

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

---



**“Rol del ejercicio físico crónico en la regulación de la lipofagia en un modelo de esteatosis hepática, inducida por una dieta alta en grasas”**

Francisco Javier Pino De la Fuente

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE**

**MAGISTER EN Fisiología**

Director de Tesis: Dra. Alejandra Espinosa Escalona

Dr. Rodrigo Troncoso Cotal

**2018**



*Dedicado a mi hermana Yerka y a mi hija María Paz.*

*Para la primera, siempre te llevo en mi corazón, estoy seguro de que nos volveremos a encontrar y disfrutaremos todo lo que nos faltó.*

*Y para mi niña, haz lo que te haga feliz, yo estaré para cuidarte y guiarte, te amo.*

## **Agradecimientos**

Primero quiero agradecer a mis tutores de tesis, la Dra. Alejandra Espinosa y el Dr. Rodrigo Troncoso por recibirme en sus respectivos laboratorios, por sus enseñanzas y correcciones, que me hicieron aprender y poder realizar un gran trabajo. Además, aprendí con respecto al trabajo de laboratorio, trabajo en equipo, comenzar a desarrollarme como investigador y lo más importante conocer a todos los compañeros con los cuales compartí.

A los miembros del LABINAF, en especial a Juan, Laura y Carlos por su ayuda directa en la realización de diversos experimentos y sus consejos para mejorar mi trabajo. Por supuesto a todos los demás también, Díaz, Matías, JC, Edson, Felipe, Claudia, ya que no hubiera podido realizar mi trabajo sin todas esas risas, partidos de ping-pong, escuchar música, los retos, etc. Hicieron que todo este proceso fuera mucho más llevadero, puesto que tuvo altos y bajos, en esos momentos es que se van forjando amistades, que es lo que más valoro de todo este proceso, gracias infinitas muchas bendiciones para todos y que se vayan cumpliendo las metas de cada uno.

También a Camila del departamento de Tecnología Médica, por su paciencia para enseñarme y ayudarme a trabajar. A todos los de la oficina de Tecnología por recibirme de la mejor forma y hacerme sentir bien mientras trabajaba en mi tesis.

A todos mis amigos que siempre se preocuparon por cómo me estaban saliendo las cosas y que cuando me veían decaído me decían que saliera a carretear, a Juan Javier, Gisse, Anne y a todos los que de alguna forma me desearon lo mejor para mi trabajo.

A mis familiares, tíos, primos que siempre me daban sus buenas intenciones. Por último y más importante a mi familia, ya que sin ellos no podría haber tenido el privilegio de seguir estudiando, gracias por darme esa posibilidad y por apoyarme en cada decisión que he tomado. A mi madre por contenerme cada vez que lo necesito, por escucharme, por aguantarme, regalóarme, gracias por todo. A mi papá gracias por apoyarme en las diferentes decisiones que he tomado. A mi hermana por su ayuda siempre que la necesito, por estar incondicionalmente a pesar de todas nuestras diferencias. A mi bebé perdón por el tiempo que dejé de estar contigo por estar trabajando y gracias por tus besos, abrazos, cariños que siempre me llenan de energía para seguir adelante, los amo con todo mi ser, gracias por todo.

Gracias a todas las personas que forman parte de mi vida y que de alguna u otra manera me ayudaron, con un gesto, una palabra, lo que sea, gracias y bendiciones para todos.

## Índice

Resumen .....	6
Abstract.....	8
Introducción.....	10
Obesidad y comorbilidades.....	10
Esteatosis hepática no alcohólica.....	10
Efecto del aumento de ácidos grasos libres en EHNA producto de una dieta alta en grasas .....	12
Autofagia y EHNA .....	13
Lipofagia.....	16
Efecto de las dietas ricas en grasas sobre la autofagia.....	18
Ejercicio físico como terapia no farmacológica en el tratamiento de la EHNA.....	19
Efecto del ejercicio físico sobre la autofagia .....	20
Hipótesis .....	23
Objetivos.....	23
Resultados.....	24
Caracterización del modelo de trabajo.....	24
Evaluación del nivel de esteatosis hepática .....	29
Evaluación de la autofagia .....	32
Discusión .....	36
Materiales y métodos.....	44
Animales y protocolo de alimentación .....	44
Protocolo de ejercicio .....	44
Tamaño de la muestra .....	45
Variables bioquímicas.....	45
Marcadores de autofagia y lipofagia.....	46
Histología.....	47
Triglicéridos intrahepáticos .....	47
Inmunoblot.....	47
Análisis estadístico .....	48
Normas de Bioseguridad.....	48
Bibliografía.....	51

## Resumen

La esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) es una de las patologías más comunes en las sociedades de occidente. La EHNA está fuertemente relacionada con la obesidad y los trastornos asociados a ella, la génesis de esta patología no está del todo clara, debido a los múltiples factores que pueden promover la acumulación de grasa en el hígado. Al contrario, se ha descrito que la autofagia podría contribuir al manejo correcto de los lípidos en las células hepáticas, mediante un proceso específico llamado lipofagia. La autofagia es un mecanismo altamente conservado en células eucariontes y consiste en un proceso catabólico de organelos, proteínas y de constituyentes citoplasmáticos, mediado por los lisosomas. Diversos estudios han descrito que la autofagia está disminuida en condiciones de obesidad y EHNA. Por otra parte, se ha encontrado que el ejercicio físico de tipo aeróbico aumenta los niveles de autofagia. El objetivo de este proyecto es estudiar la regulación de la autofagia/lipofagia en el hígado por el ejercicio físico crónico, en ratones con EHNA inducida por alimentación con una dieta alta en grasas. La hipótesis de esta tesis es: *El ejercicio aeróbico crónico de 8 semanas revierte la disminución de la lipofagia en hígado graso inducido por una alimentación con dieta alta de grasa en ratones.* Los animales utilizados son ratones C57BL/6. 36 ratones divididos en dos grupos fueron sometidos a una alimentación con dieta control (DC) y dieta alta en grasas (DAG) durante 3 meses. Posterior a esos 3 meses estos grupos experimentales fueron sub-divididos en 4, DC n=9, y DC más ejercicio físico (DCE n=9), DAG n=9, DAG más ejercicio físico (DAGE n=9). Los grupos que realizaron ejercicio físico fueron sometidos a un protocolo de ejercicio físico crónico durante 8 semanas, 5 veces por semana. Entre los resultados se encuentra que el ejercicio físico aeróbico crónico mejora la condición física aeróbica tanto de los animales controles como de los sometidos a una dieta alta en grasas. El peso del hígado de ratones sometidos a una dieta alta en grasas más ejercicio es menor en comparación a la dieta alta en grasa sin ejercicio. Se encontró que el ejercicio físico disminuye el daño hepático medido mediante la alanina aminotransferasa y además presenta un mejor metabolismo de la glucosa. El grupo sometido a ejercicio físico y dieta alta en grasas presenta menor área de las gotas de lípidos con respecto al grupo alto en grasas sin ejercicio. Los animales alimentados con dieta alta en grasas presentan mayor relación entre LC3II/LC3I, sin embargo, el ejercicio crónico no cambio esta relación. La lipofagia no presenta diferencias entre los diferentes grupos, encontrando resultados similares en

todos ellos, por lo que el ejercicio físico no estaría induciendo este proceso en el hígado. Conclusiones: el ejercicio físico aeróbico crónico mejora la condición física aeróbica, disminuye el peso del hígado en el grupo sometido a una dieta alta en grasas, reduce el daño hepático, mejora la tolerancia a la glucosa, cambia la morfología de los lípidos intrahepáticos y no modifica el proceso de autofagia/lipofagia. En resumen, el ejercicio físico aeróbico crónico mejora aspectos metabólicos que favorecen la reducción de la esteatosis hepática no alcohólica, por lo tanto, estos resultados sugieren que el ejercicio físico puede ser de ayuda en el tratamiento de esteatosis hepática.

## Abstract

Non-alcoholic Fatty liver Diseases hepatic steatosis (NAFLD) is one of the most common pathologies in western societies. NAFLD is strongly related to obesity and related disorders. However, the genesis of this pathology is not entirely clear, due to the multiple factors that promote the accumulation of fat in the liver. By contrast, it has been described that autophagy could contribute to the correct handling of lipids in liver cells, through a specific degradation process called lipophagy. Autophagy is a highly conserved mechanism in eukaryotic cells and consists of a catabolic process of organelles, proteins and cytoplasmic constituents, mediated by lysosomes. Several studies have described that autophagy is decreased in conditions of obesity and NAFLD. On the other hand, it has been found that aerobic physical exercise increases the levels of autophagy. The objective of this project was to study the if chronic physical exercise regulates regulation of autophagy/lipophagy in the liver in mice with high fat diet-induced NAFLD. The hypothesis of this thesis is "*8-week chronic aerobic exercise reverses the decrease of lipophagy in high fat diet-induced fatty liver in mice.*" The animal model used was C57BL/6 mice. 36 mice were divided into two groups were subjected to a control diet (DC) or high-fat diet (HFD) for 12 weeks. After these 12 weeks, groups were sub-divided into 4 groups, DC (n = 9), and DC plus physical exercise (DCE, n = 9), HFD (n = 9), HFD plus physical exercise (HFDE, n = 9). The groups that performed physical exercise were subjected to a protocol of chronic physical exercise for 8 weeks, 5 times a week. The results showed that chronic aerobic physical exercise improves the aerobic physical condition of both control animals and those subjected to an HFD. The liver weight of mice subjected to a HFD plus exercise is lower compared to the HFD without exercise. It was found that physical exercise reduces liver damage measured by alanine aminotransferase and also improves glucose tolerance. The group subjected to physical exercise and HFD has a lower area of lipid droplets compared to the HFD group. Mice fed with HFD have a higher relationship between LC3II/LC3I, however, chronic exercise does not change this relationship. The lipophagy does not present differences between the different groups, finding similar results in all of them, so that physical exercise would not be inducing this process in the liver. The conclusions are that chronic aerobic exercise improves aerobic fitness, decreases liver weight, reduces liver damage, improves glucose tolerance and changes the morphology of intrahepatic lipids (and autophagy) in mice fed with HFD. In



summary, chronic aerobic physical exercise improves metabolic aspects that favor the reduction of NAFLD, therefore, these results suggest that physical exercise can be of help in the treatment of hepatic steatosis.

## **Introducción**

### **Obesidad y comorbilidades**

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo que resulta de un balance energético positivo en condiciones de exceso de energía y que puede ser perjudicial para la salud de los sujetos que la padecen. La prevalencia de obesidad depende de condiciones económicas, aspectos sociales, estilo de vida y representa una condición común de diferentes poblaciones que viven en ambientes caracterizados por abundantes alimentos ricos en calorías y baja actividad física (1).

Cifras del año 2016 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), muestran que es una enfermedad que ha ido en aumento a nivel mundial con el correr de los años (2); Chile no está exento de esta realidad, según datos del Ministerio de Salud (MINSAL) entre los años 2016-2017, los sujetos con sobrepeso llegan al 39,8% de la población, siendo 31,2% es obeso y un 3,2% obeso mórbido (3). La obesidad es un grave problema de salud pública si se considera que está asociada causalmente con múltiples patologías tales como enfermedades cardiovasculares (4), cáncer (5), esteatosis hepática (6), el síndrome metabólico (7), el cual se define por obesidad visceral, presión arterial elevada, dislipidemia aterogénica y resistencia a la insulina con o sin alteración en el metabolismo de la glucosa (8).

### **Esteatosis hepática no alcohólica**

Dentro de las patologías asociadas a la obesidad se ha descrito que la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) es la manifestación hepática del síndrome metabólico, el cual se define como un conjunto de anomalías metabólicas que se asocian a mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (9,10). Más aún un estudio del año 2015 plantea que la EHNA es un precursor del síndrome metabólico más que una causa (11). La EHNA se desarrolla por un desorden metabólico sostenido en el tiempo e involucra una compleja interacción entre hormonas, nutrición y factores genéticos (12). La EHNA es la enfermedad hepática más común de las sociedades occidentales (13), se sugiere una prevalencia entre un 10% y 31% (14), siendo en el caso de Chile un 23% (15), tal prevalencia ha sido asociada al aumento de la obesidad y la diabetes tipo 2 (16). La EHNA se define como la acumulación de triglicéridos en el hígado (17), su diagnóstico

clínico consiste en tener un 5% o más de esteatosis en el hígado, determinado por técnicas de imágenes o biopsia hepática, excluyendo causas secundarias que puedan acumular grasa en el hígado, como el consumo excesivo de alcohol, infecciones por virus hepatotrofos, consumo de medicamentos hepatotóxicos entre otros (18). Esta patología fue descrita por primera vez en 1980 (19) y se dividió en categorías histológicas, a) EHNA, que incluye pacientes con esteatosis hepática aislada y pacientes con esteatosis e inflamación inespecífica leve y b) esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), la cual se distingue de la primera por la presencia adicional de rasgos de lesión hepatocelular con o sin fibrosis (20). Se ha determinado que esta patología progresa con el tiempo partiendo en la mayoría de los casos como EHNA, entre un 25%-30% progresa a NASH, y 4% a cirrosis, en cambio los sujetos que presentan NASH un 20% puede desarrollar cirrosis (21). Otra herramienta utilizada para diagnosticar la presencia de esta patología es la medición de marcadores sanguíneos, los cuales son enzimas hepáticas. Estas enzimas son la aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y gamma glutamil transpeptidasa, estas a pesar de no ser un marcador tan fiable como los anteriores, igualmente son de utilidad para determinar si hay daño en el hígado lo que podría indicar en conjunto a otros marcadores que un sujeto presenta la patología (21).

Dentro de los factores de riesgo que condicionan el desarrollo de EHNA, se encuentra el consumo de dietas altas en grasas y carbohidratos, siendo otro factor determinante los bajos niveles de actividad física (22). Además, la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina es característica en sujetos con EHNA, en quienes el desarrollo de resistencia a la insulina resulta en (1) aumento de la lipólisis en el tejido adiposo y altos niveles de ácidos grasos libres disponibles para el posterior consumo hepático, (2) disminución en la oxidación de ácidos grasos libres (AGL), (3) incremento de la lipogénesis de *novo* en el hígado y (4) disminución en la liberación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado (23). Por esto, la EHNA puede ser considerada una consecuencia de la resistencia a la insulina (24), ya que los procesos descritos promueven el aumento en el contenido de triglicéridos en el hígado, desarrollando esteatosis hepática (25). Sumado a estas alteraciones en el metabolismo de la insulina, se presentan otras como la hipertrigliceridemia e hiperglicemia, es más, en sujetos que padecen diabetes mellitus tipo 2, entre un 65-85% de los pacientes presentan EHNA (26). Por otra parte en el último tiempo se ha estudiado el rol directo que podría tener el colesterol en el

desarrollo de la EHNA, la acumulación de colesterol en el hígado ha sido asociado a disfunción mitocondrial, estrés de retículo, formación de sustancias tóxicas como oxisteroles, activación de células de Kupffer, entre otros efectos, los cuales en conjunto favorecen un estado de acumulación de triglicéridos e inflamación en el hígado, dañándolo y generando NASH (27).

Las causas de la aparición de EHNA son múltiples, por lo que resulta difícil asegurar cual es la que inicia esta patología, no existiendo certeza si estas son causa o consecuencia de la misma. No obstante, si hay claridad que la EHNA es una enfermedad multifactorial en la que se comprometen diversos órganos, organelos y vías de señalización. Existen diferentes defectos sistémicos que afectan en el desarrollo de la EHNA dentro de estos se encuentran los siguientes: a) disfunción mitocondrial, asociada a una menor  $\beta$ -oxidación y mayor producción de especies reactivas al oxígeno (ROS), b) estrés de retículo endoplasmático y c) estado de inflamación prolongado, dado principalmente por citoquinas pro inflamatorias como, TNF- $\alpha$  e interleucina-6 (IL-6), además de macrófagos pro inflamatorios (28). Estos defectos están asociados a la lipotoxicidad producida por el excesivo aumento de ácidos grasos libres que finalmente causan disfunción y/o muerte celular del hepatocito (29). La lipotoxicidad hepática puede ocurrir en situaciones en que la capacidad de utilizar los ácidos grasos, de almacenarlos y exportarlos está sobrepasada por el flujo de ingreso desde tejidos periféricos, especialmente el tejido adiposo, además la lipogénesis de novo puede estar incrementada (30), facilitando la acumulación de triglicéridos y productos tóxicos derivados de estos como son diacilgliceroles (DAG) (31), ceramidas, que han sido asociados a la generación de resistencia a la insulina, entre otros efectos nocivos. Producto de esto es importante conocer el efecto que producen las dietas con alto contenido de grasas en la EHNA.

