



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME FINAL DE PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

Análisis de la expresión del gen *FASN* y *ACSL* en hígado de ratas
alimentadas con dieta alta en grasa y probióticos,
por medio de PCR en tiempo real

ALUMNA:

MATILDE IRENE GALICIA PÉREZ

MATRÍCULA:

2173082698

ASESORES:

DRA. MARÍA ANGÉLICA GUTIÉRREZ NAVA

DRA. JULIA ESPERANZA TORRES MENA

Julio 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Julio Isael Pérez Carreón por permitirme el uso de las instalaciones del laboratorio de Enfermedades Hepáticas del INMEGEN para realizar los experimentos necesarios para concluir este proyecto, a la Dra. Ema Elvira Herrera López por enseñarme las técnicas para el desarrollo de este proyecto, a la Dra. Julia Esperanza Torres Mena por mostrarse siempre dispuesta a resolver mis dudas con gran disposición y compartirme sus conocimientos y a la Dra. María Angélica Gutiérrez Nava por el apoyo, la paciencia, el tiempo y la disposición para realizar este proyecto en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la UAM Xochimilco.

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	4
• LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	4
• DIETA OCCIDENTAL (RICA EN GRASAS Y AZÚCARES)	5
• EJE HÍGADO-INTESTINO	6
• INTERACCIÓN VITAL: MUCOSA INTESTINAL Y MICROBIOTA	8
• METABOLISMO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	9
• MICROBIOTA INTESTINAL Y LA EHGNA	10
• PROBIÓTICOS Y LA ENFERMEDAD DEL HGNA	12
• PREBIÓTICOS Y LA ENFERMEDAD DEL HGNA	14
• METABOLISMO EN EL HÍGADO	15
• METABOLISMO DE LÍPIDOS: METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS	16
• FUENTES DE ÁCIDOS GRASOS HEPÁTICOS	16
• LIPOGÉNESIS DE <i>NOVO</i>	18
• FASN: SINTASA DE ÁCIDOS GRASOS	20
OBJETIVOS	22
• OBJETIVO GENERAL	22
• OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
• MICROORGANISMO Y MEDIO DE CULTIVO	23
• ACTIVACIÓN DE <i>BIFIDOBACTERIUM SP.</i>	23
• PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES DE <i>BIFIDOBACTERIUM SP.</i>	23
DISEÑO EXPERIMENTAL	24
• INDUCCIÓN DE HÍGADO GRASO Y ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS	24
• COMPOSICIÓN DE LA DIETA ALTA EN GRASA (HFD)	25
• OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	25
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>FASN</i> POR PCR EN TIEMPO REAL	26
• EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA	26
• CUANTIFICACIÓN DE RNA	27
• OBTENCIÓN DE cDNA	27
• PCR EN TIEMPO REAL	28
ANÁLISIS HISTOLÓGICO	30
• INCLUSIÓN DE TEJIDOS EN PARAFINA	30
• TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA EN TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA	30
• TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA EN TEJIDO FRESCO	30
• ANÁLISIS DE DATOS	31
RESULTADOS	32
• PESO CORPORAL	32
• CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LOS HÍGADOS	32
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>FASN</i>	35
• CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL	35
• INTEGRIDAD DEL ARN	37
• qPCR: GEN QUE CODIFICA PARA LA ÁCIDO GRASO SINTASA EN LOS GRUPOS CON INULINA Y COMBINADA CON <i>BIFIDOBACTERIUM SP.</i>	38
• CAMBIOS SEROLÓGICOS DE LOS LÍPIDOS Y LOS MARCADORES HEPÁTICOS	39
• ANÁLISIS HISTOLÓGICO	40
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43

Introducción

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) es el padecimiento hepático más común a nivel mundial, comprende un amplio espectro clínico patológico que incluye esteatosis hepática, esteatohepatitis, cirrosis y hepatocarcinoma. La EHGNA se relaciona con la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico; y se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado ($\geq 5\%$ de los hepatocitos), en ausencia del consumo significativo de alcohol (menos 20-30 g de alcohol al día), infección viral hepática o medicamentos.

