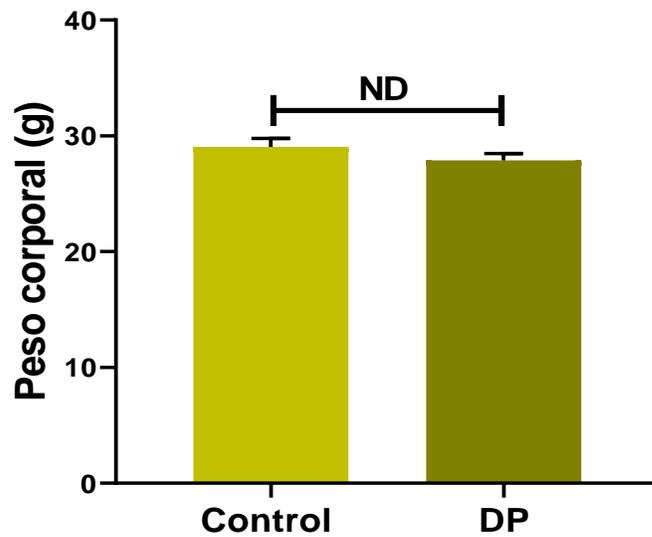


**Figura 16. Representación gráfica: determinación de glucosa en plasma.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

### **Peso corporal.**

En la figura 17 se observó que no hubo diferencia significativa en cuanto a los pesos de los ratones pertenecientes al grupo alimentado con la dieta Paigen en comparación con el grupo control.

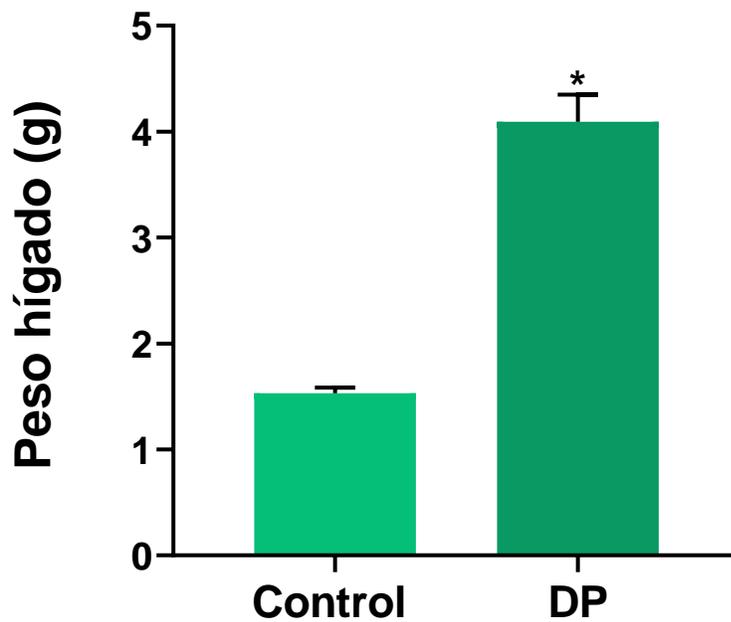


*Figura 17. Representación gráfica: peso corporal de ratones.*

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

### **Peso de hígado.**

En la figura 18 se observó que los pesos del hígado de cada grupo sufren afectación, ya que el grupo alimentado con la dieta Paigen tuvo un incremento significativo (267%) en comparación con el grupo control.

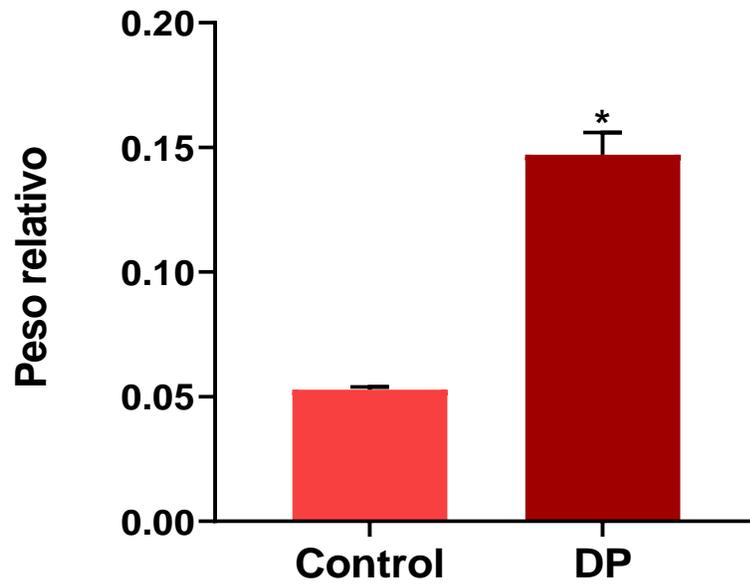


*Figura 18. Representación gráfica: peso de hígado.*

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

### **Peso relativo.**

En la figura 19 en la cual se representa la relación entre el peso del órgano y el peso del animal vivo para cada grupo, se observa que el peso relativo es mayor en el grupo alimentado con la dieta Paigen aumentando un 282% en comparación con el grupo control.



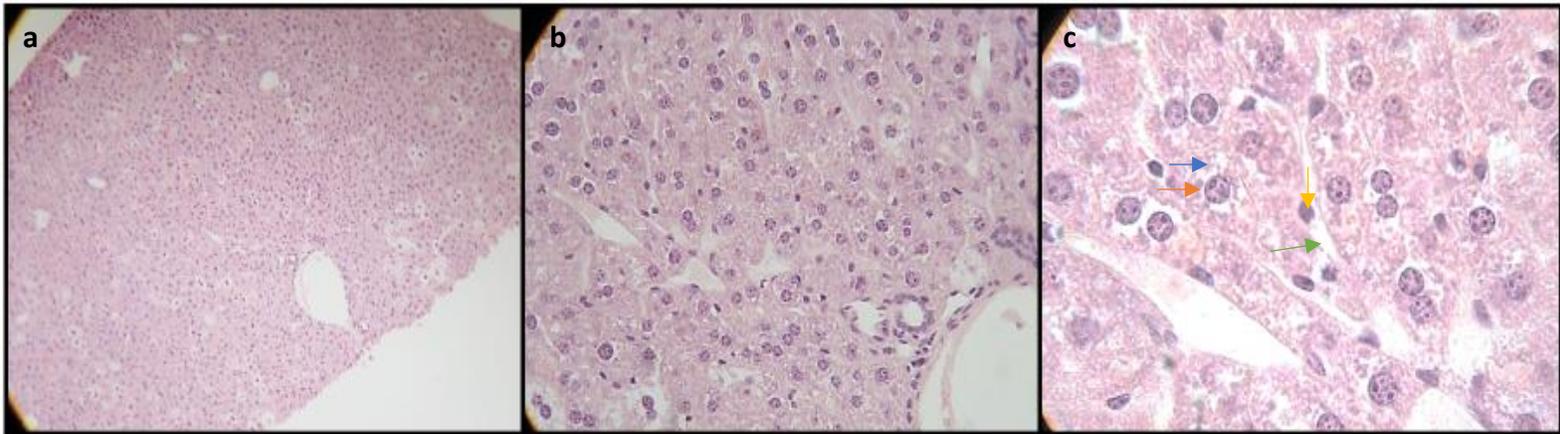
*Figura 19. Representación gráfica: peso relativo.*

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

## Cortes histológicos.

### Tinción: Hematoxilina-eosina.

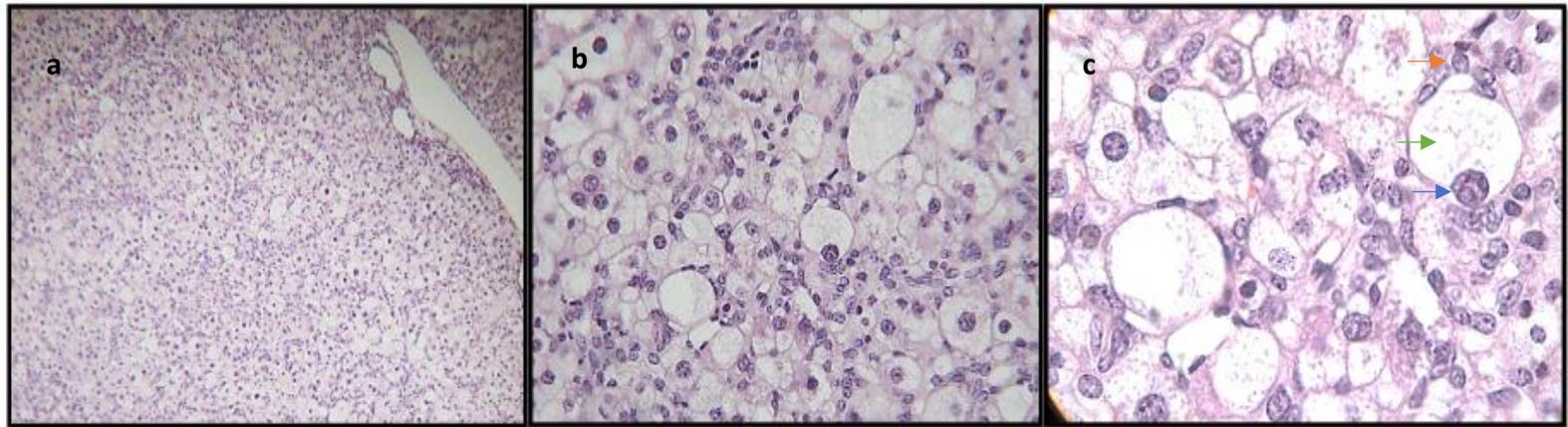
En la figura 20 se puede observar el corte histológico del hígado del grupo control teñido con hematoxilina-eosina, en la cual se aprecia que los hepatocitos conservan su morfología poliédrica con su núcleo central de color morado, el citoplasma se ve homogéneo, es decir con apariencia bien definida con una baja presencia de microvesículas de color rosa. También es evidente la presencia de los espacios sinusoidales hepáticos bien definidos con poca cantidad de células estrelladas y células de Kupffer.