### **Efecto del aumento de ácidos grasos libres en EHNA producto de una dieta alta en grasas**

Para estudiar la EHNA se han utilizado diversos modelos animales, donde destaca el uso de roedores (ratones y ratas), debido a su semejanza biológica con los humanos (32). Para inducir EHNA los modelos utilizados son variados, desde dietas deficientes en colina y metionina (MCD), dietas ricas en fructosa, dietas altas en grasas (HFD), hasta modelos genéticos (33,34). Una de las más utilizadas es la HFD, debido al efecto que

esta produce y su semejanza con lo que ocurre en humanos, las dietas altas en grasas más utilizadas para desarrollar EHNA son las que contienen 45% y 75% de las calorías provenientes de las grasas (33,35). Estas dietas producen resistencia a la insulina, obesidad y en consecuencia EHNA (32,33,36,37). Se ha encontrado que el avance de la patología es proporcional a la cantidad de tiempo que estén sometidos los animales a la dieta y que a partir de la semana 8 se encuentran cambios metabólicos significativos. Ya desde la semana 12 los cambios son mucho más notorios, por este motivo la gran mayoría de los estudios utilizan esta cantidad de semanas o superiores, para evaluar una condición más parecida a la patología en humanos (36).

Los dos ácidos grasos más abundantes en la dieta corresponden al ácido palmítico (C16:0) y al ácido oleico (C18:1), por este motivo es de gran importancia conocer cuál es el efecto de estos en el desarrollo de la EHNA. Es conocido que el palmitato induce esteatosis en modelos de cultivo primario de hepatocito, los mecanismos celulares por los cuales se produce la esteatosis están bien estudiados. El palmitato produce un efecto citotóxico asociado a mayor producción de especies reactivas al oxígeno, lo que produce apoptosis y necrosis del tejido hepático, aumentando el clivaje y activación de la proteína ejecutora de la apoptosis caspasa 3 (38). Además, el palmitato produce disminución en el potencial de la membrana mitocondrial lo que es una señal para la apoptosis o mitofagia de las mitocondrias (38). Por otra parte, los ácidos grasos saturados producen estrés de retículo seguido de un aumento de la salida de  $Ca^{2+}$  (39). En resumen, las alteraciones producidas por estos ácidos grasos son principalmente a nivel de organelos, que afectan la funcionalidad de estos produciendo la muerte del hepatocito.

## **Autofagia y EHNA**

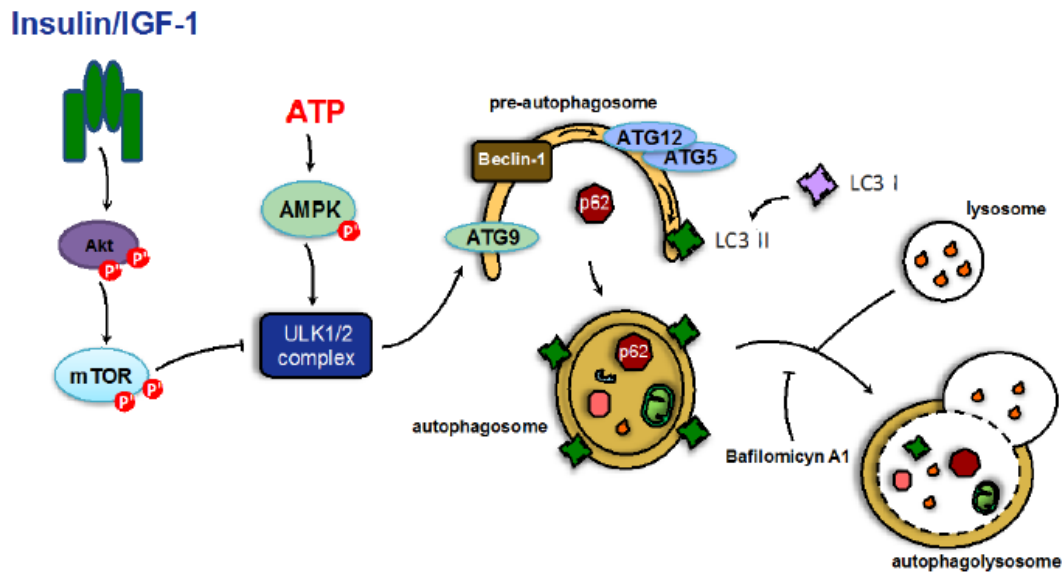
La autofagia es una vía de degradación lisosomal que promueve la supervivencia celular al suministrar energía en tiempos de estrés o mediante la eliminación de organelos y proteínas mal plegadas (40). Usualmente se utiliza el término flujo autofágico para representar el proceso de la autofagia, se ha encontrado que este se ve alterado en múltiples patologías tales como, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, miopatía, cardiovasculares y desordenes al sistema inmune (41).

Existen tres tipos de autofagia descritos hasta ahora, la microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) y macroautofagia. La microautofagia se refiere al

secuestro de componentes citosólicos directamente por el lisosoma mediante la invaginación de su membrana. La CMA implica la translocación directa de las proteínas de sustrato desplegadas a través de la membrana del lisosoma mediante la acción de una chaperona citosólica y lisosómica, llamada proteína de choque térmico de 70 kD (Hsc70), y el receptor de membrana integral LAMP-2A (proteína de membrana asociada a los lisosomas tipo 2A). Por último, la macroautofagia hace referencia al proceso en que los productos (organelos, proteínas, gotas de grasa) se secuestran dentro de una única vesícula citosólica de doble membrana, un autolisosoma. Los primeros estudios sobre autofagia planteaban que el secuestro de proteínas y estructuras citoplasmáticas era inespecífico, pero los estudios más recientes han mostrado que también puede ser selectivo, ya que puede ayudar a digerir organelos o microbios invasores. El autofagosoma se forma por la expansión del fagóforo, que se define como una membrana de aislamiento alrededor del componente celular dirigido para degradación, pero el origen de la membrana es desconocido. La fusión del autofagosoma con un endosoma o un lisosoma suministra hidrolasas, para la degradación de los componentes secuestrados. La lisis de la membrana interna de los autofagosomas y la descomposición de los contenidos se producen en el autolisosoma, y las macromoléculas resultantes son liberadas de nuevo al citosol a través de permeasas localizadas en la membrana del lisosoma (42).

La macroautofagia, que de ahora en adelante solo será denominada autofagia, consta de tres pasos: iniciación, nucleación y elongación/cierre. La iniciación es controlada por tres proteínas ULK1 (UNC-51-like kinase 1), Atg13 (proteína relacionada con la autofagia 13) y FIP200 (proteína de interacción familiar de kinasa de adhesión focal de 200 kD), las que forman el complejo ULK1-Atg13-FIP200. La nucleación requiere del complejo Beclin-1 fosfatidil inositol 3-kinasa de clase 3 (PI3K), el que incluye las proteínas Beclin-1, Vps34 (clase III PI3K), Vps15, Atg14L (Barkor) y Ambra-1. Por último, la elongación/cierre necesita de dos sistemas de conjugación, el primero es la conjugación de Atg12-Atg5 mediada por dos ligasas Atg7 y Atg10. Además, Atg5 se asocia con Atg16 para formar un complejo Atg12-Atg5-Atg16. El segundo implica el corte de LC3 (proteína de cadena liviana-3 asociada a microtúbulos) por Atg4 que conduce a la forma soluble LC3-I, que luego se conjuga a fosfatidiletanolamina (PE) a través de la participación de Atg7 y Atg3. Esta conjugación de lípidos forma LC3-II

asociada a la doble membrana autofágica que permite el cierre de la vacuola autofágica (Figura 1) (43).



**Figura 1. Etapas de formación de la autofagia y formación del autofagosoma.** La activación del complejo ULK1 comienza el proceso de iniciación, seguido por la formación del fagoforo inicial que requiere de Beclin-1, la expansión de la membrana es mediada por Atg12-Atg5 y LC3-II, la elongación y fusión de los extremos de la membrana da lugar al autofagosoma. En el paso final el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el autolisosoma donde el contenido es degradado.

La regulación de la autofagia es un proceso complejo en el que se han encontrado dos proteínas con funciones antagónicas, la primera es la proteína quinasa mTOR (mechanistical target of rapamacyn), es uno de los principales reguladores negativos de la autofagia. La proteína mTOR es uno de los mayores sensores metabólicos en el miocito, en el hígado y en múltiples órganos (44), en consecuencia, puede regular diversos procesos fisiológicos dependiendo del estado nutricional en que se encuentre un sujeto. Los estímulos necesarios para la activación de mTOR son la abundancia de alimentos (principalmente aminoácidos), estímulos hormonales (insulina, factor de crecimiento del tipo insulina 1 (IGF-1)), una vez activado mTOR fosforila ULK1 en serina 757 previniendo la activación e interacción con la proteína quinasa activada por 5-AMP (AMPK), inhibiendo de esta forma la autofagia. En contra parte, AMPK activa la autofagia, a través de la fosforilación de un residuo diferente en ULK1, serina 555, de esta forma comienza el proceso de iniciación de la autofagia (45,46). AMPK es considerado un sensor metabólico dentro de las células y presenta diversas formas de

activación; el aumento de la razón entre AMP/ATP, la disminución de los niveles de glicógeno muscular, o por un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual activa proteínas quinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMK). El aumento  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se produce en el proceso de acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético, que ocurre con el ejercicio físico y la privación de glucosa (47,48).

Se ha descrito que una disminución de la autofagia está asociada con el desarrollo de EHNA. Por ejemplo, en condiciones de obesidad se han encontrado menores niveles de autofagia debido a múltiples factores: (a) activación de calpaina 2, (b) sobreactivación de mTOR, (c) un defecto en la acidificación del lisosoma, (d) una función defectuosa del autofagosoma-lisosoma en el hígado y (e) la hiperinsulinemia que podría contribuir a la disminución de la autofagia (49). Otro estudio demostró que una disminución de la expresión de catepsina (proteasa presente en el lisosoma) hepática en EHNA se asocia con disfunción autofágica. Debido a la disminución de la capacidad proteolítica de este sistema. Este hallazgo indica que la supresión de la proteólisis autofágica por esteatosis hepática está implicada en el desarrollo de la EHNA (50). Además, se ha demostrado que el flujo autofágico está disminuido en ratones sometidos a una alimentación alta en grasas con desarrollo de EHNA, en quienes se encontró acumulación de p62, un aumento en la razón LC3-II/LC3-I y acumulación de autofagosomas en los animales. Dentro del mismo modelo de trabajo se encontró que los marcadores de estrés de retículo endoplasmático, estaban aumentados y que esto se correlaciona con la disminución del flujo autofágico (51). La literatura presenta diversos mecanismos por los cuales la disminución de la autofagia puede contribuir al desarrollo de EHNA, por lo tanto, la autofagia es una vía de interés para ser estudiada y desarrollar terapias que reviertan estos efectos negativos sobre su funcionamiento.

## **Lipofagia**

Los lípidos intracelulares se almacenan en gotas lipídicas (LD, por sus siglas en inglés, lipid droplet) y se metabolizan por hidrolasas citoplasmáticas neutras para suministrar lípidos para el uso celular. Los LD son organelos dinámicos y consisten en un núcleo de lípidos neutros, principalmente triglicéridos o ésteres de colesterol, que están rodeados por una monocapa de fosfolípidos y otras proteínas asociadas (52). Estas proteínas consisten en una familia de cinco componentes denominados perilipinas (PLIN), ellas son: PLIN1 (perilipina), PLIN2 (proteína relacionada con la diferenciación adiposa),



PLIN3 (proteína que interactúa con la cola de 47kDa), PLIN4 (Se-12) y PLIN5 (proteína de las gotas lipídicas miocárdicas) (53).

Recientemente, se ha descrito una vía alternativa de metabolismo de los lípidos a través de la vía lisosomal de degradación de la autofagia, la cual se ha denominado lipofagia. En la lipofagia, los triglicéridos (TGs) y el colesterol son absorbidos por los autofagosomas y entregados a los lisosomas para su degradación por hidrolasas ácidas. Los ácidos grasos libres generados por lipofagia a partir de la descomposición de TGs aumentan las tasas celulares de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Por lo tanto, la lipofagia contribuye en la regulación de los lípidos intracelulares, los niveles celulares de ácidos grasos libres y la homeostasis energética. La cantidad de lípidos metabolizados por lipofagia varía en respuesta al suministro extracelular de nutrientes (54). La capacidad de la célula para alterar la cantidad de lípidos dirigida a la degradación autofágica dependiendo del estado nutricional demuestra que este proceso podría ser selectivo, pero aún se sabe poco sobre las proteínas específicas de LD que guían el proceso selectivo de la lipofagia (55). Se han planteado múltiples mecanismos de regulación, uno de ellos es mediante la degradación de PLIN2 a través de la autofagia mediada por chaperonas (CMA), la que facilitaría la degradación de los LD, por parte de las lipasas lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL), lipasa sensible a hormonas (HSL) y monoacilglicerol lipasa (MGL) y de la lipofagia (56). También se ha encontrado que la familia de proteínas Rab, que es un miembro de la super familia Ras de proteínas G monoméricas, podrían estar involucradas en facilitar la interacción de LD con otros organelos que promueven la degradación de estos (55). Otro trabajo reciente plantea que la ATGL tiene un papel importante en la regulación de la lipofagia, actuando como un señalizador que favorece este proceso (57). Aunque se conocen algunos posibles encargados de iniciar la lipofagia, todavía no existe consenso de cuál es el más relevante en este proceso.

La lipofagia puede ser activada por un aumento moderado en la disponibilidad de lípidos o por medio de la privación de nutrientes, esas son las maneras en que la autofagia hepática degrada LD con la finalidad de proveer de ácidos grasos libres para la producción de ATP (54). Para probar el papel de la autofagia en la degradación de las reservas de lípidos celulares, se realizó un estudio en cultivos celulares de hepatocitos expuestos a dos tipos de inhibición de la autofagia, un grupo sometido a 3-metiladenina, que bloquea la actividad de PI3K de clase III y otro grupo fue tratado con shARN frente

al gen de autofagia Atg5. Los resultados obtenidos presentaron un aumento en el contenido de gotas lipídicas en ambos tipos de inhibición de autofagia, en todos los medios de cultivo utilizados en el estudio; tanto en un medio de cultivo normal, como en otros, donde las células fueron expuestas a un medio rico en ácidos grasos libres (oleato) y en un medio deficiente de metionina y colina, aunque cabe destacar que estos efectos se vieron acrecentados en los medios que promueven la acumulación de ácidos grasos (54). Los autores plantean que el aumento del contenido de LD en células deficientes en autofagia es el resultado de una disminución en el recambio de lípidos, determinada por una tasa reducida de utilización de triglicéridos y una disminución de  $\beta$ -oxidación mitocondrial (54).

Actualmente se han realizado diversos estudios que plantean que el importante rol de la lipofagia en el control del contenido de lípidos en el hígado. Un estudio en el que se usó cafeína como activador de la autofagia, plantea que la estimulación mediante la cafeína disminuye los niveles de triglicéridos intracelulares, siendo un posible tratamiento en sujetos con EHNA (58). Por otra parte, también se ha demostrado que la inhibición de la lipofagia produce aumento de lípidos en el tejido hepático (54). Utilizando un regulador negativo que interactúa con Beclin1 para la fusión de autofagosoma-lisosoma, se observa también la acumulación de TG hepáticos. En este trabajo se demostró que producto de la inhibición de la autofagia se acelera el proceso de lipoapoptosis, mecanismo que se produce cuando hay un exceso de ácidos grasos de cadena larga y estos no son oxidados, produciendo sub-productos como la ceramida, que promueven la apoptosis celular (59) y la acumulación de lípidos (60). Zhang y cols plantean que la lipofagia se encuentra disminuida en la EHNA y por lo tanto una inducción de esta podría ser beneficiosa como tratamiento para esta patología. Las moléculas diana que se proponen para la inducción son variadas (61), debido a esto es importante investigar un posible mecanismo para en la regulación de la lipofagia.

### **Efecto de las dietas ricas en grasas sobre la autofagia**

En un estudio se comparó el efecto de una dieta rica en sacarosa y otra rica en grasas sobre la autofagia en el hígado de ratones en diferentes condiciones, en ayuna y alimentados. Los resultados indicaron que la dieta rica en sacarosa no afectó los marcadores de autofagia, mientras que la dieta alta en grasa afectó la autofagia de manera distinta en las dos condiciones. Por una parte en los animales alimentados

aumentó la autofagia, entretanto en los animales sometidos a un estado de ayuno no se vio afectada la autofagia (62). Otro estudio realizado en la línea celular HepG2, encontró que el ácido palmítico favorece la acumulación de LC3II y p62, alterando el desarrollo normal de la autofagia e induce apoptosis en estas células (60). Por otra parte se evaluó el efecto de la dieta alta en grasa sobre la autofagia en el hígado, pero en cuanto a temporalidad a corto (2 semanas) y largo plazo (10 semanas), encontrando interesantes hallazgos, primero se observó que el flujo autofágico con la dieta de 2 semanas se incrementaba pero cuando aumenta a 10 semanas se ve casi inhibido, por lo tanto en base a estos resultados se aprecia que la autofagia tendría una respuesta bifásica con respecto a las dietas altas en grasas, en un comienzo aumentaría la maquinaria autofágica pero si esto es mantenido en el tiempo se presentará disminución de la misma (63).