La EHGNA se observa con mayor frecuencia en personas con sobrepeso y obesidad, y se ha vuelto más común principalmente en países occidentales; compromete diferentes mecanismos bioquímicos y genera diversos tipos de lesiones hepáticas. La fisiopatología consiste en la acumulación de grasa (esteatosis), inflamación y fibrosis de intensidad variable. Distintos mecanismos buscan explicar la progresión de esta enfermedad y se ha planteado el papel que pudieran jugar los factores genéticos en la patogenia de la EHGNA.

Los cambios en el estilo de vida, son hasta ahora la terapia más aceptada para la EHGNA y comorbilidades asociadas, pero en algunos casos se requiere la administración de terapia farmacológica como coadyuvante en pacientes que no tengan buena respuesta a las modificaciones en el estilo de vida, para impedir la progresión de la enfermedad. Entre las ayudas farmacológicas destacan: la vitamina E y D, la metformina, el ácido ursodeoxicólico y como una nueva alternativa se propone el uso de probióticos y prebióticos. Los efectos fisiológicos sistémicos relacionados con el metabolismo lipídico de los probióticos y los prebióticos podrían ser un factor protector en la patogénesis de la enfermedad de HGNA.

Por lo anterior, en el presente proyecto se analizó el efecto de la administración de inulina y el probiótico *Bifidobacterium* sp., en la expresión del gen *FASN*, relacionado con el metabolismo de lípidos, en el hígado de las ratas alimentadas durante 6 semanas con una dieta alta en grasa y fructosa. El gen *ACSL* no se analizó porque no se contó con la sonda.

Marco teórico

- **La enfermedad del hígado graso no alcohólico**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), es un término que comprende dos enfermedades hepáticas: la esteatosis hepática simple y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), esta última puede progresar a fibrosis, cirrosis y finalmente, carcinoma hepatocelular (Fig.1) (1). Estos cambios histopatológicos ocurren en el hígado en la ausencia de un consumo excesivo de alcohol (<20 g de etanol/día), hepatitis viral o autoinmune, trastornos hepáticos congénitos o el uso prolongado de medicamentos (2) La esteatosis hepática simple, se caracteriza por la acumulación de grasa en forma de vacuolas lipídicas, principalmente triglicéridos, en el citoplasma de los hepatocitos debido a una alteración en los mecanismos homeostáticos que regulan la síntesis de grasa en el hígado (3). Si no se identifica y trata a tiempo, aproximadamente el 5% de los pacientes pueden progresar a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). La EHNA, además de la acumulación de grasa, se distingue por un infiltrado inflamatorio, balonización hepatocelular, muerte celular y depósito de colágeno (fibrosis). Tras la instauración de la EHNA, hasta un 30% de pacientes podrían desarrollar cirrosis en 10 años y aproximadamente el 2% de ellos desarrollará carcinoma hepatocarcinoma (4).

La enfermedad de hígado graso no alcohólica tiene múltiples factores de riesgo tales como el sobrepeso, la obesidad, la dislipidemia, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2); todos ellos están asociados con el síndrome metabólico. La alta prevalencia actual de la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, así como el progreso en el manejo de las hepatitis virales, ha llevado a la EHGNA a ser un problema clínico muy relevante. Hoy en día es la causa principal de la enfermedad hepática crónica en países desarrollados y de la indicación de trasplante hepático (5). La EHGNA afecta prácticamente a un tercio de la población mundial y México es uno de los países cuya población reúne varios factores de riesgo, por lo tanto, su prevalencia podría superar el

50%, y su incidencia está aumentando en los últimos años y puede encontrarse hasta en un 30% de la población general y hasta en un 70% en individuos obesos o con DM (6).

