



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de las propiedades mecánicas en el
desarrollo de hígado graso no alcohólico
inducido por dieta alta en grasa.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

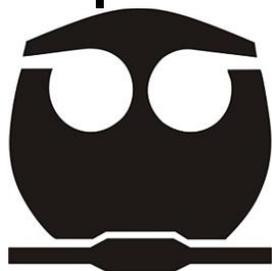
QUÍMICA

P R E S E N T A

LESLIE ALINE JOSE ESPINOSA

Ciudad de México

2024





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado

PRESIDENTE	Profesor: Plasencia de la Parra Francisco Javier
VOCAL	Profesor: Escalona Mugica José Rene
SECRETARIO	Profesor: Tobón Cornejo Sandra
1er. SUPLENTE	Profesor Guerrero Ríos Itzel
2do. SUPLENTE	Profesor Rodríguez Sotres Rogelio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Embriología y Genética

Facultad de Medicina, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Doctor José Rene Escalona Mugica

SUSTENTANTE:

Leslie Aline Jose Espinosa

Agradecimientos

A la UNAM por permitirme formarme como profesionista.

A la Facultad de Química, por todo lo que viví y aprendí en sus aulas. Así como, a mis maestros por todo el conocimiento que me compartieron.

A mi asesor y al departamento de Embriología y Genética por su apoyo en la realización de este proyecto.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNsBioDyT) y a todos los que trabajan ahí, por todo lo que me enseñaron y compartieron conmigo.

A mis amigos, por hacerme vivir una experiencia inolvidable en cada etapa de mi vida.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la U.N.A.M IA205321.

Agradecemos a la Unidad Académica de Bioterio de la Facultad de Medicina. A los Dres. Rafael Hernández e Ismael Torres, por su apoyo técnico con el manejo y cuidado de los animales de laboratorio.

A la Facultad de Medicina y Ciencias por permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de este proyecto.

Dedicatoria

A mis padres, por su amor y comprensión. Por darme la vida y la oportunidad de estudiar. A mi madre por su dedicación, cuidados y palabras de aliento, para seguir adelante. A mi padre por su apoyo para alcanzar mi meta y enseñarme el valor del trabajo.

A mis hermanos, por todo lo que vivimos de niños, las travesuras y juegos juntos.

A mi prometido, gracias por tu apoyo y alegrar mis días. Por confiar en mí y hacerme saber que yo también soy importante.

Índice	
Resumen	1
Introducción	3
1.0 El Hígado	3
1.0.1 Histología del hígado	4
1.0.2 Comparación entre el hígado humano y el de rata.....	7
1.2 Hígado graso no alcohólico	9
1.2.1 Histología del NAFLD	14
1.2.2 Factores de riesgo para desarrollar NAFLD	15
1.3 Propiedades mecánicas del hígado	21
1.3.1 Mecanotransducción.....	22
1.4 Factores o reguladores de transcripción involucrados en los cambios mecánicos y el NAFLD	25
1.5 Modelos animales en el estudio de enfermedades metabólicas .	29
Planteamiento del problema	30
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Metodología	31
1. Animales	31
2. Diseño experimental	33
3. Peso corporal y consumo calórico.	33
4. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y de tolerancia a la insulina (ITT).	33
5. Determinación de medidas somatométricas	34
6. Obtención de muestras para análisis histológico	35
6.1 Técnica histológica	36
6.2 Cortes por congelación.....	36
7. Western Blot	37
8. Determinación de la actividad de ALT en plasma	39
9. Extracción de lípidos	40

10. Análisis estadístico	40
Resultados	41
1. Modelo de HFD	41
2. Glucosa en ayuno	42
3. Pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y de sensibilidad a la insulina (ITT)	43
4. Análisis somatométrico.	45
5. Cuantificación de los panículos de tejido adiposo	45
6. Histología del hígado	46
7. Cuantificación de la actividad de la enzima ALT en plasma	48
8. Western Blots	49
9. Contenido de lípidos totales	52
Resumen de resultados	53
Discusión de resultados	54
Conclusiones	57
Perspectivas	57
Referencias bibliográficas	58
Bibliografía	65
Anexos	66
1. Preparación de la dieta alta en grasa (HFD)	66
2. Técnica histológica	67
2.1 Cuantificación de gotas lipídicas	71
3. Lisis y fraccionamiento de tejido hepático	72
3.1 <i>Cuantificación de proteínas por el método Bradford</i>	75
3.2 <i>Precipitación de proteínas</i>	75
3.3 <i>Elaboración de gel de acrilamida-SDS para electroforesis (SDS-PAGE)</i>	76
3.4 <i>Electroforesis</i>	77
3.5 <i>Transferencia a membrana</i>	77
3.6 <i>Inmunomarcaje</i>	80

3.7 Cuantificación y normalización de bandas WB.....	80
4. Comité Institucional para el cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).....	82

Resumen

Las propiedades mecánicas del hígado son un tema sumamente estudiado, debido a que el hígado es un órgano involucrado en múltiples procesos metabólicos, como la desintoxicación de fármacos, la homeostasis energética, síntesis de lípidos, entre otros. Al generarse un cambio en el microambiente celular a causa de una enfermedad; por ejemplo, el hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés), los hepatocitos entran en un estado de estrés debido a la acumulación excesiva de grasa intracelular. Estos cambios modifican el comportamiento mecánico de la matriz extracelular (MEC) y de las células que componen el hígado, entre las que destacan los hepatocitos. Por otro lado, diversos factores transcripcionales regulan la activación de genes diana promotores de la reparación celular, para la conservación de la homeostasis celular. Sin embargo, cuando su activación es continua, la morfología celular se altera. Por ejemplo, la actividad anormal de los factores transcripcionales proteína asociada a si 1 (**YAP**, por sus siglas en inglés) y la proteína 1 reguladora de la transcripción que contiene el dominio WW (WWTR1, por sus siglas en inglés mejor conocida como **TAZ**) que promueven hepatomegalia y esteatosis hepática. Otros factores involucrados en los cambios mecánicos del hígado por la NAFLD son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés) y los factores de transcripción relacionados con la miocardina (MRFT, por sus siglas en inglés). Los PPAR controlan la expresión de redes de genes implicados en la adipogénesis, el metabolismo de lípidos, la inflamación, el mantenimiento de homeostasis metabólica y el cáncer. Los MRTF son proteínas mecanosensibles que se expresan en una amplia gama de tipos celulares. Son co-activadores del Factor de Respuesta al Suero (SRF, por sus siglas en inglés) el cual genera una respuesta al estrés mecánico.

En este trabajo se indujo NAFLD a ratas Wistar mediante una dieta alta en grasa y se analizaron los cambios provocados en el hígado. Se obtuvo el perfil metabólico de los animales; por otro lado, se realizó el análisis histológico del hígado. Adicionalmente, se analizaron algunas proteínas asociadas a daño hepático, como la alanina aminotrasferasa (ALT). Finalmente, mediante Western Blot se cuantificaron cambios en factores transcripcionales implicados en el cambio mecánico celular.

Los datos recabados durante las 23 semanas de experimentación mostraron diferencias entre los dos grupos experimentales. Al analizar el peso, el índice de masa corporal (IMC), las medidas somatométricas y el consumo calórico; se

concluyó que las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (HFD, por sus siglas en inglés) presentaban un grado de obesidad mayor en comparación con el grupo control. Las curvas de tolerancia a insulina y glucosa presentaron alteraciones en el grupo experimental. Así mismo, el porcentaje de grasas (retroperitoneal, peripancreática, supragonadal y subcutánea) fue mayor en este grupo.

Por otro lado, mediante tinción tricrómica de Masson, se observó que las ratas HFD presentaron un mayor grado esteatosis. Estos resultados fueron corroborados mediante la tinción de rojo oleoso. Sin embargo, en la cuantificación plasmática de ALT, los valores obtenidos fueron similares entre los grupos. Estos datos sugieren que las ratas del grupo HDF desarrollaron un grado de esteatosis hepática.

Abstract

The mechanical properties of the liver are a highly studied topic, because the liver is an organ involved in multiple metabolic processes, such as drug detoxification, energy homeostasis, lipid synthesis, among others. When a change is generated in the cellular microenvironment due to a disease; For example, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), hepatocytes enter a state of stress due to excessive accumulation of intracellular fat. These changes modify the mechanical behavior of the extracellular matrix (ECM) and the cells that make up the liver, among which hepatocytes stand out. On the other hand, various transcriptional factors regulate the activation of target genes that promote cellular repair, for the conservation of cellular homeostasis. However, when its activation is continuous, cell morphology is altered. For example, abnormal activity of the transcription factors yes-associated protein 1 (YAP) and WW domain-containing transcription regulatory protein 1 (WWTR1, better known as TAZ) that promote hepatomegaly and hepatic steatosis. Other factors involved in the mechanical changes of the liver by NAFLD are peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and myocardin-related transcription factors (MRTFs). PPARs control the expression of gene networks involved in adipogenesis, lipid metabolism, inflammation, maintenance of metabolic homeostasis, and cancer. MRTFs are mechanosensitive proteins that are expressed in a wide range of cell types. They are co-activators of the Serum Response Factor (SRF) which generates a response to mechanical stress.

In this work, NAFLD was induced in Wistar rats using a high-fat diet and the changes caused in the liver were analyzed. The metabolic profile of the animals was obtained;

On the other hand, histological analysis of the liver was performed. Additionally, some proteins associated with liver damage were analyzed, such as alanine aminotransferase (ALT). Finally, changes in transcriptional factors involved in cellular mechanical change were quantified using Western Blots.

The data collected during the 23 weeks of experimentation showed differences between the two experimental groups. When analyzing weight, body mass index (BMI), somatometric measurements and caloric intake; It was concluded that rats fed a high-fat diet (HFD) had a higher degree of obesity compared to the control group. The insulin and glucose tolerance curves presented alterations in the experimental group. Likewise, the percentage of fat (retroperitoneal, peripancreatic, supragenital and subcutaneous) was higher in this group.

On the other hand, using Masson's trichrome staining, it was observed that HFD rats presented a greater degree of steatosis. These results were corroborated by oil red staining. However, in plasma ALT quantification, the values obtained were similar between the groups. These data suggest that rats in the HFD group developed a degree of hepatic steatosis.

Introducción

1.0 El Hígado

El hígado es un órgano involucrado en diversos procesos metabólicos del cuerpo, como la homeostasis de glucosa y lípidos, también participa en la desintoxicación de fármacos y xenobióticos, entre otros. Es considerado como una de las glándulas más grandes del cuerpo humano, llegando a pesar entre 1200 y 1500 gramos. (Boron & Boulpaep, 2002) Asimismo, actúa como una “fábrica”, sintetizando albúmina, sales biliares, entre otros; además, funciona como un sistema excretor. Tiene una coloración parda rojiza, es de consistencia firme, aunque frágil; además, su riqueza en vasos sanguíneos los cuales almacenan una gran cantidad de sangre le da la propiedad de ser elástico (García-Porrero & Hurlé González, 2005). En el humano, el hígado está dividido en dos lóbulos principales unidos por el ligamento falciforme, un lóbulo derecho (grande) y uno izquierdo (pequeño). Cada segmento está irrigado por un sistema vascular independiente. (Tortora & Derrickson, 2005) La vesícula biliar, donde se almacena la bilis, se encuentra en un pequeño hueco en la parte inferior del hígado. (Tresguerres, 2005)

En el hígado, las vías metabólicas de glucosa, lípidos y obtención energía están integradas y reguladas de forma dependiente a nutrientes y hormonas para mantener la homeostasis metabólica. La insulina y el glucagón son dos reguladores metabólicos clave para la regulación del metabolismo hepático durante el ciclo alimentación - ayuno. La alteración de la homeostasis metabólica hepática contribuye a la generación de enfermedades hepáticas crónicas como el hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis, resistencia a la insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y obesidad. (Chiang, 2014)

Se identifican dos estructuras de manera general que componen el hígado, el parénquima y el estroma. El estroma consiste en un componente de tejido conjuntivo denso, que le da sostén al órgano. Los elementos vasculares (arteria hepática y vena porta) y los conductos biliares se localizan dentro del parénquima hepático. El parénquima está compuesto principalmente de tres tipos de células, epiteliales (hepatocitos), macrófagos (células de Kupffer) y células estrelladas (células de Ito). (Rojas Lemus, y otros, 2017) Se sitúa dentro del sistema circulatorio donde recibe sangre de la vena porta, colectora del drenado intestinal y hormonal pancreático (insulina y glucagón); así como de la vena cava inferior. (García-Porrero & Hurlé Gonzalez, 2005) (Tortora & Derrickson, 2005) Los hepatocitos representan casi el 80% del volumen total del hígado y dentro de ellos se realizan las diversas vías metabólicas, son células epiteliales poliédricas secretoras que se organizan en conjuntos tridimensionales complejos llamados placas o cordones hepáticos y pueden ser uni o binucleadas. (Tortora & Derrickson, 2005) Las células de Kupffer son los macrófagos del hígado actúan como filtro y son encargados de eliminar elementos de la sangre que están viejos o dañados, así como de fagocitar las bacterias provenientes del intestino. Las células de Ito se encargan de almacenar vitamina A y juegan un papel en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) después de una lesión celular. (Rojas Lemus, y otros, 2017)

1.0.1 Histología del hígado

Los principales componentes histológicos del hígado son los hepatocitos, los conductos biliares y sinusoides hepáticos. Los conductos biliares recogen la bilis producida por los hepatocitos, la cual después es llevada y almacenada en la vesícula biliar. Las sales biliares son moléculas anfipáticas que actúan como detergentes ayudando en la absorción de los lípidos procedentes de la ingesta alimenticia. Los sinusoides hepáticos son capilares sanguíneos muy permeables irrigados por la arteria hepática o la vena porta hepática. Los sinusoides hepáticos convergen y conducen la sangre hacia la vena central. En conjunto, un conducto

biliar, una rama de la arteria hepática y una rama de la vena hepática forma la tríada portal (**Figura 1**). (Tortora & Derrickson, 2005) Existen varias formas de analizar la organización de los componentes del hígado, como unidades anatómicas funcionales. El lóbulo hepático, el lóbulo portal y los ácinos hepáticos como se muestran en **Figura 2**.

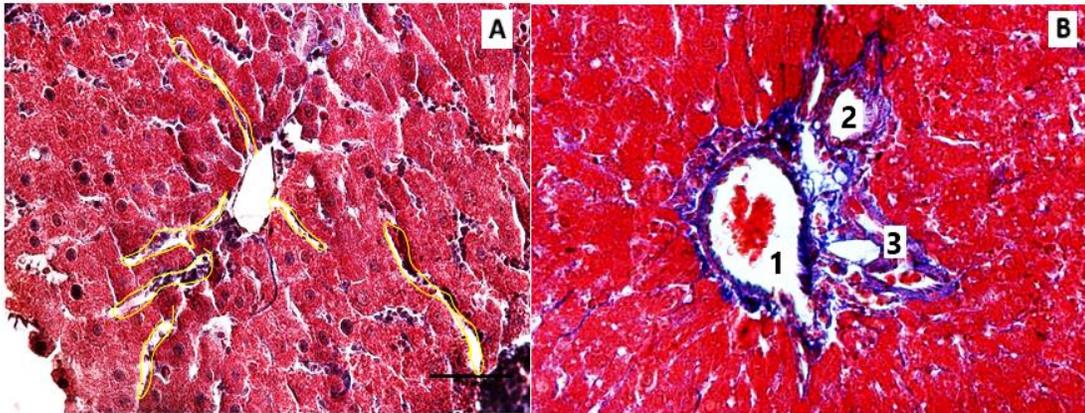
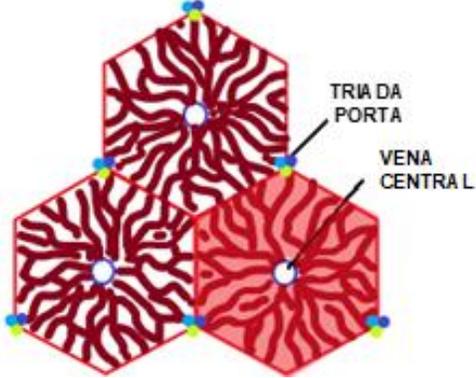
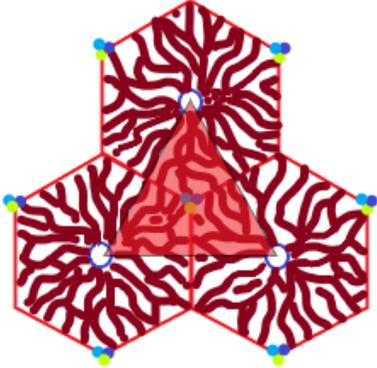
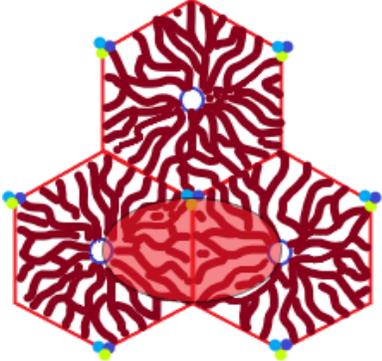


Figura 1. Morfología del hepatocito y triada portal. **A)** Hepatocitos y su organización alrededor de la vena central, en amarillo se encuentran resaltados los sinusoides hepáticos. **B)** Triada portal: 1.- vena porta 2.- conducto biliar 3.- arteria hepática. Ambas imágenes teñidas con tricómico de Masson, 40X

Figura 2. Descripción general de las unidades anatómicas del hígado.

Unidad anatómica funcional	Descripción	
Lóbulo hepático	<p>Se describe como un hexágono, en su centro la vena central y de forma radial cordones de hepatocitos. En tres de los ángulos del hexágono se encontrará una triada portal.</p>	
Lóbulo portal	<p>El conducto biliar de la triada hepática se considera el centro del lóbulo, se forma un triángulo imaginario donde cada vértice es una vena central.</p>	
Ácinos hepáticos	<p>El ácino hepático incluye porciones de 2 lóbulos hepáticos, formando una elipse que pasa por una triada portal y dos venas centrales.</p>	

1.0.2 Comparación entre el hígado humano y el de rata.

Se podría considerar una diferencia del hígado entre ratas y humanos el tamaño, pero en ambos casos el porcentaje que ocupa el órgano en el cuerpo es similar. Microestructuralmente, ambos órganos están irrigados por la vena porta y la arteria hepática, además de presentar conductos biliares. Como en la mayoría de los mamíferos, el hígado se divide en lóbulos. El hígado de la rata está dividido en 6 lóbulos individuales; mientras que en el hígado humano existen dos lóbulos unidos por el ligamento falciforme. Esta diferencia hace que sea mucho más fácil extirpar un segmento de hígado en los roedores. Otra gran diferencia es la presencia de la vesícula biliar en el hígado humano, la cual está ausente en la rata. Se han encontrado tendencias en mamíferos que presentan vesícula biliar, los cuales son carnívoros y presentan una dieta alta en grasas. (Kruepunga, Hakvoort, Hikspoors, Kohler, & Lamers, 2019) En la **Figura 3** se muestran los diferentes lóbulos que componen el hígado de rata (A y B) y los dos lóbulos del hígado humano unidos por el ligamento falciforme (C).

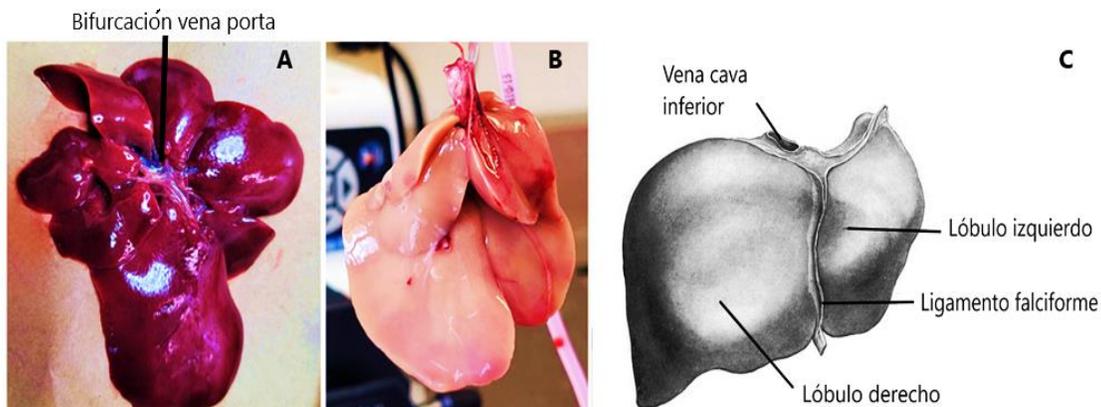


Figura 3. Anatomía del Hígado. **A)** Hígado de rata, se observa la bifurcación de la vena porta a todos los lóbulos que lo componen. **B)** Hígado de rata perfundido, libre de sangre. **C)** Esquema de hígado (cara diafragmática). Información obtenida de Rouvière, 2005

Funciones metabólicas

Entre las principales funciones del hígado se encuentran: participa activamente en el metabolismo hormonal, en los procesos de desintoxicación, aclaramiento de productos endógenos y exógenos nocivos, en la síntesis de colesterol y ácidos biliares, en la síntesis de factores involucrados en la coagulación, en mecanismos inmunitarios, entre otros. (Tresguerres, 2005)

Después de la digestión, el hígado clasifica las moléculas obtenidas para su metabolismo, almacenamiento o distribución hacia los tejidos. Asimismo, el hígado mantiene las concentraciones de glucosa en sangre dentro de un rango estrecho, es un proceso dinámico que implica la producción y utilización de glucosa. [1] Cuando los requerimientos energéticos son cubiertos y la glucosa se almacena en la forma de glucógeno. La síntesis de glucógeno está regulada por la secreción de insulina. (Rojas Lemus, y otros, 2017) El glucógeno almacenado representa de un 2 al 10 por ciento del peso total del hígado de varias especies de mamíferos; después de un periodo de ayuno de 24 horas la reserva se agota totalmente. (García-Porrero & Hurlé Gonzalez, 2005) (Cantrell & Mohiuddin, Biochemistry, Ketone Metabolism, 2023) Cuando se ha alcanzado el límite de almacenamiento de glucógeno, el hepatocito tiene la capacidad de sintetizar en ácidos grasos a partir de precursores como aminoácidos y carbohidratos. Una vez sintetizados, los ácidos grasos son transportados por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), también producidas en el hígado, hacia el tejido adiposo blanco para ser almacenado como fuente de energía. Adicionalmente, el hígado también es capaz de almacenar algunas vitaminas (A, B₁₂, D, E y K) y algunos minerales como el hierro y el cobre, que se liberan de acuerdo a las necesidades del organismo. (Tortora & Derrickson, 2005)

Durante la fase de ayuno, el hígado es capaz de convertir ciertos aminoácidos y ácido láctico en glucosa, así como transformar la fructosa y galactosa en glucosa, mediante la gluconeogénesis. De esta manera la glucosa sintetizada es secretada al torrente sanguíneo para distribuirla a otros tejidos, que necesitan de este sustrato para la producción de ATP. Uno de los precursores para la formación de glucosa es la alanina, proveniente del músculo esquelético. La glucosa, sintetizada a través del ciclo de la alanina, sólo consigue reemplazar la glucosa que se ha convertido en lactato, sin beneficio neto de glucosa. (Tortora & Derrickson, 2005) (Tresguerres, 2005) Otra fuente para la obtención de energía son los cuerpos cetónicos. El hígado convierte los ácidos grasos en cuerpos cetónicos durante ayunos prolongados. Los cuerpos cetónicos se generan a partir del acetil-CoA proveniente de la β -oxidación

de ácidos grasos, su metabolización produce NADH y FADH₂ para la cadena de transporte de electrones. (Cantrell & Mohiuddin, National Library of Medicine, 2023)