## **Ejercicio físico como terapia no farmacológica en el tratamiento de la EHNA**

El ejercicio físico ha sido utilizado como terapia no farmacológica para múltiples patologías tales como: enfermedades psiquiátricas, neurológicas, metabólicas, cardiovasculares, pulmonares, musculo-esqueléticas y cáncer (64). Donde también la EHNA ha mostrado responder de manera positiva a esta intervención (65). Los tipos de ejercicio utilizado para tratar la EHNA han sido ejercicios de sobrecarga y de tipo aeróbico, en ambos casos se ha demostrado un rol importante para revertir la esteatosis hepática (66,67).

Los mecanismos por los que el ejercicio físico puede revertir la EHNA podrían variados, se ha encontrado que el entrenamiento físico es efectivo para reducir la expresión de las proteínas relacionadas en la lipogénesis como SREBP-1c que está encargada de regular la transcripción de genes envueltos en la síntesis de colesterol y ácidos grasos libres, la sintasa de ácido graso (FAS) enzima encargada de catalizar la síntesis de *novo* de ácidos grasos en diversos tejidos y esteroil-CoA desaturasa (SCD1) otra enzima envuelta en la lipogénesis, en el hígado de ratones obesos. Además, el ejercicio aumenta la fosforilación de acetil CoA carboxilasa (ACC) que cataliza la carboxilación de acetil CoA para formar malonil-CoA, que es una molécula clave en el control del metabolismo de ácidos grasos intracelulares y la expresión de carnitil palmitoil tranferasa 1 (CPT1) enzima mitocondrial que tiene por función transportar

ácidos grasos de cadena larga desde la membrana externa de la mitocondria hacia la interna, en el tejido adiposo, favoreciendo la lipólisis (68). También promueve una mayor expresión de adiponectina y PPAR $\alpha$ . La primera es una hormona que ha sido asociada a mejores niveles de sensibilidad a la insulina en músculo, hígado y tejido adiposo, por mayores niveles de oxidación en estos tejidos. El segundo es un factor de transcripción que se relaciona con una mayor actividad mitocondrial, por lo tanto mayor  $\beta$ -oxidación y con esto mayor regulación de los ácidos grasos (69). Estos hallazgos demuestran el control que ejerce el ejercicio físico sobre la lipogénesis y la lipólisis, lo que favorece la disminución de ácidos grasos libres y por lo tanto la disponibilidad para que estos se acumulen en el hígado. Estos resultados son independientes de la regulación de la autofagia, por lo tanto, es de gran interés investigar si el ejercicio físico puede revertir la EHNA mediante la vía de la autofagia.

### **Efecto del ejercicio físico sobre la autofagia**

Las sesiones de ejercicio aisladas provocan respuestas cardiovasculares agudas y metabólicas de forma transitoria, lo que se conoce como una respuesta aguda al ejercicio. Por otra parte, la repetición frecuente de estas sesiones aisladas produce adaptaciones más permanentes, conocidas como la respuesta al entrenamiento o ejercicio crónico (70).

Una relación poco estudiada es la existente entre la EHNA, la autofagia (lipofagia) y el ejercicio físico. Diversos estudios plantean que el ejercicio físico tanto de forma aguda como crónica aumentan la autofagia a nivel muscular mediante la activación de AMPK, debido a un balance energético negativo (71), sin embargo los resultados son controversiales. Mientras que frente a un ejercicio de baja intensidad en condiciones de ayuno y estado post prandial no se encontró activación de AMPK, pero si, un aumento de autofagia, el cual se asoció a la inhibición de mTOR (72). Por otra parte, otro estudio en humanos mostró, que independiente del estado nutricional, ya sea con alimentación durante el ejercicio (aporte constante de glucosa) o manteniendo un ayuno de 36 horas, existe activación de AMPK y ULK1, con un protocolo de 1 hora de ejercicio en cicloergometro, a una intensidad del 50% del consumo máximo de oxígeno ( $VO_2max$ ) (73). No obstante, cabe destacar que el primer estudio es en roedores y el segundo en humanos, con diferentes protocolos de ejercicio, por lo tanto, las diferencias podrían explicarse debido a la respuesta especie específica. Otro estudio encontró que la

regulación de la autofagia en músculo esquelético humano difiere en varios aspectos con respecto a los datos descritos en la mayoría de los estudios en cultivos celulares y animales (roedores). El ejercicio agudo en una bicicleta cicloergometro produjo una reducción de la proporción LC3-II/LC3-I y sin cambios en p62/SQSTM1, en músculos humanos, ambas proteínas utilizadas como marcadores de autofagia. En cambio, en roedores se encontró un aumento de LC3-II/LC3-I después de 4 horas de nado. Es importante destacar que los protocolos de ejercicios aplicados en este estudio son distintos, lo que impide comparar resultados. Similar a otros experimentos donde sugieren que la activación de AMPK por sí sola no es suficiente para regular la autofagia (74).

No solo en músculo esquelético el ejercicio ha demostrado tener un control sobre la autofagia. Otros órganos como el tejido adiposo, páncreas e hígado, han mostrado ser un blanco de regulación de la autofagia (75). Además en el cerebro se encontró que la autofagia también es inducida por el ejercicio físico agudo (76). En un modelo de hígado graso inducido por una dieta rica en sacarosa y deficiente en colina, el cual no induce obesidad, se demostró que el ejercicio físico en trotadora durante tres semanas reduce la EHNA, sin cambios en el peso del tejido adiposo, con reducción del tamaño de los LD acompañado de disminución en el contenido de los triglicéridos en el hígado, mejorando diversos parámetros asociados a la patología, sin embargo, los marcadores de autofagia no sufrieron modificaciones en la expresión de proteínas (p62 y LC3) (77). En otro trabajo se aplicó una dieta para inducir obesidad durante 8 semanas, los cuales fueron divididos en sedentarios y ejercicio voluntario en una rueda para correr, durante 4 semanas más. Se encontró que los animales que realizaron ejercicio de manera voluntaria presentaron una razón de LC3-II/I un 50% mayor y un 40% menor en la expresión de p62 en el hígado, comparados con el grupo de animales sedentarios. Además disminuyó el peso del hígado y marcadores de inflamación en dicho grupo (78). Algunas limitaciones que presentan estas investigaciones, es que la primera indujo EHNA sin obesidad, lo que podría no estar asociado a la realidad de los sujetos que presentan esta patología, ya que como se mencionó están fuertemente relacionadas, donde aproximadamente un 80% de los sujetos obesos presenta esta patología (79). La segunda por su parte no logró desarrollar EHNA, pero si un modelo de obesidad. Algo a destacar es que en uno de estos se indujo la autofagia y en el otro no, las posibles razones de ello pueden ser el tipo de protocolo de ejercicio aplicado, que no haya sido lo

suficientemente sensible para inducir la autofagia y que el tipo de dieta tenga alguna influencia en la regulación de la autofagia.

Una reciente investigación, planteó un modelo que utilizó tres grupos diferentes uno con dieta control, otro sometido a DAG y otro con DAG más ejercicio. Se les aplicó la dieta durante 13 semanas, después de ese periodo el grupo ejercitado comenzó un protocolo de entrenamiento continuo durante 10 semanas. Los resultados encontrados muestran una disminución del peso corporal de las ratas con DAG sometidas a entrenamiento, además de disminución de colesterol, triglicéridos y marcadores de daño hepático. Otro hallazgo interesante de este estudio es que el entrenamiento indujo la autofagia a nivel hepático en las ratas sometidas a DAG, se encontró que la expresión de mRNA de la proteína de membrana asociada a los lisosomas (LAMP2) y Beclin1, fue revertida mediante el entrenamiento en comparación al grupo de DAG que no realizaba ejercicio, además para confirmar el rol del entrenamiento en la inducción de la autofagia se midió la expresión de ATG7, ATG5, p62 y LC3 mostrando que el entrenamiento podría modificar la vía de la autofagia. Por último, se investigó los niveles de fosforilación de p-AMPK y de p-mTOR, los datos revelaron que el entrenamiento se asoció a mayor nivel de fosforilación de p-AMPK y disminuyó el de p-mTOR, lo que podría ser responsable de la inducción de la autofagia (80).

En resumen, los mecanismos por los que el ejercicio podría contribuir a disminuir los niveles de EHNA son variados, esto se puede deber a que esta patología es sistémica y se desarrolla por múltiples factores. Es importante destacar que los diferentes tipos de ejercicio físico han demostrado tener un impacto positivo en el control de esta patología, esto ha sido confirmado tanto en los estudios realizados con animales como en humanos, aun así, no hay evidencia que plantee si el ejercicio físico puede regular el uso de lípidos por degradación de LD mediado por la autofagia, si existe algún mecanismo de control por parte del ejercicio físico sobre la lipofagia, si efectivamente las dietas altas en grasas disminuyen tanto el flujo autofágico como la lipofagia, favoreciendo la acumulación de triglicéridos en el hígado, por lo tanto queda por investigar sobre estas posibles relaciones. En vista de los antecedentes expuestos es que en esta tesis se pretende evaluar si una dieta alta en grasas disminuye los niveles de autofagia/lipofagia en hígado de ratones, y a la vez si el ejercicio físico crónico puede revertir esta situación.

## **Hipótesis**

El ejercicio aeróbico crónico de 8 semanas revierte la disminución de la lipofagia en hígado graso inducido por una alimentación con dieta alta de grasa en ratones.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar si el ejercicio aeróbico crónico regula la lipofagia en ratones con hígado graso inducido por una alimentación con dieta alta en grasas.

### **Objetivos específicos**

- i) Determinar si el ejercicio aeróbico crónico disminuye los niveles de esteatosis hepática no alcohólica.
- ii) Determinar si la alimentación con una dieta alta en grasa disminuye los niveles de lipofagia en el hígado de ratón.
- iii) Determinar si el ejercicio aeróbico crónico aumenta la lipofagia en hígado.

## Resultados

En la figura 2 se presenta el modelo de trabajo en el cual se esquematiza el diseño experimental. En ella se puede observar, la división que tendrán los grupos de trabajo, duración del entrenamiento y los diferentes experimentos a realizar para demostrar cada uno de los objetivos planteados en el proyecto.

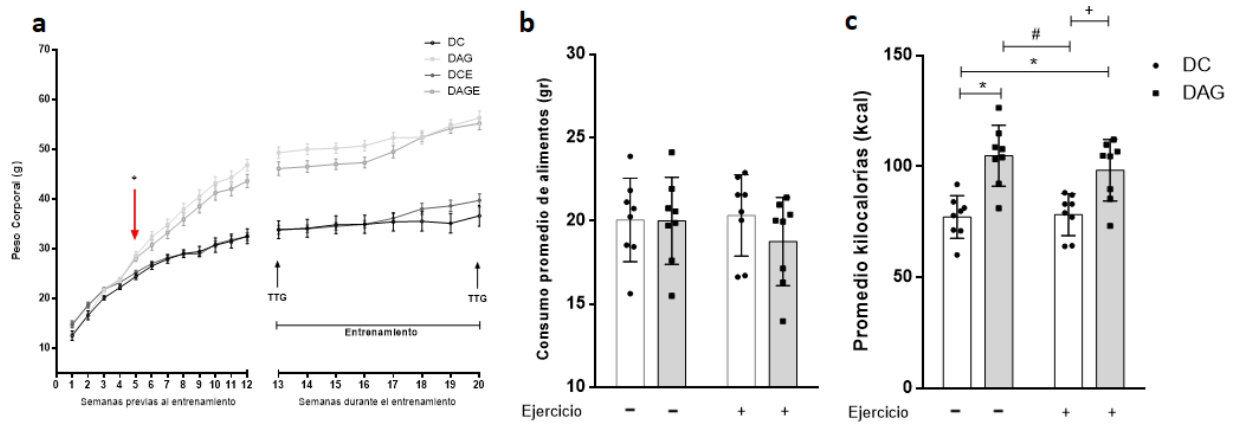


**Figura 2.** Esquema que resume el diseño experimental. Se muestra las semanas de tratamiento, las divisiones de los grupos y los diferentes experimentos que se realizarán.

## Caracterización del modelo de trabajo

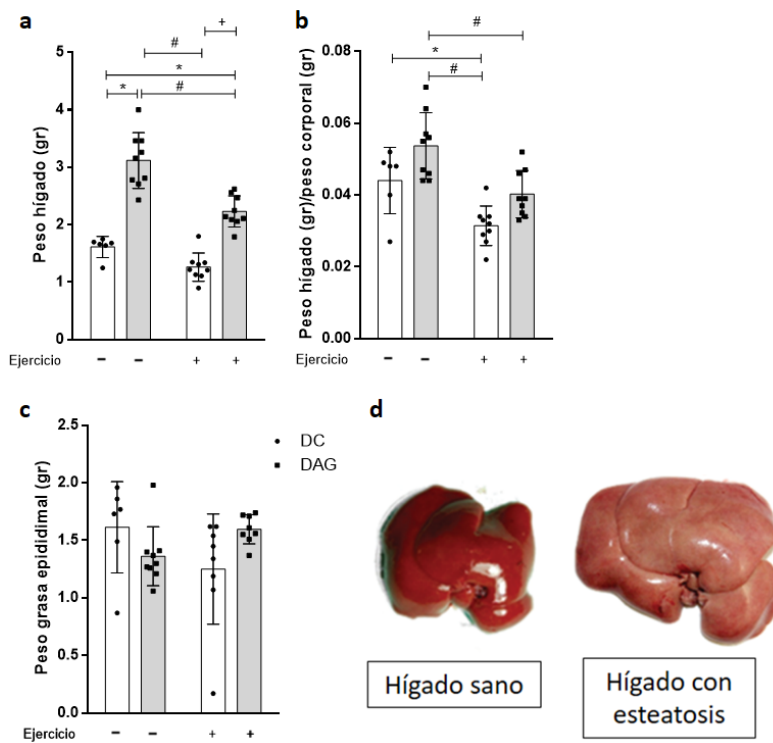
La figura 3a presenta los cambios en el peso corporal de los animales durante las 20 semanas de duración del protocolo del proyecto, se detallan los cambios por grupo, se aprecia que los animales sometidos a una alimentación rica en grasas aumentan de peso de manera significativa desde la semana 5, a partir de ese punto se mantienen las diferencias entre los grupos con dietas control y dietas altas en grasas. Antes de comenzar el entrenamiento físico en la semana 13 se realizó un test de tolerancia a la glucosa. La figura 3b detalla el consumo de alimento en promedio de los diferentes grupos, no existiendo diferencias entre los diferentes grupos. La figura 3c muestra las kilocalorías consumidas por los grupos. Encontrando diferencias entre los grupos control y dieta alta en grasas, lo que explica las diferencias de peso entre los grupos.





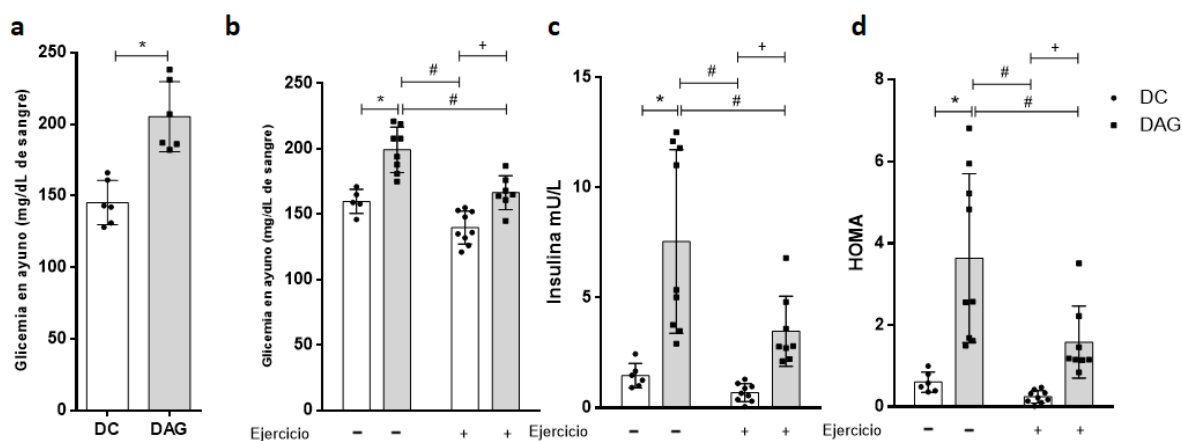
**Figura 3.** a) Se presenta los cambios en el peso de los animales desde la semana 1 hasta la 20, semana 5 existe un cambio significativo en los grupos sometidos a una dieta alta en grasas comparado con los sometidos a dieta control, \* $p < 0,05$ . b) Consumo promedio de alimentos por grupo desde la semana 13. c) Kilocalorías consumidas en promedio por los grupos. Dieta control (DC), Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE). Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DCE, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

La figura 4a muestra el peso de los hígados de los animales posterior al sacrificio, el hallazgo más relevante es la diferencia de peso entre los grupos DAG y DAGE puesto que a pesar de no existir diferencias entre ellos en el peso corporal, si hay diferencias significativas en el peso de este órgano. La figura 4c muestra el peso de la grasa epididimal de los animales posterior al sacrificio, en este tejido no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos.