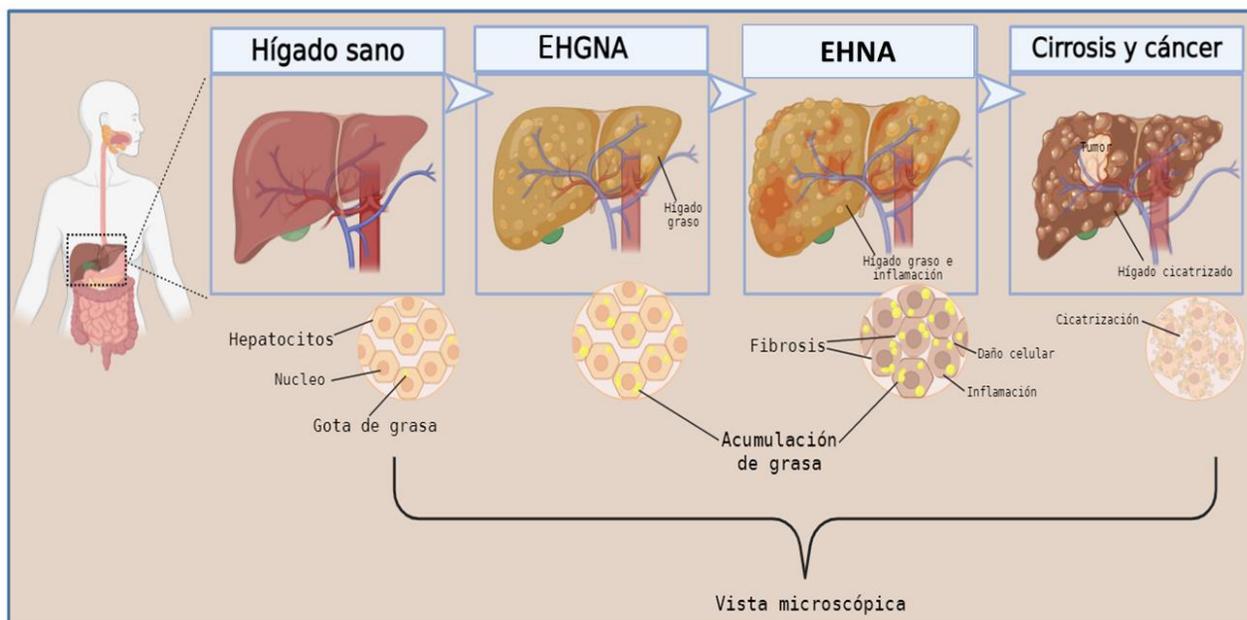


Figura 1. Etapas que comprenden la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Elaboración propia

- **Dieta occidental (rica en grasas y azúcares)**

Los acelerados procesos de industrialización y la urbanización han evidenciado el aumento exponencial del consumo de alimentos ultra procesados (7). El consumo de las dietas ricas en fructuosa, sacarosa y grasas saturadas, así como el predominio del sedentarismo han propiciado una epidemia de obesidad, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico que se están convirtiendo en un factor importante en la incidencia de la EHGNA (6).

Se utiliza el término “dieta occidental” para un tipo de hábito alimenticio cada vez más extendido, caracterizado por el consumo excesivo de proteína de origen animal, alimentos procesados, grasas saturadas, azúcares refinados, junto a una disminución en la ingesta de frutas, vegetales y granos. Estos alimentos son fuente importante de minerales, vitaminas, fibra y antioxidantes, esenciales para la salud, y su bajo consumo ha sido asociado con algunas enfermedades crónicas tales como la obesidad, la diabetes tipo 2, procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (8).

La dieta occidental puede modificar el balance y la diversidad del microbioma intestinal conduciendo a una disbiosis, caracterizada por la sobrepoblación de las bacterias anómalas y una disminución de las bacterias benéficas; lo que promueve una disminución de la función de la barrera intestinal con un aumento en su permeabilidad favoreciendo la traslocación bacteriana y la producción de una inflamación sistémica. Además, la disbiosis también afecta la función del sistema inmune al modular la diferenciación de las células inmunes y alterar su activación. También influye en la producción de las citocinas, en la secreción de las inmunoglobulinas y en la tolerancia inmune (9).

La interacción que existe entre la dieta y la microbiota intestinal dan forma al metabolismo, produciendo una variedad de metabolitos bioactivos (10), e inducen alteraciones del perfil metabólico bacteriano y en la función de la barrera intestinal, favoreciendo la aparición de endotoxemia metabólica, afectando significativamente el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, así como el equilibrio de los factores proinflamatorios y antiinflamatorios contribuyendo al desarrollo de la EHGNA, además tiene importantes impactos en la patogénesis de EHNA (11).