Finalmente, en el hígado se metaboliza el amoniaco proveniente de la desaminación de los aminoácidos en urea. Los hepatocitos también sintetizan la mayoría de las proteínas plasmáticas, como el alfa y la beta globulinas, la albúmina, la protrombina, la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG, por sus siglas en inglés) y el fibrinógeno. (Garcia-Porrero & Hurlé Gonzalez, 2005) (Tortora & Derrickson, 2005)

1.2 Hígado graso no alcohólico

La enfermedad denominada hígado graso no alcohólico (NAFLD, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) o esteatosis hepática, es un trastorno metabólico que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa infiltrada en forma de triacilgliceroles en más del 5% de los hepatocitos en el hígado. Para ser considerado NAFLD, debe manifestarse en ausencia de la ingesta significativa de alcohol, medicamentos hepatotóxicos ni otras causas conocidas de esteatosis hepática demostrado por biopsia hepática. (Mexico: instituto mexicano del seguro social, 2023)

La evidencia de esteatosis sugiere que se ha excedido la capacidad de almacenamiento de grasa del tejido adiposo. La acumulación de tejido adiposo visceral y ectópico en la obesidad, promueve la liberación de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) al torrente sanguíneo. (Cuevas & Alonso, 2016) Además, el aumento en los niveles plasmáticos de FFA interfiere con la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo mediado por insulina; lo cual incrementa la tasa de liberación de FFA al torrente sanguíneo. Los FFA liberados son absorbidos por el hígado y se esterifican en triacilgliceroles. Sin embargo, un exceso de FFA supera la capacidad del hígado para esterificar FFA induciendo el fenómeno de lipotoxicidad. (Engin , 2017) La lipotoxicidad promueve la muerte de hepatocitos y es un factor que contribuye a la fisiopatología de los trastornos metabólicos en la obesidad y la DM2. La acumulación de grasa en el hepatocito genera un estado de estrés, con formación de radicales libres de oxígeno y la liberación de citocinas inflamatorias que determinan la progresión de la enfermedad. (LaBrecque, y otros, 2014)

Es una causa frecuente de la elevación de aminotransferasas en sangre y de daño hepático crónico. Esta enfermedad comienza con inflamación, fibrosis y progresa con cirrosis y sus complicaciones; así como el posible desarrollo de hepatocarcinoma. Cuando el daño al hígado es severo, la fibrosis causada por la

cicatrización del rompimiento de hepatocitos ralentiza el metabolismo hepático, llegando a bloquear completamente su funcionamiento. (Bataller & Brenner, 2005) Diversos estudios sugieren que la etnicidad juega un papel importante en el desarrollo del NAFLD. Esto debido a los hábitos alimenticios y estilos de vida de cada país, como lo es un estilo de vida “occidental”. Es decir, la abundancia de calorías junto con un estilo de vida sedentario. También hay que tener en cuenta la predisposición genética al desarrollo de NAFLD, ya que se ha visto que hay poblaciones que tienen predisposición genética a desarrollar comorbilidades relacionadas con el NAFLD. (Juanola, Martínez Lopez, Francés, & Gómez Hurtado, 2021) Parte de esta variabilidad se explica por factores de riesgo genéticos conocidos. Hay al menos cuatro variantes genéticas comunes en cuatro genes diferentes fuertemente asociados con el desarrollo y la progresión de NAFLD (**Tabla 1**). Todos estos genes codifican proteínas implicadas en la regulación del metabolismo lipídico hepático, en particular la variación en el gen 14 de la proteína 3 que contiene el dominio de fosfolipasa similar a la patatina (PNPLA3 I148M); el cual es el principal determinante genético asociado al NAFLD. (Eslam, Valenti, & Romeo, 2018)

Tabla 1. Genes asociados con el desarrollo y progresión del NAFLD.

Variante	Gen	Función	Efectos	Impacto	MAF (frecuencia de alelos menores)	Fenotipo
rs738409 C>G	<i>PNPLA3</i>	Remodelación de gotas de lípidos.	p.I148M	Pérdida de función	0.267	↑ NAFLD, NASH, fibrosis, HCC
rs58542926 C>T	<i>TM6SF2</i>	Secreción de VLDL	p.E167K	Pérdida de función	0.067	↑ NAFLD, NASH, fibrosis
rs12137855 C>T	<i>LYPLAL1</i>	Catabolismo de TAG	?	?	0.164	↑ NAFLD
rs780094 A>G rs1260326 C>T	<i>GCKR</i>	Regulación de la lipogénesis de <i>novo</i>	Intrónico	?	0.302	↑ NAFLD, NASH, fibrosis

• VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; TAG: triacilgliceroles; HCC: hepatocarcinoma.
 Tabla 1 Información obtenida de Eslam, Valenti, & Romeo, 2018.

De igual manera, esta enfermedad es más frecuente en los hombres, debido a que tienden a tener una mayor acumulación de grasa visceral; en comparación con las mujeres que tienen una mayor acumulación de grasa subcutánea. (White & Tchoukalova, 2014) La acumulación de grasa visceral es un factor de riesgo y se correlaciona con una mayor susceptibilidad a las complicaciones metabólicas; ya que este tipo de grasa se comporta como un órgano endocrino. (Erickson , 2009) (Marcano, y otros, 2006) El tejido adiposo secreta una serie de sustancias bioactivas, como las adipocinas, entre otras. La producción desequilibrada de adipocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el tejido adiposo obeso puede contribuir al desarrollo del SM. Algunos de los factores secretados por el tejido adiposo blanco son: la adiponectina, la leptina, la angiotensina, la proteína estimulante de la acilación (ASP), los esteroides sexuales, los glucocorticoides, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6), los ácidos grasos libres (FFA), entre otros. (Coelho, Oliveira, & Fernandes, 2013)

Los métodos diagnósticos más utilizados en estudios clínicos son: la ecografía abdominal, la espectroscopia por resonancia magnética, la medición de aminotransferasas en plasma (ALT y AST) y la biopsia hepática (esteatosis por imágenes o lesiones típicas por histología). La biopsia hepática es la única forma inequívoca que permite identificar de manera fiable la presencia de inflamación, además del grado de fibrosis. (Castro S. & Silva P., 2015)

Las pruebas de función hepática son análisis de sangre que permiten la detección de diferentes enzimas, proteínas y sustancias liberadas por las células hepáticas (**Tabla 2**) se utilizan para evaluar y monitorizar enfermedades que causan daño hepático. (Tortora & Derrickson, 2005)

Tabla 2. Marcadores plasmáticos empleados como parámetros de función hepática.

Marcador	Función normal	Concentraciones normales	Las concentraciones aumentan en	Las concentraciones disminuyen en
Albúmina	Proteína producida en el hígado.	4-6 g/dL	Deshidratación, shock, infecciones crónicas.	Hepatopatías, escasa ingesta de proteínas, diarrea.
Alaninamino transferasa (ALT)	Enzimas producidas en el hígado.	0-35 U/L	Hepatopatías o lesiones hepáticas.	Embarazo, DM2 no controlada con acidosis.
Aspartato aminotransferasa (AST)		0-35 U/L	Infarto de miocardio, hepatopatía, traumatismo de los músculos.	Hipertensión
Gammaglutamil transpeptidasa (GGT)		0-30 U/L	Obstrucción de conductos biliares, cirrosis, alcoholismo y cáncer de hígado.	-----
Bilirrubina	Producto de desecho del grupo hemo, es producido en el hígado	Conjugada <0.5mg/dL No conjugada 0.2-1 mg/dL	Conjugada: disfunción hepática o litiasis vesicular No conjugada: hemólisis excesiva de glóbulos rojos.	-----
Lactato-deshidrogenasa (LDH)	Enzima presente en la mayoría de las células del cuerpo. Se libera a la sangre cuando las células han sido dañadas por una enfermedad o lesión.	71-207 U/L	Infarto al miocardio, hepatopatía,	-----

Apendice C, Valores normales de pruebas específicas en sangre. Información obtenida de Tortora & Derrickson, 2005

1.2.1 Histología del NAFLD

Debido a la acumulación de lípidos dentro del hepatocito, se generan cambios dentro de la célula como la contracción del núcleo. La acumulación de lípidos puede ser macrovesicular o microvesicular como se muestra en la **Figura 4** y puede llegar a ser tan drástica al grado de lisar al hepatocito. El daño provocado en la célula genera fibrosis; cuando la mayor parte de tejido sano es reemplazado por tejido fibroso, se llega a cirrosis.

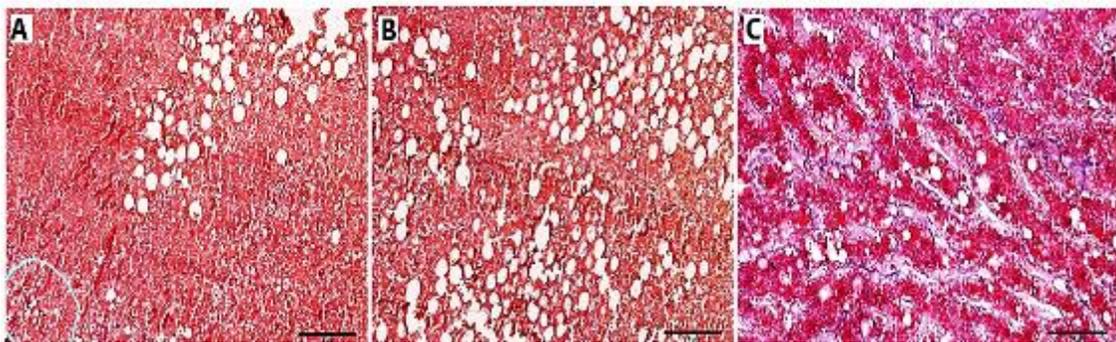
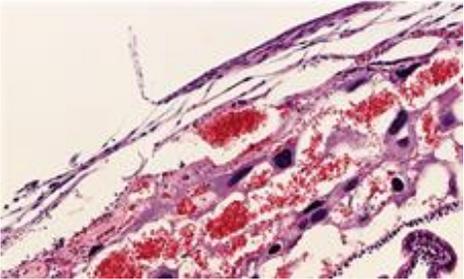
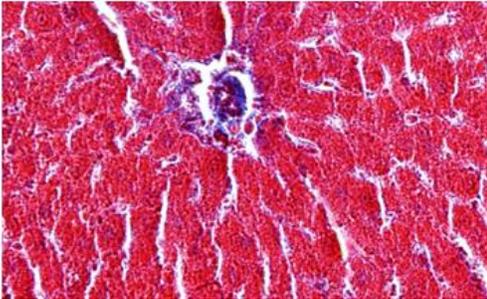
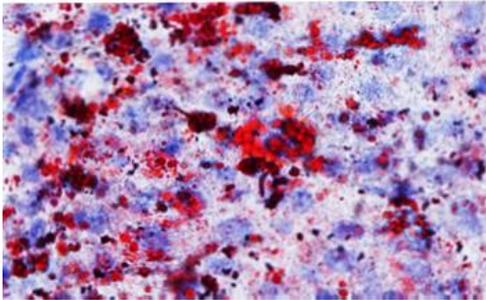


Figura 4. Grados de esteatosis. A) Esteatosis microvesicular, en la esquina inferior izquierda y esteatosis macrovesicular en la parte superior. En B el grado de esteatosis es evidentemente mayor y solo está compuesta por el tipo macrovesicular. En C se observa tejido fibroso teñido en azul, también se observa un grado leve de esteatosis. Tinción: Tricrómica de Masson 20x

El examen histológico es útil para identificar la causa subyacente de la enfermedad hepática, evaluar el grado necroinflamatorio y el estadio de la fibrosis. Algunas de las tinciones más utilizadas son hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson, Van Geasson, rojo oleoso, entre otros. (**Tabla 3**)

Tabla 3. Tinciones para diagnosticar NAFLD		
Tinción	Función	Ejemplo
Hematoxilina- Eosina	Tinción de rutina -Núcleos (azul-morado) -Citoplasma y matriz extracelular en rosa	
Tricrómica de Masson	-Citoplasma, queratina, fibras musculares en rojo -Colágena en azul -Núcleos en negros	
Rojo Oleoso	-Lípidos en rojo -Núcleos azules	

1.2.2 Factores de riesgo para desarrollar NAFLD

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es consecuencia de múltiples factores de riesgo como el sobrepeso, la obesidad, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2. La mayoría de los factores de riesgo tienen involucrada la acumulación del tejido adiposo visceral. (Castro S. & Silva P., 2015)

La NAFLD es una enfermedad reversible y puede corregirse generando cambios en el estilo de vida, incluyendo una buena dieta y actividad física. Esta enfermedad se presenta en el 70% de personas que tienen sobrepeso, en un 70% de las personas con diabetes y cerca del 90% de las personas con obesidad mórbida. (Nassir, Rector, Hammoud, & Ibdah, 2015)

Obesidad y sobrepeso

De acuerdo con la OMS, la obesidad es la “*acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud*”. La presencia de un 25% o más de grasa corporal total en hombres y un 35% o más de grasa corporal en mujeres, es considerada como obesidad. La obesidad es consecuencia de un mayor aporte de energía en relación con su consumo. (Hall & Hall, 2021)

Se puede clasificar el grado de contenido de grasa corporal de acuerdo al índice de masa corporal (IMC) **Tabla 4**. Sin embargo, no se puede utilizar únicamente el IMC para diagnosticar la obesidad; ya que se pueden presentar individuos metabólicamente obesos de peso normal e individuos obesos con un IMC >30 y sin alteraciones metabólicas. (Ezquerro, Vázquez, & Barrero, 2008)

Tabla 4. Clasificación del índice de masa corporal.	
En adultos un	Grado de peso
$IMC \geq 25Kg/m^2$	Sobrepeso
$IMC \geq 30Kg/m^2$	Obesidad

Las alteraciones del tejido adiposo son un sello distintivo de la obesidad. Un claro ejemplo es la falta de un almacenamiento adecuado del exceso de energía; el cual puede conducir a la deposición de lípidos en regiones ectópicas, lo que puede promover la resistencia a la insulina. También se ha observado que la inflamación del tejido adiposo en la obesidad puede conducir a una resistencia sistémica de la insulina. (El Ourrat, y otros, 2021) Estudios demostraron que existe una relación directa entre la cantidad de tejido adiposo visceral y un perfil metabólico alterado, que conducen al desarrollo de DM2 y de enfermedades cardiovasculares. (Ezquerro, Vázquez, & Barrero, 2008)

México tiene una de las tasas más altas de obesidad de la OCDE. (OECD, 2022) Según la Encuesta Nacional de salud y Nutrición (ENSANUT) realizada en México en el año 2018, a nivel nacional el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad es de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad); a diferencia con el porcentaje obtenido en el año 2012 fue de 71.3 por ciento (**Figura 5**)

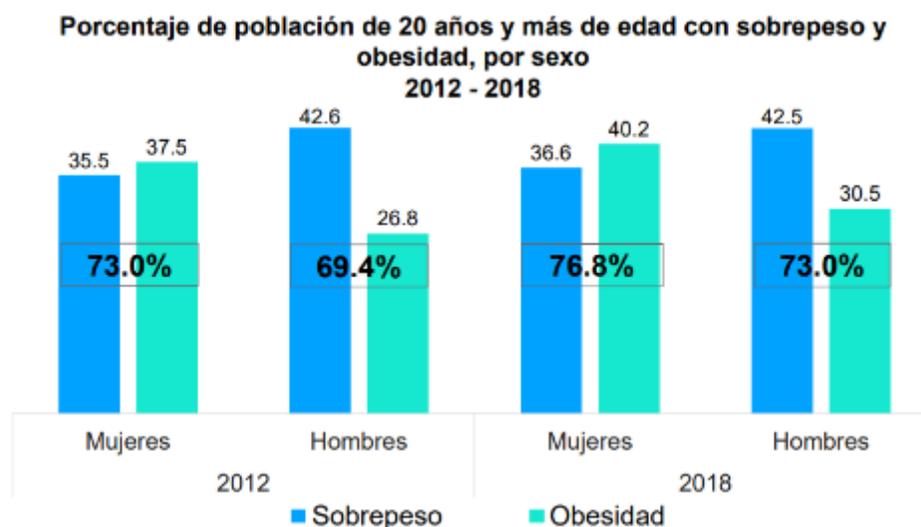


Figura 5. Tasas de obesidad en México 2012-2018. (ENASUT, 2023)

Resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina (RI) ocurre cuando las células de algunos tejidos (hígado, músculo esquelético, tejido adiposo) se vuelven menos sensibles a la acción de la insulina. La insulina es una hormona producida en las células beta del páncreas, la cual facilita la absorción de la glucosa y también evita que el hígado produzca más glucosa inhibiendo a la glucogenólisis y la gluconeogénesis. La RI es una condición multifactorial, dentro de los principales elementos implicados se encuentran la inflamación tisular derivada de la obesidad, el metabolismo de los lípidos que genera lipotoxicidad, entre otras. Al no poderse absorber la glucosa por el tejido adiposo y el músculo esquelético principalmente, esta aumenta su concentración en sangre. (IDF, 2023)

En diversos estudios se ha demostrado que la acumulación de tejido adiposo visceral genera la infiltración de macrófagos que desencadenan una respuesta inflamatoria. La cual tiene como consecuencia, la secreción de citocinas con efectos pro-inflamatorios y pro-fibróticos, que interfieren en la respuesta a la insulina. Una consecuencia o causa importante de la RI es la lipotoxicidad, ya que la RI deja de inhibir la lipólisis. (Tresguerres, 2005) (Johnson & Olefsky, 2013)

Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es el tipo más común de diabetes y representa casi el 90% de todos los casos de diabetes. (IDF, 2023) La diabetes mellitus es un

trastorno endocrino causado por la incapacidad de producir insulina (tipo 1), o por una menor sensibilidad a su acción por tejidos periféricos (tipo 2). Debido a que la insulina es incapaz de promover el transporte de la glucosa hacia el tejido adiposo y el músculo esquelético, la concentración de glucosa en plasma aumenta y es excretada en la orina. La hiperglucemia resultante induce daño a órganos como los ojos, los riñones y el corazón. (Ezquerria, Vázquez, & Barrero, 2008)

La DM2 aparece más frecuentemente en personas obesas de más de 35 años. Sin embargo, el número de niños, adolescentes y adultos jóvenes con DM2 va en aumento debido a los crecientes niveles de obesidad, inactividad física y mala alimentación. (Tortora & Derrickson, 2005) De acuerdo con la American Diabetes Association, la diabetes se diagnostica cuando varias determinaciones de glucosa basal (después de 12h de ayuno) superan los 126 mg/dL o si la glucemia 2h después de una carga oral de 75g de glucosa supera los 200 mg/dL.

Dislipidemia

Es un aumento de la concentración de lípidos en sangre, caracterizada por el aumento de los niveles de colesterol y el incremento de las concentraciones de triacilgliceroles (TAG), o una disminución en la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés). Esta enfermedad va acompañada de otras alteraciones como son la DM2, el alcoholismo, la insuficiencia renal crónica y el SM. Todos los lípidos son hidrofóbicos y en su mayoría insolubles en el plasma sanguíneo, por lo que requieren transporte dentro de las lipoproteínas. Las lipoproteínas son estructuras esféricas que poseen proteínas de superficie que son afines para las enzimas encargadas de procesar los lípidos y se clasifican de acuerdo a su tamaño y densidad. (Davidson & Pradeep, 2023)

Los lípidos provenientes de la dieta son digeridos y absorbidos en el tracto gastrointestinal (**Figura 6**), dando origen a los quilomicrones. Por otro lado, las VLDL transportan sintetizados por el hígado.

El aumento de ambas lipoproteínas en el plasma provoca un incremento en las concentraciones de TAG circulantes. La síntesis de estas lipoproteínas incrementa cuando aumenta la lipogénesis en el hígado. (Soca & Pedro Enrique, 2023) En la **Figura 6** se muestran algunas lipoproteínas y también su componente principal.

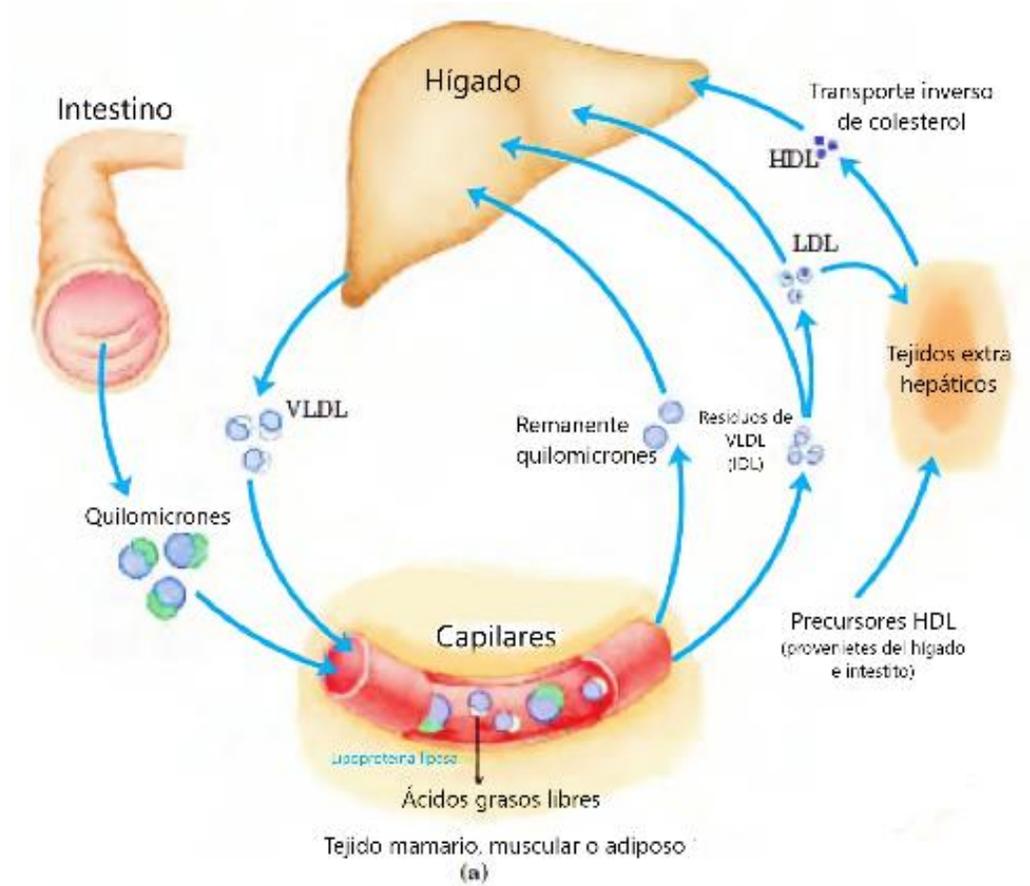


Figura 6. Metabolismo lipídico. Los lípidos de la dieta siguen una ruta por el tracto intestinal donde son transformados y absorbidos.