**Figura 4.** a) Peso de los hígados de los ratones. b) Peso hígado normalizado por peso corporal del animal. c) Peso de la grasa epididimal de los ratones. d) Imagen representativa de los hígados con dieta control y dieta alta en grasas. Dieta control (DC), Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE). Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DAGE, DAG/DCE, + $p < 0,05$  DCE/DAGE. Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

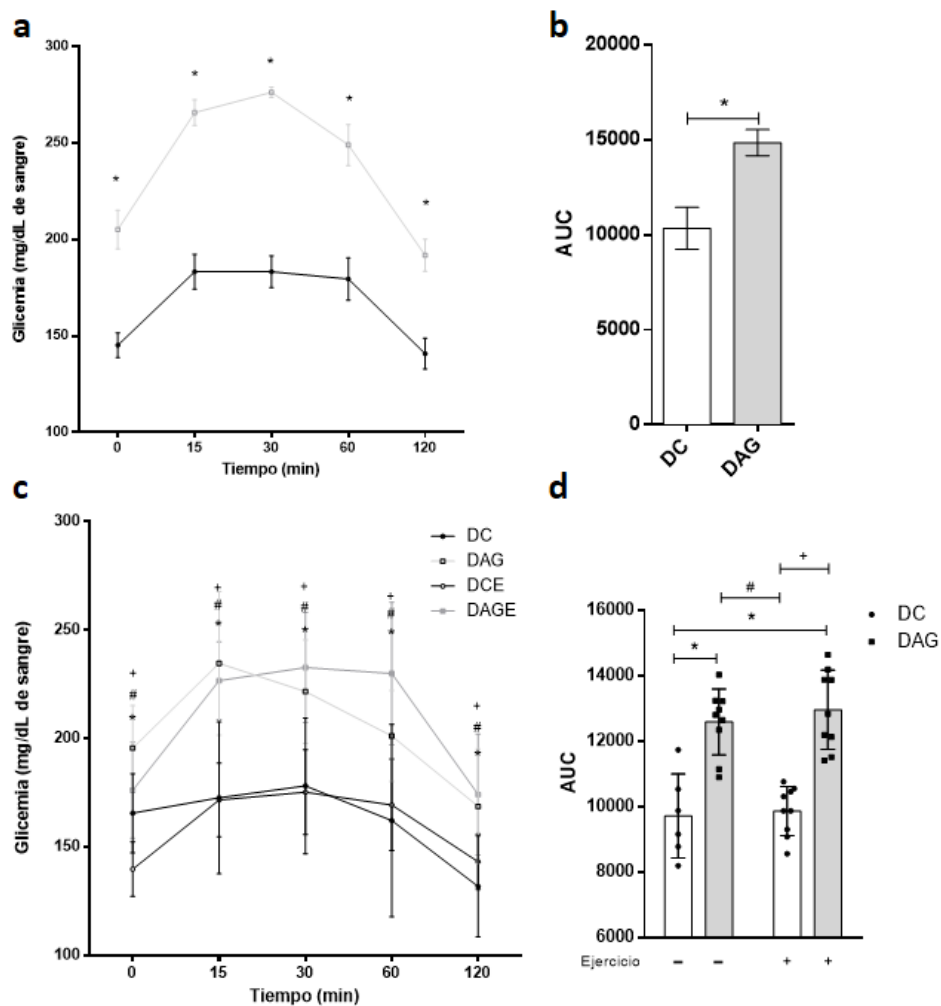
La figura 5a muestra la glicemia en ayuno al finalizar el periodo de 12 semanas de alimentación de los grupos DC y DAG, se observa que el grupo DAG presenta mayores niveles de glicemia en ayuno con respecto al grupo DC. La figura 5b muestra la glicemia en ayuno posterior al periodo de 8 semanas de entrenamiento físico, en este periodo se mantienen las diferencias entre los grupos DC y DAG, además se observan diferencias significativas entre los grupos DAG y DCE y DCE y DAGE, donde se encontró que ambos grupos sometidos a una alimentación rica en grasas presentaron mayores niveles de glicemia en ayuno con respecto a los controles con ejercicio. Los siguientes resultados muestran la insulina en ayuno de los animales (5c), en la cual se presentan diferencias significativas entre los grupos DC con DAG, DCE con DAGE, DAG con DCE y DAG con DAGE, este resultado es interesante puesto que, a pesar de no encontrarse diferencias en los niveles de glicemia, si existen menores niveles de insulina en los animales con dieta alta en grasas sometidos a ejercicio físico. La figura 5d muestra el índice HOMA, el cual indica que existen diferencias entre los animales sometidos a dieta alta en grasas, con el grupo DAGE lo que podría indicar una menor resistencia a la insulina en este grupo.



**Figura 5.** a) Glicemia en ayuno de los animales al finalizar el periodo de dieta de 12 semanas, T de students,  $p < 0,05$ , b) Glicemia en ayuno de los animales al finalizar el periodo de entrenamiento de 8 semanas. c) Insulina en ayuno. d) Índice HOMA. Dieta control (DC), Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE). Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, # $p < 0,05$ , DAG/DAGE, DAG/DCE, + $p < 0,05$  DCE/DAGE. Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

La figura 6a muestra un test de tolerancia a la glucosa aplicado a los grupos dieta control y dieta alta en grasas al finalizar el periodo de 12 semanas de dieta, se encontró que en cada uno de los tiempos medidos el grupo DAG presenta mayores niveles de

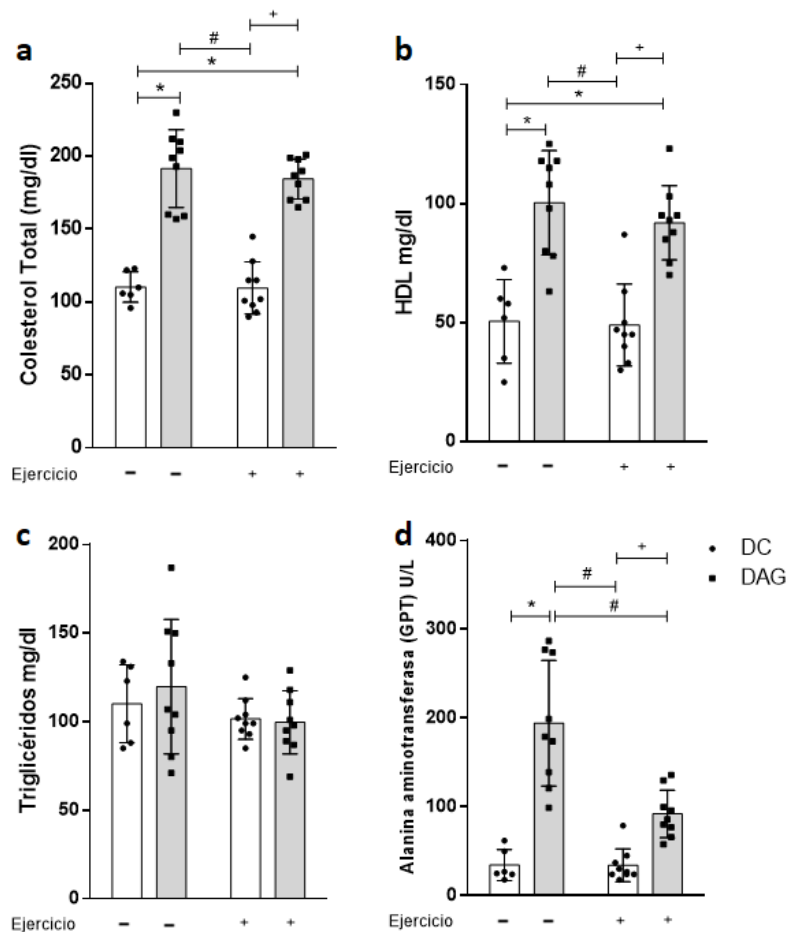
glicemia lo que indicaría la presencia de resistencia a la insulina en estos animales. La figura 6b muestra un test de tolerancia a la glucosa aplicado una vez finalizado el periodo de entrenamiento de 8 semanas, en este periodo se mantienen las diferencias encontradas en el primer test entre los grupos DC y DAG y se suma la diferencia entre DCE y DAG, además el grupo DAGE presenta mayores niveles de glucosa en sangre a partir de los 15 minutos comparado con el grupo DC y DCE, por lo tanto ambos grupos con la dieta alta en grasas tiene mayores niveles de glicemia con respecto a los controles, no existen diferencias significativas entre los grupos con dieta alta en grasa, el ejercicio por si solo parece no poder controlar la intolerancia a la glucosa que presentaban estos grupos al finalizar el periodo de 12 semanas. Las figuras 6c y 6d muestran el área bajo la curva (AUC) de cada test de tolerancia a la glucosa respectivamente, donde se confirman las diferencias significativas entre los diferentes grupos.



**Figura 6.** a) Test de tolerancia a la glucosa aplicado a los grupos dieta control y dieta alta en grasas al finalizar el periodo de 12 semanas de dieta, b) Test de tolerancia a la glucosa aplicado una vez finalizado el periodo de

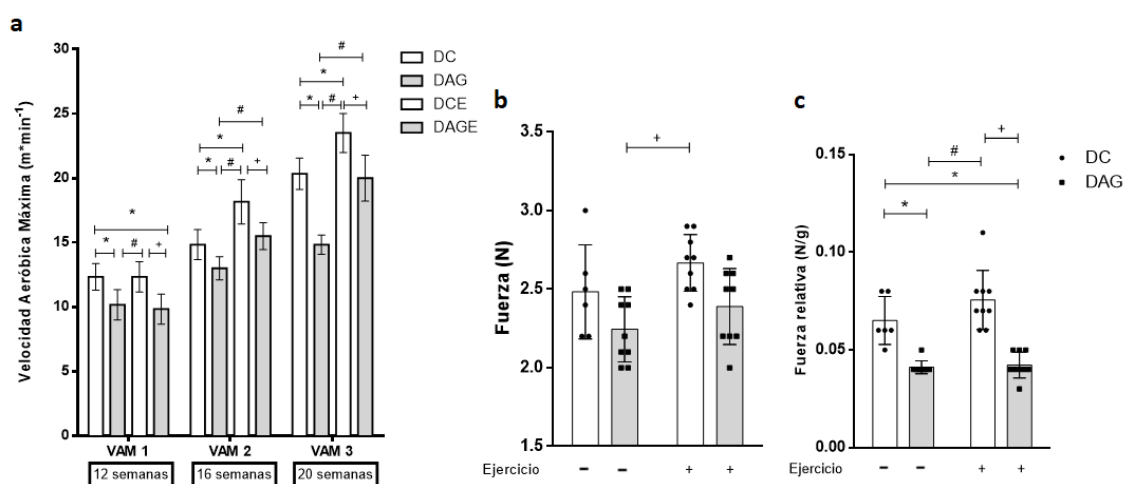
entrenamiento de 8 semanas, T de students  $p < 0,05$ . c) Área bajo la curva del test de tolerancia a la glucosa finalizado 12 semanas de dieta control y dieta alta en grasas, d) Área bajo la curva del test de tolerancia a la glucosa finalizado un periodo de 8 semanas de entrenamiento. Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG y DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DCE, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Dieta control (DC), Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE). Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

La figura 7 presentan 4 variables medidas en sangre, la figura 8a, presenta el colesterol total en esta variable se encontró que los grupos con dieta control presentan menores niveles de manera significativa de colesterol total con respecto a la dieta alta en grasas, sin existir diferencias entre los grupos sometidos a dieta alta en grasas, la figura 7b, muestra los niveles de HDL, donde se encontraron las mismas diferencias que en colesterol total. La figura 7c, muestra los triglicéridos medidos en sangre donde no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. La figura 7d, muestra el valor de la alanina transaminasa en sangre, que se utiliza como marcador de daño hepático, se encontraron diferencias significativas entre los grupos DC y DAG, donde los DAG muestran mayores niveles de esta enzima, también se encontraron diferencias entre DCE v/s DAG y DAGE, y por último el grupo DAGE presentó menores niveles que los DAG.



**Figura 7.** Variables bioquímicas medidas en sangre. a) Colesterol total b) HDL c) Triglicéridos d) Alanina aminotransferasa (GPT). Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DAGE, DAG/DCE, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Dieta control (DC), Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE). Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

La figura 8a, 8b y 8c muestran los resultados de diferentes pruebas físicas realizadas a los animales. La figura 8a muestra los resultados de un test que permite medir la velocidad aeróbica máxima (VAM), el cual mide la velocidad de carrera en la cual se alcanza el máximo consumo de oxígeno ( $VO_2 \text{ max}$ ). Esto se midió en 3 fases al inicio del periodo de entrenamiento (VAM 1), a las 4 semanas de entrenamiento (VAM 2) y al finalizar el periodo (VAM 3). Se encontró que hay un aumento de la VAM en cada uno de los grupos siendo más marcado este aumento en los grupos sometidos a entrenamiento. La figura 8b muestra los resultados de una prueba para evaluar la fuerza absoluta que realizan los animales con todas sus extremidades, en esta prueba solo el grupo DCE mostró tener mayor nivel de fuerza con respecto al grupo DAG. La figura 8c muestra los resultados de la misma prueba, pero con los datos normalizados por el peso corporal de los animales, en este caso se muestran diferencias entre los grupos sometidos a dieta control (DC y DCE) contra los alta en grasas (DAG y DAGE), no existiendo diferencias entre los grupos pareados por dieta.

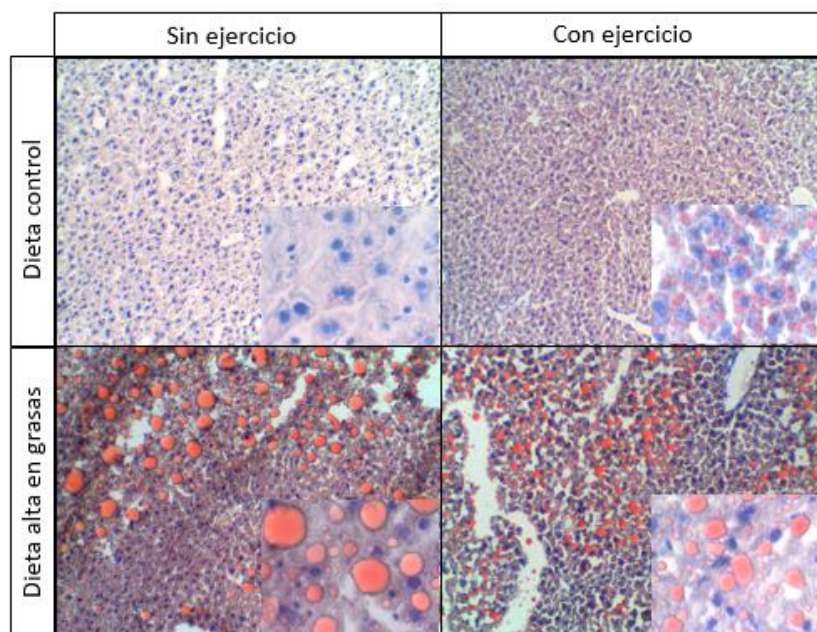


**Figuras 8.** Test de funcionalidad, a) Test de velocidad aeróbica máxima (VAM) medido en tres momentos distintos, al comienzo del entrenamiento, a la mitad y al final. b) Test de grip strength evaluando la fuerza absoluta de los ratones. c) Test de grip strength evaluando la fuerza normalizada por el peso de los ratones. Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DCE, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DAGE, DAG/DCE, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Dieta control (DC), Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE). Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