**Figura 20. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo control. Tinción H&E observado: a) 10x, b)40x y c)100x. Flecha naranja: núcleo. Flecha azul: citoplasma. Flecha verde: sinusoides. Flecha amarilla: macrófagos.**

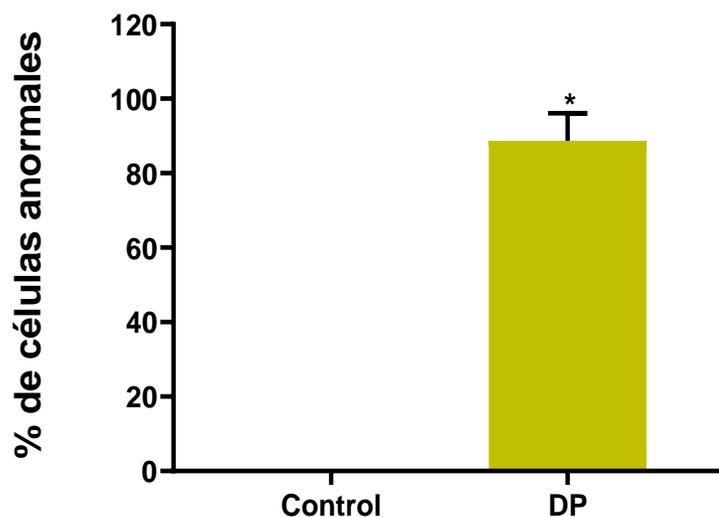
Mientras que en la figura 21 se observa el tejido hepático del grupo que recibió la dieta Paigen, en el cual hay pérdida de la arquitectura poliédrica del hepatocito, ya que se ven hipertróficos de apariencia baloneada con presencia de macrovesículas en el citoplasma desplazando el núcleo a la periferia de la célula, siendo aproximadamente el 60% de los hepatocitos balonizados. En la periferia de los hepatocitos afectados se observa hiper celularidad posiblemente polimorfonucleares como macrófagos, neutrófilos y linfocitos. Con relación a los espacios sinusoidales, se observan poco evidentes y hay una cantidad aumentada de células de Kupffer. La falta de coloración en el citoplasma es propia de las macrovesículas ya que no

tiene afinidad a la Eosina, por ello no se tiñen. Presencia de fibroblastos reactivos entre los espacios sinusoidales.



**Figura 21. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo alimentado con dieta Paigen. Tinción H&E observado: a) 10x, b)40x y c)100x. Flecha azul: núcleo. Flecha verde: macrovesículas ocupando casi la totalidad del citoplasma. Flecha naranja: infiltración leucocitaria rodeando los hepatocitos balonizados.**

Para corroborar lo observado en los cortes histológicos, se realizó la campimetría de 10 campos de las laminillas tenidas con H&E y se contaron el número de hepatocitos anormales (células balonizadas y con gotas lipídicas) que presentaban tanto el grupo control como el grupo que recibió la dieta Paigen, observándose que casi el 88% de las células están alteradas en el grupo de dieta Paigen mientras que en el grupo control no hubo ninguna célula dañada ya que el 100% eran normales, lo cual se esquematiza en la figura 22.



**Figura 22. Campimetría de laminillas teñidas con H&E, donde se muestra el porcentaje de células normales y anormales en tejido hepático.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

Además se realizó el conteo de las células que presentaban microvesículas y macrovesículas tanto en el grupo control y de dieta Paigen, observándose que el grupo control presentó diminutas gotas lipídicas en el interior del hepatocito sin embargo no modifica su morfología y las cuales solo se encuentran en estado transitorio por lo que no se consideran a diferencia del grupo dieta Paigen que se ve claramente como hay un mayor acúmulo de triglicéridos en forma de macrovesículas que corresponden a un 67 %, y solo un 33% en forma de microvesículas, representando un excesivo acúmulo de grasa que incluso hace que pierda estructura y funcionalidad el hepatocito.

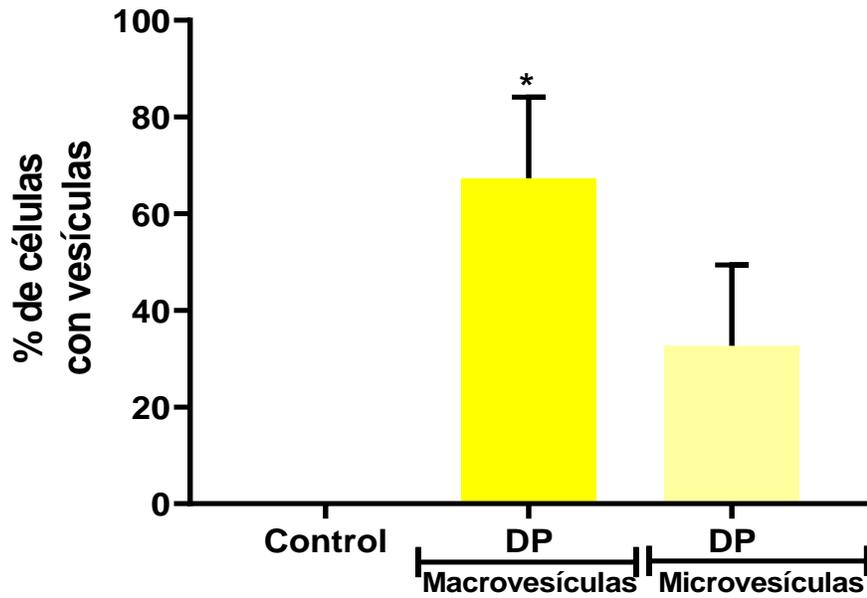
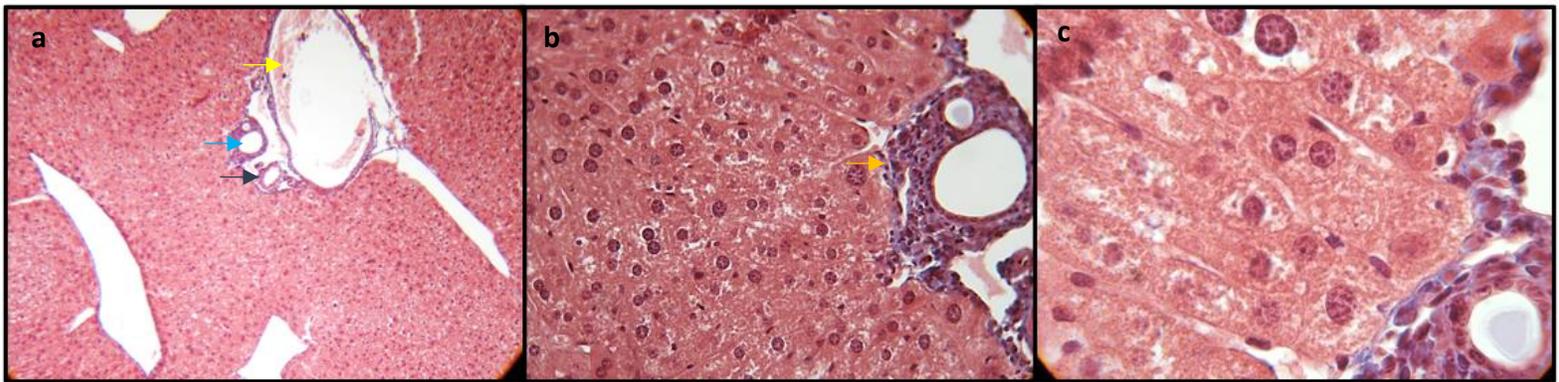


Figura 23. Porcentaje de células hepáticas que presentan macrovesículas y microvesículas.

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

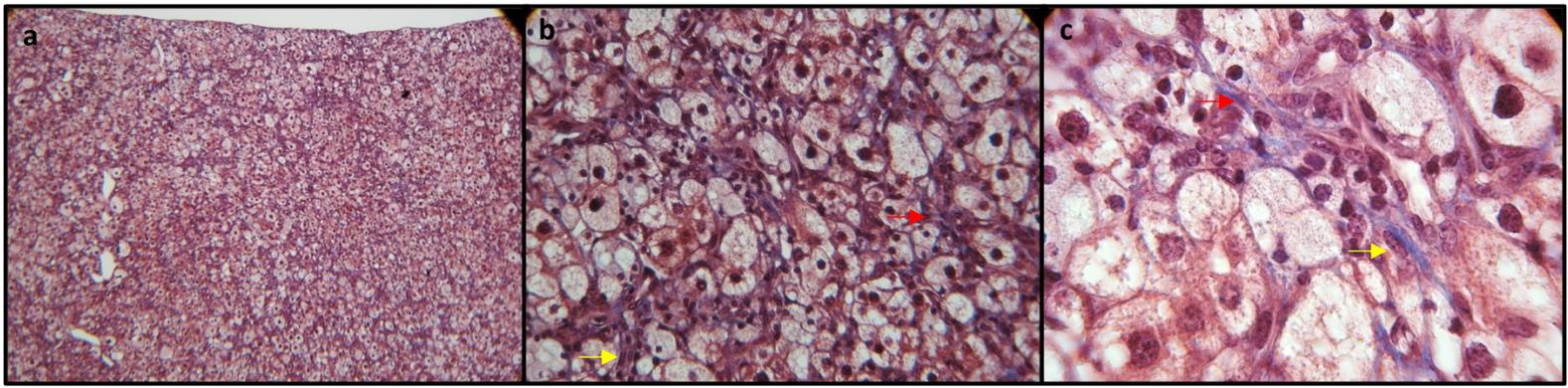
### **Tinción: Tricrómica de Masson.**

En la figura 24 correspondiente al grupo control a la que se realizó la tinción Tricrómica de Masson, se aprecia una sección del parénquima hepático compuesta por múltiples hepatocitos bien diferenciados, con una morfología normal. Multifocalmente se aprecian venas centrales, así como espacios porta, constituidos por un ducto biliar, un vaso linfático y una arteria hepática; en la periferia se observa una capsula de coloración oscura, propia del tejido conectivo que rodea a los parénquimas. Entre las células hepáticas se observan las sinusoides. Dentro del tejido conectivo se observa algunas fibras de colágeno que naturalmente forman parte de este tejido.