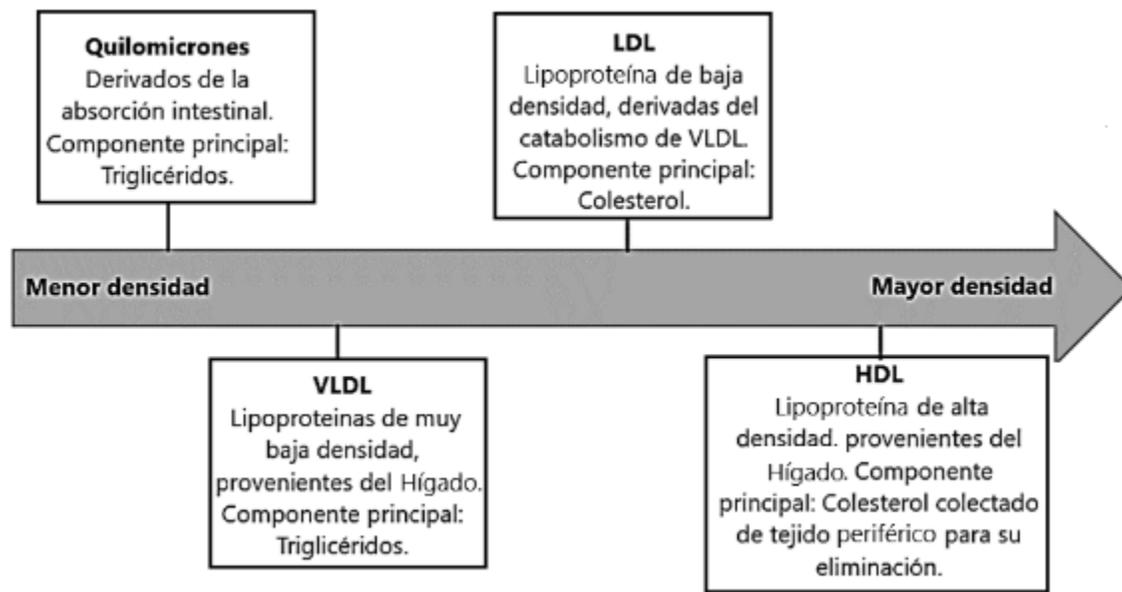


Figura 7. Principales lipoproteínas. Las lipoproteínas son agregados esféricos que contienen lípidos hidrofóbicos en el núcleo y cadenas laterales hidrofílicas, aportadas por proteínas transportadoras específicas (apolipoproteínas), y fosfolípidos en la superficie. Las diversas combinaciones de apoproteínas y lípidos forman los diferentes tipos de lipoproteínas de diferentes densidades.

La mayor parte de los quilomicrones se transforman en ácidos grasos y glicerol, que son absorbidos por los adipocitos del tejido adiposo y el músculo (cardíaco y estriado), para su uso o almacenamiento. Los remanentes de los quilomicrones circulan de regreso al hígado donde son metabolizados (Davidson & Pradeep, 2023) (**Figura 7**).

La dislipidemia también puede ser producto de la resistencia a la insulina, ya que existe un aumento en la liberación de FFA desde los adipocitos, principalmente los de la grasa visceral. Los adipocitos inducen la síntesis hepática de TAG y se promueve una sobre producción de partículas VLDL; lo que hace que los lípidos se acumulen en otras partes del cuerpo, como el hígado y los músculos. (Cuevas & Alonso, 2016) (Swarup, Goyal, Grigorova, & Zeltser, 2022)

Síndrome metabólico

La presencia del SM en un individuo es uno de los principales factores de riesgo para generar NAFLD. El SM se define de forma variable, ya que es la acumulación de varias anomalías metabólicas y cardiovasculares, que en conjunto aumentan el riesgo a desarrollar una comorbilidad; por ejemplo, DM2 o alguna enfermedad

cardiovascular. Las principales causas para el desarrollo del SM son la obesidad, la RI, la dislipidemia, hipertensión, así como factores genéticos. (Swarup, Goyal, Grigorova, & Zeltser, 2022)

El riesgo del desarrollo de SM aumenta con la edad, un IMC alto y una dieta alta en grasas, carbohidratos simples, sal combinados con sedentarismo. (Van der Pal, y otros, 2018) En un consenso, la Federación internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) el SM se diagnostica cuando el paciente cumple con dos o más criterios de la siguiente lista:

- 1- Circunferencia de cintura mayor a 40 pulgadas (101.6 cm) en hombres y mayor a 35 pulgadas (88.9 cm) en mujeres.
- 2- TAG en sangre iguales o mayores a 150 mg/dL.
- 3- Colesterol HLD a menos de 40 mg/dL en hombres o 50 mg/dL en mujeres.
- 4- Glucemia en ayunas igual o mayor a 100 mg/dL.
- 5- Presión arterial sistólica mayor o igual a 130 mmHg y/o diastólica mayor o igual a 85 mmHg.

Según la IDF, se estima que alrededor del 20-25% de la población adulta del mundo está diagnosticada con el SM. Por lo tanto, tienen el doble de probabilidades de morir, debido a las complicaciones generadas por las enfermedades que desarrollan; así como el triple de posibilidades de sufrir un ataque cardíaco o un derrame cerebral, en comparación con las personas sin SM. Adicionalmente, una persona con SM tiene un riesgo cinco veces mayor a desarrollar DM2. Al igual que con las otras comorbilidades, el principal tratamiento para el SM es mejorar el estilo de vida con ejercicio y una dieta saludable. (International Diabetes Federation, 2023)

1.3 Propiedades mecánicas del hígado

Un hígado sano se sostiene por fibras de colágeno y contiene alrededor del 1-4% de tejido fibroso; mientras que uno con cirrosis esta cantidad aumenta del 15 al 35%. El grado de rigidez del hígado está determinado por dos parámetros biomecánicos: su elasticidad y viscosidad. La matriz extracelular (MEC) del hígado; es decir, su contenido de colágeno es uno de los determinantes de su elasticidad. Por otro lado, la infiltración de grasa, la presión de perfusión y la inflamación determinan la viscosidad. (Simon, y otros, 2020) Por lo tanto, la viscoelasticidad es un estado de espesor o tenacidad basado en la estructura interna del material; donde se perciben propiedades tanto elásticas como viscosas. Las propiedades viscoelásticas de las células y tejidos actúan como importantes reguladores del crecimiento celular y tisular, la motilidad celular y la homeostasis tisular. Los cambios en la viscoelasticidad de tejidos se asocian con la progresión de enfermedades, como por

ejemplo: el cáncer, la cirrosis o la esclerosis múltiple. (Simon, y otros, 2020) (Ogawa, 2016) (Chaudhuri, 2020) El hígado tiene un comportamiento viscoelástico; es decir, al aplicar una fuerza en el tejido la deformación depende del tiempo, mientras que vuelve a su forma original al eliminar la tensión aplicada. Por lo tanto, la fuerza es proporcional a la cantidad de cambio en la deformación. (DuFort, 2011)

Un hígado fibrótico aumenta en rigidez y tamaño; en la cual la respuesta a una fuerza mecánica dependerá de la densidad del tejido, la estructura del tejido, la fuerza de la MEC, el tamaño del hígado y la edad. (Ogawa, 2016)

En el estudio de la rigidez con tejido hepático con diferentes grados de esteatohepatitis no alcohólica, Saori Ogawa y colaboradores (2016) mediante elastografía de ondas de corte (SWE, por sus siglas en inglés), se observa que la viscosidad aumenta principalmente en paralelo con los cambios asociados con la esteatosis, la inflamación lobular y el abombamiento de los hepatocitos; mientras que la fibrosis aumenta principalmente la elasticidad. (Ogawa, 2016)

1.3.1 Mecanotransducción

Todas las células que conforman un tejido son sometidas a diferentes fuerzas, incluidas la tensión de compresión, la tracción y el cizallamiento de fluidos, así como la presión hidrostática. Las células interactúan con estas fuerzas y responden a ellas mediante sus propiedades físicas, la MEC y las células adyacentes. (DuFort, 2011)

Avances tecnológicos en microscopía, genómica y sistemas de cultivo celular en 3D han demostrado que la mecanotransducción es una parte integral de la regulación de la transcripción, ya que las señales mecánicas regulan cambios directos de la accesibilidad de la cromatina. (Wagh K. I., 2021)

La mecanotransducción es un proceso funcional de la célula, involucra la capacidad de detección de señales mecánicas de su microentorno y de convertirlas en señales bioquímicas para provocar respuestas transcripcionales adaptativas, para mantener la función y estructura normal del tejido. Estas señales se detectan a través de cambios organizativos o conformacionales inducidos por la fuerza en moléculas o estructuras, como canales iónicos o complejos de cadherina, que al activarse se desencadenan vías de señalización que modifican la fisiología celular. En el siguiente apartado se habla de algunas de estas vías. (DuFort, 2011)

El cambio en la rigidez de la MEC implica cambios en la regulación del desarrollo embrionario, la homeostasis celular, los procesos regenerativos y la progresión de una enfermedad. El cambio de la viscoelasticidad de la MEC interfiere o disminuye

la respuesta a las fuerzas aplicadas externamente, lo cual también puede alterar las vías de mecanotransducción que generan una respuesta bioquímica al estímulo. Asimismo, múltiples estados patológicos, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, se derivan de perturbaciones en la mecanotransducción durante periodos de tiempo prolongados. (DuFort, 2011)

Las señales mecánicas generalmente regulan la arquitectura y expresión del genoma. Por lo que existe una conexión entre la viscoelasticidad de la MEC, la señalización celular, la activación de factores de transcripción y el epigenoma. (Shivashankar, 2019) Las señales mecánicas se transmiten al núcleo, lo que conduce a amplios cambios en la estructura y accesibilidad de la cromatina. Los cambios en la rigidez de la MEC activan los programas genéticos para dirigir el desarrollo embrionario, la tumorigénesis y el destino de las células madre, entre otros procesos (Graham, 2016) **Figura 8.**

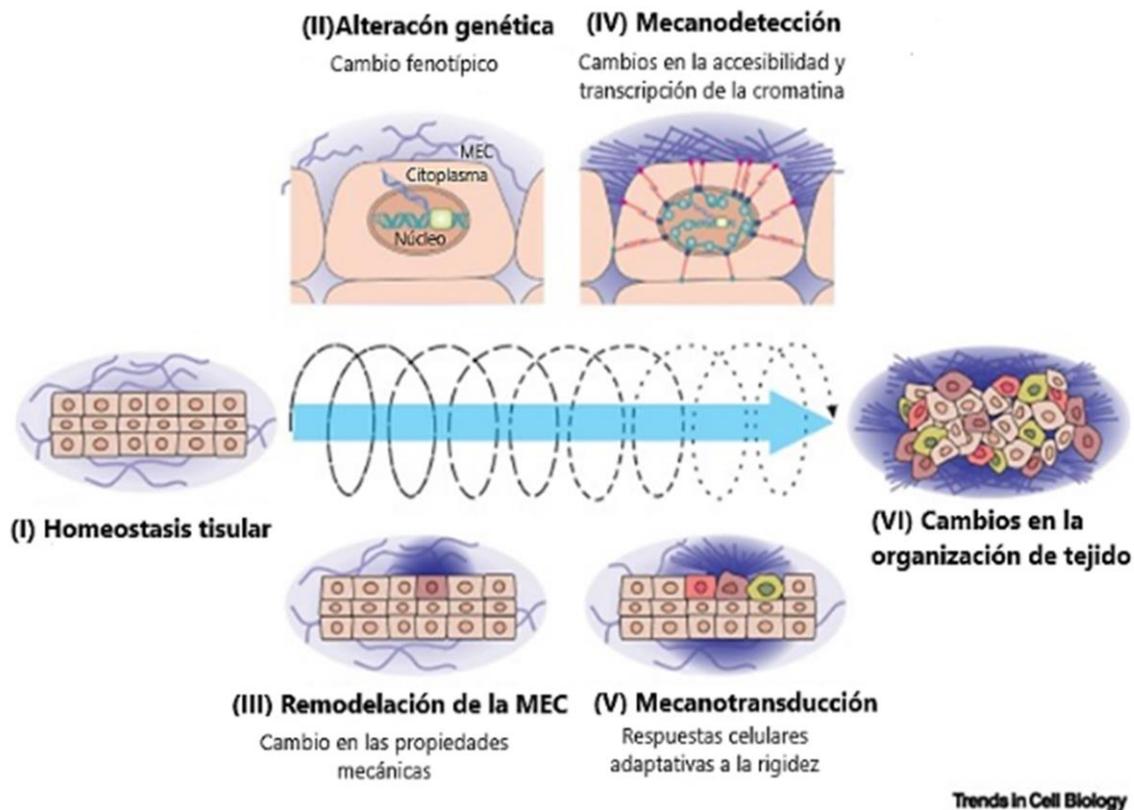


Figura 8. Alteraciones en la matriz extracelular (MEC). La percepción de señales o estímulos (externos o internos), genera una respuesta bioquímica; la cual, modifica la arquitectura celular y la expresión del genoma. Adaptado de Wagh K. , 2021

Janmey y colaboradores (2013) nos muestran los diferentes modelos en la identificación de vías de señalización. La mayoría de los modelos de transición de estímulos físicos a una respuesta bioquímica, sugieren que estos inician en la membrana plasmática o dentro del citoplasma y conducen a cambios bioquímicos en los factores de transcripción o reguladores transcripcionales, provocando su entrada en el núcleo para regular la expresión génica. En uno de estos modelos, la mecanotransducción se inicia mediante un paso dependiente de la fuerza, como la activación de una cinasa. Una vez que ocurre el evento inicial estimulado mecánicamente, el proceso es independiente de las señales físicas. Otro modelo sugiere que el estrés mecánico causado por una fuerza externa o por la misma tensión entre células, se transmite directamente a los reguladores transcripcionales o desde la superficie celular hasta el núcleo. (Janmey, 2013)

1.4 Factores o reguladores de transcripción involucrados en los cambios mecánicos y el NAFLD

La vía de señalización Hippo desempeña un papel clave en la regulación del crecimiento de los tejidos y órganos, la homeostasis, el metabolismo y la regeneración de tejidos. Esta vía se mantiene regulada por los cofactores transcripcionales YAP y TAZ, los cuales bajo ciertas condiciones pueden conducir al desarrollo de enfermedades. YAP y TAZ son genes ortólogos del gen *Yorkie* de *Drosophila melanogaster*, un regulador transcripcional que promueve el desarrollo de tumores en moscas. (Driskill, 2021)

En la vía Hippo se han identificado 4 genes supresores, los cuales generan una cascada de fosforilación que activan o inhiben a los cofactores transcripcionales mecanosensibles YAP y TAZ. La fosforilación inactiva a YAP/TAZ, la cual está mediada por el secuestro citoplasmático de estos cofactores y también mediante su degradación en el proteosoma. (Driskill, 2021) En la **Figura 9** se muestra que la eliminación de los genes supresores mantiene a YAP/TAZ en el núcleo (Hippo apagado, YAP/TAZ activos), mientras que si existe una sobreexpresión de los genes supresores conduce a una mayor translocación citoplasmática de YAP/TAZ (Hippo encendido, YAP/TAZ inactivo). Por lo tanto el nivel de las proteínas y su localización subcelular se utiliza como lectura de la actividad de la vía Hippo y como un indicador de mecanotransducción. (Driskill, 2021)

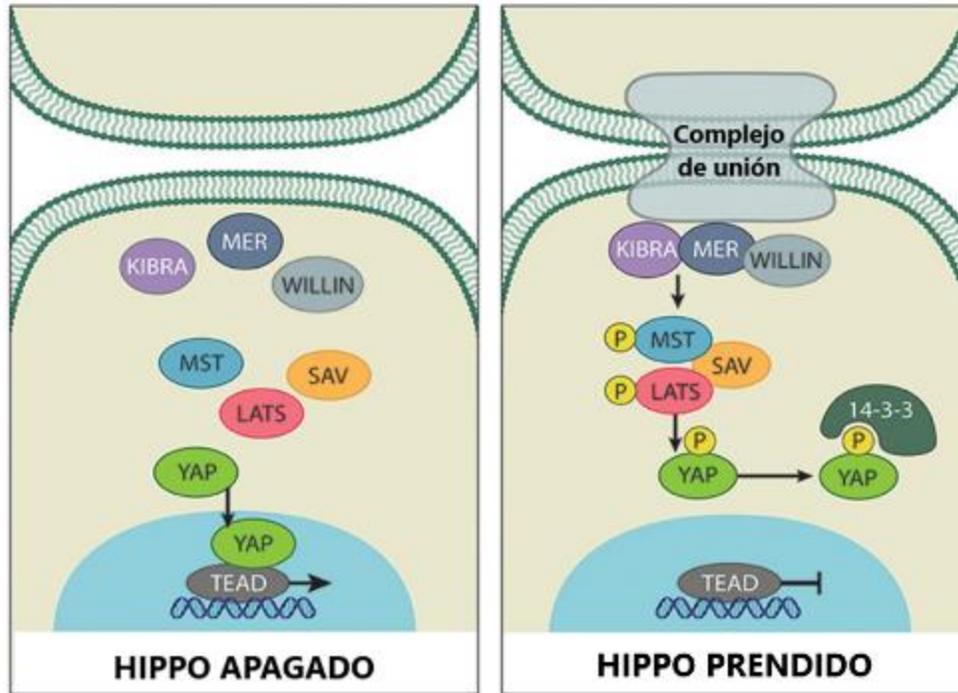


Figura 9. La vía Hippo. En la vía Hippo, la fosforilación de YAP/TAZ genera un sitio de unión a la proteína 14-3-3 que resulta en el secuestro citoplasmático y también los marca para su degradación por el proteosoma inhibiendo así la actividad de YAP y TAZ. Si la vía está desactivada YAP/TAZ se transloca al núcleo. En el núcleo, YAP ejerce su actividad transcripcional interactuando con la familia TEAD de factores de transcripción y activar la expresión del gen objetivo; como por ejemplo, el gen para la proliferación celular. YAP and TAZ are transcriptional co-activators that associate with several DNA-binding proteins to drive gene transcription. Adaptado de Institute, 2023

En el hígado, una sobreexpresión transgénica de YAP provoca hepatomegalia masiva; es decir, hígados hasta cinco veces más grandes que su tamaño normal. Mientras que la sobreexpresión de TAZ da como resultado la formación de carcinoma hepatocelular. Además, YAP y TAZ participan en la regulación del tamaño del hígado, así como la regeneración de este. Por lo tanto, YAP/TAZ se ven activados cuando existe una lesión hepática. (Driskill, 2021)

Un paradigma emergente es que la vía Hipo y la actividad de YAP/TAZ están reguladas por fuerzas biomecánicas, como el estiramiento celular. YAP/TAZ se localizan en el citoplasma de las células que experimentan bajos niveles de señalización mecánica; en cambio, son nucleares en las células que perciben una

señalización mecánica alta. Esto se ve claro en células cultivadas en sustratos rígidos o blandos (Pancier, 2017) (**Figura 10**).

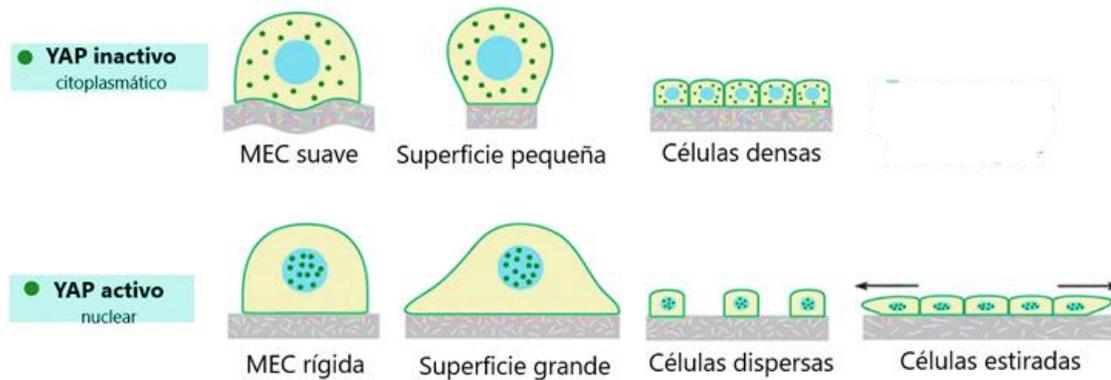


Figura 10. Activación de YAP. Algunos ejemplos de señales mecánicas que perciben las células y proceden en la activación de YAP/TAZ. Mechanical and topological cues regulate the localization of the YAP effector protein. Adaptado de: Institute, 2023

Al estar en el núcleo se activa la transcripción de genes que contribuyen a cambios morfológicos, como la formación de fibras de estrés, la proliferación celular, el crecimiento de órganos y la tumorigénesis. (Janmey, 2013) En particular, se cree que YAP/TAZ regulan el depósito de colágeno durante la fibrosis hepática, mediante su translocación al núcleo en las células estrelladas. (Xu, 2021) Al activarse estos factores de transcripción, las células se transdiferencian a un estado miofibroblástico, en el cual secretan factores que participan en el desarrollo de la inflamación y la reparación de heridas. Sin embargo, la activación continua de las células estrelladas durante el daño hepático crónico provoca un depósito excesivo de colágeno y la formación de tejido cicatricial patológico que conduce a la fibrosis y, en su última fase, a la cirrosis. (Mannaerts, 2015) La fuerza mecánica parece influir en la identidad celular y la diferenciación de hepatocitos en el hígado mediante YAP. Por ejemplo, hepatocitos que son expuestos a un estrés mecánico pierden su fenotipo y translocan YAP a su núcleo. En primer lugar, formando fibras de colágeno y posteriormente se reprograman hacia un linaje de colangiocitos. (Sun, 2019) El nivel de la proteína TAZ se ve significativamente aumentada en hígados con esteatohepatitis en comparación con hígados sanos. En modelos de ratón de esteatohepatitis no alcohólica, la supresión de TAZ previene la inflamación, la fibrosis y la muerte celular, pero no la esteatosis. En los ratones donde su actividad no fue suprimida, se promovió la progresión de la esteatohepatitis y de todas sus características, incluida la fibrosis. (Wang X. Z., 2016)

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés) son otros factores transcripcionales de importancia en el desarrollo del NAFLD. Forman parte de la súper familia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción inducibles por ligandos específicos, de esta manera alteran la expresión génica de forma específica para cada tipo celular. Los PPAR controlan la expresión de redes de genes implicados en la adipogénesis, el metabolismo de lípidos, la inflamación, el mantenimiento de homeostasis metabólica y el cáncer. (Ahmadian M. S., 2013)

En mamíferos se han descubierto tres subtipos de PPAR, las isoformas α , β/δ y γ . PPAR α , estimula la oxidación de los ácidos grasos como sustratos energéticos y se expresa predominantemente en el hígado (hepatocito), el corazón (cardiomiocito) y el tejido adiposo pardo. (Uauy D, 2000) PPAR β/δ tiene un papel crucial en la oxidación de ácidos grasos en tejidos como el músculo esquelético, el hígado y el corazón. Por último PPAR γ se expresa en tejido adiposo blanco donde es regulador maestro de la adipogénesis, así como del metabolismo de lípidos. De igual forma, participa en la patogénesis de la DM2, la aterosclerosis, la RI y el cáncer. Al igual que otros receptores nucleares, los PPAR son fosfoproteínas y su actividad transcripcional se ve afectada por su interacción con cinasas y fosfatasas. (Ahmadian M. S., 2013) (Burns, 2007)