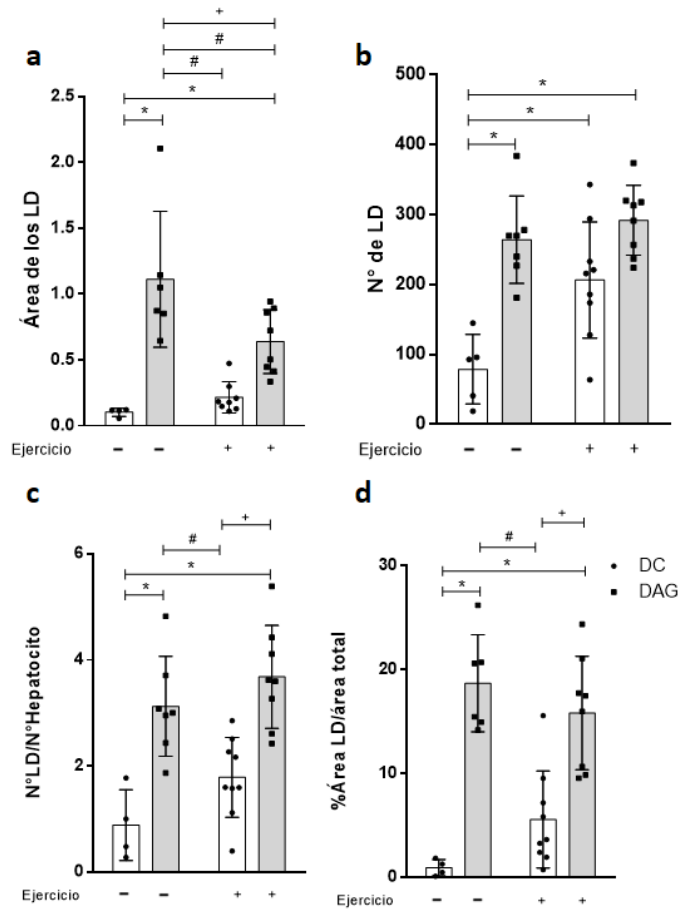
## Evaluación del nivel de esteatosis hepática

La figura 9 muestra una imagen representativa de la técnica Oil Red O para cada una de las condiciones del estudio. La figura 10 muestra los resultados obtenidos por la técnica Oil Red O. En la figura 10a se presenta el área de las gotas de grasa (LD), los resultados indican que se encontraron diferencias entre los grupos con dieta control frente a la dieta

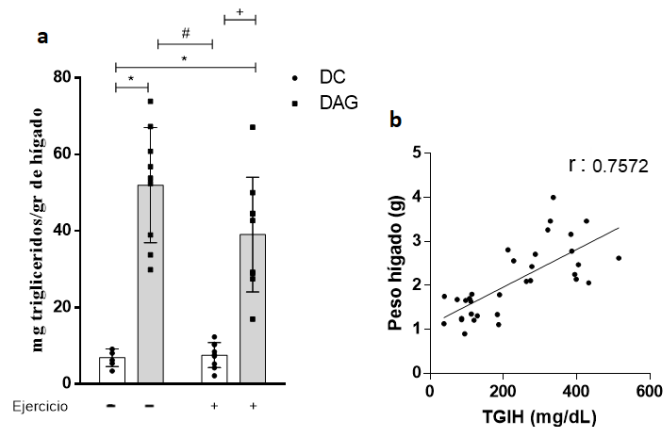
alta en grasas, donde los primeros presentan menor área de las gotas, además se encontró que el grupo DAGE presenta menor área por gota de grasa cuando se compara con el grupo DAG. La figura 10b muestra la relación de lipid droplet por hepatocito (LD/hepatocito). Se encontró que existen diferencias entre los grupos dieta control frente a dieta alta en grasas. La figura 10c muestra el número de lipid droplet. En este caso solo existen diferencias por parte del grupo control (DC) frente a los otros tres grupos. Por último, la figura 10d muestra el área que representan los lipid droplet de área evaluada. Se encontró que existen diferencias entre los grupos dieta control frente a dieta alta en grasas. Por otra parte, en la figura 11a se evaluó el nivel de triglicéridos intrahepáticos, se encontró que existen diferencias entre los grupos con dieta control (DC y DCE) con ambos grupos sometidos a dieta alta en grasas (DAG y DAGE). En la figura 11b se presenta una correlación entre peso del hígado y la cantidad de triglicéridos intrahepáticos, encontrando que es positiva. Además mediante la técnica Western Blot (figura 12), se midió la perilipina 2 (PLIN 2), se encontraron diferencias entre los grupos control (DC y DCE) con los grupos sometidos a dieta alta en grasas (DAG y DAGE), donde los últimos presentan mayor expresión de esta proteína.



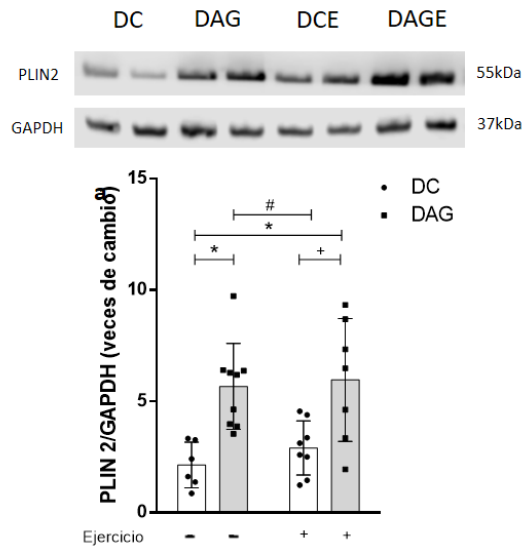
**Figura 9.** Oil Red O, imagen representativa de cada uno de los grupos para la técnica Oil Red O, se presenta una imagen en 4x y otra en 40x.



**Figura 10.** Oil Red O, a) Área de los LD, b) número de los LD, c) relación LD/número de hepatocitos. d) Porcentaje del área analizada que representan los LD. Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DAGE, DAG/DCE, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE). Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .



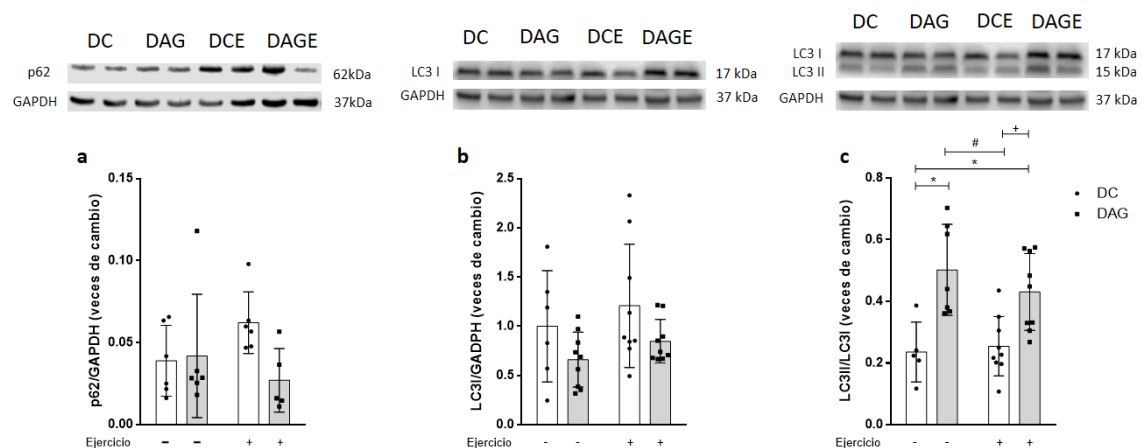
**Figura 11.** a) Triglicéridos intrahepáticos, Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DCE, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey. b) Correlación de Spearman entre peso del hígado y triglicéridos intrahepáticos,  $p < 0,05$ ,  $r = 0,7572$ . Dieta alta en grasas (DAG), Dieta control con ejercicio (DCE), Dieta alta en grasas con ejercicio (DAGE),  $n = 6-9$ .



**Figura 12.** Western Blot, a) Imagen representativa de PLIN2 y análisis de la densitometría, Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DAGE, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

## Evaluación de la autofagia

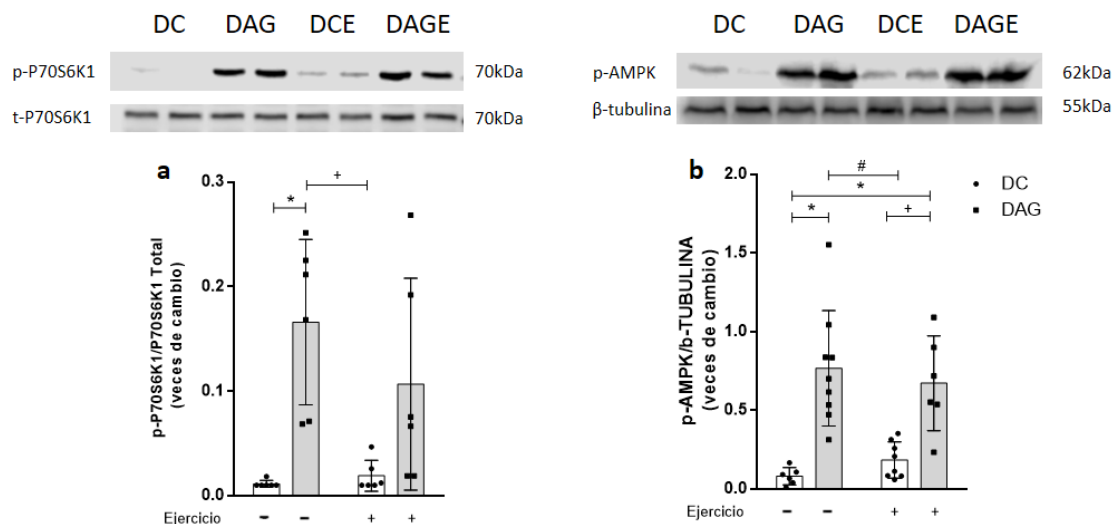
Para evaluar la función de la autofagia se midieron los clásicos marcadores de autofagia, los que son p62 y LC3. La figura 13a muestra los resultados obtenidos para Western Blot en p62, donde no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos, esta proteína es envuelta por el lisosoma y degrada, por lo que se espera que disminuya cuando la autofagia está activada. En la siguiente figura (13b) se muestra el análisis de LC3I/GAPDH, donde no se encontraron diferencias significativas, aun así se aprecia una tendencia en los grupos sometidos a entrenamiento (DCE y DAGE), encontrando mayores niveles de expresión de LC3 I con respecto a sus grupos control. La figura 13c presenta los resultados de LC3 en Western Blot, en este caso se encontró que la razón LC3II/LC3I está aumentada en los grupos sometidos a dieta alta en grasas (DAG y DAGE) con respecto a los sometidos a dieta control (DC y DCE), esto podría indicar una mayor acumulación de LC3 II en estos grupos, lo que sería consecuencia de menor degradación de este marcador, ya sea por menor activación de la autofagia o por algún otro mecanismo que está impidiendo la degradación, aunque la autofagia esté activa.





**Figura 13.** Western Blot, a) Imagen representativa de p62 y análisis de la densitometría. b) Imagen representativa de LC3I y análisis de la densitometría. c) Imagen representativa de LC3II/LC3I y análisis de la densitometría. Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DCE/DAG, + $p < 0,05$ , DCE/DAGE. Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

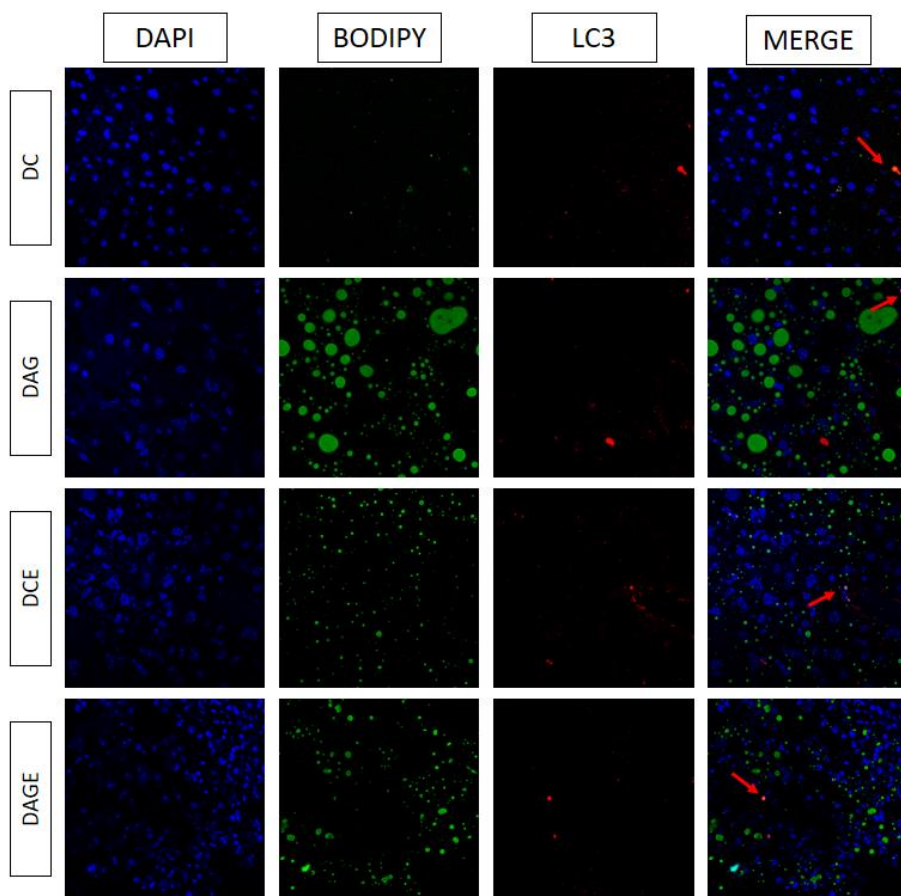
Además de los marcadores de autofagia se midieron proteínas relacionadas con la regulación de la autofagia. En la figura 14a se presenta la proteína P70S6K1 y la relación entre la fosforilación (p-P70S6K1) y la proteína total (t-P70S6K1) de esta, los resultados indican que existen diferencias significativas entre el grupo DC con DAG y DCE con DAG, lo que significa que el grupo DAG presenta mayor fosforilación de esta proteína, indicando que la vía de mTOR está más activa en este grupo y por lo tanto la autofagia estaría siendo inhibida. Por otra parte, en la figura 14b se muestra la fosforilación de la p-AMPK, proteína que tiene el efecto contrario a mTOR en la regulación de la autofagia, los resultados son interesantes, puesto que muestran que existe mayor fosforilación en los grupos sometidos a dieta alta en grasa (DAG y DAGE) con respecto a los grupos con dieta control (DC y DCE), a simple vista estos resultados indicarían que la vía de AMPK al estar activa favorecería la activación de la autofagia. Para aclarar estos resultados se midieron dos proteínas que están río abajo de que tienen que ver con el metabolismo de las grasas, la primera es la ácido graso sintasa (FAS) la cual se encontró que está aumentada en los ratones sometidos a dieta control, sin cambios en los demás grupos, la otra proteína evaluada fue la acetil coa carboxilasa (ACC), que se encuentra río debajo de AMPK, en este caso los resultados indican que está elevada en los animales sometidos a dieta control (DC y DCE) en comparación a los sometidos a dieta alta en grasa. Estos resultados dispares que muestran la vía de mTOR y AMPK activadas en los animales sometidos a dieta alta en grasas, dan cuenta de una disminución de las proteínas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos.



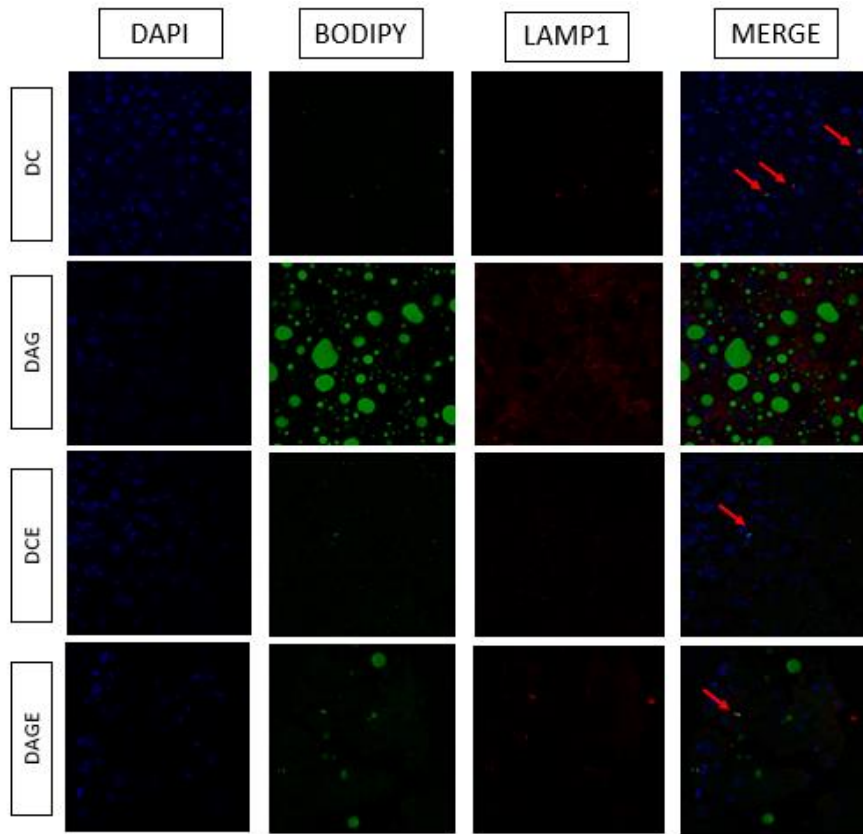
**Figura 14.** Western Blot, a) Imagen representativa de p-P70S6K1 y análisis de la densitometría, b) Imagen representativa de p-AMPK y análisis de la densitometría. Datos presentados como promedio y desviación estándar. \* $p < 0,05$ , DC/DAG, DC/DAGE, # $p < 0,05$ , DAG/DAGE. Determinado con Anova de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey.  $n = 6-9$ .