**Figura 24. Cortes histológicas de tejido hepático del grupo control. Tinción Tricrómica de Masson observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: vena porta. Flecha azul claro: arteria hepática. Flecha Azul grisáceo: ducto biliar. Flecha amarillo oscuro: Tejido fibroso propio de la arteria.**

Por otra parte, en la figura 25 se observa infiltrado celular propio de una respuesta inflamatoria, posiblemente macrófagos que se presentan en forma de “ríos” que se extienden a lo largo del tejido. Al examinarlo se observan mayoritariamente fibras de colágeno que en algunos casos son más gruesas y se superponen, dichas estructuras muestran indicios de fibrosis. Hay un patrón celular difuso ya que aparecen a lo largo de todo el tejido, señalando un daño severo.

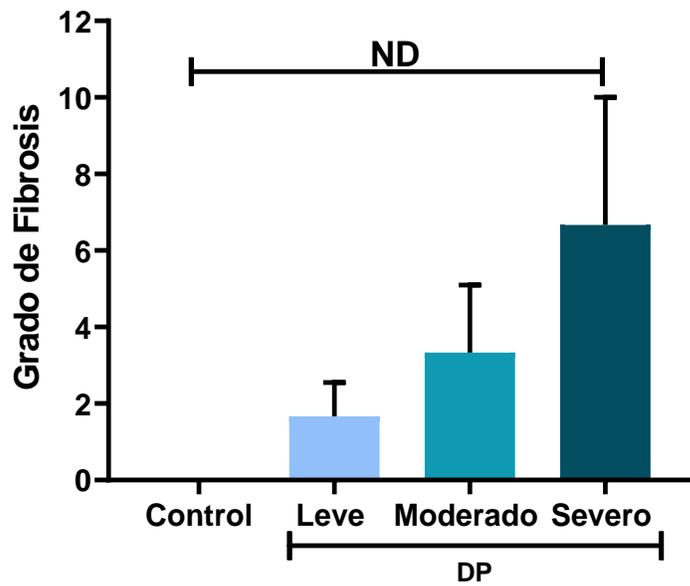


**Figura 25. Cortes histológicos de tejido hepático del grupo alimentado con dieta Paigen. Tinción Tricrómica de Masson observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: fibroblastos. Flecha roja: fibras de colágeno.**

Para poder representar el grado de fibrosis, se realizó la campimetría de las laminillas teñidas con Tricrómica de Masson en 10 campos evaluando cualitativamente el acúmulo de las fibras de colágeno en el tejido mediante la intensidad del color azul, así como la frecuencia de la aparición de las fibras de colágeno, estableciendo la siguiente escala:

<b>Criterio.</b>	<b>Grado de fibrosis.</b>
+	Leve
++	Moderado
+++	Severo

Siguiendo el criterio establecido se observó que el grupo que recibió la dieta Paigen presentó una mayor tendencia de depósito de fibras de colágeno en el parénquima hepático presentando un patrón difuso, es decir en varias zonas ya que no se observó que fuera localizado, clasificándolo como presencia de fibrosis severa difusa, que al ser comparado con el grupo control observamos que no hay presencia de fibras de colágeno en el parénquima hepático, solo en zonas como venas y arterias que es normal del tejido, como se observa en la figura 26.

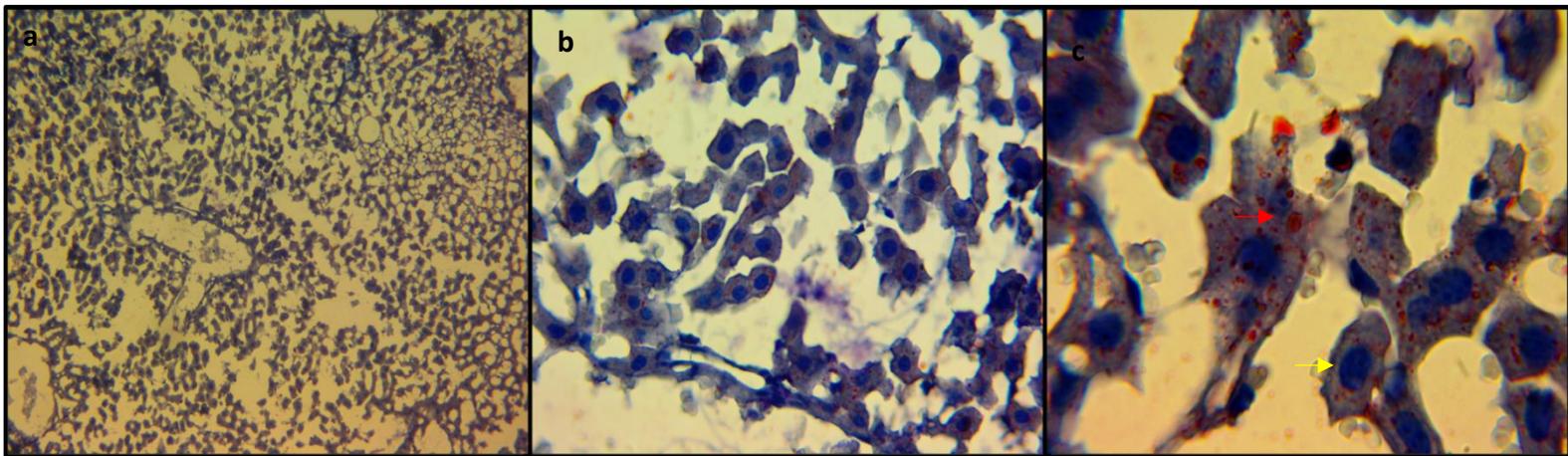


**Figura 26.** Campimetría de laminillas teñidas con Tricrómica de Masson, donde se representa el grado de fibrosis en tejido hepático.

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

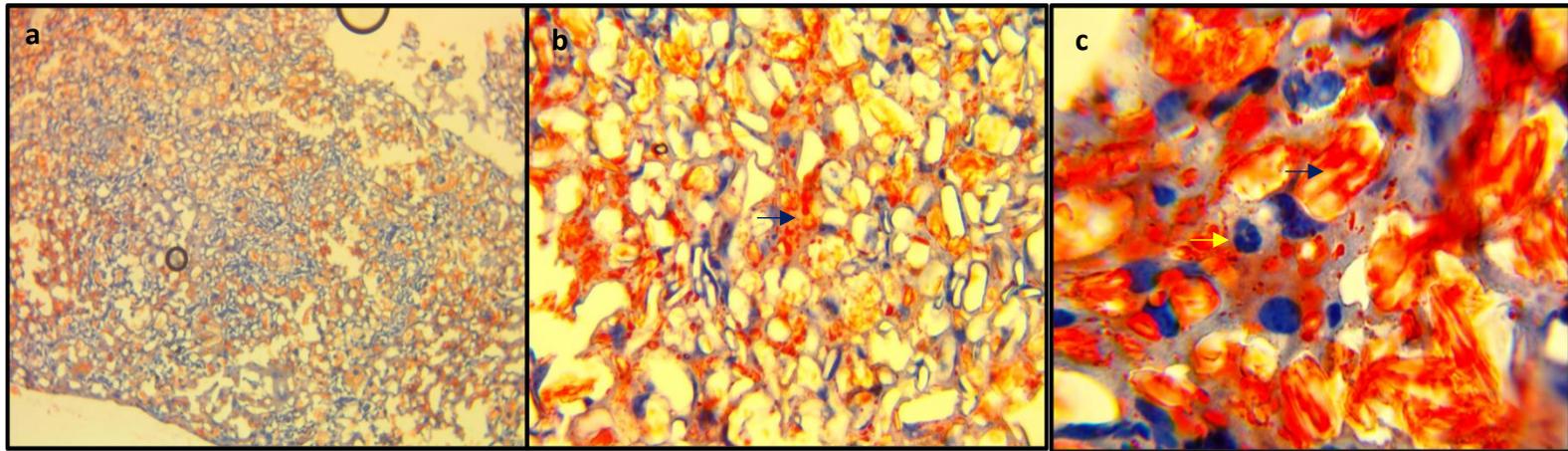
### **Tinción: Rojo oleoso.**

En la figura 27 correspondiente al grupo control se observa como el tejido hepático se encuentra en condiciones anatómicas normales, presentando su estructura celular intacta. Las células hepáticas conservan su arquitectura y su morfología poliédrica. También se aprecia el citoplasma en buen estado, presentado ligeras gotas lipídicas. El núcleo se encuentra céntrico sin desplazamiento a la periferia.



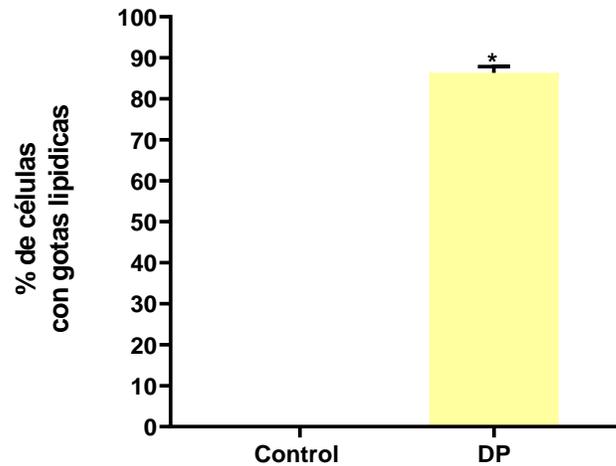
**Figura 27.** Cortes histológicos de tejido hepático del grupo control. Tinción Rojo Oleoso observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: núcleo. Flecha roja: citoplasma con pequeñas gotas lipídicas.