PPAR γ se considera un regulador maestro en la diferenciación de adipocitos (adipogénesis) y modula el papel del tejido adiposo en el metabolismo de la glucosa en todo el cuerpo. La activación de PPAR γ en el tejido adiposo induce la expresión del ARNm del transportador de glucosa dependiente de insulina Glut4. La activación de PPAR γ mediante fármacos es un método establecido para tratar la resistencia a la insulina. (El Ouarrat, 2020)

En la literatura se estudian otros reguladores transcripcionales involucrados en la mecanotransducción como son los factores de transcripción relacionados con la miocardina (MRTF, por sus siglas en inglés). MRTF-A y MRTF-B son proteínas mecanosensibles que se expresan en una amplia gama de tipos celulares. Son co-activadores del Factor de Respuesta al Suero (SRF, por sus siglas en inglés) el cual genera una respuesta al estrés mecánico. (Janmey, 2013) MRTF-A está ampliamente relacionado con la patogenia de la fibrosis hepática. Cuando MRTF-A se encuentra activo, se traslada al núcleo y forma un complejo activo SRF/MRTF-A, conduciendo a la expresión de múltiples proteínas fibróticas y componentes de la matriz extracelular. (Al-Hetty, 2022)

1.5 Modelos animales en el estudio de enfermedades metabólicas

El uso de modelos animales sigue siendo un aspecto vital para investigar los mecanismos moleculares que contribuyen a la desregulación metabólica y facilitan la identificación de nuevos objetivos farmacológicos. Los modelos de ratas son invaluable para adquirir conocimientos básicos sobre enfermedades humanas. (Saxena, 2022)

La rata es uno de los animales de investigación más utilizados para estudiar fisiología, farmacología y metabolismo en la investigación médica básica. Las ratas Wistar son la cepa más utilizada para las investigaciones en laboratorio; por lo que son un modelo para el análisis de un número importante de características biomédicas y toxicológicas. Un ejemplo notable es su utilización como modelos para los experimentos de metabolismo del colesterol. Son aceptables para el estudio de los trastornos inducidos por una dieta alta en grasas con variaciones individuales, incluida la dislipidemia y la patología cardíaca anormal. Existen muchas ventajas que brinda el uso de modelos animales para estudiar ciertas patologías y el tratamiento de estas; por ejemplo, las ratas tienen un ciclo de vida más corto que los humanos. Los cambios y la adaptación se pueden observar a lo largo de su ciclo de vida o incluso a lo largo de varias generaciones. (Udomkasemsab, 2019)

El modelo de obesidad inducida por la dieta imita de cerca la creciente disponibilidad de alimentos ricos en grasas/alta densidad en la sociedad moderna durante las últimas dos décadas; los cuales son los principales contribuyentes a la tendencia de la obesidad en humanos. (Wang C.-Y. L., 2012)

Existen múltiples modelos de enfermedades metabólicas inducidas por la dieta. Algunos ejemplos son: obesidad inducida por una dieta de la cafetería, sobrealimentación materna y exposición a dietas ricas en grasas. La elección del modelo dependerá del objeto del estudio. (Lutz, 2012)

Se han utilizado una multitud de diferentes dietas altas en grasas (HFD, por sus siglas en inglés) con fracciones relativas de grasa entre 20% y 60% de energía como grasa. El componente básico de grasa varía entre grasas de origen animal; por ejemplo, manteca de cerdo o sebo de res, y aceites vegetales como de maíz o de cártamo. (Buettner, 2007)

Algunos estudios han informado que no todas las grasas son obesogénicas y que el perfil de ácidos grasos de la dieta, más que la cantidad de energía de las grasas es una variable importante en el desarrollo de la obesidad dietética. (Bourgeois, 1983)

Planteamiento del problema

El NAFLD es una enfermedad sistémica asociada a la obesidad, la RI, DM2 y el síndrome metabólico. Es provocada principalmente por el consumo excesivo de calorías en la dieta y un estilo de vida malo. La obesidad, la DM2 y otras comorbilidades afectan a gran parte de los países occidentales. Incluso, también existe prevalencia del NAFLD en personas no obesas y sin RI. Por lo tanto, el NAFLD aumentará drásticamente en la población mundial, adicionalmente es el causante más común de enfermedades hepáticas crónicas. Aún no se conoce como el NAFLD activa los factores de transcripción y cómo estos modifican la arquitectura celular. Aunque el NALFD no es una enfermedad mortal, puede progresar a enfermedades que sí lo son, como el cáncer. Es por lo que en este estudio estudiaremos los cambios biomecánicos involucrados en el desarrollo del NAFLD, mediante un modelo de ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasas.

Hipótesis

Una dieta alta en grasa provocará hígado graso no alcohólico en las ratas experimentales; esto mediante cambios en la arquitectura celular, el comportamiento biomecánico del hígado y del cambio en la actividad de los factores de transcripción.

Objetivo general

Demostrar que una dieta alta en grasa promueve el desarrollo de hígado graso no alcohólico. Esto debido a la acumulación de lípidos en los hepatocitos (esteatosis hepática), lo cual modificará sus propiedades mecánicas del hígado y sus funciones bioquímicas.

Objetivos específicos

- Generar obesidad en ratas experimentales Wistar en un periodo aproximado de 6 meses.
- Generar alteraciones metabólicas en ratas experimentales Wistar.
- Obtención de muestras y análisis histológico.
- Fraccionamiento nuclear y citoplasmático de muestras hepáticas.
- Cuantificación de proteínas y realización de Western Blots.
- Ensayo ALT en plasma Hepático.
- Extracción de lípidos en muestras hepáticas.
- Confirmación del desarrollo de hígado graso no alcohólico.

Metodología

1. Animales

Se obtuvieron ratas Wistar macho de 3 semanas de vida (después del destete) de la Unidad Académica Bioterio (UAB) de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron alojados en el vivario del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina. Fueron mantenidos en condiciones estándar ($20^{\circ} \pm 4$ C, 65% de humedad relativa y ciclos de 12h luz/oscuridad). Durante el periodo experimental, los animales fueron alojadas en cajas de acrílico (32x47x20 cm); con dos cambios semanales de cama, cajas y agua potable. Asimismo, el alimento fue cambiado 3 veces a la semana. Durante su estancia en el vivario tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento correspondiente, de acuerdo con su grupo experimental. Adicionalmente, de forma semanal se registró su consumo calórico (Kcal/día) y la ganancia de peso (g) hasta el final del experimento (**Figura 11**).

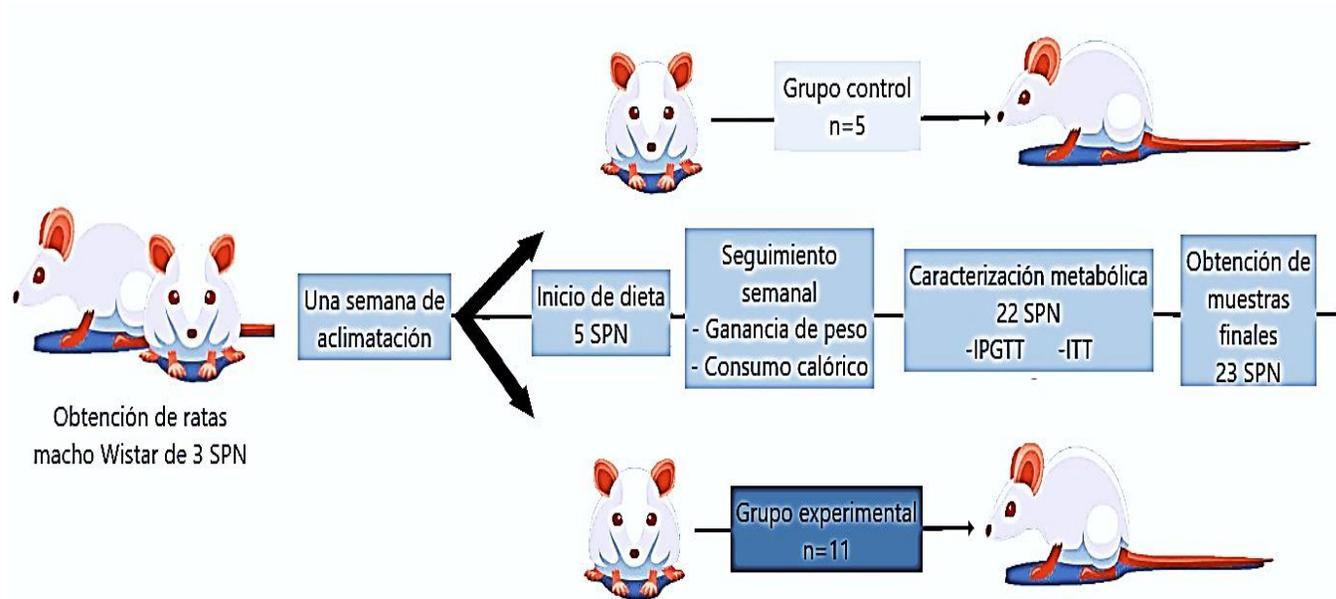


Figura 11. Diseño experimental. Inicio de la dieta, cada grupo experimental comenzó a ser alimentado con su dieta correspondiente. Se llevó a cabo un seguimiento semanal de consumo y ganancia de peso. A las 22 SPN realización de curvas de tolerancia de glucosa intraperitoneal (IPGTT) y de sensibilidad a la insulina (ITT). Finalmente, a las 23 SPN se obtienen las muestras para el análisis.

2. Diseño experimental

Las ratas se separaron de manera aleatoria en 2 grupos ($n_{total}=16$). El grupo 1 ($n=11$), considerado como el grupo experimental (EXP) fue alimentado con una dieta alta en grasa (HFD). El grupo 2 ($n=5$), considerado como el grupo control (CTRL) fue alimentado con dieta monocalórica estándar (Laboratory Rodent Diet 5001).a dieta HFD estaba compuesta por: albúmina, pellets de dieta estándar (molidos), grasas de origen vegetal (aceite de oliva) y de origen animal (manteca de cerdo). La dieta fue preparada en el laboratorio del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la UNAM (**Anexo 1**). El proyecto cuenta con la aprobación del Comité Institucional para el cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). (**Anexo 4**) En la **Tabla 5** se muestra la comparación de la composición calórica de ambas dietas.

Tipo de dieta	Carbohidratos (%)	Proteínas (%)	Grasa (%)	Aporte energético (Kcal/g)
Estándar	58	29	13	3.36
HFD	24.1	26.9	37.5	5.41

3. Peso corporal y consumo calórico.

El peso corporal se determinó una vez por semana de la siguiente manera: la rata se colocó dentro de un recipiente de plástico (previamente tarado) y se pesaba en la balanza; los datos fueron registrados en gramos con una resolución de 0.01g. Para el consumo calórico: se dejó 24 h antes una cantidad de comida conocida (aproximadamente 75g por animal) en el comedero de la jaula de los animales. Pasadas las 24h, se recolectó el remanente y fue pesado. Los datos se expresaron en calorías/animal/24h.

4. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y de tolerancia a la insulina (ITT).

En la SPN 22 ambos grupos fueron puestos en ayuno durante 12h previo a la realización de las pruebas. Para ambas pruebas el primer paso es la determinación de glucosa en plasma en ayuno.

Para la IPGTT, se les suministró una inyección intraperitoneal a cada uno de los animales con una solución estéril de glucosa al 40% (a una dosis final de 2g/kg de

peso). Para la prueba de ITT se suministró una dosis de insulina humana recombinante de acción rápida (Humulin, Lilly; 0.2 UI/kg de peso).

Posterior a las inyecciones, se realizaron mediciones consecutivas de glucemia mediante una punción en la vena lateral de la cola a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos (**Imagen 1A**). Si las ratas presentaban una glucemia menor a 50mg/dL durante el experimento, se retiraban inmediatamente del experimento y se les proporcionaba alimento y agua (datos que fueron excluidos de análisis experimental). Los datos obtenidos de glucemia en sangre fueron graficados contra tiempo y se calculó el área bajo la curva. Las concentraciones de glucosa fueron determinadas en mg/dL mediante un glucómetro (AccuCheck Instant, Roche) (**Imagen 1B**).



Imagen 1. Pruebas IPGTT e ITT. A) Aplicación de glucosa intraperitoneal. B) Medición de glucemia por punción en la vena lateral de la cola.

5. Determinación de medidas somatométricas

A las 23 SPN, previo a las disecciones, se determinaron la talla y el perímetro abdominal (PA) de los animales (**Imagen 2**). Ambas mediciones se realizaron bajo anestesia general con pentobarbital sódico intraperitoneal (Pisabental, 100mg/kg). Para la talla, se colocó a la rata sobre una cinta métrica y se midió la distancia desde la nariz al ano. Por otro lado, para determinar el PA, la cinta se colocó alrededor del abdomen, a la altura de las crestas iliacas. Ambas medidas se reportaron en centímetros (cm) y con los datos obtenidos se calculó el índice de masa corporal (IMC), de acuerdo con la **Ecuación 1**:

$$\text{Ecuación 1:} \quad IMC = \frac{\text{peso}}{\text{talla}^2} = \frac{g}{\text{cm}^2}$$

Y también el índice de Lee (**Ecuación 2**):

$$\text{Ecuación 2:} \quad \text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso}}}{\text{talla}} = \frac{g^{1/3}}{\text{cm}}$$



Imagen 2. Determinación de talla y perímetro abdominal. La cinta métrica se coloca debajo de la rata y se procede a medir de la nariz al ano.

6. Obtención de muestras para análisis histológico

Después de la determinación de las medidas somatométricas, y aun bajo anestesia se procedió a comenzar las disecciones (**Imagen 3A**). Previo a la extracción de tejidos, se extrajeron 5mL de sangre a partir de la vena cava inferior y se colectaron en tubos con EDTA (1.5mg por cada mL de sangre). La sangre se centrifugo y se decantó, para conservar solo el plasma (**Imagen 3B**). Los tubos se almacenaron a -80°C hasta la cuantificación de ALT. Se tomaron dos porciones del tejido hepático, una se lavó en buffer de fosfato salino (PBS) para remover la mayor cantidad de sangre, se fijó durante 24h en paraformaldehído (PFA) al 4% en solución de PBS a 4°C , pasado el tiempo el tejido se transfirió a PBS y se guardó a 4°C para su posterior paso por técnica histológica. Por otro lado, la otra porción de hígado fue procesada para la realización de Wester Blot (sección 6). Finalmente, se extrajeron los panículos de tejido adiposo. El tejido adiposo supra-gonadal (TASG), retroperitoneal (TARP), peri-pancreático (TAPP) y sub-cutáneo (TASC) se pesaron por separado en una balanza analítica y se reporta el peso de los depósitos de grasa como un porcentaje del peso total de cada animal (**Ecuación 3**).

$$\text{Ecuación 3: } \% \text{Tejido adiposo} = \frac{\text{peso del tejido adiposo}(g)}{\text{peso del animal}(g)} * 100$$

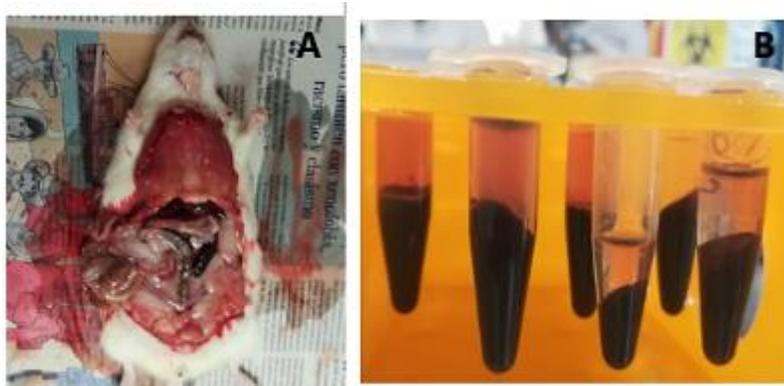


Imagen 3. Obtención de muestras. A) Disección de una rata HFD. B) Muestras de sangre después de la centrifugación.

6.1 Técnica histológica

Después de la fijación, las muestras pasan por un tren de deshidratación de diferentes alcoholes en concentraciones (30-100%). Ya que el tejido se encuentra deshidratado, pasa por el agente aclarante (xilol) y al final es infiltrado con parafina líquida; posteriormente se coloca en un molde y se deja enfriar. El siguiente paso es la obtención de un corte histológico de 5 μm de grosor. Todos los cortes son desparafinados en un horno ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) durante 10min. Ya desparafinadas, las muestras pasan por un tren de rehidratación. El último paso del tren de rehidratación es el agua, luego pueden ser teñidas; en este caso las muestras fueron teñidas con la técnica tricrómica de Masson. **(Anexo 1)**

6.2 Cortes por congelación

Para la determinación de lípidos en el tejido, las muestras fueron fijadas, lavadas en PBS y posteriormente se colocaron secuencialmente en disoluciones de sacarosa en PBS al 10%, 20% y 30% con azida de sodio (0.02%). El cambio de las muestras se realizó cada 24hrs (o hasta que la muestra deje de flotar). En este punto las muestras ya están lista para ser cortadas en el criostato. Las muestras se embeben a un soporte con OCT compound (Sakura, Tissue-Tek) y se dejan en la cámara refrigerada del criostato ($-20 \pm 5^\circ\text{C}$), ya congeladas se proceden a cortar. Los cortes obtenidos son de 10 μm de grosor y son montadas en portaobjetos. Los cortes fueron guardados a -20°C hasta su tinción.

Estas muestras fueron teñidas mediante la técnica de rojo oleoso (RO) (Anexo 2); posteriormente fueron observadas y capturadas con el ocular 40x en el microscopio digital (Nikon elipse E600). Finalmente, se les realizó un análisis con el programa *Image J*, donde se cuantificó el área total de la foto y después el área que ocupan las partículas lipídicas (teñidas color rojo) y se obtiene un porcentaje promedio para cada grupo CRTL y HFD **(Anexo 2.1)**

7. Western Blot

Las muestras de hígado colectadas durante las disecciones fueron almacenadas a -80°C hasta su uso (máximo 24hrs después). Las muestras se maceraron y fraccionaron en su componente nuclear y la citoplasmático. A cada fracción se les cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford; posteriormente se diluyeron en buffer Laemmli hasta una concentración de $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En cada carril del gel de acrilamida (al 10%) se cargaron $40\mu\text{L}$ ($80\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de cada fracción (nuclear y citoplasmática) de muestra. Se dejó correr la electroforesis del gel a 100V con un amperaje constante y se detuvo una vez que saliera el frente de carga. Terminada la electroforesis, las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Ya fijadas las proteínas a la membrana, se procede a bloquear los sitios inespecíficos con una disolución de leche en polvo (*Svelty* al 5%) en TrisBase buffer con Tween (1%) (TBS-T), el bloqueo se realizó en agitación durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se procede a incubar con el anticuerpo primario. En este trabajo se utilizaron los anticuerpos mostrados en la **Tabla 4**.

El anticuerpo primario (AB 1°) se colocó en diferentes concentraciones dependiendo de su especificidad. En la siguiente tabla se muestran la dilución utilizada por cada anticuerpo. La membrana se coloca en una bolsa sellada con el volumen suficiente para de anticuerpo primario y se deja en agitación a 4°C entre 24 y 48hrs.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Western blot

Anti-YAP (anti-ratón) Santa cruz biotechnology #cat: sc-101199	Anti-TAZ (anti-conejo) Cell Signaling Technology #cat: 4883S	Anti-PPAR γ (anti-ratón) Santa cruz biotechnology #cat: sc-7273	Anti-MRFT-B (anti-conejo) Cell Signaling Technology #cat: 14613S	Anti-Lamina B 1 (anti-ratón) Santa cruz biotechnology #cat: sc-377000	Anti- β -Tubulina (anti-ratón) Cell Signaling Technology #cat: 4466X
Dilución 1/1000 AB 1° en TBS-t con timerosal.	Dilución 1/2000 AB 1° en TBS-t con timerosal.	Dilución 1/1000 AB 1° en TBS-t con timerosal.	Dilución 1/2000 AB 1° en TBS-t con timerosal.	Dilución 1/1000 AB 1° en TBS-t con timerosal.	Dilución 1/1000 AB 1° en TBS-t con timerosal.
AB 2° Dilución 1/1000 Disolución de leche en TBS-t más AB 2° anti-ratón IgG- HRP	AB 2° Dilución 1/20000 Disolución de leche en TBS-t más AB 2° anti-conejo IgG- HRP	AB 2° Dilución 1/20000 Disolución de leche en TBS-t más AB 2° anti-ratón IgG- HRP	AB 2° Dilución 1/20000 Disolución de leche en TBS-t más AB 2° anti-conejo IgG- HRP	AB 2° Dilución 1/10000 Disolución de leche en TBS-t más AB 2° anti-ratón IgG- HRP	AB 2° Dilución 1/1000 Disolución de leche en TBS-t más AB 2° anti-ratón IgG- HRP
*TBS:t: TrisBase buffer más Tween; IgG-HRP: Peroxidasa de rábano conjugada.					

Los anticuerpos secundarios están acoplados a la enzima de peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) contra ratón o conejo respectivamente (**Tabla 4**). La enzima HRP cataliza la reacción química con luminol y Peróxido de hidrógeno (immobilon western chemiluminescent substrato, Sigma Aldrich), la cual genera una señal luminosa. La señal fue registrada en el equipo ChemiDoc XRS+ (**Anexo 3**). El análisis cuantitativo se realizó mediante el software Image J. [58]

8. Determinación de la actividad de ALT en plasma

El plasma colectado durante las disecciones fue almacenado a -80°C por un máximo 24h para evitar la degradación de proteínas. Las alícuotas fueron descongeladas y mantenidas en hielo durante la prueba.

La prueba se realizó con el kit ALT (Sigma-Aldrich, #CAT:MAK052-1KT) (**Figura 12**); siguiendo las indicaciones del proveedor. (**Anexo 4**)

Debido a que las muestras presentaron una baja actividad de la enzima ALT, se decidió concentrarlas. La concentración del plasma sanguíneo se realizó con dispositivos con membrana microporosa (Ultrafree-MC, Millipore). Se colocó un volumen de $200\mu\text{L}$ por muestra y se centrifugaron 3 veces a 12000RPM a 4°C durante 10min. El volumen concentrado final fue de $100\mu\text{L}$.

Al suero concentrado se le realizó la prueba de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit. Al final los datos obtenidos se normalizaron y se reportaron en U/L.



Figura 12. Componentes Kit ALT

- Buffer ALT
- Sustrato fluorescente peroxidasa.
- Mezcla de enzimas
- Sustrato ALT
- Estándar piruvato $100\text{nmol}/\mu\text{L}$
- Control positivo

9. Extracción de lípidos

Se obtuvieron 12 muestras de tejido hepático durante la disección y se marcaron con un código y se guardaron a -80°C . El análisis se realizó sin saber a qué grupo experimental pertenecía cada muestra (en ciego). Cada una de las muestras se descongeló a temperatura ambiente y se secó durante 10 min sobre una toalla de papel. Posteriormente, se pesaron y se procedió a homogeneizar la muestra con un homogeneizador mecánico (IKA T18 digital, ULTRA TURRAX) en una disolución 2:1 de cloroformo:metanol, durante aproximadamente 10 min. La mezcla se transfirió a un tubo Falcon previamente pesado, durante 1 h se sonicaron todos los tubos y después se dejaron en agitación toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Se colectó el sobrenadante y se enjuagó con 4 mL de una disolución NaCl (0.9%), para eliminar lípidos polares. Para hacer más efectivo el lavado se utilizó un vortex durante aproximadamente 1 min; después se centrifugo a 2500rpm durante 10 min. Se desechó la fase superior y la fase inferior (orgánica) se enjuagó dos veces con una disolución al 50% de metanol. Nuevamente se conservó la fase orgánica y se dejó evaporar a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 h. Finalmente, los tubos se llevaron a una estufa y se dejaron secar durante 16 h ($40-42^{\circ}\text{C}$).