- **Eje hígado-intestino**

La relación anatómica y funcional entre el intestino y el hígado se denomina eje hígado-intestino, y es la comunicación bidireccional mediada por los metabolitos derivados tanto del hígado como del intestino y distribuidos a través del tracto biliar, la vena porta y la circulación sistémica (12). (Fig. 2A). La unidad estructural y funcional del hígado es el lobulillo hepático; es una estructura poligonal cuyo centro está ocupado por la vena central y hacia los bordes de tres a seis triadas portales (Fig. 2B). Cada triada portal está formada por el ducto biliar, una rama de la vena porta que suministra sangre rica en nutrientes y otra rama de la arteria hepática a través de la cual se suministra sangre rica en oxígeno. La sangre de ambos conductos se mezcla en los sinusoides hepáticos, drenan hacia la vena central (Fig. 2C). En el lobulillo hepático, los hepatocitos suelen aparecer organizados en forma de cordones de una o dos células de grosor, separados por sinusoides (Fig. 2C) (13).

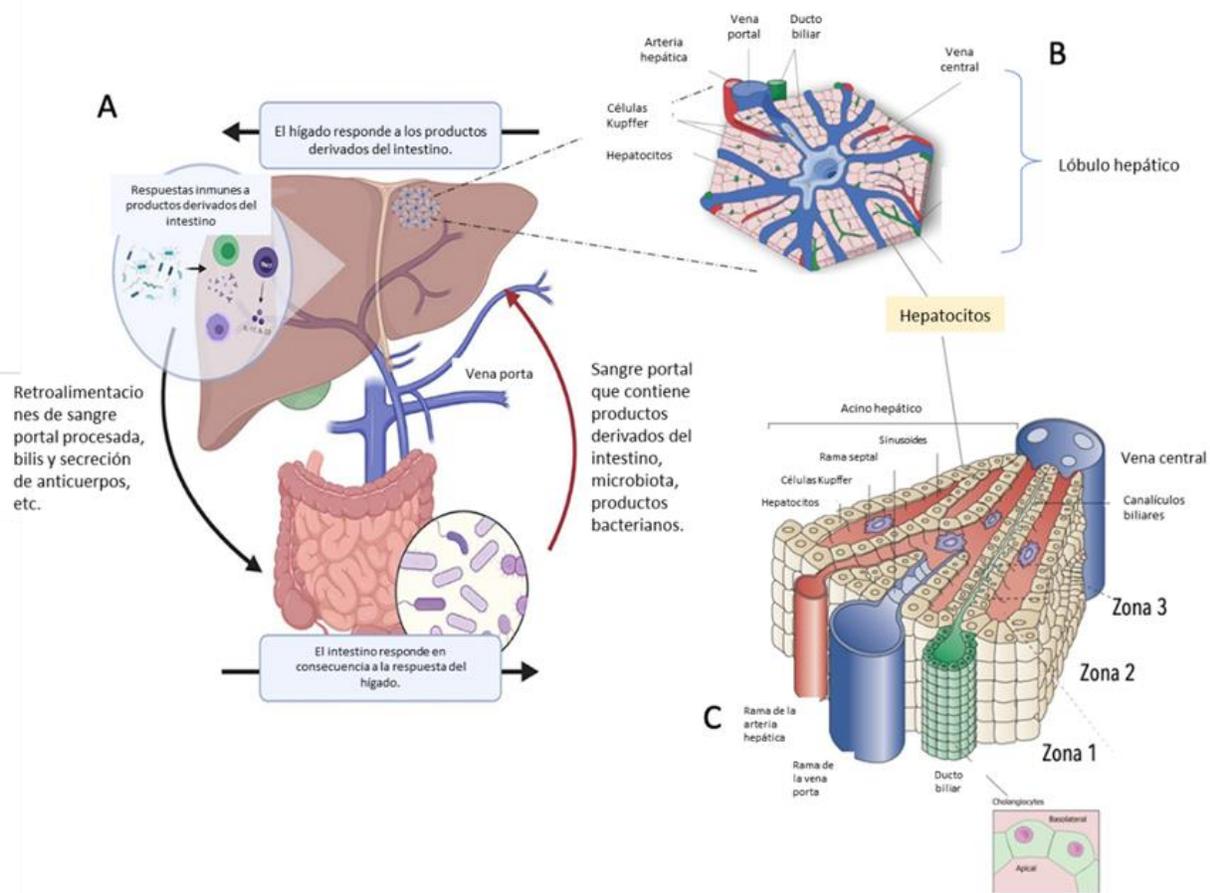


Figura 2. Relación anatómica que existe entre el intestino e hígado, mediada principalmente por los metabolitos derivados tanto del hígado como del intestino a través del tracto biliar, la vena porta y la circulación sistémica (A). Lobulillo hepático (B) y su arquitectura (C).