En la figura 28 se muestra el tejido del grupo alimentado con la dieta Paigen, donde se observa que la célula sufre el fenómeno de balonización debido al acúmulo de grasa. Este acúmulo se ve representado por una gran cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma, dichas gotas se ven claramente teñidas de color rojo y se aprecia una mayor proporción de macrovesículas que de microvesículas en comparación con el grupo control. Por lo tanto, hay pérdida de la arquitectura celular, siendo desplazado el núcleo a la periferia debido a la generación de la gota lipídica.



**Figura 28.** Cortes histológicos de tejido hepático del grupo alimentado con la dieta Paigen. Tinción Rojo Oleoso observado: a) 10x, b) 40x y c) 100x. Flecha amarilla: núcleo. Flecha azul oscuro: gotas lipídicas presentes en el citoplasma.

Para poder representar el número de hepatocitos que presentaban gotas lipídicas en el citoplasma se realizó un análisis campímetro de 10 campos en las laminillas teñidas con Rojo Oleoso, en el cual se estableció un criterio porcentual para el número de células normales o afectadas. En donde el grupo control no presentó gotas lipídicas que provocaran un cambio en su morfología celular, por lo tanto, el 100% de los hepatocitos del grupo control eran sanos. Por otra parte, el grupo alimentado con la dieta Paigen sufrió un acúmulo lipídico considerable en donde el 86% de los hepatocitos de los ratones presentaban gotas lipídicas dentro del citoplasma.

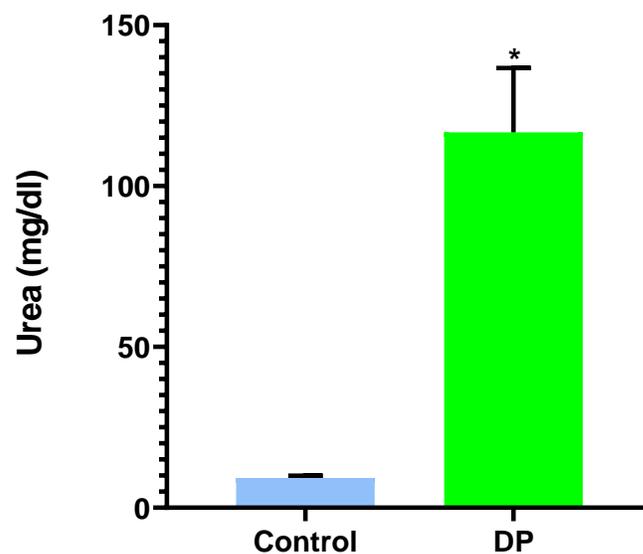


**Figura 29. Porcentaje de células hepáticas con gotas lipídicas.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

### Urea.

En la figura 30 se observa que la concentración de urea en plasma incremento significativamente comparado con el grupo control.

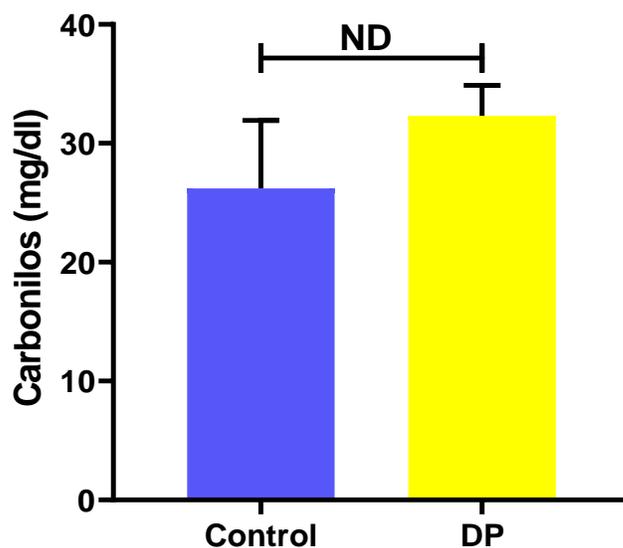


**Figura 30. Representación gráfica: determinación de urea en plasma.**

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

## Carbonilos

En la figura 31 se representa la concentración de carbonilos en plasma, donde se observa que hay tendencia de aumento de carbonilos sin llegar a ser significativo del grupo que consume la dieta Paigen más fructosa en comparación con el grupo control.



*Figura 31. Representación gráfica: determinación de carbonilos en tejido hepático.*

Datos presentados como medias  $\pm$  error estándar medio de cada grupo (n=6). \*= Diferencia significativa vs grupo control; ND= No hay diferencia significativa, después de un análisis estadístico t de Student independiente de dos colas ( $p \leq 0.05$ ).

## 8. Resumen de resultados.

		Grupo DP
<i>Perfil lipídico</i>	Colesterol	+
	Triglicéridos	+
	LDL	+
	HDL	-
	Índice aterogénico	+
<i>Pesos (g)</i>	Peso corporal	————
	Peso hígado	+
	Peso relativo	+
<i>Pruebas sanguíneas</i>	Glucosa	————
	Urea	+
	Carbonilos	————
<i>Histología</i>	H&E	+
	Tricrómica de Masson	+
	Rojo Oleoso	+

*Sin cambio:* ———

*Disminución:* -

*Aumento considerable:* +

## 9. Discusión.

En investigación, los estudios preclínicos son una herramienta que permiten desarrollar diferentes patologías a través de diversos mecanismos de inducción. El uso de animales de laboratorio como modelo biológico es primordial ya que estos permiten asimilar el proceso de aparición de una enfermedad lo más cercano al humano. En un estudio realizado por Fang et al (2022), menciona que una dieta alta en grasas acompañada del uso de fructosa favorece a la aparición de esteatosis, inflamación y fibrosis. Por otra parte, Yu Ri Im et al (2021), menciona que las dietas altas en grasas y altas en fructosa usadas en ratones se acercan fielmente a los resultados de EHGNA en humanos.

Los ratones C57BL/6 son una cepa que se emplea constantemente en modelos de EHGNA ya que al ser alimentados con una dieta rica en grasas es susceptible a generar resistencia a la insulina, obesidad y lesiones ateroscleróticas (Schreyer et al. 1998), además, desencadena características comunes del síndrome metabólico humano (Fraulob et al. 2010).

El modelo de inducción de EHGNA que llevamos a cabo se caracterizó por el aumento de colesterol, triglicéridos, LDL e índice aterogénico y la disminución de HDL; lo cual se vio reflejado en el aumento del peso del hígado. De acuerdo con Silva C. et al (2014), el consumo de dietas ricas en grasas repercute directamente en el perfil lipídico ya que presentan un aumento en los niveles de colesterol total y triglicéridos. Los ratones que han sido alimentados con dieta rica en grasas desarrollan resistencia a la insulina lo cual lleva a la alteración del perfil bioquímico plasmático (Rodríguez Calvo. et al. 2019). En la EHGNA la dislipidemia se caracteriza por niveles altos de triglicéridos, colesterol LDL y una disminución de colesterol HDL (Lee et al. 2021). Los resultados obtenidos en la determinación del perfil lipídico coinciden con los reportados por Hidalgo et al. (2020), en el cual encontraron que los animales alimentados con una dieta rica en grasas muestra un aumento significativo en los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos e índice aterogénico en comparación con el grupo control; de tal manera

que la ingesta de dieta Paigen combinada con fructosa induce un desorden metabólico muy similar al observado en humanos.

Al evaluar la concentración de colesterol en el plasma de los ratones, se encontró que los niveles aumentan 97% en el grupo alimentado con la DP en comparación con el grupo control. El colesterol que es ingerido por la dieta es perjudicial para la salud y el riesgo aumenta conforme sus niveles incrementan (Kanuri & Bergheim, 2013). Eisinger et al. (2014) realizó un estudio en el cual alimentó a ratones C57BL/6 con una dieta alta en grasas durante 14 semanas y al término evalúa la concentración de colesterol total el cual se encuentra elevado, coincidiendo con nuestros resultados reportados. Uno de los mecanismos por los cuales se cree que la dieta alta en grasa induce el incremento de colesterol hepático en ratones es a través de la inducción en la expresión de HMG-CoA reductasa lo cual lleva al incremento del almacenamiento de colesterol contribuyendo a la aparición de la dislipidemia como consecuencia del consumo excesivo de grasas (Rabot et al., 2010).

Anteriormente, ya se ha mencionado la repercusión de la ingesta de la dieta alta en grasas en los niveles lipídicos hepáticos y séricos; Kim et al. (2011) evaluó los niveles de triglicéridos en ratones de la cepa C57BL/6 que fueron alimentados con una dieta alta en grasas por 10 semanas; los hallazgos reportados mencionan que los ratones alimentados con la dieta grasa presentan un incremento en la concentración de triglicéridos. El desequilibrio en los niveles de triglicéridos propicia a la aparición de EHGNA (Cohen et al., 2011).