## Evaluación de la lipofagia

Con la finalidad de evaluar la autofagia específica encargada de degradar lípidos (lipofagia), se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para colocalizar diversos organelos, lipid droplet (BODIPY), con lisosomas (LAMP1) y LD con autofagosoma (LC3). En la figura 15, se muestra una imagen representativa para LC3 con BODIPY, el patrón de colocalización encontrado en los diferentes grupos fue el mismo sin encontrar diferencias significativas entre ellos. Resultado similar fue el que encontré para LAMP1 y BODIPY, que se muestra en la figura 16, donde tampoco existen diferencias significativas entre los diferentes grupos. Con estos resultados se puede concluir que no existe mayor o menor lipofagia en las diferentes condiciones y que el entrenamiento aeróbico no logra activar este mecanismo.



**Figura 15.** Inmunofluorescencia, imagen de muestra de la técnica inmunofluorescencia para la proteína LC3, marcador de autofagosoma (rojo), marcador de núcleos DAPI (azul) y marcador de gotas de grasa BODIPY (verde), aumento 60X.



**Figura 16.** Inmunofluorescencia, imagen de muestra de la técnica inmunofluorescencia para el marcador de lisosomas LAMP1 (rojo), marcador de núcleos DAPI (azul) y marcador de gotas de grasa BODIPY (verde), aumento 60X.

## Discusión

Los primeros resultados obtenidos muestran un panorama general del estado de los ratones después de ser sometidos por 12 semanas a las respectivas dietas (dieta control y dieta alta en grasas) y posteriormente a la división de los grupos que practicaron ejercicio durante 8 semanas. Se encontró que efectivamente la dieta alta en grasas produce un aumento significativo en el peso corporal de los animales en comparación a la dieta control (68,69,81–83), se aprecia que estos cambios no son producto de diferencias en la ingesta de alimentos, ya que presentan cantidades similares, el ejercicio físico parece no tener efecto en la ingesta de alimentos. Comparando estos resultados con otros estudios se consigna que los animales sometidos a DAG con y sin ejercicio no presentan diferencias significativas entre ellos en el peso corporal, por lo que el ejercicio físico por sí solo no logra reducir el peso corporal (69,77,81–83). También se consignó que el peso del hígado de los ratones al momento de ser sacrificados presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos, destacando que el grupo DAGE presentó menor peso que el DAG, esto es importante de destacar, porque a pesar de no haber diferencias significativas en el peso corporal si se encontró esta diferencia a nivel del tejido hepático, resultado encontrado en otros estudios (82). Un resultado dispar a lo encontrado en la literatura es el peso de la grasa epididimal puesto que se encontró que esta no presenta diferencias significativas entre los diferentes grupos, mientras que en la literatura si se encuentran diferencias en los grupos sometidos a ejercicio frente a los que no realizan (68,69,81–83).

Se realizaron test de tolerancia a la glucosa al finalizar las 12 semanas de alimentación con las respectivas dietas y las 8 semanas finalizado el entrenamiento. Los resultados son los esperados según la literatura en ambos casos, donde la dieta alta en grasas desarrolla resistencia a la insulina en los animales sometidos a ese tipo de dieta (82,83). De manera interesante las glicemias en ayuno de los animales sometidos a dieta alta en grasas más ejercicio son menores en comparación al grupo DAG, pero durante la el test de tolerancia a la glucosa se comportan de manera similar, se han encontrado resultados similares en otros estudios (9,66,83,84). También se evaluó la insulina circulante, con respecto a los resultados hay que destacar que el grupo DAGE presenta menores niveles en comparación al grupo DAG lo que podría dar cuenta de una disminución en la resistencia a la insulina en este grupo, mejorando el control de la glicemia mediante el ejercicio, como ya ha sido reportado (68,69,82).

Dentro de la caracterización del modelo de estudio se evaluaron diferentes variables bioquímicas a nivel sanguíneo, se encontró que los niveles de colesterol total y HDL fueron mayores tanto en el grupo DAG y DAGE en comparación a los dieta control, sin existir diferencias significativas entre ellos, dos estudios encontraron resultados similares a estos, donde los niveles de HDL no mejoraron con el ejercicio físico en los animales sometidos a DAG (69,83), mientras que otro estudio encontró disminución en el colesterol total en el grupo DAGE (80). En el caso de los triglicéridos no se encontraron diferencias entre ninguno de los diferentes grupos, siendo los valores normales para todos los grupos, hallazgo que se ha encontrado en otros estudios (82,83). Una posible explicación de que no exista disminución en los triglicéridos plasmáticos es que estos estén acumulados en otros tejidos, principalmente en el tejido hepático y adiposo. Un marcador sanguíneo para evaluar la presencia de esteatosis hepática es el nivel transaminasas, en este caso se midió la alanina aminotransferasa (ALT-GPT) la que presentó niveles muy elevados en el grupo dieta alta en grasas, en cambio en los grupos de dieta control, se obtuvieron niveles normales, el grupo DAGE presentó niveles disminuidos con respecto al DAG con diferencias significativas. Por lo que se puede inferir que el ejercicio actuó regulando de manera positiva la esteatosis hepática a pesar de no tener variación en otras variables, este resultado es avalado por otros estudios que obtuvieron resultados similares en los grupos DAGE (69,80,82) en cambio en otro no se encontró diferencias en el nivel de ALT (78).

Para evaluar que el entrenamiento físico tuvo efecto en la condición física de los animales, independiente de los hallazgos encontrados en los otros parámetros, se tomaron dos pruebas para determinar su efectividad, la primera tiene que ver con la capacidad aeróbica de los ratones, este es el test de la velocidad aeróbica máxima (VAM), el cual mide la velocidad de carrera en la cual se alcanza el máximo consumo de oxígeno ( $VO_2$  max), el cual se encuentra validado en animales (85). Se encontró que los animales de todos los grupos presentaron mejorías, tanto los sometidos a entrenamiento como los que no lo realizaron, pero esta mejora fue más marcada en los grupos entrenados, una posible explicación de porque los grupos que no entrenaron mejoraron, es debido a una adaptación a la prueba y el propio crecimiento de los animales. Un dato que considerar y el cual no se registró fue el tiempo en que los animales descansaban durante la prueba. Puesto que, en determinados momentos los animales se fatigaban antes de la hora de entrenamiento, por lo que se debían retirar 3

minutos para descansar y después volver, no se realizó el registro de esto lo que podría ser un dato interesante a la hora de analizar el volumen total de trabajo de los grupos entrenados y si existen diferencias en este aspecto. El otro test utilizado fue el de grip strength (dinamómetro) el que sirve para evaluar la fuerza ejercida por todas las extremidades de los animales en tres ocasiones, sacando un promedio de rendimiento (86,87), los resultados muestran que solo hubo diferencias significativas cuando se relativiza por el peso de los animales, es decir cuando se toma en consideración la fuerza ejercida según el peso del animal, solo los grupos DAG con DAGE y DC con DCE no presentaron diferencias entre ellos. Los grupos sometidos a una dieta control presentaron mayores niveles de fuerza relativa en comparación a los sometidos a una dieta alta en grasas, esto indica que los animales sometidos a una dieta alta en grasas pueden desarrollar menores niveles de fuerza a pesar de tener mayor peso corporal.

Mediante el análisis de la técnica Oil Red O se obtuvo un panorama cualitativo del estado del hígado de los animales, del cual se pueden extraer diversas conclusiones. Primero se observó disminución del tamaño de las gotas de grasa en el grupo DAGE en comparación al DAG, este resultado es importante tomando en cuenta los tamaños del autofagosoma, que es entre 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , el de los lisosomas entre 50 a 100 nm, mientras que las gotas de grasa pueden llegar a valores de 10  $\mu\text{m}$  (88), por lo tanto, la digestión de gotas más pequeñas podría estar facilitado. Otro resultado interesante es que la cantidad de gotas de grasa aumenta en los ratones del grupo control sometido a ejercicio físico, destacando que estas gotas son pequeñas en comparación a los grupos con dieta alta en grasas. Se ha reportado que después de una sesión de ejercicio físico, entre 2 a 4 horas posterior a la sesión los triglicéridos intrahepáticos están aumentados. Esto es diferente para el músculo esquelético puesto que en él están disminuido los triglicéridos. La posible explicación para este fenómeno es que el músculo esquelético es un gran consumidor de ácidos grasos durante el ejercicio, pero debido a que los niveles circulantes de estos son muy elevados, no todos pueden ser utilizados, por lo que una parte se re-esterifica en el hígado (89–91). Si bien este fenómeno se ha descrito de forma aguda en el hígado, al parecer también ocurre cuando los animales son sometidos a un periodo de entrenamiento crónico, esto podría ser de interés puesto que estos ácidos grasos podrían ser utilizados como sustrato energético por el hígado.

En conjunto con la tinción de lípidos neutros se evaluó la cantidad de triglicéridos intrahepáticos, de esta manera se puede determinar que los animales sometidos a dieta

alta en grasas presentan esteatosis hepática no alcohólica y que el ejercicio físico no logra revertir esta situación, además los grupos con dieta control no presentan esta condición, pero existe una tendencia del grupo control más ejercicio a un aumento de los triglicéridos, esto se puede explicar por lo descrito más arriba. Nuevamente al comparar con la literatura estos resultados son dispares, puesto que diversos estudios encuentran que existe disminución en la cantidad de triglicéridos intrahepáticos, cuando son sometidos a dieta alta en grasas y diversos tipos de ejercicio físico (68,81–83) La PLIN2 es la perilipina más expresada en hepatocitos (92), se ve aumentada en condiciones como EHNA, favorece la acumulación de triglicéridos e inhibe la oxidación de ácidos grasos (93). Por esto motivo se evaluó la expresión de PLIN2, usado como marcador de la cantidad de lipid droplets, los datos obtenidos son concordante con los resultados antes expuestos, ya que los animales sometidos a dieta alta en grasa presentan mayor expresión en comparación a los grupos con dieta control. Como se ve alterada la expresión de perilipinas en el hígado con el ejercicio físico es algo que no está del todo claro, además de existir poca evidencia científica. Un estudio en que se analizó el efecto agudo del ejercicio físico 3 horas y 28 horas post ejercicio, con dos modalidades de ejercicio físico diferentes una con un entrenamiento intervalado de alta intensidad (HIIT) y el otro con entrenamiento continuo, encontró que la expresión de la proteína aumentó con las dos modalidades de ejercicio siendo el HIIT la que mostró mayor aumento, mientras que en el segundo día (28 horas) con los dos tipos de ejercicio se regresó a los niveles de los controles (94). Según lo expuesto en este trabajo la regulación de la PLIN2 sería rápida y aumentaría independiente de la modalidad de ejercicio físico realizado. Hasta el momento no hay reportes de los cambios con entrenamiento crónico como los encontrados en este trabajo. Otro mecanismo que podría estar actuando es el de la autofagia mediada por chaperonas, ya que se ha encontrado que este tipo de autofagia que degrada proteínas, tiene la capacidad de degradar perilipinas como la PLIN2 Y PLIN3 que son las con mayor expresión en el hígado y que al degradarlas permite que puedan actuar las lipasas como ATGL y posteriormente la lipofagia (95). Pero no existe evidencia de que el ejercicio físico pueda activar este tipo de autofagia, por lo que sería interesante en futuras investigaciones evaluar el papel de este tipo de autofagia en conjunto con la lipofagia en la EHNA.

Para evaluar el proceso de autofagia se utilizaron las dos proteínas clásicas utilizadas como marcadores de autofagia, p62 y LC3. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas para la proteína p62, la cual se espera disminuya cuando la autofagia es estimulada, puesto que es una proteína que se incorpora dentro de los lisosomas para ser degradada (42). En el caso de LC3 se encontraron diferencias significativas entre los animales sometidos a dieta control versus los sometidos a dieta alta en grasas, los últimos presentan mayor ratio LC3II/LC3I, lo que indica diferencias en el proceso de la autofagia en ambos grupos. LC3 es utilizada como marcador de autofagia debido a que es una proteína que se une al autofagosoma y por lo tanto se utiliza para cuantificar la cantidad de estos (40). Otro análisis que se realiza a partir de esta proteína es la conversión de LC3 I a LC3 II, puesto que puede dar cuenta de la mayor o menor activación de la autofagia o por otra parte de un bloqueo de esta, que se observe con una mayor acumulación de LC3 II (41). Se evaluó la expresión de LC3 I encontrando una tendencia a presentar mayores niveles por parte de los grupos sometidos a entrenamiento (DCE y DAGE) con respecto a sus controles, lo que indicaría mayor activación de la autofagia, aunque sin diferencias significativas. Al comparar estos resultados con lo que existe en la literatura se observan diferencias en las dos proteínas evaluadas. Un estudio en que se utilizó una dieta alta en sacarosa y deficiente en colina, para inducir EHNA y se entrenó durante 3 semanas a los animales, 5 veces por semana con 1 hora de duración, en una trotadora, se encontró que el entrenamiento, no indujo cambios en la expresión de p62 y LC3 (77). Otro estudio en que se utilizó una dieta western (donde un 42% de las calorías provienen de las grasas) durante 8 semanas, se utilizó otro protocolo de ejercicio físico, el cual es voluntario por parte de los animales, donde pueden correr en una rueda para ejercitarse, se sometieron a este protocolo durante 4 semanas y después fueron sacrificados. En este estudio se encontró que los animales que realizaron ejercicio físico voluntario tenían disminución de p62 y un aumento en el ratio LC3II/LC3I, lo que indicaría una mayor activación de la autofagia (78). Por último, un estudio del presente año en que se utilizó una dieta alta en grasas (45% de las calorías provenientes de la grasa) y un protocolo de entrenamiento durante 10 semanas que consistía en entrenar 5 veces por semana, en una trotadora, con un calentamiento de 5 minutos a un 30%-40% del VO<sub>2</sub> max, seguido de 30 minutos al 60%-65% del VO<sub>2</sub> max, para finalizar con 5 minutos de enfriamiento al 30%-40% del VO<sub>2</sub> max. En este estudio encontraron que el entrenamiento disminuyó la



expresión de p62 y aumentó a expresión de otras proteínas relacionados con la autofagia (80).

La evidencia de que el entrenamiento modifique la autofagia en el hígado graso es reciente y no del todo contundente por la variabilidad de los resultados. Si bien en los diferentes estudios citados hay mejoras en diversos parámetros asociados a la EHNA, solo en algunos se encuentran que la autofagia podría ser uno de los mecanismos asociados a estas mejoras. Al comparar estos estudios con los resultados encontrados en mi tesis hay que tener cuidado en el análisis, puesto que todos utilizamos diferentes dietas que inducen la EHNA y además diferentes protocolos de entrenamiento, así como también los tiempos de las dietas y del entrenamiento son distintos. Otro aspecto importante a considerar es la variabilidad de la autofagia cuando los animales son sometidos a dietas altas en grasas, algo que ya había sido discutido en esta tesis (62,63). Zhang y colaboradores, encontraron resultados similares a los estudios ya citados, en este estudio evaluaron la cantidad de autofagosomas (midiendo LC3 marcados con GFP) en diferentes semanas cuando se administra una dieta alta en grasas. Se encontró que a media semana de empezar una dieta alta en grasas hay disminución de LC3, lo que confirma que de forma aguda la autofagia se ve activada para consumir el exceso de energía disponible, posteriormente a la semana y 3 semanas de dieta se encuentra un leve aumento, sin llegar a los niveles basales, a las 10 semanas hay un brusco aumento en la cantidad de autofagosomas, lo que podría indicar disminución de la autofagia y finalmente ellos encuentran que a las 16 semanas nuevamente caen a niveles muy bajos, la cantidad de autofagosomas (LC3), lo que claramente grafica que el proceso de la autofagia es extremadamente variable cuando se utilizan modelos de dietas elevadas en grasas (96).