Una vez evaporado todo el cloroformo se pesaron y por gravimetría se obtuvo el peso total de lípidos por muestra. Los datos obtenidos se expresaron en porcentaje de lípidos por peso de muestra.

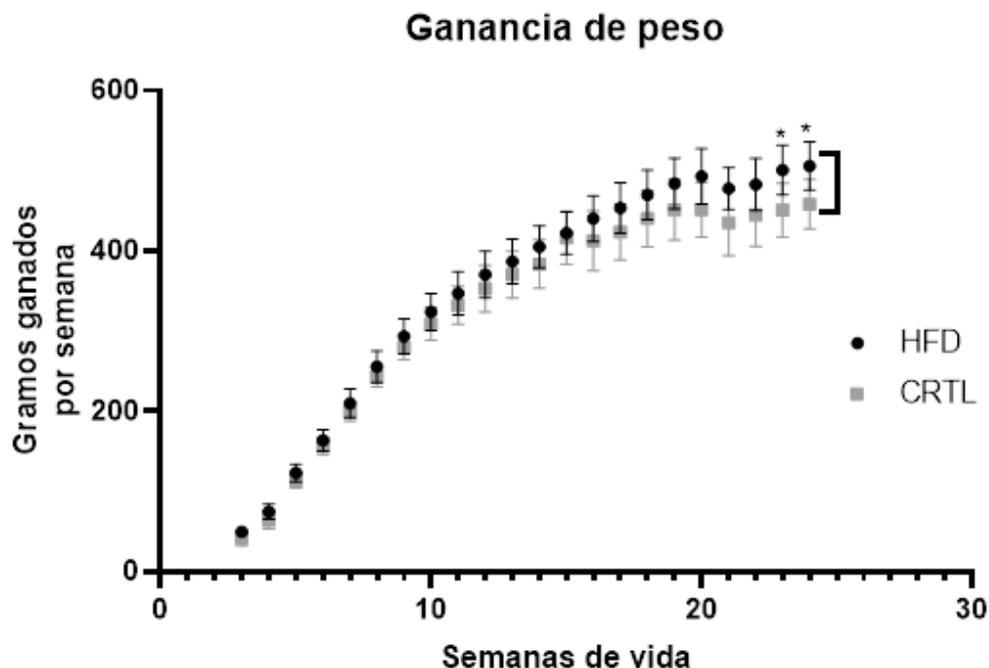
10. Análisis estadístico

A los datos obtenidos de consumo de alimento, ganancia de peso y pruebas de tolerancia tanto de insulina como de glucosa intraperitoneal se les realizó una prueba t de Student y se reportó la significancia $p < 0.05$; previamente se determinó si presentaban una distribución normal. Se reporta la media de cada experimento \pm el error estándar.

Resultados

1. Modelo de HFD

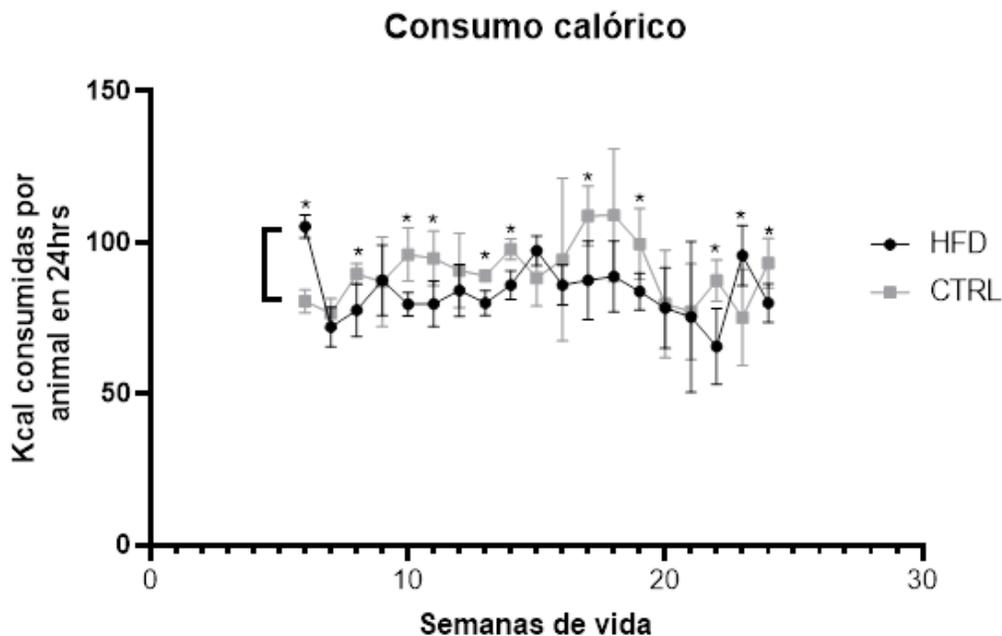
Durante las 23 SPN que las ratas estuvieron en el experimento y fueron alimentadas con alimento HFD o dieta estándar, dependiendo de su condición. La **Gráfica 1** muestra la ganancia de peso en ambos grupos.



Gráfica 1. Ganancia de peso. La ganancia de peso de los animales durante las 23 semanas de experimentación. Las ratas alimentadas con dieta HFD ganaron más peso comparadas con las control. A la semana 22 HFD: n=11, Media=483.8±9.776. CTRL: n= 5, Media=444.7±17.45.

Dónde: *** $p \leq 0.001$ ** $p \leq 0.01$ * $p \leq 0.05$

En cuanto al consumo calórico, durante las 23 semanas del tratamiento, el consumo fue variado. Sin embargo, al realizar una comparación con los promedios de cada semana, las ratas del grupo control tienen un mayor consumo calórico (**Gráfica 2**).

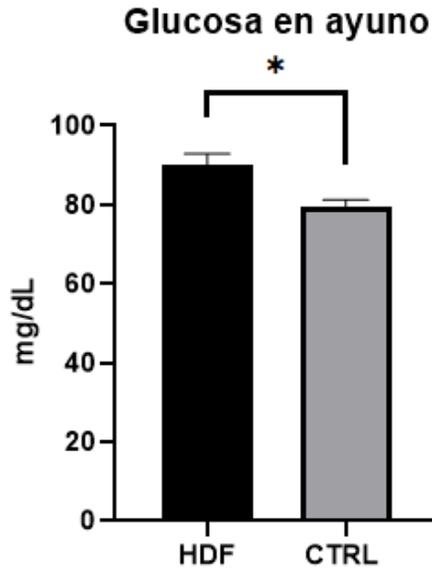


Grafica 2. Consumo calórico. El consumo de calorías en cada semana del tratamiento experimental. Se observa un consumo calórico variable sin una tendencia clara entre los dos grupos experimentales.

Dónde: *** $p \leq 0.001$ ** $p \leq 0.01$ * $p \leq 0.05$

2. Glucosa en ayuno

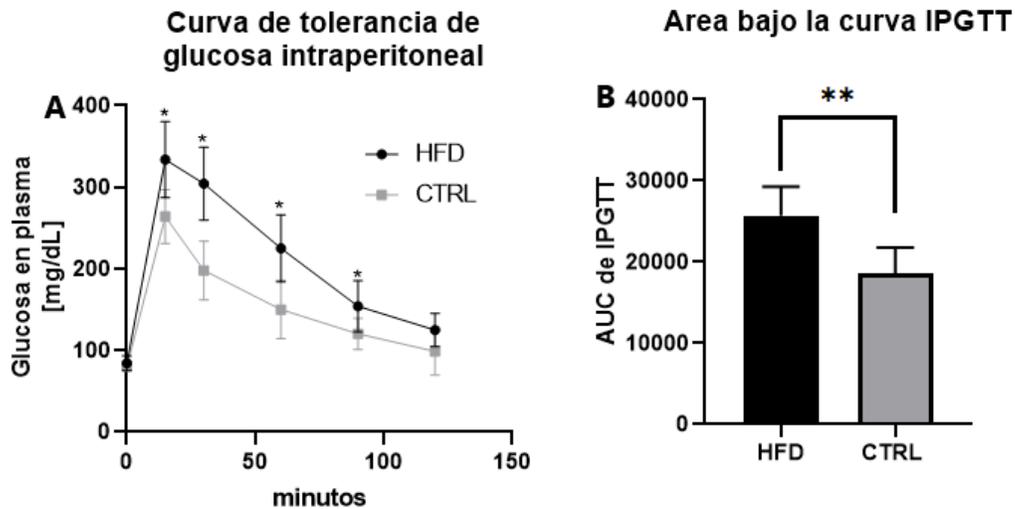
Pasadas las 23 SPN se realizaron las disecciones de los animales de la experimentación, previo a la aplicación de anestesia y con 12hrs de ayuno se les determinó la glucosa en ayuno a partir de la vena posterior de la cola. También se tomaron en cuenta los valores de glucosa plasmática obtenidos al tiempo cero en la realización de curvas IPGTT e ITT. Las ratas HFD presentaron un nivel de glucosa en sangre significativamente mayor comparado con las ratas CTRL. El promedio de la glucosa en ayuno en sangre de las ratas HFD fue de 90.06mg/dL, mientras que el promedio las ratas CRTL fueron de 79.33mg/dL (**Gráfica 3**).



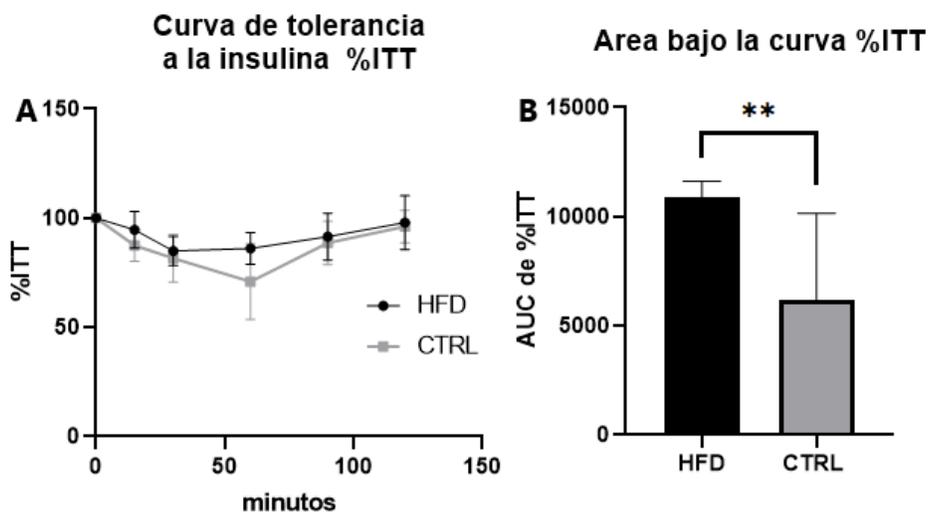
Gráfica 3. Glucosa en ayuno. Previo a las disecciones y con ayuno, se tomó el índice glicémico a los animales. También los valores obtenidos en el tiempo cero durante la realización de las curvas IPGTT e ITT se tomaron en cuenta. El promedio de la glucosa en ayuno en sangre de las ratas EXP fue de 90.06 ± 2.834 mg/dL, mientras que el promedio las ratas CTRL fue de 79.33 ± 1.909 mg/dL. En la prueba t de Student EXP vs CTRL se encontró significancia. EXP: n=11 y CTRL: n= 5.

3. Pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y de sensibilidad a la insulina (ITT)

Los resultados de las pruebas de tolerancia de glucosa intraperitoneal y de sensibilidad a la insulina indican que las ratas del grupo HFD tenían una menor capacidad de internalizar la glucosa (**Gráfica 4 y 5**). Por ejemplo, la **Gráfica 4A** muestra que el pico de glucosa al primer tiempo es mayor en las HFD. Por otro lado, tres ratas del grupo CTR debieron abandonar la ITT debido a una hipoglucemia (menos de 50 mg/dL); mientras que ninguna rata del grupo HFD presentó este efecto.



Gráfica 4. Prueba de tolerancia a la glucosa. A) Curva de tolerancia de glucosa intraperitoneal. HFD: n=11, Media=204.4±40.99. CTRL: n= 5, Media=151.9±28.07. B) En el área bajo la curva con la prueba t de Student HFD vs CTRL se encontró una significancia <0.05.



Gráfica 5. Prueba de tolerancia a la insulina. A) Curva de tolerancia a la insulina. EXP: n=11, Media=92.55±2.514. CTRL: n= 5, Media=87.47±4.248. B) En el área bajo la curva con la prueba t de Student HFD vs CTRL se encontró una significancia <0.05.

Dónde: *** $p \leq 0.001$ ** $p \leq 0.01$ * $p \leq 0.05$

4. Análisis somatométrico.

La **Tabla 5** muestra las medias aritméticas de las medidas somatométricas de ambos grupos. Los datos obtenidos previos a las disecciones de los animales nos muestran nuevamente que las ratas HFD obtuvieron un PA mayor, al igual que el IMC; aunque también una talla mayor.

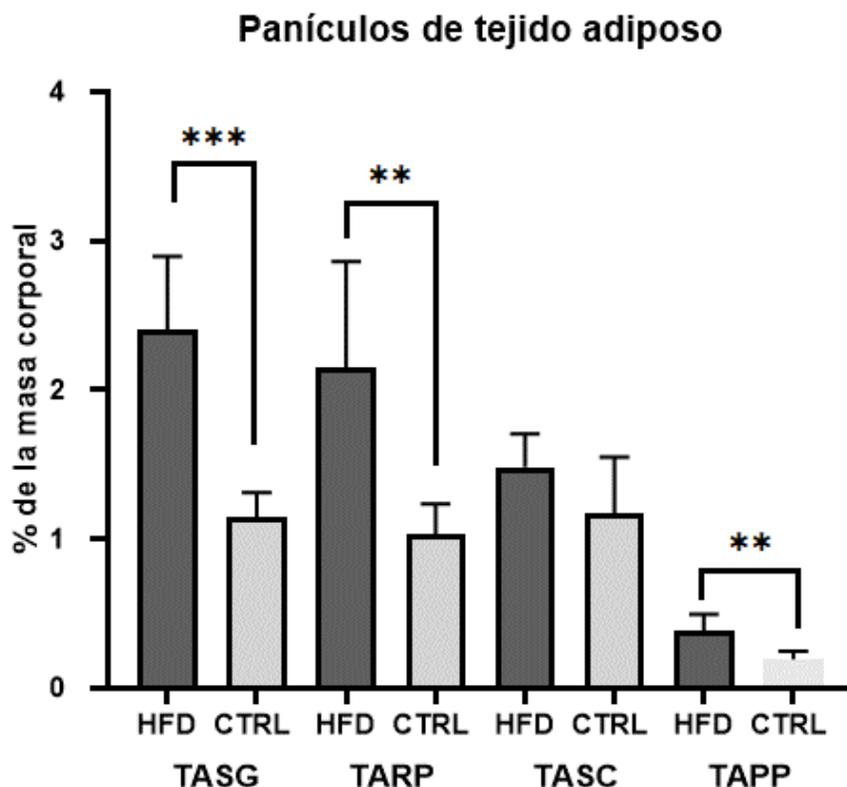
Tabla 5. Medidas somatométricas por cada condición.				
Condición	PA (cm)	Talla (cm)	IMC (g/cm ²)	Índice de Lee (g ^{1/3} /cm)
EXP	21.47±0.3298	25.71±0.243	0.786±0.0197	0.3127±0.003
CTRL	20.1±0.6336	24.9±0.4155	0.770± 0.024	0.3141±0.004

Medias aritméticas ± SEM. HFD n=11, CTRL n=5

*P.A: perímetro abdominal e IMC: índice de masa corporal.

5. Cuantificación de los panículos de tejido adiposo

Los porcentajes obtenidos del tejido adiposo supra-gonadal (TASG), retroperitoneal (TARP), peri-pancreático (TAPP) y sub-cutáneo (TASC) son mayores en las ratas EXP, podemos interpretar que las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa tienen un grado de obesidad mayor. En la **Gráfica 6**, se muestran los porcentajes obtenidos en cada panículo adiposo extraído de ambos grupos.



Gráfica 6. Proporción de los panículos de tejido adiposo.

%TASG: EXP = 2.407±0.1547. CTRL = 1.145±0.0834, p<0.05

%TARP: EXP = 2.154±0.2242. CTRL = 1.028±0.1038, p<0.05

%TASC: EXP = 1.485±0.06956. CTRL = 1.176±0.1867, no hubo significancia p=0.0741.

%TAPP: EXP = 0.3845±0.0345. CTRL = 0.1940±0.028, p<0.05.

Dónde: EXP n=11 CTRL n=5

Dónde: *** p ≤ 0.0001 ** p ≤ 0.001 * p ≤ 0.05

6. Histología del hígado

La biopsia hepática es uno de los métodos para la confirmación de NALFD. Con la tinción tricrómica de Masson fue evidente la observación de los daños en el tejido hepático por la acumulación de gotas lipídicas (*Imagen 4A*) de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa; mientras que el tejido de las ratas del grupo control no presentaba dichas alteraciones (*Imagen 4D*). Por otro lado, la tinción de R.O

confirma que la acumulación de lípidos es mucho mayor en ratas HFD (**Imagen 4B-C**).

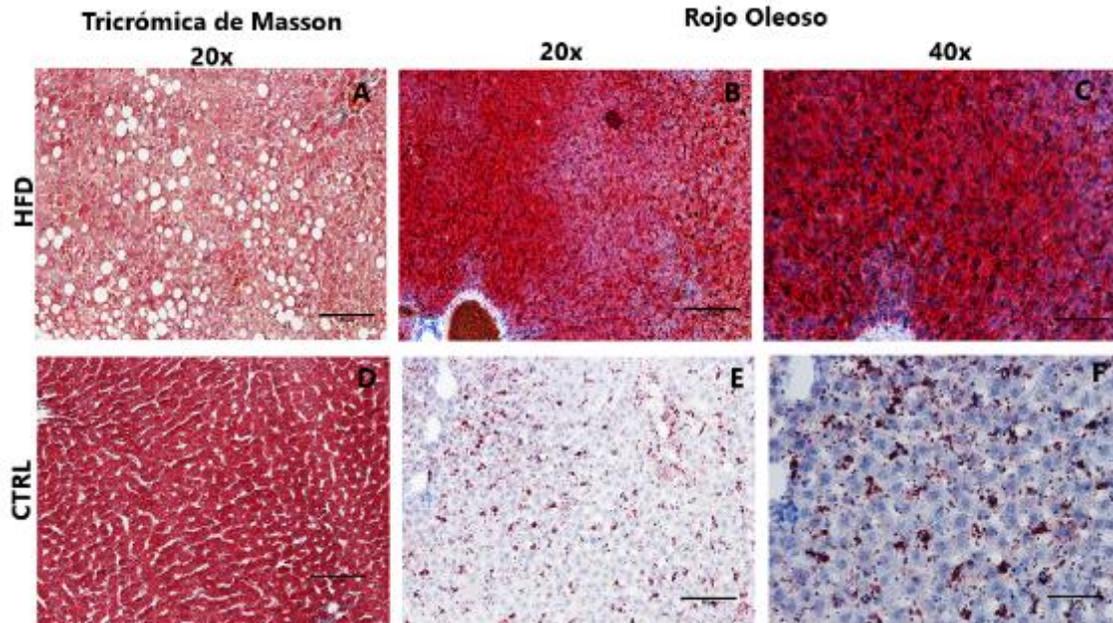
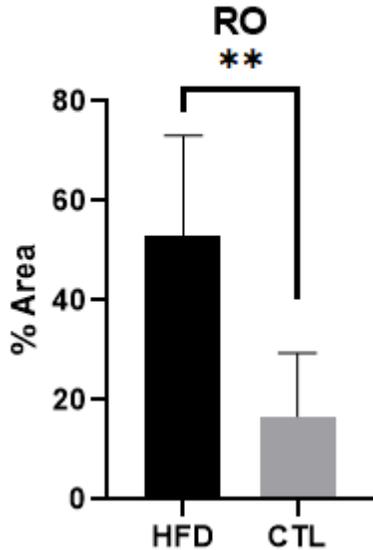


Imagen 4. Histología de tejido hepático de ambas condiciones. A) Corte de tejido de una rata alimentada con comida alta en grasa, presenta esteatosis macro y micro vesicular, el orden de los hepatocitos se ha perdido. B y C) Se observa una acumulación de gotas lipídicas de diferentes tamaños dentro de los hepatocitos. D) Corte de tejido de una rata macho alimentada con una dieta estándar. Cordones de hepatocitos rodean una vena central (superior izquierdo). Se logra distinguir una triada portal (inferior derecho). E y F) se observa una leve acumulación de pequeñas gotas lipídicas, en F se logran distinguir los núcleos de los hepatocitos. A, B y C pertenecen al mismo animal, mientras que D, E y F pertenecen al mismo animal.

La cuantificación del porcentaje que ocupan las gotas lipídicas en las laminillas sugiere que la dieta alta en grasa provocó la acumulación de grasa ectópica dentro de los hepatocitos. En promedio las gotas lipídicas ocupan el 52.95% del área observada en las laminillas de las ratas HFD y solo el 16.72% en las laminillas de las ratas CTRL (**Gráfica 7**).

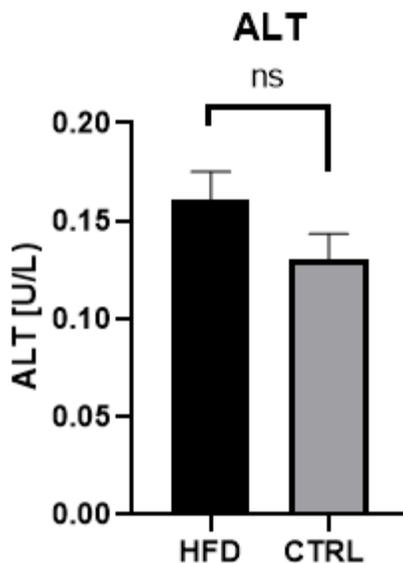


Gráfica 7. Cuantificación del área de las gotas lipídicas. El porcentaje de gotas lipídicas es mayor en las ratas HFD. HFD: n=11, Media= 52.95±6.086. CTRL: n= 5, Media=16.72±5.684, p<0.05

Dónde: *** p ≤ 0.001 ** p ≤ 0.01 * p=0.05

7. Cuantificación de la actividad de la enzima ALT en plasma

Cuando la concentración en el plasma sanguíneo de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) es mayor de los valores de referencia, es un indicio de daño hepático. En la **Gráfica 8** la concentración promedio de la ALT en las ratas HFD es ligeramente mayor comparada con las ratas CTRL; sin embargo, esta tendencia no presentó significancia estadística.



Gráfica 8. Concentración ALT.

Los valores obtenidos de la concentración ALT en plasma para ambos grupos.

HFD: n=3, Media= 0.1604±0.015. CTRL: n= 3, Media=0.1307±0.01. En la prueba t de Student HDF vs CTRL no hubo significancia.