La concentración de LDL y HDL también se ven modificadas dentro de los grupos experimentales. Los resultados obtenidos muestran que la concentración de LDL aumentan significativamente un 366% en contraste con el grupo control y la concentración de HDL disminuye significativamente. Nuestros resultados se asemejan a los reportados por Hidalgo et al (2020), en los cuales reporta que en un grupo de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta Paigen y fructosa al 30%, los niveles de LDL aumentaron y los niveles de HDL disminuyen. En un estudio experimental realizado por Ali et al (2014), también se menciona lo anterior, al

alimentar ratones con una dieta alta en grasas/colesterol los niveles de LDL aumentan considerablemente y los valores de HDL se mantienen por debajo de los niveles de LDL. Carvajal (2014), menciona que los niveles altos de triglicéridos se asocian con niveles de HDL disminuidos. El aumento de colesterol plasmático está relacionado con las LDL aterogénicas (Hartvigsen et al., 2007). Cuando los niveles de LDL que circulan por el torrente sanguíneo aumentan, se desencadena un proceso activado por diversos factores y las lipoproteínas LDL comienzan a oxidarse dentro de las células endoteliales. Las moléculas de LDL oxidadas son captadas por macrófagos a través de receptores “scavenger” como CD36, SR-B1 y LOX-1, lo cual activa células endoteliales, monocitos, macrófagos, células T y células espumosas, desencadenando la liberación de moléculas proinflamatorias como IL- $\beta$ 1, IL-8, TNF- $\alpha$ , entre otras. Los macrófagos activados liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) que aumentan la oxidación de LDL e incrementan las LDL oxidadas generando un proceso de aterogénesis (Carvajal, 2015)

El índice aterogénico es un valor indicativo que resulta de la relación: TG/HDL, permite identificar el riesgo para desarrollar enfermedades cardiometabólicas (Muñoz et al., 2020). De acuerdo con la “Guía Clínica para la detección, Diagnóstico y tratamiento de la Dislipemia Aterogénica en Atención Primaria”, el índice aterogénico mayor a 3 es considerado como un objetivo de alto riesgo cardiovascular, en nuestro caso es mayor a 3 por cual los ratones alimentados con DP son propensos a sufrir enfermedades cardiometabólicas. Oršolić et al. (2019), determinó el índice aterogénico en ratones alimentados con una dieta rica en grasas durante 30 días, reportando que los ratones que recibieron la dieta rica en grasas tienen mayor índice aterogénico en comparación con el grupo control, lo cual se asemeja a nuestros resultados. Sa’adah et al. (2017) hace referencia a que la administración de una dieta que conduce a la hiperlipidemia causa incremento en el índice aterogénico, colesterol total y niveles de LDL en ratas.

En cuanto a la determinación de glucosa, nuestros resultados muestran que este parámetro no se modifica. Este hecho está relacionado con la ingesta de la fructosa. La fructosa es transportada al hígado donde se fosforila por la enzima fructocinasa a fructosa 1 fosfato que se convierte en gliceraldehido 3 fosfato o dihidroxiacetona fosfato, finalmente forman Acetil CoA. En el hígado el Acetil CoA conduce a la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol, estimulando la vía glicolítica y lipogénica de la célula hepática (Esquivel & Gómez, 2007). En una revisión, Carvallo et al. (2019), menciona la relación que existe entre el consumo de fructosa y los efectos metabólicos en el organismo; la fructosa promueve el riesgo metabólico al incrementar el depósito de grasa visceral e intrahepática. En ratas alimentadas con dietas altas en fructosa se ha visto que el depósito de tejido adiposo abdominal ha aumentado, sin cambios en el peso corporal y niveles plasmáticos altos de triglicéridos y ácidos grasos. Además, un consumo prolongado de fructosa genera un estado de inflamación crónica.

El peso corporal tampoco se modificó, como se mencionó arriba el consumo de fructosa en algunos casos no genera cambios en el peso corporal (Carvallo et al., 2019). Tipoe et al. (2009), comenta que algunos investigadores han hallado que una dieta alta en grasas no siempre puede generar obesidad en ratas sanas, esto también se relaciona con la calidad y composición de la dieta. Él desarrolló un modelo dietario para inducción de EHGNA en ratas durante 8 semanas, dentro de sus resultados reporta que en el grupo control y el grupo de esteatosis no hubo una diferencia significativa en los pesos corporales. Los ratones libres de gérmenes son resistentes a la obesidad al ser alimentados con una dieta rica en grasas y carbohidratos (Rabot et al., 2010). El tiempo en el cual se llevó a cabo el experimento puede influir en la generación a la obesidad, se podría modificar este para desarrollar este proceso de obesidad.

Por otra parte, el peso del hígado si se modifica. A pesar de que el peso corporal no aumenta, el peso del hígado y la cantidad de tejido adiposo tiende a aumentar. Gowda et al. (2020), hace mención de que el peso del hígado si se ve afectado con

la ingesta de una dieta alta en grasas, lo cual se asemeja a los resultados obtenidos en los cuales el peso del hígado aumento significativamente en el grupo alimentado con la DP en comparación con el grupo control.

El peso relativo es una determinación del peso de un órgano en relación con el peso corporal de un roedor. Esta información es un aporte útil para comparar los efectos de un tratamiento sobre el desarrollo de algún órgano (Yanez & Candela, 2003). De acuerdo con los resultados del peso relativo obtenidos experimentalmente, se pude observar que la diferencia de peso relativo en el grupo DP es significativamente mayor al compararlo con el grupo control, con lo cual se evidencia que con la dieta Paigen el hígado de los ratones es afectado directamente. La determinación de este parámetro demuestra que con la dieta el aumento del peso corporal y el peso del hígado no tienen una relación directamente.

En la actualidad, además de emplearse diversos métodos para la detección de EHGNA, no existen pruebas no invasivas que tengan un alto valor predictivo y detección de formas agresivas de enfermedades hepáticas como la EHGNA. La biopsia hepática es un examen estándar para un adecuado diagnóstico y evaluación del grado de esteatosis, fibrosis, actividad inflamatoria y daño hepático del paciente. La histopatología ayuda a distinguir entre los diversos estadios de la EHGNA, así como aquellos que son propensos a desarrollar formas de daño hepático avanzado como la cirrosis (Arab et al., 2014).

Nuestros resultados, muestran los cambios observados microscópicamente en la histología hepática realizada al grupo alimentado con la dieta Paigen, que fue caracterizada por: 1) el balonamiento de los hepatocitos y aparición de gotas lipídicas en el citoplasma; 2) presencia de fibrosis; 3) filtración de células inflamatorias; 4) perdida de la arquitectura celular; y 5) cambios degenerativos en los hepatocitos. En el grupo control se mantuvieron las características propias de las células hepáticas, la arquitectura celular no se modificó, no hubo presencia de fibrosis y la infiltración lipídica no fue propia de la aparición de EHGNA.

Según Arab et al. (2014) las principales características histopatológicas de la EHGNA incluyen: 1) esteatosis; 2) inflamación; 3) daño hepatocelular; y 4) presencia de fibrosis. Las cuales se asemejan mucho a los resultados que obtuvimos.

Dentro del análisis de los cortes teñidos con hematoxilina y eosina se encontró que el 88% de las células hepáticas del grupo DP presentaron una pérdida de la arquitectura celular siendo balonizadas por las gotas lipídicas que se infiltraron en el citoplasma, en su mayoría se presentaron macrovesículas (67%) y una menor presencia de microvesículas (33%). Este resultado coincide con lo mencionado por Arab et al. (2014), donde menciona que el elemento morfológico central de la EHGNA es la acumulación de vesículas lipídicas en el parénquima hepático. En la tinción de hematoxilina y eosina se visualizan espacios circulares ópticamente vacíos de un tamaño grande (macrovesículas) fácilmente identificables en el citoplasma que desplaza el núcleo hacia la periferia de los hepatocitos. Tsuchida et al. (2018), mencionaron que la ingesta de una dieta alta en grasas, fructosa y colesterol exagera las características histológicas de EHGNA en ratones C57BL/6J; histológicamente esto repercute con la aparición de hepatocitos balonizados con presencia de cuerpos de Mallory. Tipoe et al. (2009) también menciona que el consumo de grasas en la dieta genera un mayor grado de esteatosis; en el análisis que él realizó a ratas a las que les indujo EHGNA, observó un gran depósito de vacuolas citoplasmáticas en el hígado y también encontró una gran cantidad de inflamación. La inflamación está caracterizada por la presencia de pequeños grupos de células inflamatorias, incluyendo linfocitos, eosinófilos y neutrófilos, que se encuentran cerca a los hepatocitos balonizados; esto refleja una desregulación en la síntesis de citocinas y quimiocinas en el hígado (Hebbard & George, 2010). Reforzando lo anterior, Pilar L. (2014), también menciona que los hallazgos histopatológicos de la EHGNA se centran en la aparición de macrovesículas y microvesículas que se manifiesta de acuerdo con la presencia de vacuolas grasas.

Dentro de la dieta empleada se adiciona colesterol y colato de sodio. En ratones el uso de colesterol y colato inducen diversas manifestaciones hepáticas como la inflamación y la expresión de colágeno. En una dieta aterogénica que contiene colesterol, colato y alta cantidad de grasa se promueve la aparición de daño hepático y fibrosis (Hebbard & George, 2010).

Para poder ver el desarrollo de fibrosis hepática se procedió a realizar la tinción Tricrómica de Masson. Con la administración de la dieta Paigen se observó un mayor desarrollo de fibrosis ya que el depósito de fibras de colágeno se extiende por todo el parénquima hepático presentado un patrón difuso, además se observa infiltrado de células inmunitarias. En comparación con el grupo control en donde se encontró que no existe presencia de fibrosis.

Tipoe et al. (2009), reporta que en ratas con EHGNA inducida a través de dieta, se visualiza un mayor porcentaje de depósitos de colágeno con un engrosamiento de en el tejido conectivo alrededor de venas y la presencia de fibrosis celular; también menciona que aumentaron tres veces las áreas de colágeno en ratas con EHGNA que en el grupo control. El experimento realizado por Hidalgo et al. (2020), también hace referencia a que la dieta Paigen es esencialmente influyente en la generación de fibrosis. Ella reporta que el grupo control no muestra indicios de fibrosis, mientras que el grupo DP presenta una mayor aparición de fibrosis. Nuestros resultados se asemejan a los dos experimentos citados.