Como ya se ha mencionado la regulación de la autofagia a corto plazo está controlada principalmente por los niveles energéticos de la célula, esto es regulado por los dos sensores metabólicos más importantes AMPK y mTOR, la primera con una función de activación y la segunda de inhibición de la vía respectivamente (45). Por este motivo se evaluó el estado de fosforilación de ambas proteínas encontrando que se encuentra activa tanto p-AMPK como p-P70S6K que es una proteína río abajo de mTOR en los animales sometidos a dieta alta en grasa, mientras que en los DAGE solo está activa p-AMPK. Estas vías a pesar de que compiten entre ellas pueden estar activadas al mismo tiempo, por ejemplo después de realizar ejercicio aeróbico (97). En el caso de los

animales sometidos a dieta alta en grasa es esperable que tuvieran niveles más elevados de p-P70S6K, debido al exceso de nutrientes a los que estaban expuestos (98), mientras que la activación de p-AMPK puede ser debido a un mayor ratio AMP/ATP, en estos animales debido a que podrían presentar alteraciones a nivel mitocondrial, lo que impediría mantener niveles adecuados de ATP (99), lo que estaría activando AMPK.

Finalmente, para evaluar si la lipofagia estaba modificada se utilizó la técnica de inmunofluorescencia. En diversos estudios se ha utilizado esta técnica para evaluar si existe aumento de lipofagia frente a diferentes estímulos, encontrando mayor colocalización de gotas de grasas con autofagosomas o lisosomas, lo que estaría indicando un aumento en la degradación de las gotas de grasa (54,57,100,101). En este trabajo en cambio, no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos, es decir, no hay mayor o menor colocalización, entre LD con LC3, ni entre LD y LAMP1, por lo tanto, el ejercicio físico al parecer no estimula esta vía de degradación en el hígado.

## **Conclusiones**

En este trabajo se evaluó el rol del ejercicio físico crónico en la regulación de la lipofagia en un modelo de esteatosis hepática, inducida por una dieta alta en grasas. Considerando los antecedentes expuesto y los resultados obtenidos se concluye que:

- a) El ejercicio físico crónico logra disminuir el peso del hígado de animales sometidos a dieta alta en grasas.
- b) El ejercicio físico crónico de 8 semanas disminuye el daño hepático, medido a través de alanina aminotransferasa.
- c) El ejercicio físico crónico de 8 semanas disminuye los valores de glicemia e insulina en ayuno en animales sometidos a dieta alta en grasas.
- d) El área de las gotas de grasa en los animales sometidos a dieta alta en grasa y ejercicio físico crónico es menor en comparación al grupo sin ejercicio.
- e) El ejercicio físico crónico de 8 semanas no logra disminuir la cantidad de triglicéridos intrahepáticos en los animales sometidos a una dieta alta en grasas.
- f) Existe aumento de la razón LC3II/LC3I en los animales sometidos a dieta alta en grasas.
- g) No hay mayor colocalización de gotas de grasas con proteínas relacionadas con la autofagia.

## **Limitaciones del estudio**

Dentro de las limitaciones de este estudio se debe mencionar que el protocolo de entrenamiento, no se consignaron las salidas de los animales cuando estos no podían seguir corriendo. Esto se refiere al momento en que un animal se fatigaba era retirado de la trotadora para descansar por 3 minutos y después continuar, al no tener registro de estas salidas, no se sabe si el volumen de trabajo final para todos los animales sometidos al entrenamiento fue igual, lo que podría explicar la variabilidad de resultados entre animales del mismo grupo (DCE y DAGE) en algunos de los experimentos realizados.

En la actualidad todavía no se describe un marcador para la lipofagia, por ese motivo la técnica más utilizada por los investigadores es la inmunofluorescencia, para colocalizar lipid droplet, con autofagosomas y lisosomas. Esto se transforma en una limitante de este trabajo, puesto que esta técnica por sí sola no permite explicar la complejidad de interacciones que ocurren para degradar finalmente una gota de grasa, por lo tanto los resultados podrían estar siendo sobreestimados o subestimados.

## **Materiales y métodos**

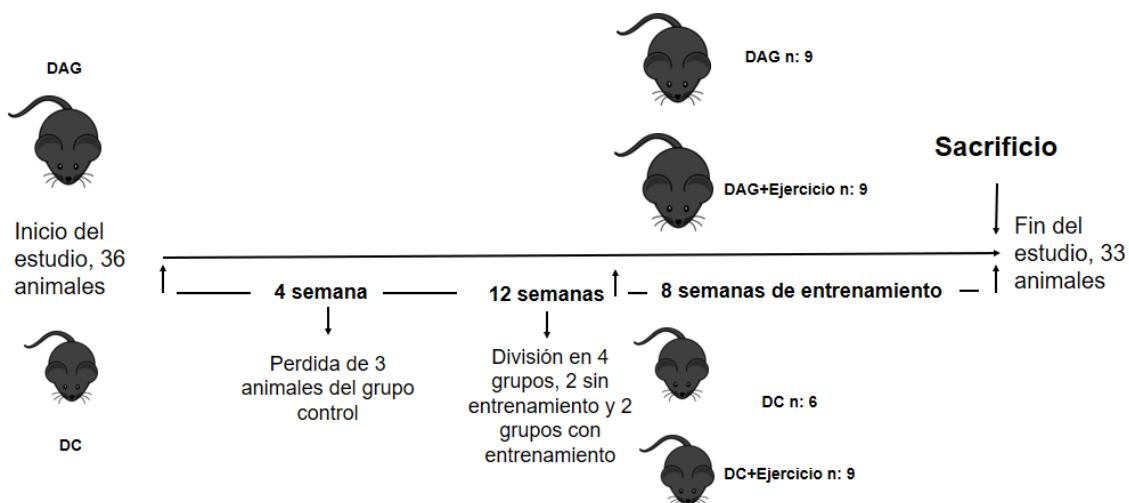
### **Animales y protocolo de alimentación**

Los animales machos C57BL/6J fueron obtenidos desde el Bioterio del Instituto Salud Publica. Se mantuvieron en el bioterio del INTA de la Universidad de Chile, en una habitación con temperatura constante entre 21-23°C y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 hrs. A los 21 días de nacidos, los ratones fueron divididos en los grupos correspondientes. El grupo dieta control recibió una dieta *chow* (D12450J; Research Diets, New Brunswick, NJ) que contendrá 10% grasa, 20% proteínas y 70% carbohidratos. Los grupos alimentados con dieta alta en grasas recibirán una dieta con 60% grasa, 20% proteínas y 20% carbohidratos (D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ). Esta dieta contiene gran cantidad de ácidos grasos saturados (32%) donde destaca la cantidad de ácido palmítico (49,9g). Los animales fueron alimentados durante 20 semanas en total con las respectivas dietas para los experimentos posteriores.

### **Protocolo de ejercicio**

Una vez finalizado el periodo de 12 semanas sometidos a los dos tipos de dieta (control y alta en grasas), los grupos fueron divididos en 4 grupos, dieta control, dieta control ejercicio, dieta alta en grasas y dieta alta en grasas ejercicio. El entrenamiento físico de los animales fue un tipo de entrenamiento crónico continuo, con una extensión de 8 semanas y una frecuencia de 5 veces por semana por 1 hora. Antes de comenzar el entrenamiento los animales fueron sometidos a una semana de adaptación para que conozcan el treadmill y se familiaricen con la sala en la cual ocurrirá el entrenamiento. Posterior a esa semana se somete a una prueba de ejercicio para determinar la velocidad aeróbica máxima de los animales, producto de esos resultados se determinaron las velocidades a las cuales son entrenados los animales. En la semana número 16 se vuelve someter al test de velocidad aeróbica máxima, para corregir las velocidades a las cuales los animales son entrenados y por último en la semana 20 se realizó la última medición de la VAM para evaluar los resultados del entrenamiento. La velocidad de entrenamiento será entre 4-12 m\*min<sup>-1</sup>, sobre un treadmill adaptado con carriles para que 8 ratones puedan ejercitarse en forma paralela. Si un animal se fatiga antes de tiempo se retirará por 3 minutos para que descanse y después será reincorporado para terminar la sesión de entrenamiento. La pendiente del treadmill será de un 5% y la sala de entrenamiento se ubica en el Bioterio del Instituto de Nutrición y Tecnología de los

Alimentos de la Universidad de Chile fue adaptada para mantener temperaturas entre 21-25°C.



**Figura 18.** En esta figura se muestra la cantidad de animales que tiene el estudio en total y por grupos. Se detalla la pérdida de animales sufrida en la semana 4.

### Tamaño de la muestra

La determinación del número mínimo de muestra, se realizó según la siguiente fórmula (102):

Para el primer objetivo, aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan mínimo 5 sujetos en el primer grupo y 5 en el segundo para detectar una diferencia igual o superior a 1 unidades. Se asume que la desviación estándar común es de 0.5%. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%. Para el tercer objetivo, aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se necesitan mínimo 6 ratones en cada grupo para detectar una diferencia mínima de 4 entre dos grupos, asumiendo que existen 4 grupos y una desviación estándar de 0.5.

### Variables bioquímicas

Se realizaron diversas pruebas bioquímicas con la finalidad de tener un panorama general del estado de salud de los animales, los test a realizar serán los siguientes: curva de tolerancia a la glucosa, medición de insulina, perfil lipídico, perfil hepático. La curva de tolerancia a la glucosa será realizada pre y post periodo de entrenamiento, es decir, a las 12 semanas y 20, mientras que las otras variables solo serán medidas al finalizar las 20 semanas.

## **Marcadores de autofagia y lipofagia**

LC3: Es la proteína más estudiada en relación con la autofagia y más usada como marcador de autofagosomas. A través de su resolución en electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posterior Western blot, la proteína LC3 endógena puede ser detectada como dos bandas, una representa LC3-I, la cual es citosólica y la otra representa LC3-II, la cual se encuentra conjugada a fosfatidiletanolamina y está unida a la membrana del autofagosoma. La masa molecular de LC3-II es mayor que LC3-I debido a su conjugación con fosfatidiletanolamina. A pesar de esto, se observa que LC3-II migra más rápido que LC3-I al resolver extractos proteicos por medio de SDS-PAGE. Esto ocurriría probablemente a la gran hidrofobicidad que LC3-I tiene en uno de los extremos de su estructura. Por lo tanto, la conversión de LC3-I a LC3-II no se debe a un procesamiento de la proteína sino a la conjugación con fosfatidiletanolamina. A través de ensayos de Western blot, LC3-I y LC3-II se detectan como bandas alrededor de los 14 y 16 KDa, respectivamente. De este modo la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas y, por ende, sirve como un indicador de autofagia.

p62/SQSTM1: Esta proteína es cargo específico de autofagia. Al inducirse el proceso de autofagia, esta es degradada dentro del lisosoma, por lo tanto, su disminución se utiliza como marcador de la inducción de autofagia, por esta razón se determina los niveles de esta proteína mediante western blot.

Inmunofluorescencia: Esta técnica fue utilizada para determinar la cantidad de lipid droplet (BODIPY 493/503) que se colocan con los lisosomas (LAMP 1) y autofagosomas (LC3). Se ha encontrado que la mayor colocalización entre BODIPY 493/503, LAMP 1 y LC3 se da en condiciones en la cual la autofagia es estimulada, por lo tanto, esto fue utilizado como marcador de lipofagia.

Se obtuvieron cortes de hígado obtenidos con criostato, para la tinción con BODIPY, luego para la inmunofluorescencia, los cortes se fijaron en paraformaldehído 4% p/v en PBS 0.1M pH 7.4 por 10 minutos, seguido de tres lavados con PBS (10 minutos cada uno) y bloqueo con PBS/BSA 2% por una hora. La incubación con el anticuerpo primario específico se realizó de acuerdo con las condiciones (temperatura,

concentración, etc.) entregadas por el proveedor respectivamente. El anticuerpo secundario estará conjugado con Alexa 488 o Alexa 633 según corresponda, finalmente los cortes fueron montados con DAKO (Dako Florescent Mounting Medium, DAKO North America, Inc). Los cortes montados fueron examinados con microscopio confocal Carl Zeiss, Inc. Axiovert 135. La Fluorescencia relativa será cuantificada usando el software ImageJ (NIH), en regiones ópticas de interés.

### **Histología**

Tinción de LD: La tinción con Oil red O es una tinción liposoluble que permite detectar triglicéridos neutros y lípidos en los tejidos. El oil red (Sigma©) se prepara disolviéndolo al 0,7% en propilenglicol y eliminando las impurezas con un papel filtro y se almacena a 60°C hasta el momento de su uso. Para esta tinción, se cortaron secciones de hígado congelado en la solución O.C.T (Tissue-Tek©) a 5 µm en el criostato. Las muestras se deben montar en un medio acuoso Aquatex (Merck©) antes de ser observadas al microscopio óptico.

### **Triglicéridos intrahepáticos**

Se extrajo 20 mg de hígado, los cuales fueron homogenizados mediante disrupción mecánica en un tubo de vidrio con 1 mL de solución cloroformo-metanol (2:1), se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se separó la fase orgánica. Se midieron triglicéridos intrahepáticos a través del kit TG Color *GPO/PAP* AA (1780105, Wiener Lab) agregando 10 µL de muestra más 1 mL de reactivo. Para cuantificar proteínas se utilizó el reactivo Coomassie Plus<sup>TM</sup> Protein Assay (1856210, Thermo Scientific), agregando 10 µL de muestra más 2 mL de reactivo, ambas variables fueron medidas a través del espectrofotómetro (BTS-350, BioSystems), y se expresaron como mg de TG/g de proteína.

### **Inmunoblot**

Las muestras de hígado de los ratones fueron homogeneizadas mediante sonicación en buffer de lisis frío (140 mM NaCl; 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA y 20 mM Tris·HCl, pH 7,5) y fueron suplementadas con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras fueron incubadas en hielo durante 30 minutos y posteriormente centrifugadas a 3.000 g, las proteínas del sobrenadante son separadas en un gel SDS-PAGE al 12%. Posteriormente fueron transferidas a una membrana difluoruro de

polivinilideno y he incubadas con un anticuerpo primario a 4°C durante la noche. Posterior al lavado, las membranas fueron incubadas durante 2 hrs con anticuerpo secundario, anti-rabbit o anti-mouse (Sigma Aldrich). Los análisis posteriores fueron realizados con ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). Los anticuerpos primarios a utilizar serán: anti-fosfo-AMPK (1:1000), anti-AMPK (1:1000), anti-LC3 (1:1000), anti-p62/SQSTM1 (1:1000), anti-fosfo-p70S6K (1:1000), anti-p70S6K (1:1000), obtenidos de Cell Signalling Technology (Denver, MA), Anti-PLIN2 (1:1500, OriGene Technologies, Inc.). Los anticuerpos secundarios fueron anti-rabbit o anti-mouse según correspondan y serán obtenidos de Sigma Aldrich.

### **Análisis estadístico**

La evaluación de la distribución normal de los datos se realizará utilizando el test de Shapiro Wilk. En el caso de que la distribución de los datos sea normal las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se determinará mediante t-student o ANOVA (dos vías) seguido de un test post-hoc (Bonferroni), según corresponda. En caso de que los datos tengan una distribución no normal se utilizarán las pruebas estadísticas U de Mann Whitney y Kruskal Wallis. Se determinará una significancia estadística con  $p < 0.05$ . Los resultados se expresarán como promedio  $\pm$  DS. Para todos estos análisis se utilizará el software GraphPad Prism versión 6.0, San Diego, CA, USA.

### **Normas de Bioseguridad**

#### **Protocolo de manejo y cuidado de los animales.**

El manejo de los animales queda bajo la exclusiva responsabilidad del tesista, Francisco Javier Pino De la Fuente, y de su tutor Dr. Rodrigo Troncoso Cotal. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto y Tecnología de los Alimentos en las condiciones que la cepa lo requiere (entre 21-25°C, agua y alimentación ad libitum, ciclos de luz-oscuridad de 12-12h, en una sala especial aislada de sonidos y de contaminación). La especie del ratón es *Mus Musculus*, cepa C57BL/6, sexo masculino, en un total de 36, adquiridos a los 21 días de nacimiento en el Instituto de Salud Pública, según los requerimientos que estipula la ley y el propio ISP. Luego de 1 semana de aclimatación en el Bioterio INTA, fueron sometidos a 12 semanas a una dieta alta en grasa y dieta control, para posteriormente ser entrenados físicamente en un treadmill adaptado para ratones de laboratorio. El peso promedio a la llegada al Bioterio corresponde a aproximadamente 10 g y se espera que alcancen sobre los 50 g al



finalizar el estudio. Se requiere del uso de estos animales ya que no existen a la fecha modelos celulares para el estudio de la obesidad y menos para el protocolo de entrenamiento. La cepa 57 está ampliamente validada en la literatura científica como un modelo adecuado de estudio de obesidad por dieta alta en grasa. Además, esta especie es ampliamente utilizada en Chile por diferentes grupos de laboratorios lo que permite establecer una base sólida de conocimiento sobre su manejo y mantención. El número mínimo de ratones para la totalidad de los experimentos se calculó de acuerdo a la variabilidad de los procedimientos experimentales y de acuerdo a la variación intrínseca entre los animales. Para el test de tolerancia a la glucosa, se contactó a Liza Fonseca una veterinaria que ha trabajado en otras investigaciones junto al Dr. Rodrigo Troncoso, los animales fueron privados durante toda la noche de alimentación y en la mañana serán inyectados vía intraperitoneal con una carga de glucosa. A las 2 horas se les medirá la glicemia a través de un pequeño corte en la cola.