8. Western Blots

Los cuatro anticuerpos analizados tuvieron respuestas diferentes, tanto en su fracción nuclear como citoplasmática. YAP y PPAR γ se mostraron solo en la fracción nuclear y las bandas del grupo experimental se notan un poco más saturadas. TAZ fue más heterogéneo, aunque en la muestra 1 y 3 la banda nuclear se nota muy marcada; también la banda citoplasmática de la muestra 5. Las bandas de la muestra 6 en PPAR γ no se distinguieron (**Imagen 5**). En la **Gráfica 9** se comparan las cuantificaciones colorimétricas de solo las fracciones nucleares. En la **Grafica 10** se comparan los grupos experimental y control con solo el anticuerpo TAZ.

La incubación de la membrana con anticuerpo contra MRTF-B no mostro bandas.

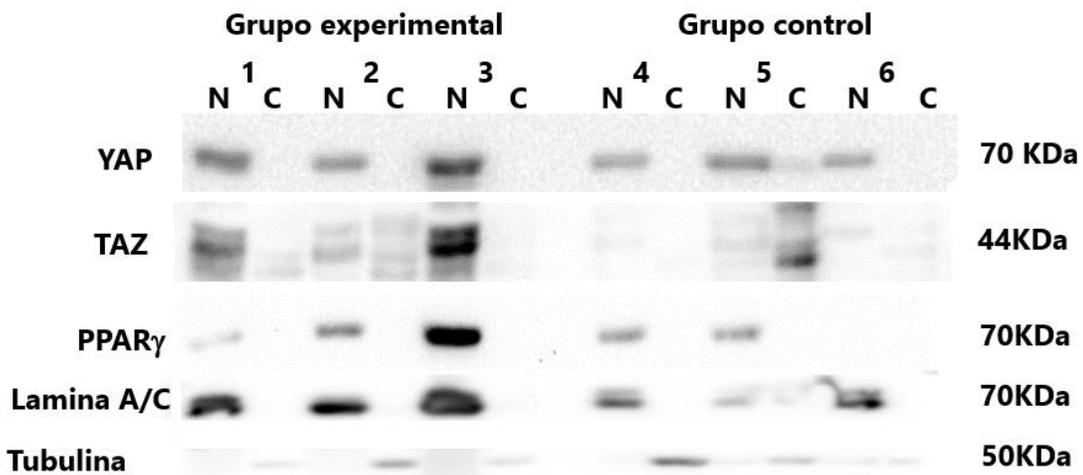
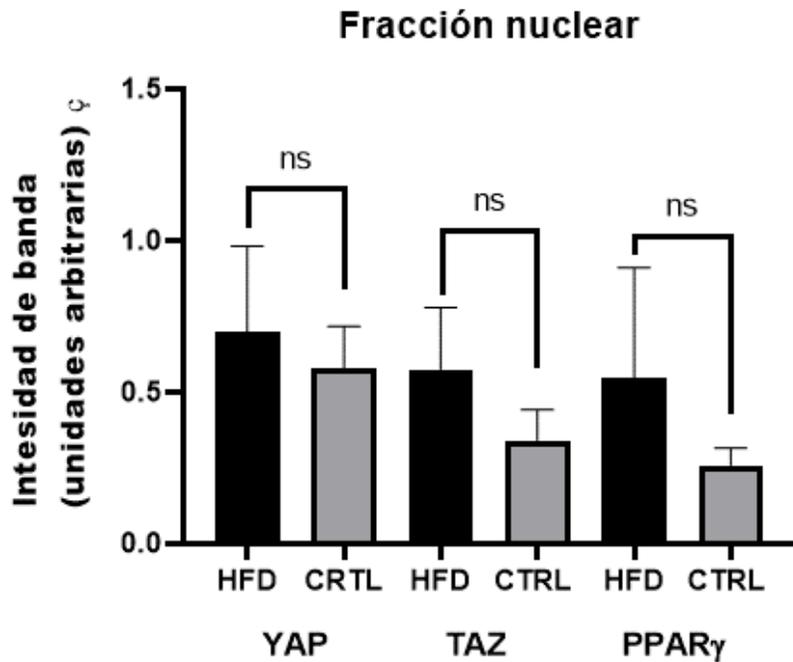


Imagen 5. Experimento de Western Blot. Las bandas de la fracción nuclear del grupo EXP se muestran mayormente marcadas en comparación con las del grupo CTRL con los anticuerpos anti-YAP y anti-PPAR. Las bandas de anti-TAZ se distribuyen tanto en fracción nuclear como en la citoplasmática y también son mayormente marcadas en el grupo EXP. Las bandas Lamina A/C y Tubulina representan la constitución nuclear y citoplasmática, respectivamente en la proteína total.

*N: fraccionamiento nuclear; C: fraccionamiento citoplasmático

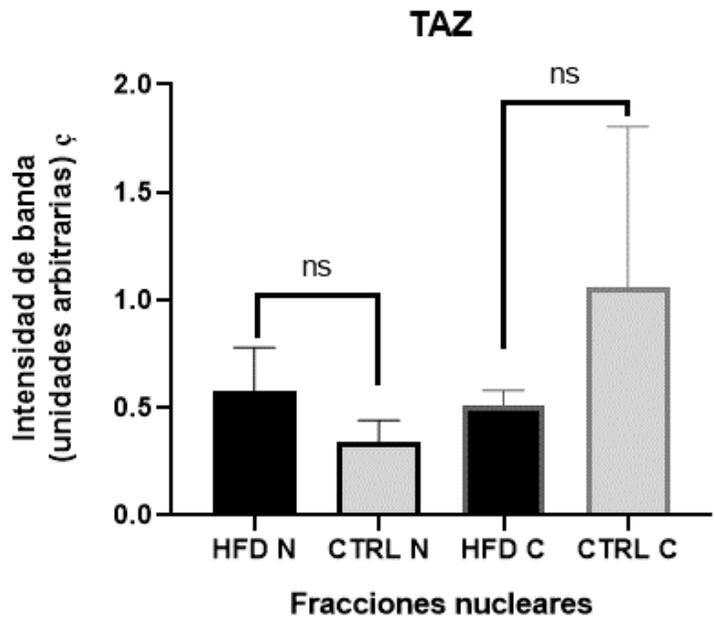


Gráfica 9. Fracción nuclear. La densitometría de las bandas de la fracción nuclear y su normalización dio como resultado una intensidad promedio de bandas mayor en el grupo EXP. En la prueba t de Student no se mostró significancia.

YAP EXP: n=3, Media=0.7005±0.2815. CTRL: n= 3, Media=0.5795±0.137. p=0.7189

TAZ EXP: n=3, Media=0.5753±0.204. CTRL: n= 3, Media=0.3408±0.1002. p=0.3605

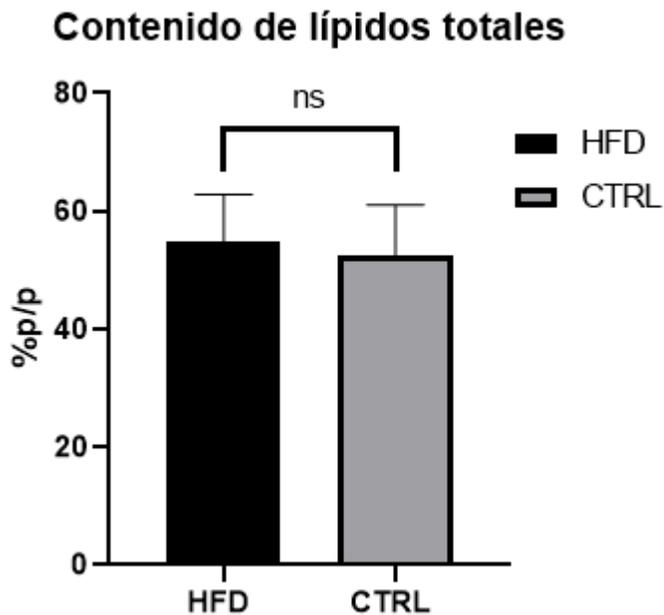
PPAR EXP: n=3, Media=0.5458±0.3654. CTRL: n= 3, Media=0.2592±0.057. p=0.5878



Gráfica 10. Fracciones nucleares y citoplasmáticas del anticuerpo TAZ. Existe una mayor concentración de TAZ en la fracción nuclear del grupo EXP y una mayor concentración en el citoplasma del grupo CTRL. En la prueba t de Student no se encontró significancia.

9. Contenido de lípidos totales

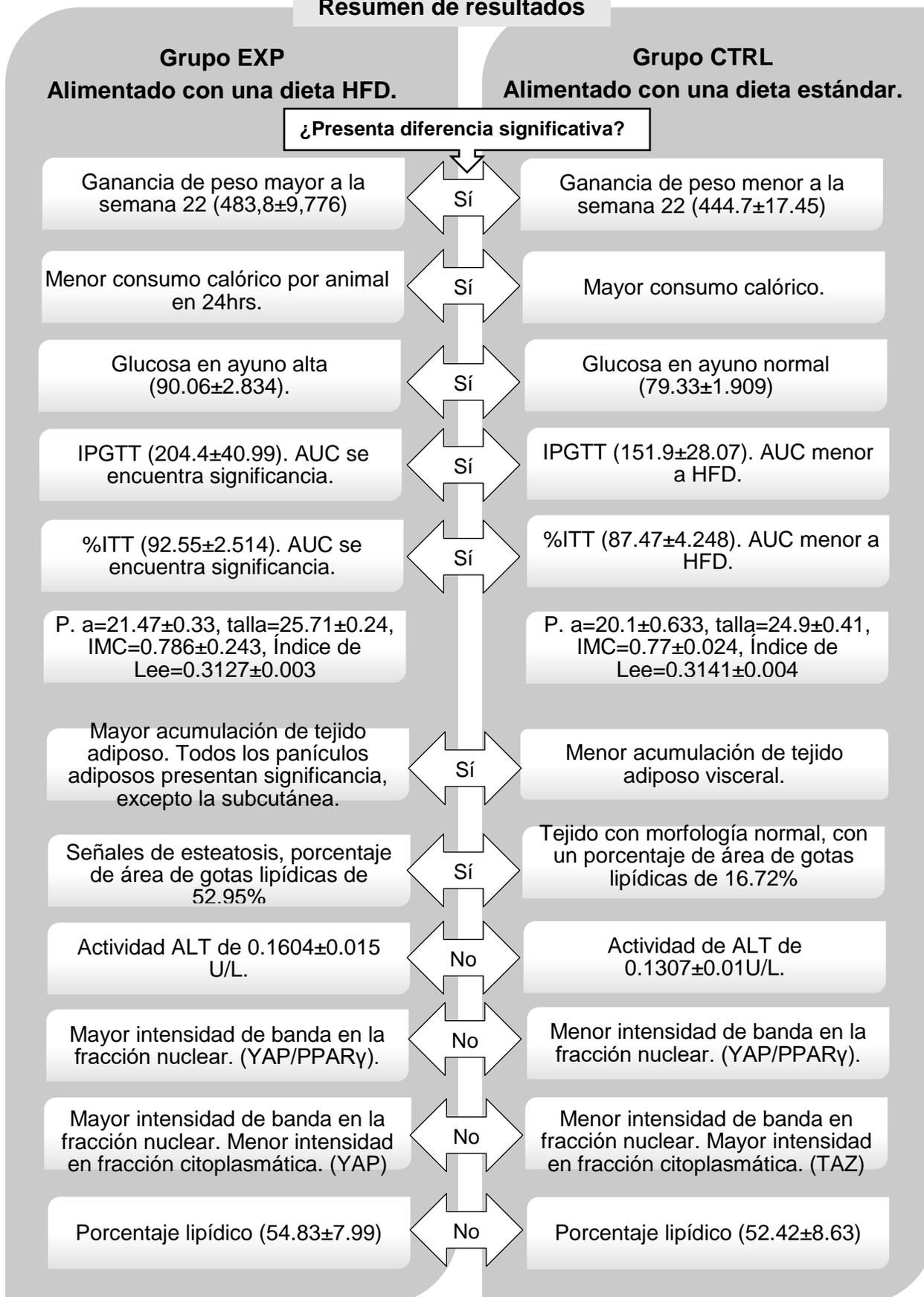
Los porcentajes de contenido de lípidos en las muestras fueron similares, sin alcanzar diferencia significativa.



Gráfica 11. Extracción de lípidos.

Comparación de porcentajes promedio de lípidos en las muestras EXP y CTRL. En la prueba t de Student no se encontró significancia. EXP n=7, Media=54.83±7.993. CTRL n=5, Media=52.42±8.631

Resumen de resultados



Discusión de resultados

El experimento demuestra que alimentar ratas Wistar con una dieta alta en grasa promueve una ganancia de peso corporal y la acumulación de tejido adiposo visceral. Las ratas del grupo EXP presentaron una ganancia de peso mayor durante las semanas del experimento, aunque su consumo calórico fue menor. De acuerdo a de Wit y colaboradores (2012) los mecanismos de disipación de energía son diferentes de acuerdo al tipo de grasa que contenga una dieta. Las formas más comunes de disipación de energía son mediante la termogénesis y mediante la lipogénesis de novo en el hígado y tejido adiposo blanco. (de Wit, 2012)

La termogénesis inducida por dieta se relaciona con la energía requerida para la absorción intestinal, los pasos iniciales del metabolismo y el almacenamiento de nutrientes. Esta energía es diferente para cada nutriente, siendo del 0 al 3% para grasas, del 5 al 10% para carbohidratos y del 20 al 30% para proteínas. (Westertep, 2004) La composición de la dieta CTRL contenía más proteínas y carbohidratos, y menos grasa que la HFD; por lo tanto, podemos suponer que la energía requerida para la asimilación y almacenamiento era mayor para esta dieta. También se ha visto que los ácidos grasos saturados no logran suprimir la lipogénesis hepática *de novo*, en comparación con los ácidos grasos insaturados. (Shillabeer, 1990) La dieta HDF es rica en ácidos grasos saturados provenientes de la manteca de cerdo que la componen.

Respecto a la glucemia en ayuno, se encontraron valores significativamente más altos ($> 10\text{mg/dL}$) en ratas del grupo EXP; lo que nos indica alteraciones en la homeostasis de glucosa plasmática. Las pruebas de tolerancia de glucosa (IPGTT), así como de sensibilidad a la insulina (ITT) muestran diferencias entre los dos grupos experimentales. Donde, todos los valores de la curva en el grupo EXP son mayores que los del grupo CTRL. El decaimiento de glicemia tiene un comportamiento lineal del tiempo 15 al 90 en el grupo EXP, mientras que en el CTRL entre el tiempo 15 y 30 la caída de glicemia es pronunciada y finalmente tiene un decaimiento con comportamiento lineal.

En la curva ITT, nuevamente el grupo EXP presenta valores de glucemia de ayuno mayores que el grupo CTRL. Adicionalmente, no todos los animales del grupo CTRL terminaron la prueba; ya que presentaron valores de hipoglicemia ($<50\text{mg/dl}$) y salieron del experimento. Esto nos sugiere una menor sensibilidad a la insulina en el grupo EXP, debido a una posible resistencia a la insulina.

En el análisis somatométrico, el IMC y el índice de Lee son parámetros para determinar el grado de obesidad. (Novelli, 2007) Sin embargo, en este estudio, no mostraron diferencias entre las dietas. La dieta HFD del grupo EXP provocó un perímetro abdominal mayor, podemos atribuirlo a la acumulación visceral de tejido adiposo. Sin embargo, la recolección del tejido adiposo permitió comprobar que las ratas del grupo EXP presentaban un porcentaje de grasa corporal mayor que el grupo CTRL. El peso de los panículos de tejido adiposo visceral fue significativamente mayor en el grupo EXP. Los panículos de tejido adiposo supragenital, retroperitoneal y peripancreático forman parte del tejido adiposo visceral; todos ellos presentaron un mayor peso que su contraparte en ratas CTRL. Por otro lado, el tejido adiposo subcutáneo no presentó significancia entre los grupos.

El tejido adiposo visceral está asociado mayormente con la resistencia a la insulina y el riesgo de desarrollar DM2, en comparación con el depósito de grasa subcutánea. (Kn, 2014) (Wagenknecht, 2003) Adicionalmente, existe una estrecha relación entre la alta morbilidad y un estado inflamatorio exagerado cuando existe un exceso de grasa visceral. (Mittal, 2019)

El análisis histológico de las biopsias hepáticas con la tinción tricrómica de Masson, mostró niveles de esteatosis hepática en las ratas EXP; aunque no se presentó una acumulación de fibras de colágeno. El NAFLD comprende un amplio espectro de la enfermedad y se refiere a pacientes con esteatosis simple, a casos con esteatohepatitis no alcohólica y enfermos con fibrosis que progresan a cirrosis. (Tsochatzis, 2018) Probablemente el daño hepático no fue tan grave debido al tiempo de la experimentación y que al finalizar el experimento las ratas aun no eran consideradas de mediana edad. (Ghasemi, 2021)

En las laminillas teñidas con RO, se observó diferencia en la acumulación de lípidos en los hepatocitos entre los dos grupos experimentales. La acumulación de grasa hepática es un sello distintivo del NALFD. (Liu, 2010) La resistencia a la insulina se asocia a un aumento de la lipólisis y la liberación de FFA, que se vuelven disponibles para absorción hepática y la reesterificación a TAG. (Puri, 2009) Los FFA sensibilizan a los hepatocitos a la apoptosis mediada por ácidos biliares. (Puhl, 2008)

La enzima ALT es un biomarcador de daño hepático, la lesión de los hepatocitos da como resultado una alteración de la permeabilidad de la membrana celular, que provoca una liberación excesiva de transferasas. (Kasarala, 2016) A pesar de que los valores entre ambos grupos fueron similares, en el grupo experimental fueron

ligeramente más altos, sugiriendo el inicio de daño hepático. Nuevamente se plantea que el tiempo de experimentación no fue el óptimo para tener significancia.

Mediante la técnica Western Blot, se observó mayor intensidad de banda en las fracciones nucleares con los anticuerpos YAP y PPAR γ , mientras que TAZ se mostró más concentrado en la fracción nuclear del grupo EXP y en la fracción citoplasmática del grupo CTRL. Una mayor intensidad de banda indica una mayor cantidad de dicha proteína.

A pesar de que en ambos grupos se encontró a la proteína YAP translocada al núcleo, hubo una mayor concentración en el grupo EXP. Al estar en el núcleo sabemos que YAP se encuentra desfosforilado; por lo tanto, se encuentra en su estado activo. Sallum y colaboradores (2021) encontraron que la expresión del gen codificante para YAP tenía relación con el aumento de la etapa de fibrosis, sugiriendo un papel causal de YAP en la fibrosis relacionada con NAFLD. En su estudio aparte de la demostración de un mayor marcaje de YAP en pacientes que presentaban fibrosis y/o esteatosis, se evaluó la fosforilación de YAP mediante la cuantificación de esta en el residuo serina 127 (S127). (Salloum, 2021) Podríamos sugerir anexar un análisis como el de Sallum para comprobar que YAP se encuentra mayormente fosforilado en el grupo CTRL. También podríamos concluir que tenemos un grado de fibrosis leve, lo cual se refleja en la insignificancia entre la concentración nuclear de YAP en el grupo EXP y CTRL.

El comportamiento de TAZ sugiere una mayor concentración nuclear en el grupo EXP, lo cual nos indica su activación. En contraste, existe una mayor concentración citoplasmática de TAZ en el grupo control. Wang y colaboradores (2016) demuestran que la concentración de TAZ es mayor en hígados con esteatohepatitis que en el hígado normal. Además, el silenciamiento de YAP revierte la inflamación hepática, la muerte de hepatocitos y la fibrosis, pero no la esteatosis. En el estudio se concluye que TAZ interfiere en progresión de NALFD a hesteato-hepatitis; sin embargo, no es el responsable de la generación de esteatosis. (Wang X. Z., 2016)

En el estudio de Songtao Yu y colaboradores (2003), se demostró que la sobreexpresión de PPAR γ inducía esteatosis hepática en ratones. En nuestro trabajo se observó una concentración mayor de PPAR γ en el grupo EXP. Adicionalmente, solo se observó la presencia de la proteína en dos de las tres muestras del grupo control. Por lo tanto, la presencia de esteatosis hepática se le atribuye a una mayor activación de PPAR γ .

Finalmente, al realizar la extracción de lípidos, no se observó una diferencia significativa. Asimismo, la nula observación de la proteína MRTF-B nos confirma

que nuestra experimentación no tuvo el desarrollo de un fenotipo completo de NAFLD en el tiempo asignado. Probablemente el aumento del tiempo de experimentación, así como una dieta enfocada al desarrollo de NALFD; como la rica en grasas definida por L-aminoácidos y deficiente de colina (CDAHFD, por sus siglas en inglés), (Fang, 2022) generen una evidencia clara de cómo se comportan los factores transcripcionales estudiados en el desarrollo de la NAFLD.

Conclusiones

La biomecánica entre células es importante, en el hígado existe una biomecánica viscoelástica, pero cuando el entorno de sus células es perturbada el comportamiento entre ellas cambia. El daño provocado por la acumulación de gotas lipídicas dentro del hepatocito es reparado con la acumulación de fibras de colágeno, las cuales interfieren en la comunicación entre células dificultando las funciones bioquímicas realizadas por el hígado. Las funciones bioquímicas son esenciales para un buen metabolismo lipídico.

La dieta alta en grasas (HFD) generó obesidad en las ratas EXP y también algunos desordenes metabólicos, como la resistencia a la insulina. Las laminillas obtenidas de porciones de hígado sugieren acumulación de grasa. Sin embargo, la dieta no fue suficiente para que en las pruebas de ALT se observara una diferencia significativa entre el grupo CTRL y el EXP. Se logró el fraccionamiento nuclear y citoplasmático de las proteínas plasmáticas y la realización de Western Blots. Los resultados sugieren que el daño hepático no fue lo suficiente grave como para clasificarlo como NAFLD.

Perspectivas

Utilizar una dieta especializada para desarrollar NAFLD en ratas a sus 22SPN o en su defecto mantener la dieta HFD por un mayor tiempo.

Estudiar un mayor número de proteínas que se han visto involucradas en desordenes metabólicos, para saber cuál es su prevalencia en el desarrollo de NAFLD.

Hacer un estudio con un indentador mecánico, para conocer del cambio de la biomecánica (viscoelasticidad) del hígado.

Referencias bibliográficas

- Ahmadian, M. S. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*, 19(5), 557-566. doi: 10.1038/nm.3159.
- Al-Hetty, H. R. (2022). SRF/MRTF-A and liver cirrhosis: Pathologic associations. . *Journal of Digestive Diseases*, 23(11), 614-619. doi:10.1111/1751-2980.13150.
- Bataller, R., & Brenner, D. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209 - 218. doi:10.1172/JCI24282.
- Boron, W., & Boulpaep, E. (2002). *Manual de Fisiología Médica*. Barcelona: Elsevier España.
- Bourgeois, F. A. (1983).). Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *The British Journal of Nutrition*, 49(1),17-26. doi:10.1079/bjn19830006.
- Buettner, R. S. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(4), 798-808. doi:10.1038/oby.2007.608.
- Burns, K. A. (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(8), 952-960. doi: 10.1016/j.bbali.2007.04.018.
- Cantrell, C., & Mohiuddin, S. (23 de Mayo de 2023). *National Library of Medicine*. Obtenido de Biochemistry, Ketone Metabolism. StatPearls Publishing.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554523/>
- Castro S., L., & Silva P., G. (2015). Hígado graso no alcohólico / Non-alcoholic fatty liver disease. *Rev. Méd. Clín. Condes*, 26(5), 600-612, <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.09.006>.
- Chaudhuri, O. C.-W. (2020). Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature*, 584, 535-546, <http://doi.org/10.1038/s41586-020-2612-2>.