Por otra parte, se evaluó la infiltración de gotas lipídicas en el citoplasma con la tinción de rojo oleoso. En los resultados del grupo DP se encontró que el porcentaje de células que presentan vesículas lipídicas corresponde al 86%, las cuales se depositan en el citoplasma de los hepatocitos y se tiñen de rojo; además se observa que por la presencia de macrovesículas el núcleo es desplazado a la periferia. A comparación del grupo control en donde solo se encontraron ligeras gotitas lipídicas, sin desplazamiento del núcleo y sin balonización del hepatocito.

Después del adipocito, en los animales, el hígado cumple una función almacenadora de grasa en donde se almacenan en forma de gotas lipídicas (Megías et al., 2019), por lo que en los hepatocitos sanos se logra ver gotitas lipídicas en el citoplasma. Tipoe et al. (2009), también menciona que en ratas sanas que han sido alimentadas con una dieta normal se logran ver estas gotas lipídicas.

Ge et al. (2010), realizó la tinción de rojo oleoso para observar las gotas lipídicas hepáticas de diferentes grupos de ratones C57BL/6J a los que les indujo EHGNA por diversas causas. Encontró que todos los grupos (ob/ob, db/db, etanol y dieta alta en grasas) mostraron múltiples gotas lipídicas en el citoplasma. El análisis visual demostró que la dieta alta en grasas induce la aparición de gotitas lipídicas dentro del hepatocito. También encontró presencia de pequeñas gotitas lipídicas en el grupo control.

Hidalgo et al. (2020), realizó una tinción de rojo oleoso en un grupo de ratones alimentados con dieta Paigen y fructosa. Ella describe el tejido hepático de este grupo como fuertemente teñido de color rojo en las vacuolas en forma de macrovesículas en los hepatocitos que eran de gran tamaño en comparación con el grupo control. Nosotros vimos en los cortes histológicos realizados que el citoplasma de los hepatocitos también se tiñó de gran coloración roja, propia de las gotas lipídicas, con lo cual asemejamos nuestros resultados con lo reportado en su estudio.

El consumo excesivo de fructosa está relacionado con hipertrofia renal y también se relaciona con el síndrome metabólico (Kretowicz et al., 2011). Nuestros resultados mostraron un incremento significativo de la concentración de urea en plasma en el grupo que consumió la dieta Paigen y fructosa. Dichos resultados coinciden con lo reportado por Liu y colaboradores (2013) quienes encontraron que pacientes con EHGNA tenían una concentración de urea significativamente más alta en comparación con los casos de control, e indican que su valor puede ser predictivo

en pacientes con EHGNA, lo cual se relaciona con aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular. También su incremento está relacionado con el consumo de fructosa la cual favorece el desarrollo de síndrome metabólico y por ende un aumento de la incidencia de EHGNA y la enfermedad renal crónica (Nakagawa et al., 2021), lo anteriormente mencionado es corroborado por Abdel et al. (2016), quienes realizaron un estudio en el que administraron fructosa a un grupo de ratas albinas macho mostrando un aumento significativo de la concentración sérica de urea en comparación con el grupo de control.

La EHGNA es una enfermedad multifactorial que puede presentarse de diferentes maneras clínicas cuyos mecanismos aún no se conocen totalmente. El estrés oxidativo (EO) en la EHGNA aumenta, por lo que la prueba de carbonilos es un indicador adecuado para medir el estrés oxidativo proteico (Carrasco et al., 2003). El EO se caracteriza por niveles intracelulares elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentando la carbonilación de proteínas del tejido hepático (Coelho et al., 2023). La carbonilación proteica es mucho mas compleja de lo que se visualiza. Dentro de los procesos oxidativos celulares, los lípidos son más fáciles de oxidar que las proteínas. Los resultados obtenidos muestran que no hubo un incremento en la determinación de carbonilos, esto puede ocurrir por el tiempo en el que se llevó a cabo la inducción de la patología a través de dieta ya que durante el tiempo de inducción posiblemente se presentó una oxidación de ácidos grasos y no de proteínas, por lo tanto es preciso hacer la determinación de estos ácidos para corroborar que hay procesos oxidativos intracelulares propios de la patología.

## **10. Conclusiones.**

Fue posible establecer un modelo de inducción de EHGNA en ratones C57BL/6 a través de la ingesta de una dieta alta en grasas, colesterol, colato y fructosa al 30%, obteniendo la aparición de alteraciones metabólicas similares a las observadas en humano como la variación del perfil lipídico, cambios histológicos, cambios renales y cardiometabólicos, lo que permite concluir que el modelo establecido es adecuado para la realización de estudios serológicos, celulares y moleculares que contribuyan a la generación de nuevos conocimientos de la progresión de la enfermedad.

## 11. Referencias.

1. Abdel-Kawi, S. H., Hassanin, K. M., & Hashem, K. S. (2016). The effect of high dietary fructose on the kidney of adult albino rats and the role of curcumin supplementation: A biochemical and histological study. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.12.002>
2. Ali, K., Abo-Ali, E. M., Kabir, M. D., Riggins, B., Nguy, S., Li, L., Srivastava, U., & Thinn, S. M. (2014). A Western-fed diet increases plasma HDL and LDL-cholesterol levels in apoD<sup>-/-</sup> mice. *PloS one*, 9(12), e115744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115744>
3. Almeda Valdés, P., Cuevas Ramos, D., & Aguilar Salinas, C. A. (2009). Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 8, S18-S24. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31822-8](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31822-8)
4. Ampuero, J., Sánchez-Torrijos, Y., Aguilera, V., Bellido, F., & Romero-Gómez, M. (2018). Nuevas perspectivas terapéuticas en la esteatohepatitis no alcohólica. *Gastroenterología y Hepatología*, 41(2), 128-142. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2017.07.006>
5. Angulo, P. (2002). Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, Vol. 1(1), 12-19 pp. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)32187-8](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)32187-8)
6. Armstrong, M. J., Gaunt, P., Aithal, G. P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., Hazlehurst, J. M., Guo, K., Abouda, G., Aldersley, M. A., Stocken, D., Gough, S. C., Tomlinson, J. W., Brown, R. M., Hübscher, S. G., & Newsome, P. N. (2016). Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet*, 387(10019), 679-690. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00803-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00803-x)
7. Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, M., Bosques-Padilla,

- F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J., Cisneros-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., Higuera de la Tijera, M., Kershenobich-Stalnikowitz, D., . . . Velarde-Ruiz Velasco, J. (2019). Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista De Gastroenterología De México*, 84(1), 69–99. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.11.007>  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0375090618301794>)
8. Buqué, X., Aspichueta, P., & Ochoa, B. (2008). Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(9), 565-578. Recuperado en 20 de enero de 2023, de: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-01082008000900007&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082008000900007&lng=es&tlng=es).
  9. Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
  10. Caballería Rovira, L., Torán Montserrat, P., Auladell Llorens, M. A., & Pera Blanco, G. (2008). Esteatosis hepática no alcohólica. Puesta al día. *Atención Primaria*, 40(8), 419–424. <https://doi.org/10.1157/13125408>
  11. Caballería, J., & Caballería, L. (2016). Esteatohepatitis no alcohólica y diabetes. *Endocrinología y Nutrición*, 63(8), 377-379. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.06.001>
  12. Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Pedroza-Tobías A, et al. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. *Ensanut MC 2016. Salud Publica Mex.* 2018; 60:233---43.
  13. Carrasco, L. R., Castillo, P. L., Huerta, B. A., & Thieleman, L. (2003). La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. *MedUNAB*;6(16): 15-20, mayo 2003. tab, graf | LILACS. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-349657>
  14. Carvajal, Carlos. (2014). Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. *Medicina Legal de Costa Rica*, 31(2), 88-94. Recuperado de:

trieved January 30, 2023, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152014000200010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200010&lng=en&tlng=es).

15. Carvajal Carvajal, Carlos. (2015). LDL oxidada y la aterosclerosis. *Medicina Legal de Costa Rica*, 32(1), 161-169. Retrieved October 20, 2023, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152015000100020&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152015000100020&lng=en&tlng=es).
16. Carvallo Pamela, Carvallo Eugenia, Barbosa-da-Silva Sandra, Mandarim-de-Lacerda Carlos Alberto, Hernández Alfonso, & del-Sol, Mariano. (2019). Efectos metabólicos del consumo excesivo de fructosa añadida. *Revista Internacional de Morfología*, 37 (3), 1058-1066. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000301058>
17. Chaves-Chavarría, Alicia, Vargas-Umaña, Marianela, Schosinsky-Neermann, Karl, & Jiménez-Díaz, Manuel. (1997). Evaluación de un método enzimático colorimétrico para la cuantificación de colesterol sérico. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-43. Recuperado de: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-29481997000100003&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29481997000100003&lng=en&tlng=es).
18. Clària J. & Titos E. (2004, 1 abril). La célula de Kupffer. *Gastroenterología y Hepatología*. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-la-celula-kupffer-13059356>
19. Coelho, P. M. (2023). Type 2 diabetes mellitus in obesity promotes prolongation of cardiomyocyte contractile function, impaired CA<sup>2+</sup> handling and protein carbonylation damage. *J Diabetes Complications*;37(8): 108559, 2023 08. | MEDLINE. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-37480704>
20. Cohen, H., González, M., & Ramírez, M. (1997). Etiología y diagnóstico de la esteatosis hepática. *Rev Med Uruguay*, 13, 4-11.
21. Cohen, J. D., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science*, 332(6037), 1519-1523. <https://doi.org/10.1126/science.1204265>