En el lobulillo hepático pueden distinguirse tres zonas, la zona periportal (o zona 1); la zona media (o zona 2) y la zona pericentral (o zona 3), que reciben un mayor a menor aporte de oxígeno y nutrientes de acuerdo a su proximidad a la vena porta o a la vena central, respectivamente (13). De acuerdo a la concentración de oxígeno existen diferencias zonales en la capacidad metabólica, por lo tanto, los hepatocitos de la zona 1 participan mayoritariamente en la gluconeogénesis, en la síntesis de la urea y en la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que los hepatocitos de la zona 3 intervienen en la glucólisis y en lipogénesis (14).

Debido a la distribución zonal del metabolismo de los lípidos, la enfermedad de hígado graso se manifiesta en la zona 3, aunque en la esteatohepatitis puede manifestarse hasta en la zona 1 (15,16). De manera similar, las enzimas de biosíntesis se pierden en las

últimas etapas de la enfermedad; por ejemplo, un análisis histológico, de poblaciones de pacientes sanos, con esteatosis simple y con esteatohepatitis, mostró que la expresión de la fosfatidiletanolamina metiltransferasa pasó de una localización perivenosa a una distribución panlobular, y luego la expresión fue mayor en los sitios de inflamación, respectivamente (17).

Uno de los componentes estructurales críticos del eje hígado-intestino es la barrera intestinal, y constituye una barrera dinámica y semipermeable al paso de moléculas mediante difusión facilitada o por diferencia de gradientes. La permeabilidad selectiva de la barrera intestinal involucra mecanismos de respuesta inmunitaria, por lo tanto, desempeña un papel clave en la salud y la enfermedad del huésped al protegerlo contra patógenos tóxicos de la luz intestinal (19).

En la actualidad se han propuesto numerosos mecanismos que relacionan la microbiota intestinal con la EHGNA, en la que destaca la desregulación en la función de la barrera endotelial intestinal provocada por la disbiosis que permite el paso de componentes bacterianos tales como el lipopolisacárido y conduce a la inflamación hepática (3); esto se debe a las alteraciones en la función de la barrera intestinal y a un aumento en su permeabilidad, provocando un aumento en la capacidad de los componentes de la luz intestinal para cruzar la mucosa a través de poros dependientes de las uniones estrechas entre las células epiteliales o de una vía independiente (10). Una barrera intestinal intacta es importante para la absorción de nutrientes, pero también es importante porque mantiene billones de microorganismos en la luz intestinal y evita que se propaguen sistémicamente. (4). La clave para un hígado sano y no inflamado es garantizar la integridad de la barrera mucosa intestinal (19).

- **Interacción vital: mucosa intestinal y microbiota**

La microbiota intestinal es una red biológica compleja que consta de al menos 500 especies bacterianas diferentes. La composición, diversidad y metabolismo de la microbiota va cambiando a lo largo del tracto; se encuentra en pequeñas cantidades en el estómago, y aumenta en cantidad y variabilidad en el duodeno, el yeyuno y el íleon. El colon es el que tiene la mayor cantidad y variabilidad de especies bacterianas de todo

el tracto gastrointestinal, con un aumento en el orden de 1×10^{12} debido al pH neutro y al tránsito lento, lo que permite mayor disponibilidad de nutrientes. Más del 99% de los microorganismos del colon son estrictamente anaeróbicos tales como *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, entre otros (20).

La mucosa intestinal y la microbiota mantienen una relación simbiótica esencial para la vida. Los alimentos suministran sustratos diversos y variables para el metabolismo microbiano y los microorganismos colaboran en la digestión de componentes de la dieta proveyendo de vitaminas y otros nutrientes esenciales, además proporcionan protección frente a la invasión por agentes patógenos al promover el desarrollo del sistema inmunitario (20). Por lo tanto, la dieta influye y modula la estructura y la composición de las comunidades microbianas en el intestino (9). La microbiota intestinal es un regulador crucial de la obtención de energía a partir de los alimentos dietéticos y esto puede provocar un aumento de la deposición de grasa a través de diferentes mecanismos, como lo que acontece en el desarrollo del epitelio intestinal; cuando se mejora la densidad de las vellosidades del intestino delgado se afecta la fisiología y la salud intestinal (5).