Al finalizar los animales fueren eutanasiados según procedimientos estandarizados para minimizar el dolor o sufrimiento del ratón. Los animales se les aplicó como método de anestesia isoflurano en una caja acondicionada para ello, y rápidamente luego de comprobar el estado de anestesia los animales se les aplicará dislocación cervical. Los cadáveres serán eliminados de acuerdo con las normas de bioseguridad del INTA. Se depositan en bolsa transparente, se agrega una etiqueta de identificación del laboratorio. Posteriormente se introducen a freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  a la espera de la Derivación a la red de gestión de cadáveres por la unidad de bioseguridad.

### **Relevancia del estudio**

La esteatosis hepática no alcohólica es una de las enfermedades más comunes en las sociedades de occidente, por lo tanto, es importante conocer diferentes estrategias para poder regularla. La autofagia es un proceso fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del sistema, por lo que resulta relevante determinar cuáles son los mecanismos que la regulan, a su vez el ejercicio físico como terapia no farmacológica no ha sido del todo explorado, pudiendo ser un tratamiento para inducir la autofagia en sujetos con EHNA.

La relación entre esteatosis hepática, autofagia y ejercicio físico crónico, ha sido tratada en pocos estudios, por lo tanto, es de gran interés investigar esta triada en conjunto, ya que se ha demostrado que el ejercicio físico puede regular tanto la esteatosis hepática

como la autofagia, y que esta última es uno de los procesos que está asociado a la esteatosis. Además, como se ha mencionado la lipofagia tiene un papel relevante en el mantenimiento de los lípidos a nivel del hígado, por este motivo es interesante estudiar como el ejercicio físico regula la lipofagia en condiciones de EHNA. Este es uno de los puntos novedosos de esta tesis, puesto que no hay literatura que plantee esta interrogante y que ocupe marcadores para medir la lipofagia.

Por estos motivos y los antecedentes expuestos en este proyecto, es que se pretende evaluar si el ejercicio físico crónico revierte la disminución de la lipofagia en hígado graso no alcohólico inducido por una dieta alta en grasas.

## Bibliografía

1. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm*. 2010 Jul 1;2010:e802078.
2. OMS | Obesidad y sobrepeso [Internet]. WHO. [cited 2017 Jan 16]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
3. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Obesidad y falta de conciencia de la sociedad chilena [Internet]. INTA. 2018 [cited 2018 Jun 29]. Available from: <http://inta.cl/encuesta-nacional-de-salud-2016-2017-obesidad-y-falta-de-conciencia-de-la-sociedad-chilena/>
4. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):875–80.
5. Renehan AG, Zwahlen M, Egger M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer*. 2015 Aug;15(8):484–98.
6. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 Jul 28;20(28):9330–7.
7. Rabkin SW. The relationship between epicardial fat and indices of obesity and the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Metab Syndr Relat Disord*. 2014 Feb;12(1):31–42.
8. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *The Lancet*. 2005 Apr 16;365(9468):1415–28.
9. Takahashi A, Abe K, Usami K, Imaizumi H, Hayashi M, Okai K, et al. Simple Resistance Exercise helps Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Sports Med*. 2015 Oct;94(10):848–52.
10. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004 Jun;33(2):351–75.
11. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis*. 2015 Mar 1;47(3):181–90.
12. Carr RM, Oranu A, Khungar V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterol Clin*. 2016 Dec 1;45(4):639–52.
13. Alwis NMW de, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: The mist gradually clears. *J Hepatol*. 2008 Jan 1;48:S104–12.
14. López-Velázquez JA, Silva-Vidal KV, Ponciano-Rodríguez G, Chávez-Tapia NC, Arrese M, Uribe M, et al. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann Hepatol*. 2014 Apr;13(2):166–78.
15. Riquelme A, Arrese M, Soza A, Morales A, Baudrand R, Pérez-Ayuso RM, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its association with obesity, insulin resistance and increased serum levels of C-reactive protein in Hispanics. *Liver Int*. 2009 Jan 1;29(1):82–8.

16. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology*. 2011 Jan 1;140(1):124–31.
17. Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med*. 2002 Apr 18;346(16):1221–31.
18. Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association | American College of Gastroenterology [Internet]. [cited 2016 Dec 20]. Available from: <http://gi.org/guideline/the-diagnosis-and-management-of-non-alcoholic-fatty-liver-disease-practice-guideline-by-the-american-association-for-the-study-of-liver-diseases-american-college-of-gastroenterology-and-the-america/>
19. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980 Jul;55(7):434–8.
20. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun 1;41(6):1313–21.
21. Rinella ME. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *JAMA*. 2015 Jun 9;313(22):2263–73.
22. Brouwers B, Hesselink MKC, Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling VB. Effects of exercise training on intrahepatic lipid content in humans. *Diabetologia*. 2016 Oct 1;59(10):2068–79.
23. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Dec 1;19(10):371–9.
24. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Its Connection with Insulin Resistance, Dyslipidemia, Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. *Nutrients*. 2013 May 10;5(5):1544–60.
25. Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: The metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Apr 1;25(4):672–90.
26. Geisler CE, Renquist BJ. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J Endocrinol*. 2017 Jan 7;234(1):R1–21.
27. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res*. 2013 Jan 1;52(1):175–91.
28. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metab - Clin Exp*. 2016 Aug 1;65(8):1038–48.
29. Cusi K. Role of Insulin Resistance and Lipotoxicity in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009 Nov 1;13(4):545–63.
30. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2010 Mar 1;1801(3):299–310.

31. Gonzalez-Baró MR, Lewin TM, Coleman RA. Regulation of Triglyceride Metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2007 May 1;292(5):G1195–9.
32. Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 Jul 14;20(26):8364–76.
33. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide. *Nutrients* [Internet]. 2017 Sep 27 [cited 2018 Aug 16];9(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5691689/>
34. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*. 2006 Feb 1;87(1):1–16.
35. Lau JKC, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol*. 2017 Jan;241(1):36–44.
36. Lai Y-S, Chen W-C, Kuo T-C, Ho C-T, Kuo C-H, Tseng YJ, et al. Mass-Spectrometry-Based Serum Metabolomics of a C57BL/6J Mouse Model of High-Fat-Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease Development. *J Agric Food Chem*. 2015 Sep 9;63(35):7873–84.
37. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006 Jan 6;36(3):485–501.
38. Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res*. 2015;64 Suppl 5:S627-636.
39. Win S, Than TA, Le BHA, García-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Sab (Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity. *J Hepatol*. 2015 Jun;62(6):1367–74.
40. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005;12(S2):1542–52.
41. Zhang X, Chen S, Huang K, Le W. Why should autophagic flux be assessed? *Acta Pharmacol Sin*. 2013 May;34(5):595–9.
42. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1069–75.
43. Lavallard VJ, Meijer AJ, Codogno P, Gual P. Autophagy, signaling and obesity. *Pharmacol Res*. 2012 Dec;66(6):513–25.
44. Kennedy BK, Lamming DW. The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand ConducTOR of Metabolism and Aging. *Cell Metab*. 2016 Jun 14;23(6):990–1003.
45. Egan DF, Kim J, Shaw RJ, Guan K-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*. 2011 Jun;7(6):645–6.

46. Neel BA, Lin Y, Pessin JE. Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Dec;24(12):635–43.
47. Egan B, Zierath JR. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):162–84.
48. Turcotte LP, Abbott MJ. Contraction-induced signaling: evidence of convergent cascades in the regulation of muscle fatty acid metabolism. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012 Oct 31;90(11):1419–33.
49. Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Res Int.* 2014 Sep 10;2014:e120179.
50. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, et al. Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2014 Sep 1;44(9):1026–36.
51. González-Rodríguez Á, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis.* 2014 Apr 17;5(4):e1179.
52. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 May;7(5):373–8.
53. Okumura T. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem.* 2011 Dec 1;67(4):629.
54. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1131–5.
55. Schulze RJ, Drižytė K, Casey CA, McNiven MA. Hepatic lipophagy: New insights into autophagic catabolism of lipid droplets in the liver. *Hepatol Commun.* 2017 Jun 9;1(5):359–69.
56. Kaushik S, Cuervo AM. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy.* 2016 Feb 1;12(2):432–8.
57. Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG. ATGL Promotes Autophagy/Lipophagy via SIRT1 to Control Hepatic Lipid Droplet Catabolism. *Cell Rep.* 2017 Apr 4;19(1):1–9.
58. Sinha RA, Farah BL, Singh BK, Siddique MM, Li Y, Wu Y, et al. Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology.* 2014 Apr 1;59(4):1366–80.
59. Unger RH, Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2002 Dec 30;1585(2):202–12.
60. Tanaka Satoshi, Hikita Hayato, Tatsumi Tomohide, Sakamori Ryotaro, Nozaki Yasutoshi, Sakane Sadatsugu, et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology.* 2016 Oct 21;64(6):1994–2014.

61. Zhang Z, Yao Z, Chen Y, Qian L, Jiang S, Zhou J, et al. Lipophagy and liver disease: New perspectives to better understanding and therapy. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jan 1;97(Supplement C):339–48.
62. The autophagy-lysosomal pathway is involved in TAG degradation in the liver: the effect of high-sucrose and high-fat diet. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Aug 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974050>
63. Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Aug 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=effect+of+short+and+long+term+high+fat+feeding+on+autophagy>
64. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports.* 2015 Dec 1;25:1–72.
65. Whitsett M, VanWagner LB. Physical activity as a treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *World J Hepatol.* 2015 Aug 8;7(16):2041–52.
66. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut.* 2011 Jan 9;60(9):1278–83.
67. Bacchi E, Negri C, Targher G, Faccioli N, Lanza M, Zoppini G, et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 randomized trial). *Hepatology.* 2013 Oct 1;58(4):1287–95.
68. Cintra DE, Ropelle ER, Vitto MF, Luciano TF, Souza DR, Engelmann J, et al. Corrigendum to “Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: The role of sterol regulatory element-binding protein-1c” [Life Sci. 91(11–12) (2012) 395–401]. *Life Sci.* 2016 May 1;152:178–9.
69. Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol.* 2012 May;64(4):273–82.
70. Thompson PD, Crouse SF, Goodpaster B, Kelley D, Moyna N, Pescatello L. The acute versus the chronic response to exercise. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. [cited 2017 Sep 1];33(6 Suppl). Available from: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=11427768>
71. Sanchez AMJ. Autophagy regulation in human skeletal muscle during exercise. *J Physiol.* 2016 Sep 15;594(18):5053–4.
72. Jamart C, Naslain D, Gilson H, Francaux M. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2013 Oct 15;305(8):E964–74.
73. Møller AB, Vendelbo MH, Christensen B, Clasen BF, Bak AM, Jørgensen JOL, et al. Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2015 Apr 15;118(8):971–9.

74. Fritzen AM, Madsen AB, Kleinert M, Treebak JT, Lundsgaard A-M, Jensen TE, et al. Regulation of autophagy in human skeletal muscle: effects of exercise, exercise training and insulin stimulation. *J Physiol*. 2016 Feb 1;594(3):745–61.
75. He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 2012 Jan 26;481(7382):511–5.
76. He C, Rhea Sumpter J, Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy*. 2012 Oct 16;8(10):1548–51.
77. Alex S, Boss A, Heerschap A, Kersten S. Exercise training improves liver steatosis in mice. *Nutr Metab*. 2015;12:29.
78. Rosa-Caldwell ME, Lee DE, Brown JL, Brown LA, Perry RA, Greene ES, et al. Moderate physical activity promotes basal hepatic autophagy in diet-induced obese mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016 Oct 12;42(2):148–56.
79. Sandra Milić DL, timac. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 28;20(28):9330–7.
80. Ghareghani P, Shanaki M, Ahmadi S, Khoshdel AR, Rezvan N, Meshkani R, et al. Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. *Obes Res Clin Pract [Internet]*. [cited 2017 Mar 9]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871403X17300042>
81. Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, Meers GM, Laughlin MH, Booth FW, et al. Treating NAFLD in OLETF Rats with Vigorous-Intensity Interval Exercise Training. *Med Sci Sports Exerc*. 2015 Mar;47(3):556–67.
82. Cho J, Kim S, Lee S, Kang H. Effect of Training Intensity on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Med Sci Sports Exerc*. 2015 Aug;47(8):1624–34.
83. Kapravelou G, Martínez R, Andrade AM, Nebot E, Camiletti-Moirón D, Aparicio VA, et al. Aerobic interval exercise improves parameters of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations of metabolic syndrome in obese Zucker rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015 Aug 14;40(12):1242–52.
84. Bae JC, Suh S, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, et al. Regular Exercise Is Associated with a Reduction in the Risk of NAFLD and Decreased Liver Enzymes in Individuals with NAFLD Independent of Obesity in Korean Adults. *PLOS ONE*. 2012 Oct 22;7(10):e46819.
85. Marcaletti S, Thomas C, Feige JN. Exercise Performance Tests in Mice. In: *Current Protocols in Mouse Biology [Internet]*. John Wiley & Sons, Inc.; 2011. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470942390.mo100160/abstract>
86. Castro B, Kuang S. Evaluation of Muscle Performance in Mice by Treadmill Exhaustion Test and Whole-limb Grip Strength Assay. *Bio-Protoc [Internet]*. 2017 Apr 20;7(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5510664/>



87. Bonetto A, Andersson DC, Waning DL. Assessment of muscle mass and strength in mice. *BoneKEy Rep* [Internet]. 2015 Aug 19;4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549925/>
88. Autophagy and Lipid Droplets in the Liver. *Annu Rev Nutr.* 2015;35(1):215–37.
89. Bilet L, Brouwers B, Ewijk PA van, Hesselink MKC, Kooi ME, Schrauwen P, et al. Acute exercise does not decrease liver fat in men with overweight or NAFLD. *Sci Rep.* 2015 Apr 13;5:srep09709.
90. Bucher J, Krüsi M, Zueger T, Ith M, Stettler C, Diem P, et al. The effect of a single 2 h bout of aerobic exercise on ectopic lipids in skeletal muscle, liver and the myocardium. *Diabetologia.* 2014 May 1;57(5):1001–5.
91. Egger A, Kreis R, Allemann S, Stettler C, Diem P, Buehler T, et al. The Effect of Aerobic Exercise on Intrahepatocellular and Intramyocellular Lipids in Healthy Subjects. *PLOS ONE.* 2013 Aug 14;8(8):e70865.
92. Kimmel AR, Sztalryd C. The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet–Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis. *Annu Rev Nutr.* 2016;36(1):471–509.
93. Carr RM, Ahima RS. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Exp Cell Res.* 2016 Jan 15;340(2):187–92.
94. Tuazon MA, McConnell TR, Wilson GJ, Anthony TG, Henderson GC. Intensity-dependent and sex-specific alterations in hepatic triglyceride metabolism in mice following acute exercise. *J Appl Physiol.* 2014 Sep 25;118(1):61–70.
95. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol.* 2015 Jun;17(6):759–70.
96. Zhang H, Yan S, Khambu B, Ma F, Li Y, Chen X, et al. Dynamic MTORC1-TFEB feedback signaling regulates hepatic autophagy, steatosis and liver injury in long-term nutrient oversupply. *Autophagy.* 2018 Jul 25;0(0):1–17.
97. Vissing K, McGee SL, Farup J, Kjølhede T, Vendelbo MH, Jessen N. Differentiated mTOR but not AMPK signaling after strength vs endurance exercise in training-accustomed individuals. *Scand J Med Sci Sports.* 2013 Jun 1;23(3):355–66.
98. Kim SG, Buel GR, Blenis J. Nutrient Regulation of the mTOR Complex 1 Signaling Pathway. *Mol Cells.* 2013 Jun 30;35(6):463–73.
99. Mansouri A, Gattolliat C-H, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology.* 2018 Sep 1;155(3):629–47.
100. Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, Athonvarangkul D, Liebling E, Merlo P, et al. Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metab.* 2016 Jan 12;23(1):113–27.
101. Varshney R, Varshney R, Mishra R, Gupta S, Sircar D, Roy P. Kaempferol alleviates palmitic acid-induced lipid stores, endoplasmic reticulum stress and pancreatic  $\beta$ -cell

dysfunction through AMPK/mTOR-mediated lipophagy. *J Nutr Biochem*. 2018 Jul 1;57:212–27.

102. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303–6.