22. Day C, James O. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; 114:842–5 DOI: [10.1016/s0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70599-2)
23. Du, J., Zhao, L., Kang, Q., He, Y., & Bi, Y. (2023). An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution. *Adipocyte*, 12(1), 2179334. <https://doi.org/10.1080/21623945.2023.2179334>
24. Eisinger, K., Liebisch, G., Schmitz, G., Aslanidis, C., Krautbauer, S., & Buechler, C. (2014). Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 2991–3002. <https://doi.org/10.3390/ijms15022991>
25. Eng, JM & Estall, JL (2021). Modelos inducidos por la dieta de la enfermedad del hígado graso no alcohólico: elementos de reflexión sobre el azúcar, la grasa y el colesterol. *Células*, 10 (7), 1805. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071805>
26. Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 25(2), 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>
27. Esquivel Solís Viviana, & Gómez Salas Georgina. (2007). Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarricense*, 49(4), 198-202. Recuperado de: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022007000400005&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022007000400005&lng=en&tlng=es)
28. Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(2), 679–689. <https://doi.org/10.1002/hep.23280>
29. Fang, T., Wang, H., Pan, X., Little, P. J., Xu, S., & Weng, J. (2022). Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies. *International Journal of Biological Sciences*, 18(15), 5681-5697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65044>
30. Fraulob, J. C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M. B., & Mandarim-De-Lacerda, C. A. (2010). A Mouse Model of Metabolic Syndrome:

Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 46(3), 212-223. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.09-83>

31. Ge, F., Lobdell, H., 4th, Zhou, S., Hu, C., & Berk, P. D. (2010). Digital analysis of hepatic sections in mice accurately quantitates triglycerides and selected properties of lipid droplets. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 235(11), 1282–1286. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010095>
32. González, M. J. (2008, 1 febrero). *El laboratorio clínico y las dislipemias | Endocrinología y Nutrición*. <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-el-laboratorio-clinico-dislipemias-S1575092208706429>
33. Gowda, S. G. B., Gao, Z., Chen, Z., Abe, T., Hori, S., Fukiya, S., Ishizuka, S., Yokota, A., Chiba, H., & Hui, S. (2020). Untargeted Lipidomic Analysis of Plasma from High-fat Diet-induced Obese Rats Using UHPLC–Linear Trap Quadrupole–Orbitrap MS. *Analytical Sciences*, 36(7), 821-828. <https://doi.org/10.2116/analsci.19p442>
34. Guía Clínica para la detección, Diagnóstico y tratamiento de la Dislipemia Aterogénica en Atención Primaria. Sociedad Española de Arteriosclerosis. Recuperado de: [https://irp-cdn.multiscreensite.com/789c52f8/files/uploaded/dislipemia\\_v3\\_aaff\\_baja.pdf](https://irp-cdn.multiscreensite.com/789c52f8/files/uploaded/dislipemia_v3_aaff_baja.pdf)
35. Guía de Referencia Rápida Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-719-14. Diagnóstico y Tratamiento DE ENFERMEDAD HEPÁTICA Grasa No Alcohólica del Adulto. Tomado de: <https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/719GRR.pdf> Citado el día: 15/02/2023
36. Gutiérrez-Rodelo, C. (2017b, junio 15). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=72312>

37. Harrison, S. (2002). Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(11), 2714-2724.  
[https://doi.org/10.1016/s0002-9270\(02\)05486-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9270(02)05486-2)
38. Hartvigsen, K., Binder, C. J., Hansen, L. F., Rafia, A., Juliano, J., Hökkö, S., Steinberg, D., Palinski, W., Witztum, J. L., & Li, A. Y. (2007). A Diet-Induced Hypercholesterolemic Murine Model to Study Atherogenesis Without Obesity and Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(4), 878-885.  
<https://doi.org/10.1161/01.atv.0000258790.35810.02>
39. Hebbard, L., & George, J. (2010). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(1), 35-44.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.191>
40. Hidalgo, I. L., Nájera, N., Meaney, E., Pérez-Durán, J., Valdespino-Vazquez, Y., Villarreal, F., & Ceballos, G. (2020). Effects of (-)-epicatechin on the time course of the expression of perilipins in a diet-induced model of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 77, 108296.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108296>
41. Im, Y. R., Hunter, H., De Gracia Hahn, D., Duret, A., Cheah, Q., Jiawen, D., Fairey, M., Hjalmarsson, C., Li, A. S., Lim, H. E., McKeown, L., Mitrofan, C., Rao, R., Utukuri, M., Rowe, I. A., & Mann, J. P. (2021). A Systematic Review of Animal Models of NAFLD Finds High-Fat, High-Fructose Diets Most Closely Resemble Human NAFLD. *Hepatology*, 74(4), 1884-1901.  
<https://doi.org/10.1002/hep.31897>
42. J. Lizardi Cervera, I. Becerra Laparra, N.C. Chávez Tapia, et al. Prevalencia de hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico en población asintomática. *Rev Gastroenterol Mex.*, 71 (2006), pp. 453-459
43. J.P. Arab V. et al. Clasificación histológica de actividad de hígado graso no alcohólico. *Gastroenterol. latinoam* 2014; Vol 25, N° 4: 308-313. Recuperado de: <https://gastrolat.org/DOI/PDF/10.0716/gastrolat2014n400011.pdf>
44. JE Mells, PP Fu , P. Kumar , T. Smith , SJ Karpen , FA Anania. Las grasas saturadas y el colesterol son fundamentales para inducir el síndrome

- metabólico murino con esteatohepatitis no alcohólica robusta. *J. Nutr. Bioquímica*, 26 (2015) , págs. 285 – 292
45. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, et al. Fisiología, Hígado. [Actualizado el 8 de mayo de 2022]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
46. Kanuri, G. & Bergheim, I. (2013). Modelos in vitro e in vivo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 14 (6), 11963–11980. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140611963>
47. Kaplan, L. M. (1998b). Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology*, 115(4), 997-1001. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70272-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70272-0)
48. Keltikangas Järvinen, L. (2007). Metabolic syndrome. En Elsevier eBooks (pp. 717-721). <https://doi.org/10.1016/b978-012373947-6.00230-0>
49. Kim, H. J., Kim, J., Noh, S., Hur, D. H., Sung, M. J., Hwang, J., Park, J. Y., Yang, H. R., Kim, M., Kwon, D. Y., & Yoon, S. R. (2011). Metabolomic Analysis of Livers and Serum from High-Fat Diet Induced Obese Mice. *Journal of Proteome Research*, 10(2), 722-731. <https://doi.org/10.1021/pr100892r>
50. Kim, J. J., & Sears, D. D. (2010). TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2010/212563>
51. Kretowicz, M., Johnson, R. J., Ishimoto, T., Nakagawa, T., & Manitius, J. (2011). The impact of fructose on renal function and blood pressure. *International journal of nephrology*, 2011, 315879. <https://doi.org/10.4061/2011/315879>
52. Lee, J., Lee, H. S., Cho, J., Lee, Y. R., & Kwon, Y. (2021). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Is an Independent Risk Factor for LDL Cholesterol Target Level. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(7), 3442. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073442>

53. Lefkowitz, J. H. (2021b). The Normal Liver. En *Elsevier eBooks* (pp. 20-33).  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-7584-1.00003-6>
54. Liu, X., Zhang, H., & Liang, J. (2013). Blood urea nitrogen is elevated in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato-gastroenterology*, 60(122), 343-345.
55. López Panqueva, Rocío del Pilar. (2014). Enfermedad hepática grasa: Aspectos patológicos. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 29(1), 82-88. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572014000100012&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572014000100012&lng=en&tlng=es).
56. Lozano, J. A. (2005, 1 octubre). Dislipidemias | *Offarm*.  
<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-dislipidemias-13079594>
57. Manterola, C. et al. Anatomía quirúrgica y radiológica del hígado. Fundamentos para las resecciones hepáticas. *Int. J. Morphol.*, 35(4):1525-1539, 2017.
58. Martín V, González R, Mendoza J, et al. . Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Rev Esp Enferm Dig.* Vol. 105, N.º 7, pp. 409-420, 2013  
[https://scielo.isciii.es/pdf/diges/v105n7/es\\_punto\\_vista.pdf](https://scielo.isciii.es/pdf/diges/v105n7/es_punto_vista.pdf)
59. Megías M, Molist P, Pombal MA. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. La célula. Recuperado de : <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-introduccion.php>
60. Megías, M. P. M. (s. f.). *Técnicas Histológicas. 5. Tinción. Generales. Atlas de Histología Vegetal y Animal*. <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>
61. Mirmiran, P., Amirhamidi, Z., Ejtahed, H. S., Bahadoran, Z., & Azizi, F. (2017). Relationship between Diet and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review Article. *Iranian journal of public health*, 46(8), 1007–1017. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5575379/>
62. Moayedfard, Z., Sani, F., Alizadeh, A. et al. (2022) El papel del sistema inmunitario en la patogénesis de NAFLD y los posibles impactos terapéuticos

de las vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales. *Stem Cell Res Ther* 13 , 242 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02929-6>

63. Modelo animal. (s. f.). NIH. Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Modelo-animal>. Citada el: 9 de febrero del 2023.
64. Montalvo Arenas, C. E. (2010, agosto). *Técnica Histológica*. Recuperado de: 16 de febrero de 2023 , de [https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/3\\_tecnica\\_histologica.pdf](https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/3_tecnica_histologica.pdf)
65. Morales Carrasco, A. Et Al. (2020). Nuevos enfoques diagnósticos para la esteatosis hepática no alcohólica. *Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica*, 39, 725–729. <https://biblat.unam.mx/hevila/Archivosvenezolanosdefarmacologiayterapiaca/2020/vol39/no6/10.pdf>
66. Muñoz, A. I. G., Buitrago, P. J. M., Arcila, M. A. R., & Zambrano, D. A. S. (2020). Índices aterogénicos y composición corporal en cadetes de una escuela de formación militar colombiana. *Sanidad militar: revista de sanidad de las Fuerzas Armadas de España*, 76(1), 13-18. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712020000100003>
67. NAFLD & NASH | World Gastroenterology Organisation. (s. f.). World Gastroenterology Organisation (WGO). <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/nafl-d-nash>
68. Nakagawa, T., & Kang, D. H. (2021). Fructose in the kidney: from physiology to pathology. *Kidney research and clinical practice*, 40(4), 527-541. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.21.138>
69. Neuschwander-Tetri, B. A., Loomba, R., Sanyal, A. J., Lavine, J. E., Van Natta, M. L., Abdelmalek, M. F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A. M., Hameed, B., Kowdley, K. V., McCullough, A., Terrault, N., Clark, J. M., Tonascia, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., & Doo, E. (2015). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial.