- Chiang, J. (2014). Liver physiology: Metabolism and detoxification. . *En Pathobiology of Human Disease.* , 17770- 1782, <https://doi.org/10.1016/B978-0.12-386456-7.04202-7>.
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of Medical Science: AMS*, 9(2), 191-200, doi: 10.5114/aoms.2013.33181.
- Cuevas, M., & Alonso, K. (2016). DISLIPIDEMIA DIABÉTICA. *Revista médica Clínica Las Condes*, 27(2), 152-159, doi: 10.1016/j.rmcl.2016.04.004.
- Davidson, M., & Pradeep, P. (27 de Junio de 2023). *MSD Manual Professional Edition*. Obtenido de Overview of Lipid Metabolism. : <https://www.msmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/lipid-disorders/overview-of-lipid-metabolism>
- de Wit, N. D.-V.-v. (2012). Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(5), 589-599, doi: 10.1152/ajpgi.00488.2011.
- Driskill, J. H. (2021). The Hippo pathway in liver homeostasis and pathophysiology. . *Annual Review of Pathology*, 299-322, doi: 10.1146/annurev-pathol-030420-105050.
- DuFort, C. C. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12, 308-319, doi: 10.1038/nrm3112.
- El Ourrat, D., Isaac, R., Lee, Y., Young Oh, D., Wollam, J., Lackey, D., . . . Olefsky, J. (2021). Taz is a negative Regulator of PPARγ activity in adipocytes and Taz deletion improves insulin sensitivity and glucose tolerance. *Cell metab*, 31(1), 162-173, doi: 10.1016/j.cmet.2019.10.003.
- ENASUT. (21 de Abril de 2023). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018*. Obtenido de Porcentaje de la población de 20 años y más de edad con sobrepeso y obesidad, por sexo 2012-2018: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/informes.php>
- Engin , A. (2017). What is lipotoxicity? *Advances in Experimental Medicine and Biology. Pub Med*, 960, 197-220, doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_8.

- Erickson , S. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Lipid Research*, 412-416, doi: 10.1194/jlr.R800089-JL200.
- Eslam, M., Valenti, L., & Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*, 68(2), 268 - 279, doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.003.
- Ezquerro, E., Vázquez, J., & Barrero, A. (2008). Obesity, metabolic syndrome, and diabetes: Cardiovascular implications and therapy. *Revista Española de Cardiología*, 61(7), 752-764, PMID: 18590648.
- Fang, T. W. (2022). Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies. . *International Journal of Biological Sciences*, 18(15), 5681-5697, doi: 10,7150/ijbs.65044.
- Garcia-Porrero, J., & Hurlé Gonzalez, J. M. (2005). *Anatomía humana*. México: Médica Panamericana S.A de C.V.
- Ghasemi, A. J. (2021). The laboratory rat: Age and body weight matter. . *EXCLI Journal*, 1431-1445, doi: 10.17179/excli2021-4072.
- Graham, D. M. (2016). Mechanotransduction and nuclear function. *Current Opinion in Cell Biology*, 40, 98-105, doi: 10.1016/j.ceb.2016.03.006.
- Hall, J., & Hall, M. (2021). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. ELSEVIER.
- IDF. (20 de marzo de 2023). *International Diabetes Federation*. . Obtenido de Type 2 diabetes. : <https://idf.org/about-diabetes/type-2-diabetes/>
- Institute, M. (13 de Abril de 2023). *MBINFO Defining Mechanobiology*. Obtenido de What is the Hippo-YAP/TAZ tumor-suppressor pathway?: <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/signaling-pathways/what-is-the-hippo-yaptaz-tumor-suppressor-pathway/>
- International Diabetes Federation*. (20 de marzo de 2023). Obtenido de Consensus world wide definition of the metabolic syndrome.: www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html
- Janmey, P. A. (2013). From tissue mechanics to transcription factors. *Research in Biological Diversity*, 86(3), 112-120, doi: 10.1016/j.diff.2013.07.004.
- Johnson, A., & Olefsky, J. (2013). The origins and drivers of insulin resistance. *CellPress*, 152(4), 673-684, doi: 10.1016/j.cell.2013.01.041.

- Juanola, O., Martínez Lopez, S., Francés, R., & Gómez Hurtado, I. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease: Metabolic, genetic, epigenetic and environmental risk factors. *Non-alcoholic fatty liver disease: Metabolic, genetic International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5227, doi: 10.33907/ijerph18105227.
- Kasarala, G. T. (2016). Standard liver tests: Standard Liver Tests. *Clinical Liver Disease*, 8(1), 13-18, doi: 10.1002/cld.562.
- Kn, B. P. (2014). Quantification of abdominal fat depots in rats and mice during obesity and weight loss interventions. *PloS One*, 9(19):e108979, doi: 10.1371/journal.pone.0108979.
- Kruepunga, N., Hakvoort, T., Hikspoors, J., Kohler, S., & Lamers, W. (2019). Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1865(5), 869-878, doi: 10.1016/j.bbadis.2018.05.019.
- LaBrecque, D., Abbas, Z., Anania, F., Ferenci, P., Khan, A., Goh, K., . . . LeMair, A. (2014). S., World gastroenterology organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48(6), 467- 473, doi: 10.1097/MCG.000000000000116.
- Liu, Q. B. (2010). The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in Health and Disease*, 9, 42, doi: 10.1186/1476-511X-9-42.
- Lutz, T. A. (2012). Overview of animal models of obesity. . *Curr Protoc Pharmacol*, 5.61.1-5.61.18, doi: 10.1002/0471141755.ph0561s58.
- Mannaerts, I. L. (2015). The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. . *Journal of Hepatology*, 63(3), 679-688, doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.011.
- Marcano, Y., Torcat, J., Ayala, L., Verdi, B., Lairret, c., Maldonado, M., & de Vegas, J. (2006). Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 4(1), 15-21. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102006000100003&lng=es&tlng=es.
- Mexico: instituto mexicano del seguro social. (12 de Abril de 2023). Obtenido de Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hepática grasa no alcohólica

del adulto.:

<http://www.imss.gob.mx/profesionales/guiasclinicas/pages/guias.aspx>

- Mittal, B. (2019). Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. *The Indian Journal of Medical Research*, 149(5), 571-573, doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1910_18.
- Nassir, F., Rector, R., Hammoud, G., & Ibdah, J. (2015). Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology & Hepatology*, 11(3), 167-175, PMID: 27099587.
- Nelson, D., & Cox, M. (2021). *Principles of Biochemistry*. W.H.FREEMAN & CO LTD.
- Novelli, E. L. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. . *Laboratory Animals*, 41(1), 111-119, doi: 10.1258/00236770779399518.
- OECD. (24 de Noviembre de 2022). Obtenido de The heavy burden of obesity and the economics of prevention. En *The Heavy Burden of Obesity* : <https://www.oecd.org/els/the-heavy-burder-of-obesity-67450d67-en.htm>.
- Ogawa, S. M. (2016). Relationship between liver tissue stiffness and histopathological findings analyzed by shear wave elastography and compression testing in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *Relationship between liver tissue stiffness and histopathological findings analyzed by she Journal of Medical Ultrasonics*, 43(3), 355-360, doi: 10.1007/s10396-016-0698-9.
- Pancieria, T. A. (2017). Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(12), 758-770, doi: 10.1038/nrm.2017.87.
- Puri, P. W.-K. (2009). The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(6), 1827-1838, doi: 10.1002/hep.23229.
- Pusl, T. W. (2008). Free fatty acids sensitize hepatocytes to bile acid-induced apoptosis. . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(3), 441-445, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.113.
- Rojas Lemus, M., Milán Chávez, R., Delgado Medina, A., Bizarro Nevares, P., Cano Gutiérrez, G., Cafaggi Padilla, D., . . . Fortoul Van der Goes, T. (2017). El hepatocito como un ejemplo de interacción entre la biología

celular y las rutas metabólicas. . *Revista de la Facultad de Medicina* , 60(2), 52-58.

- Rouvière, H (2005). Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional (Vol. tomo 2). Barcelona, España. MASSON S. A.
- Salloum, S. J.-H. (2021). Fatty acids activate the transcriptional coactivator YAP1 to promote liver fibrosis via p38 mitogen-activated protein kinase. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(4), 1297-1310, doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.06.003.
- Saxena, R. N.-M. (2022). Insights from a high-fat diet fed mouse model with a humanized liver. . *PloS One*, 17(5), 260-268, doi: 10.1371/journal.pone.0268260.
- Shillabeer, G. H. (1990). Hepatic and adipose tissue lipogenic enzyme mRNA levels are suppressed by high fat diets in the rat. . *The Journal of Lipid Research*, 31(4), 623-631, PMID: 2191066.
- Shivashankar, G. V. (2019). Mechanical regulation of genome architecture and cell-fate decisions. *Current Opinion in Cell Biology*, 56, 115-121, doi: 10.1016/j.ceb.2018.12.001.
- Simon, G., Soma Poór, V., Heckmann , V., Kozma, Z., & Molnár, T. (2020). The effect of steatosis and fibrosis on blunt force vulnerability of the liver. *International Journal of Legal Medicine*, 134(3), 1067-1072, doi: 10.1007/s00414-019-02245-4.
- Soca, M., & Pedro Enrique. (20 de marzo de 2023). *ACIMED*. Obtenido de Dislipidemias: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352009001200012&lng=es&tlng=es.
- Sun, P. Z. (2019). Maintenance of primary hepatocyte functions in vitro by inhibiting mechanical tension-induced YAP activation. *Cell Reports*, 29(10), 3212-3222, doi: 10.1016/j.celrep.2019.10128..
- Swarup, S., Goyal, A., Grigorova, Y., & Zeltser, R. (2022). *Metabolic Syndrome*. StatPearls.
- Tortora, G., & Derrickson, B. (2005). *Principios de Anatomía y Fisiología*. México: Médica Panamericana S.A de C.V. PMID: 29083742.
- Tresguerres, J. (2005). *Fisiología Humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Tsochatzis, E. A. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease and the interface between primary and secondary care. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 3(10), 509-517. doi: 10.1016/S2468-1253(18)30077-3
- Uauy D, R. M. (2000). Uauy D, Ricard Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus: regulación del metabolismo de los lípidos por receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR). *Revista medica de Chile*, 120(4), 437-446. doi: 10.1016/S2468-1253(18)30077-3
- Udomkasemsab, A. P. (2019). High fat diet for induced dyslipidemia and cardiac pathological alterations in Wistar rats compared to Sprague Dawley rats. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis: Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*, 31(2), 56-62. doi: 10.1016/j.arteri.2018.09.004
- Van der Pal, K., Koopman, A., Lakerveld, J., Van der Heijden, A., Elders, P., Beulens, J., & Rutters, F. (2018). The association between multiple sleep-related characteristics and the metabolic syndrome in the general population: the New Hoorn study. *Sleep Medicine*, 52, 51-57. doi: 10.1016/j.sleep.2018.07.022
- Wagenknecht, L. E. (2003). Insulin sensitivity, insulin secretion, and abdominal fat: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family Study. *Diabetes*, 52(10), 2490-2496. doi: 10.2337/diabetes.52.10.2490
- Wagh, K. I. (2021). Mechanical regulation of transcription: Recent advances. *Trends in Cell Biology*, 31(6), 457-472. doi: 10.1016/j.tcb.2021.02.008.
- Wang, C.-Y. L. (2012). A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 421-433. doi: 10.1007/978-1-61779-430-8_27
- Wang, X. Z. (2016). Hepatocyte TAZ/WWTR1 Promotes Inflammation and Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 24(6), 848-862. doi: 10.1016/j.cmet.2016.09.016
- Westertep, K. R. (2004). Diet induced thermogenesis. *Nutrition & Metabolism*, 1(1). doi: 10.1186/1743-7075-1-5
- White, U., & Tchoukalova, Y. (2014). Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 377-392. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.006

Xu, L. W. (2021). Myofibroblast YAP/TAZ is dispensable for liver fibrosis in mice. *Journal of Hepatology*, 75(1), 238-241. doi: 10.1016/j.jhep.2021.02.026

Bibliografía

Buettner, R., Parhofer, K., Woenckhaus, M., Wrede, C., & Kunz_Schughart, L. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of molecular endocrinology*, 36(3), 485-501. doi:https://doi.org/10.1677/jme.1.01909

Buettner, R., Parhofer, K., Woenckhaus, M., Wrede, C., Kunz Schughart, L., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. (27 de feb de 2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of molecular endocrinology*, 36(3), 485-501. doi:https://doi.org/10.1677/jme.1.01909

Escalona Mugica , J., Barajas Martínez, A., Alfaro Becerril, O., Estrada Rojo, F., Ángeles Castellanos, M., & Ubaldo Reyes, L. (2021). Modelos Animales en el estudio del síndrome metabólico. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-12. doi:https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.373

Anexos

1. Preparación de la dieta alta en grasa (HFD)

- Limpiar la mesa a utilizar con alcohol, sacar todos los materiales e ingredientes. Colocar y ajustar el molino en la mesa.
- Comenzar a moler los pellets de 5001 en el molino, posteriormente, moler en el Nutribullet durante 20s, hasta obtener un polvo fino. Después cernir, para eliminar lo que no se molió completamente.
- Una vez molido el 5001, pesar todos los ingredientes en la balanza, como lo marca la **Tabla A1**.

Tabla A1. Composición de 1Kg de HFD				
	Albumina (g)	Laboratory Rodent Diet 5001 (g)	Aceite de oliva (g)	Manteca de cerdo (g)
1Kg	150	495	177.5	177.5

- Con ayuda de un globo mezclar la manteca con el aceite de oliva, hasta tener una mezcla uniforme. Una vez homogéneo agregar los sólidos y seguir mezclando. Vaciar la mezcla en contenedores previamente etiquetados y almacenar en el refrigerador hasta su uso (máximo 2 semanas).



Imagen complementaria A1: A) Molido de croqueta en un molino manual. B) Remolienda en procesador Nutribullet. C) Cernido de alimento. D) Pesado de los ingredientes de acuerdo a la Tabla A1. E) Mezclado de manteca con aceite de oliva. F) Mezcla final de todos los ingredientes.

2. Técnica histológica

Deshidratación

Colocar las muestras en casetes para biopsia previamente etiquetados, se introducen en un vaso de precipitado (el tamaño dependerá del número de muestras). Las muestras pasarán por un tren de alcoholes de concentraciones ascendentes, xilol y al final en parafina líquida. En la siguiente tabla se muestran el número de disoluciones y los tiempos. Es importante considerar que en ningún momento se debe permitir que el tejido se seque.

Tabla A2. Deshidratación	
Disolución	Tiempo (min)
Alcohol 30%	45
Alcohol 40%	45
Alcohol 50%	45
Alcohol 60%	45
Alcohol 70%	45
Alcohol 80%	45
Alcohol 96%	45
Alcohol 100% I	45
Alcohol 100% II	45
Xilol I	45
Xilol II	45
Parafina I (56°C)	45
Parafina II (56°C)	60

Ya que las muestras se encuentran en la parafina II, están listas para el siguiente paso.

Inclusión

Las muestras se sacan de la parafina líquida II y se dejan escurrir en papel estraza para quitar el exceso. Una vez solidificadas, se pueden almacenar en un lugar fresco y seco hasta su uso.

La inclusión de las muestras se realiza en el centro de inclusión del departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina, el cual cuenta con una cámara térmica para las muestras ($56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), un dispensador de parafina líquida y una plancha de enfriado. Las muestras dentro de su casete se colocan en la cámara térmica y se dejan aproximadamente 1hr. Con ayuda de unas pinzas se saca la muestra del casete y se orienta en un molde metálico, este se llena de parafina en su totalidad evitando la formación de burbujas y se colocan en la plancha de enfriado. Ya sólido el bloque se desmolda y se guarda hasta su corte.

Corte

Previo a cortar, colocar los bloques a cortar al menos 1hr en el congelador o cuarto frío, para que la parafina este lo más sólida posible. Simultáneamente, poner agua en el baño de flotación hasta alcanzar la temperatura adecuada ($40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Colocar el bloque en el micrótopo, ajustar el grosor de los cortes es de 5 micras y orientarlo paralelo a la cuchilla. Comenzar a cortar el bloque hasta obtener la mayor área del tejido. Cortar el bloque seguido para obtener una tira, y ponerla flotando

suavemente en el baño de agua; para que el tejido no presente pliegues. Ya en el portaobjetos las laminillas se almacenan a temperatura ambiente hasta su uso.

Tinción

Las laminillas se colocan en una canasta porta laminillas y se colocan en un horno a $(56 \pm 1^\circ\text{C})$ durante 10min o hasta que la parafina excedente se derrita. Pasado el tiempo, quitar el excedente de parafina cuidadosamente con papel y colocarlas en vasos de Coplin, para proceder al protocolo de tinción. En la tabla 5 se muestran los pasos de rehidratación de laminillas.

Reactivo	Tiempo (min)
Xilol I	5
Xilol II	2
Etanol 100% I	2
Etanol 100% II	2
Etanol 96% I	2
Etanol 96% II	2
Agua	Lavados (2 x 1min)

Después de la rehidratación las laminillas se separan para seguir el protocolo de tinción elegida. Tabla 6 pasos de las tinciones Hematoxilina y Eosina (H-E)

Tabla A6. Protocolo para las tinciones HE y Tricrómica de Masson.			
Hematoxilina & Eosina (HE)		Tricrómica de Masson	
Reactivo	Tiempo	Reactivo	Tiempo
Hematoxilina de Gill	5 minutos	Bouin	20 minutos a 56°C
Agua	2 Lavados rápidos	Agua	Lavados hasta que desaparezca el tono amarillo
Carbonato de Litio (1%)	10 segundos	Hematoxilina Férrica	
		Agua	5 lavados rápidos
		Agua destilada	2 lavados rápidos
Agua	2 Lavados rápidos	Fucshina	5 minutos
		Agua destilada	5 lavados rápidos
Eosina amarillenta	1 minuto		
Deshidratación		Ácido fosfotúngtico fosfomolibdico	12 minutos
Etanol 96% I	2 minutos	Azul de anilina	10 minutos
Etanol 96% II	2 minutos	Agua destilada	2 lavados rápidos
Etanol 100% I	2 minutos	Agua acética (1%)	1 lavado rápido
Etanol 100% II	1 minutos	Seguir pasos de deshidratación como se muestra para HE	
Xilol I	2 minutos		
Xilol II	Hasta el montaje		

Terminado el tren de deshidratación las laminillas se sacan del xilol hasta el momento de su montaje. Se limpia el exceso de Xilol con una gasa, sin dañar el

tejido y se añaden de 2 a 3 gotas de resina y se coloca cuidadosamente un cubreobjetos para no generar burbujas. Las laminillas se dejan secar 24hrs y se guardan a temperatura ambiente hasta su observación.

Por otro lado, las laminillas para la tinción de Rojo Oleoso (RO) tuvieron otro tratamiento. Primero se preparó el colorante de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En breve, se disolvieron 0.5g de RO en 100 mL de isopropanol al 60%. Después las laminillas se colocaron en un vaso de Coplin y se procedió a seguir el protocolo (**Tabla A7**)

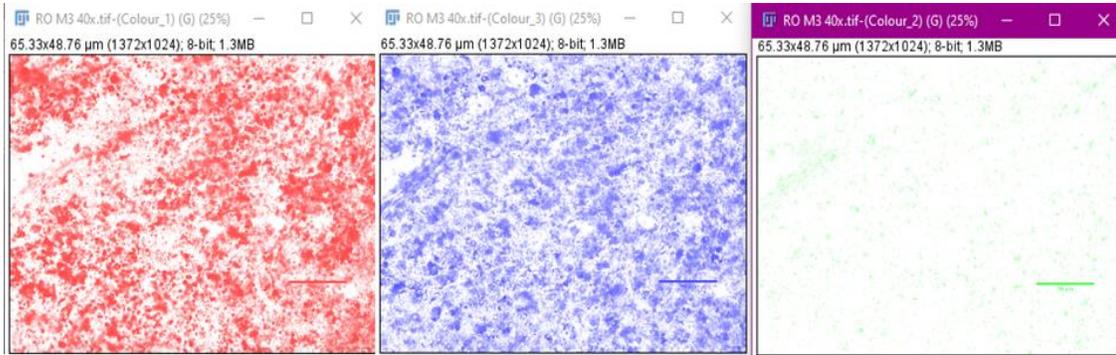
Tabla A7. Tinción Rojo Oleoso	
Sustancia	Tiempo
Isopropanol al 60%	Lavado rápido
Solución de RO	20 min a 60°C
Isopropanol al 60%	Lavado rápido
Agua destilada	Lavado rápido
Hematoxilina de Gill	10 min
Agua destilada	Hasta el montaje

Para el montaje se utilizó un medio de montaje acuoso (Mowiol), se colocaron 2 o 3 gotas sobre el tejido, evitando la formación de burbujas y se colocó el cubreobjetos. Se dejan polimerizar por 24 h y se almacenan a temperatura ambiente.

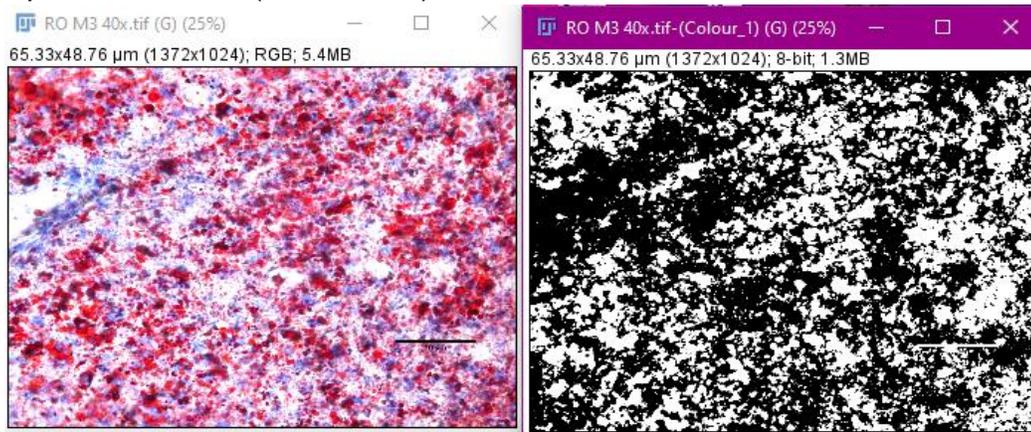
2.1 Cuantificación de gotas lipídicas

Todas las fotos de las laminillas fueron analizadas en el software FIJI (Fiji is just ImageJ)

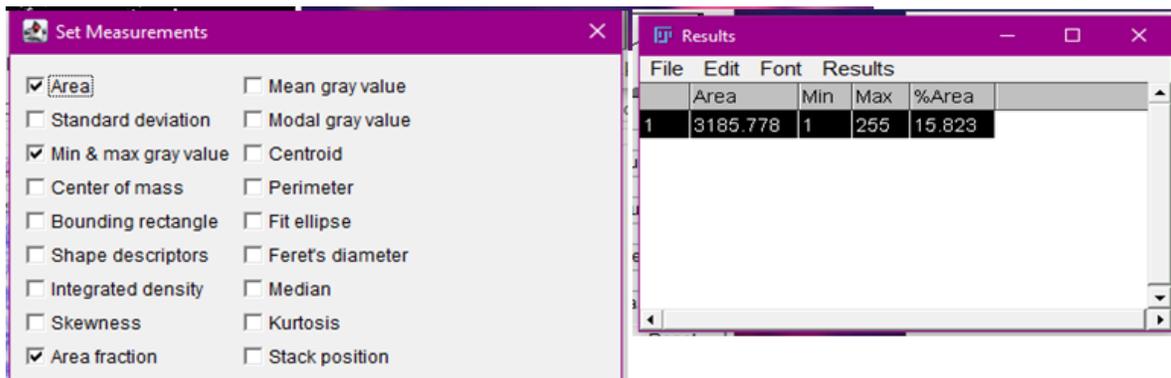
- Ajustar brillo y contraste para definir mejor las gotas lipídicas y calibrar la escala, realizando la equivalencia de micras a pixeles.
- Aplicar deconvolución (RGB), para extraer el canal rojo, el cual contiene las partículas de RO. A partir de este momento solo se trabaja con este canal.