- The Lancet*, 385(9972), 956-965. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61933-4)
70. Nishina, P. M., Wang, J., Toyofuku, W., Kuypers, F. A., Ishida, B. Y., & Paigen, B. (1993). Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice. *Lipids*, 28(7), 599-605. <https://doi.org/10.1007/bf02536053>
71. Odena, G., & Bataller, R. (2012). Fibrogénesis hepática: fisiopatología. *Gastroenterología y Hepatología*, 35, 3-9. [https://doi.org/10.1016/s0210-5705\(12\)70043-2](https://doi.org/10.1016/s0210-5705(12)70043-2)
72. Oršolić, N., Landeka Jurčević, I., Đikić, D., Rogić, D., Odeh, D., Balta, V., Perak Junaković, E., Terzić, S., & Jutrić, D. (2019). Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(6), 156. <https://doi.org/10.3390/antiox8060156>
73. Páramo, D. et al. (2010). Fibrogénesis hepática. *Rev Col Gastroenterol*. Vol. 25 (2): 187-197 pp. (10d. C., mayo 26). Scielo. Recuperado de: 29 de enero de 2023, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v25n2/v25n2a11.pdf>
74. Peng, C., Stewart, A. G., Woodman, O. L., Ritchie, R. H., & Qin, C. X. (2020). Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Review of Its Mechanism, Models and Medical Treatments. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.603926>
75. Petta, S., Gastaldelli, A., Rebelos, E., Bugianesi, E., Messa, P., Miele, L., Svegliati-Baroni, G., Valenti, L., & Bonino, F. (2016). Pathophysiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2082. <https://doi.org/10.3390/ijms17122082>
76. Pierantonelli, I., & Svegliati-Baroni, G. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation*, 103(1), e1-e13. <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000002480>
77. Piñeiro Lamas, Regino, & Fernández-Brito Rodríguez, José Emilio. (2013). Hígado graso no alcohólico como señal de aterosclerosis. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(1), 1-7. Recuperado en 03 de marzo de

2023, de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002013000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002013000100001&lng=es&tlng=es).

78. Prasomthong, J., Limpeanchob, N., Daodee, S. et al. El extracto de Hibiscus sabdariffa mejora la esteatosis hepática, parcialmente a través de las vías de señalización IRS-1 / Akt y Nrf2 en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. *Sci Rep* 12, 7022 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11027-9>
79. R. Bernal-Reyes, M.E. Icaza-Chávez, L.A. Chi-Cervera et al., Prevalencia y características clínico-epidemiológicas de una población mexicana con enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica: un estudio en población abierta, *Revista de Gastroenterología de México*, <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2021.09.002>
80. R.S. McCuskey. *Anatomy of the Liver*. T.D. Boyer, M.P. Manns, A.J. Sanyal (Eds.), *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease*, Elsevier, Philadelphia, PA (2012), pp. 3-19
81. Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gérard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., & Chou, C. J. (2010). Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *The FASEB Journal*, 24(12), 4948-4959. <https://doi.org/10.1096/fj.10.164921>
82. Ramírez Alvarado, M.<sup>a</sup> M., & Sánchez Roitz, C. (2012). El factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1751-1757. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6004>
83. Real, J. T., & Ascaso, J. F. (2021). Metabolismo lipídico y clasificación de las hiperlipemias. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 33, 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2020.12.008>
84. Ríos -López, Diana G., Aranda-López, Yuli, Sosa-Garrocho, Marcela, & Macías-Silva, Marina. (2020). La plasticidad del hepatocito y su relevancia en la fisiología y la patología hepática. *TIP. Revista especializada en ciencias*

químico-biológicas, 23, e20200225. Epub 20 de junio de 2020.<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.225>

85. Rodríguez Yunta, Eduardo. (2007). ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES HUMANAS. *Acta bioethica*, 13(1), 25-40. <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100004>
86. Rodríguez-Calvo, R., Samino, S., Guaita-Esteruelas, S., Martínez-Micaelo, N., Heras, M., Girona, J., Yanes, O., Correig, X., & Masana, L. (2020). Plasma glucose, triglycerides, VLDL, leptin and resistin levels as potential biomarkers for myocardial fat in mice. *Clínica E Investigación En Arteriosclerosis (english Edition)*, 32(1), 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.artere.2019.05.003>
87. Rossmeisl, M., Rim, J. S., Koza, R. A., & Kozak, L. P. (2003). Variation in Type 2 Diabetes-Related Traits in Mouse Strains Susceptible to Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 52(8), 1958-1966. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.8.1958>
88. Sa'adah, N., Purwani, K. I., Nurhayati, A. P. D., & Ashuri, N. M. (2017). Analysis of lipid profile and atherogenic index in hyperlipidemic rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) that given the methanolic extract of Parijoto (*Medinilla speciosa*). En *Nucleation and Atmospheric Aerosols*. American Institute of Physics. <https://doi.org/10.1063/1.4985422>
89. Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., & Robuck, P. R. (2010). Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *New England Journal of Medicine*, 362(18), 1675-1685. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0907929>
90. Saponaro, C., Gaggini, M. & Gastaldelli, A. Enfermedad del hígado graso no alcohólico y diabetes tipo 2: mecanismos fisiopatológicos comunes. *Curr Diab Rep* 15 , 34 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0607-4>
91. Sarem, M., et al. (2006, 1 febrero). Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterología y*

- Hepatología. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-las-celulas-estrelladas-del-higado-13083906>
92. Schreyer, S. A., Wilson, D., & LeBoeuf, R. C. (1998). C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 136(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(97\)00165-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(97)00165-2)
93. Sellers, R. S., Clifford, C. B., Treuting, P. M., & Brayton, C. (2012). Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Veterinary pathology*, 49(1), 32-43.
94. Shockley, K. R., Witmer, D., Burgess-Herbert, S. L., Paigen, B., & Churchill, G. A. (2009). Effects of atherogenic diet on hepatic gene expression across mouse strains. *Physiological genomics*, 39(3), 172–182. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90350.2008>
95. Sibulesky, L. (2013), Anatomía normal del hígado. Anatomía normal del hígado, 2: S61Š-S63Š. <https://doi.org/10.1002/cld.275>
96. Silva, C. A. B., Perris, P., Fernandez, I., Godoy, M. L. D., Mambrin, C., Slobodianik, N. H., & Feliu, M. S. (2014). Effects of High-Fat Diets from Different Sources on Serum and Thymus Lipid Profile: Study in an Experimental Model. *Endocrine, metabolic & immune disorders*, 14(2), 77-83. <https://doi.org/10.2174/1871530314666140519160607>
97. Song, H. K., & Hwang, D. Y. (2017). Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory animal research*, 33(2), 119–123. <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.119>
98. Tipoe, G. L., Ho, C., Liong, E. C., Leung, T. M., Lau, T., Fung, M., & Nanji, A. A. (2009). Voluntary oral feeding of rats not requiring a very high fat diet is a clinically relevant animal model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *PubMed*, 24(9), 1161-1169. <https://doi.org/10.14670/hh-24.1161>
99. Tomasi H. (2013). Métodos Histológicos: aspectos teórico–prácticos. Universidad Nacional de Córdoba. Primera parte: 56-61 pp. Recuperado de: <https://fcm.unc.edu.ar/wp-content/uploads/2018/07/METODOS->

HISTOLOGICOS-Aspectos-Teóricos-Prácticos-TI.-Hugo-Tomasi-2013-Desde-Pág.1-al-96-PRIMER-PARTE.pdf

100. Tsuchida, T., Lee, Y., Fujiwara, N., Ybanez, M. D., Allen, B., Martins, S., Fiel, M. I., Goossens, N., Chou, H. H., Hoshida, Y., & Friedman, S. L. (2018). A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *Journal of Hepatology*, 69(2), 385-395. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.011>
101. Urano, F., Wang, XZ , Bertolotti, A. et al. (2000). Acoplamiento del estrés en el RE con la activación de las proteínas quinasas JNK por la proteína quinasa transmembrana IRE1. *Ciencia*, 287 (5453), 664-666. Recuperado de: <https://oce.ovid.com/article/00007529-200001280-00024>
102. Vázquez, M., & Laguna, J. (2000). Receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR), metabolismo energético y aterosclerosis. *Endocrinología y Nutrición*, 47(10), 301-310. <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-receptores-activados-por-proliferadores-peroxisomicos-13075>
103. Verdín Terán, S. L. et al. (2013, 6 junio). Manual de Métodos. Histología e Inmunohistoquímica. Recuperado de:16 de febrero de 2023. , de <https://antares.iztacala.unam.mx/papime/wp-content/uploads/2014/10/Histologia1.pdf>
104. Yanez, F. M. y Candela, E. (2003). PESO DE LOS ÓRGANOS EN RELACIÓN AL PESO CORPORAL EN RATONES C57BI/6 y NMRI/UCLA. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIII, Nº 5, 389-402, 2003.*
105. Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease- Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