- Aplicar threshold (black-white)



- Previo a analizar las partículas, modificar las propiedades del analizador de partículas marcar el comando “*área fraction*”; finalmente analizar partículas.



3. Lisis y fraccionamiento de tejido hepático

Las muestras se sacan del ultracongelador (-80° C) y se dejan descongelar en una hielera. Previo a la descongelación de las muestras, se preparan las soluciones de lisis para fraccionamiento nuclear y citoplasmático. Las disoluciones a utilizar se muestran en la **Tabla A8**.

Tabla A8. Soluciones homogeneizadoras.

Buffer RIPA X		Solución de homogenización		Inhibidores de fosfatasa en buffer RIPA 1x (núcleos)		Inhibidores de fosfatasa en buffer RIPA 5X (citoplasma)	
Tis-HCl pH 7.4	250mM	4ml por trozo de hígado (~1cm) Aforar a 4ml con agua desionizada		Por cada mililitro de RIPPA 1x agregar:		Por cada mililitro de RIPPA 5x agregar:	
NaCl	750mM						
EDTA	5mM						
Desoxicolato de sodio (DOC)	2.5%	Sacarosa	0.342g	Ortovanadato de sodio (Na ₃ VO ₄)	10mL	Na ₃ VO ₄	10mL
		Imidazol (1mM)	120mL				
Nonidet P-40	5%			Pirofosfato de sodio (NaPPi)	10mL	Nappi	10mL
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	0.5	Na ₃ VO ₄	40mL	Floruro de sodio (NaF) (Complete™) cocktail inhibidor de proteasas	25mL	NaF	25mL
		Nappi	40mL				
		NaF	100mL				
		Complete™	100mL				

Dejar todas las disoluciones de fraccionamiento en la hilera para conservarlas frías. Una vez descongeladas las muestras de hígado, colocar 4ml de la disolución de homogenización en el tubo de ensayo de maceramiento y el fragmento de tejido hepático. Comenzar a macerar hasta que las células estén en su mayoría lisadas, esto se comprueba mezclando 10 μ L de la disolución macerada con 10ml de azul de tripano observando en el microscopio. Todo el procedimiento anterior se realiza con las muestras y disoluciones en la hielera.

Una vez que las células están lisadas se pasa el homogenizado a tubos tipo Falcón (15mL) y se centrifuga a 2000rpm por 10min a 4°C.

Terminada la centrifugación, se colecta la fracción citoplasmática (más densa) en otro tubo. Ya separadas por fracciones nucleares y citoplasmáticas, se añade 1 mL de buffer RIPA1x a la fracción nuclear y 1mL de RIPA 5x a la fracción citoplasmática. Se pipetea las disoluciones para homogeneizar y se dejan en agitación a 4°C por 90 min.

Pasado el tiempo de lisis, se pasan las fracciones a tubos Eppendorf, centrifugar a máxima velocidad durante 10min, recuperar el sobrenadante y congelar a -80° C.

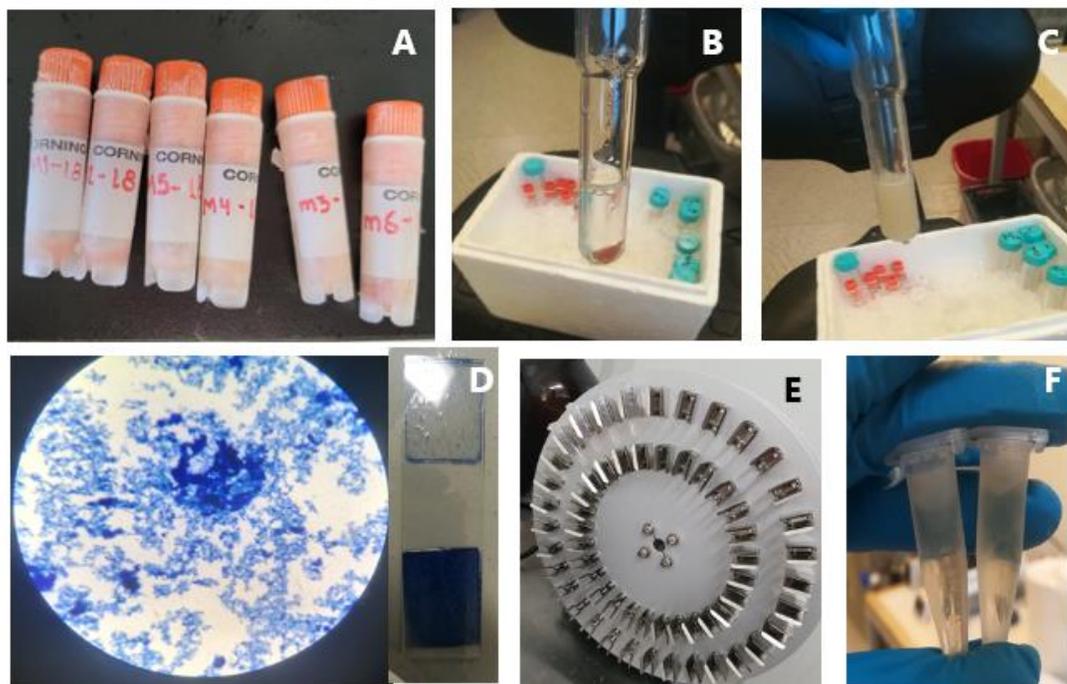


Imagen complementaria A2: A) Muestras almacenadas a 80°C. B) Fracción de hígado en solución de homogenización. C) Hígado macerado. D) Células en azul de tripano. E) Muestras en solución de fraccionamiento, mezclado de 1:30hrs. F) Muestras fraccionadas.

3.1 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Los fraccionamientos nucleares y citoplasmáticos se dejan descongelar en una hielera. Ya descongeladas, se sigue el protocolo (Bio Rad protein Assay). En una placa de 96 pozos se colocan 5 μ L de las muestras a cuantificar, se agregan 25 μ L de reactivo A a cada pocillo y 200 μ L de reactivo B. Se mezclan con un pipeteo suave para no generar burbujas. Después de 15 min se leen en un espectrómetro a 750 nm.

En cada ensayo se prepara una curva de calibración compuesta de 3 a 5 disoluciones de concentraciones estándar [0.25, 0.5, 0.75, 1 y 1.5] mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés).

Con las absorbancias de las muestras y de la curva patrón, se extrapolan las concentraciones de las muestras en [mg/mL].

3.2 Precipitación de proteínas

Se calcula el volumen necesario para precipitar 1 mg de proteína. En un tubo Eppendorf se coloca el volumen calculado y el mismo volumen de una solución de metanol:cloroformo [5:1] se vortexea durante 1 min y se centrifuga a máxima velocidad durante 10min; a partir de la cual se formaran dos fases. Se decanta la fase superior, sin tocar la interfase y se agrega 1 mL de metanol absoluto; nuevamente se vortexea durante 1 min y se centrifuga a máxima velocidad durante 10 min. La proteína queda precipitada en el fondo del tubo, se decanta el sobrenadante y se deja secar para eliminar todo el metanol restante. Finalmente, se agregan 500 μ L de buffer Laemmli 2X, se disuelve la proteína y se deja hervir a 100° C durante 10min.

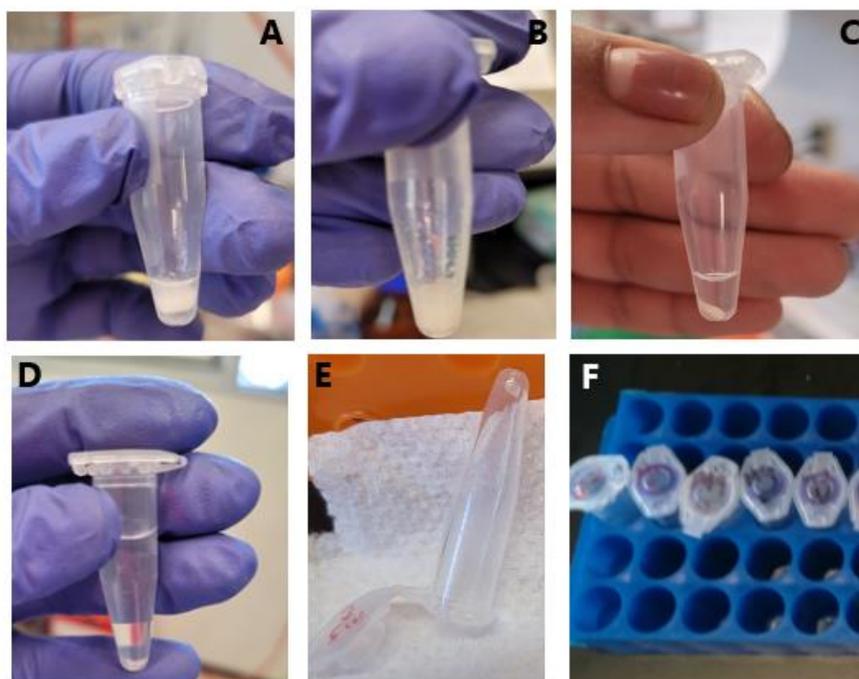


Imagen complementaria 3A. A) Proteínas y mezcla de extracción metanol:cloroformo, volumen 1:1. B) Muestra vortexeada. C) Formación de una pastilla de proteínas después de centrifugar. D) Lavado de la pastilla en metanol absoluto. E) Decantado y secado de pastilla de proteínas. F) Disolución de pastilla en buffer Laemmli y almacenamiento en tubos.

3.3 Elaboración de gel de acrilamida-SDS para electroforesis (SDS-PAGE)

Limpiar las placas de vidrio, peines, separadores (1 mm) y gomas con etanol al 70%. Comenzar a armar el molde para el gel, colocando la goma en una de las placas de vidrio y los separadores. Colocar la otra placa, una encima de la otra y fijar con pinzas; procurar que las pinzas no sobrepasen los separadores. Verificar que no haya derrames agregando agua. Se prepara primero el gel separador y al final el concentrador (**Tabla A9**).

Tabla A9. Reactivos para la elaboración del gel SDS-poliacrilamida			
Gel concentrador al 5% (5mL)		Gel separador al 8% (10mL)	
Reactivos	Volumen (mL)	Reactivos	Volumen (mL)

- Agua	3.4	-Agua	4.6
- Bisacrilamida al 40%	0.83	-Bisacrilamida al 40%	2.7
- Tris 1M (pH 6.8)	0.63	-Tris 1.5M (pH 8.8)	2.5
- SDS al 10%	0.05	-SDS al 10%	0.1
- Persulfato de amonio al 10% (APS)	0.05	-Persulfato de amonio al 10% (APS)	0.1
- TEMED	0.005	-TEMED	0.006

Colocar el peine entre las placas, marcar su borde y otra marca 1 cm abajo. Verter la mezcla del gel separador entre las placas de vidrio y enseguida agregar 300 μ L de isopropanol, se generaran dos fases (tratar de que quede paralela respecto a la mesa). Una vez que el gel polimerice retirar el isopropanol y lavar con agua desionizada, secar lo más que se pueda con papel. Colocar la mezcla del gel concentrador encima del gel separador, evitando la formación de burbujas, llegar casi hasta el borde de las placas e insertar el peine, nuevamente evitando la formación de burbujas. Dejar polimerizar por al menos 25 minutos.

3.4 Electroforesis

Una vez que el gel está listo, se retira el peine y la goma, se coloca dentro de la cámara de electroforesis. La cámara se llena con buffer de corrida (**Tabla 10A**) y se comienzan a cargar las muestras en los pocillos del gel, también se carga el marcador de peso molecular. Todos los pocillos deben estar llenos, los que no llevan muestra se cargan con buffer Laemmli. Se conecta la cámara a una fuente de poder a un amperaje constante y 100 V. Dejar correr el gel por 90 min o hasta que salga el frente de corrida.

3.5 Transferencia a membrana

Terminada la electroforesis, se retira el buffer de corrida y también el gel de las placas de vidrio. Con ayuda de una espátula se saca el gel de entre las placas de vidrio y se corta la parte del gel concentrador. Se le da un lavado en buffer de transferencia (**Tabla 10A**) y se corta una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDFV) de un tamaño similar al del gel, la membrana se humedece en metanol absoluto por 5 minutos. Durante el lavado del gel, se arma la cámara de transferencia y se comienzan a mojar esponjas y papel filtro con buffer de transferencia. Con ayuda de los casetes de la cámara de transferencia se forma un “sándwich” en el siguiente orden: esponja, papel filtro, membrana, gel, papel filtro y esponja (**figura**

A5); para que la transferencia sea eficaz se deben evitar burbujas entre el gel y la membrana. El casete se coloca en la cámara de transferencia y se llena con buffer de transferencia, se conecta a una fuente de poder a un voltaje constante a 320A por 2.5 h.

Tabla 10A. Buffers		
Buffer de corrida	Buffer de transferencia	
	10X	1X
Tris 25 mM Glicina 250mM (grado electroforesis pH 8.3) SDS al 0.1%	Tris base 30.3g Glicina 144g Aforar a 1L agua desionizada Ajustar pH a 8.6	Buffer 10X 100mL Metanol abs.200mL Agua desionizada 700mL

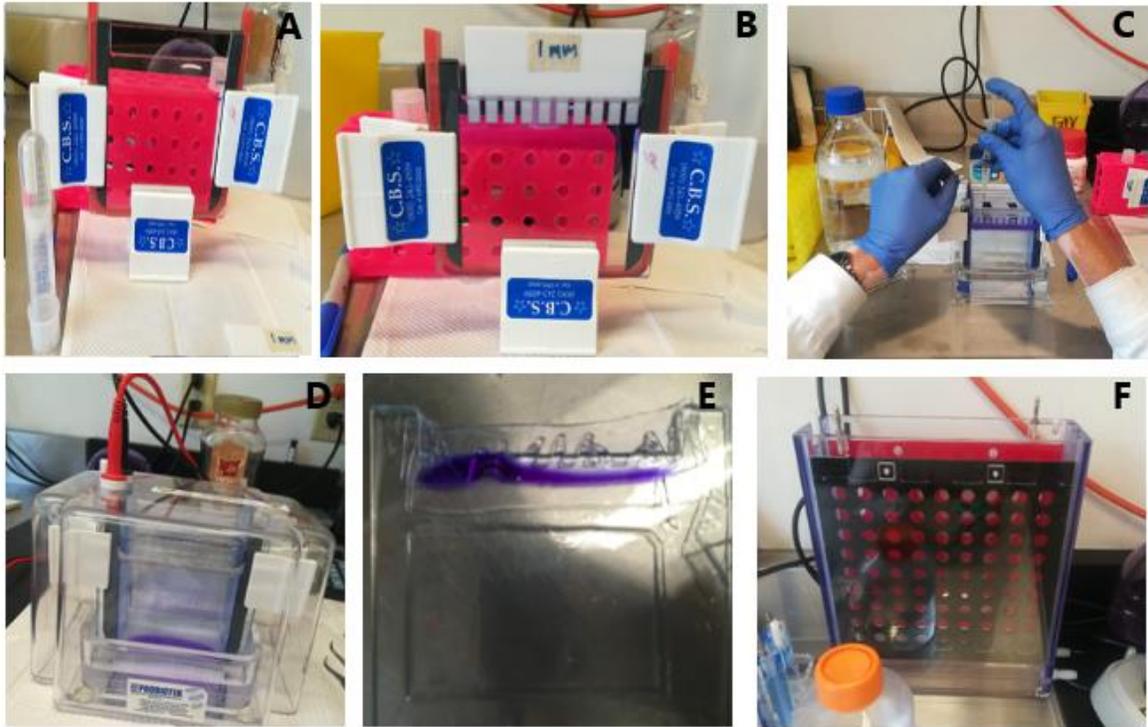


Imagen complementaria A4. A) Muestra de arreglo de elaboración de geles, fabricación de gel separador. B) Arreglo con peine, polimerización de gel concentrador. C) Cargado de las muestras en los pocillos del gel. D) electroforesis de las muestras en el gel de bisacrilamida. E) Recorte de partes innecesarias del gel. F) Cámara de transferencia.

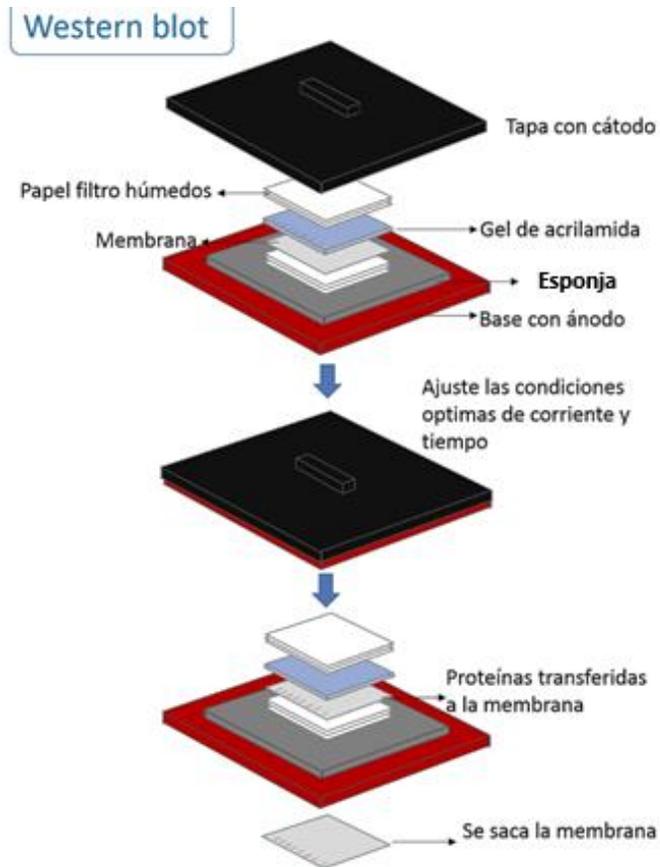


Imagen complementaria A5

Esquema del sándwich para la transferencia de proteínas del gel a la membrana. Imagen tomada de conogasi.org

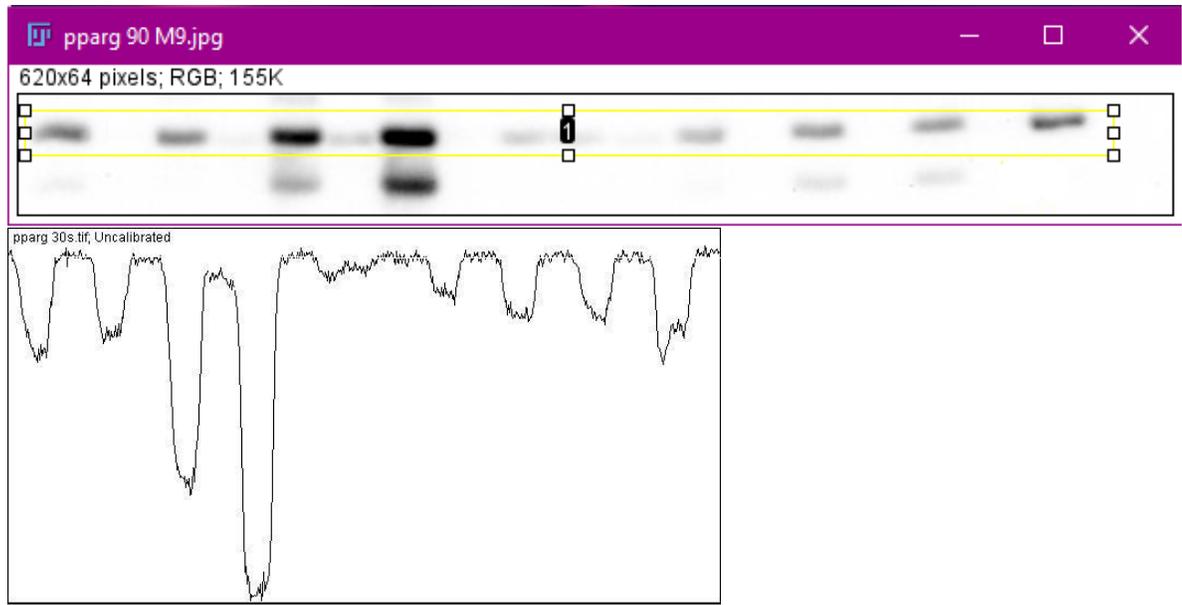
3.6 Inmunomarcaje

Terminada la transferencia la membrana se bloquean los sitios de unión inespecíficos con una solución de leche Svelty® al 5% en buffer Tris (TBS). La membrana se sumerge completamente en la leche y se deja en agitación durante 1 hora. Cuando los sitios inespecíficos ya están bloqueados se procede a colocar el anticuerpo primario.

3.7 Cuantificación y normalización de bandas WB

Todas las fotos fueron analizadas con el software FIJI-ImageJ

- Ajustar brillo y contraste, rotar para que quede pareja la banda y recortarla dejando un borde de al menos medio centímetro.
- Seleccionar con la opción rectangular una de las bandas, presionar CTRL1 + CTRL 3. Nos dará una normal de la banda, eliminar el ruido y con Wand (tracing) tool señalar el área del pico.



Se cuantifican todas las bandas de cada muestra y anticuerpo ocupado.

- Las bandas de los anticuerpos de control de carga nos ayudaran a normalizar la banda de los demás anticuerpos. Simplemente dividir el área obtenida en la banda por el anticuerpo y dividirla entre el valor del área de la banda del control de carga nuclear o citoplasmático.

4. Comité Institucional para el cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).



COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

OFICIO NO. FMED/CI/RGG/091/2019

ASUNTO: Dictamen Proyecto FM/DI/051/2019

Dr. José René Escalona Mugica
Profesor Asociado "C" T.C.
Departamento de Embriología
Presente.

Estimado doctor Escalona Mugica:

Me complace informarle que su proyecto **FM/DI/051/2019** de título **"Efecto de la obesidad paterna sobre la capacidad reproductiva y la programación metabólica de la progenie en un modelo murino de obesidad inducida por dieta"** ha sido revisado y **APROBADO** por las Comisiones de Investigación y de Ética en su sesión ordinaria de fecha **06 de agosto de 2019**, con una vigencia de 3 años a partir de la fecha de la sesión. Registro CICUAL: 012-CIC-2019

Deberá ejecutar el proyecto de acuerdo a lo especificado en el protocolo, tanto en los aspectos metodológicos como en los aspectos éticos y notificar cualquier modificación o enmienda al mismo. Por otro lado para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual en la División de Investigación de esta Facultad, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen. Asimismo le solicitamos nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de agosto de 2019.

LA SECRETARIA TÉCNICA

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

*RGG/ETF.

UnAm
La Universidad
de la Nación