El consumo de una dieta occidental aumenta la abundancia de microorganismos tolerantes de las sales biliares y disminuye los niveles de especies que metabolizan los carbohidratos complejos de los vegetales. Por el contrario, el consumo abundante de fibra dietética derivados de las frutas, las verduras y otros vegetales se asocia con el incremento de las especies fermentativas en el colon y se obtienen productos de fermentación como los ácidos grasos de cadena corta, con gran beneficio para el hospedador (9).

- **Metabolismo de la microbiota intestinal**

La microbiota intestinal regula la digestión del individuo. Parte de los alimentos consumidos, como las fibras vegetales, no son degradadas completamente por las enzimas humanas, por lo que los residuos no absorbidos se dirigen al colon donde hay una alta densidad de microorganismos con actividad metabólica (21).

Se estima que la microbiota intestinal contiene alrededor de 10 veces más bacterias que células del cuerpo humano, y expresan más de 2 millones de genes (22), con los cuales pueden sintetizar una gran variedad de enzimas con diferentes capacidades para fermentar una variedad de compuestos que han escapado de la digestión de las enzimas humanas, como las fibras (23). El proceso más común es la fermentación de los hidratos de carbono complejos, que generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC), tales como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico que son usados por los colonocitos como fuente de energía o pasan al torrente circulatorio (24). Estas moléculas son importantes para la salud y la nutrición. Influyen en el pH, la absorción de nutrientes y el equilibrio microbiano en el entorno intestinal. El epitelio colónico recibe el 70% de su energía a partir de estos ácidos grasos, particularmente del ácido butírico. El propionato es un precursor de la síntesis de proteínas, la gluconeogénesis y la lipogénesis en el hígado y el acetato es un sustrato para la síntesis del colesterol. En el metabolismo el acetato mejora la homeostasis de la glucosa, el propionato altera la acción de la insulina y el butirato mejora la sensibilidad a la insulina y el gasto energético (24).

Los metabolitos generados por el huésped y modificados por la microbiota intestinal, como los ácidos biliares secundarios y los metabolitos que se producen de *novo*, pueden inducir una serie de funciones fisiológicas y patológicas en el huésped tales como: la modulación del metabolismo energético, la absorción de nutrientes y la regulación de la composición de la microbiota intestinal (25). El conocimiento de este metabolismo es esencial para comprender el papel de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la salud y la promoción de las enfermedades.

- **Microbiota intestinal y la EHGNA**

Los productos y metabolitos microbianos ayudan a mantener la barrera intestinal y la salud del hígado. Una alteración de las comunidades microbianas intestinales (disbiosis), debido a cambios dietéticos como la ingesta calórica, es un factor de riesgo de las enfermedades hepáticas (26).

En los últimos años se ha reconocido el cambio en la microbiota intestinal como un factor importante en el desarrollo de la EHGNA. Debido a la conexión anatómica y funcional entre el intestino y el hígado; las dietas que son poco saludables modifican la barrera intestinal, se induce la producción de factores patógenos que repercuten en el hígado (3). Otros factores como la edad, el género y los factores genéticos también pueden inducir un cambio en la microbiota induciendo un mal funcionamiento de la barrera epitelial y un aumento de la permeabilidad intestinal, favoreciendo la progresión de la EHGNA (23). En la mayoría de los casos, los pacientes con EHGNA y con una dieta occidental, presentan inflamación y cambios estructurales en la microbiota intestinal.

La alteración en la composición y / o función de la microbiota intestinal induce: a) un aumento en la permeabilidad intestinal, lo que facilita el paso de los lipopolisacáridos (LPS) y otros factores inflamatorios a la sangre; b) una disminución de la disponibilidad de colina; c) cambio en la composición de los ácidos biliares y d) un aumento de la producción de etanol en el intestino. Estos factores y metabolitos, junto con los lípidos de la dieta, pueden provocar inflamación, esteatosis hepática, y, finalmente, establecer la EHGNA (20).

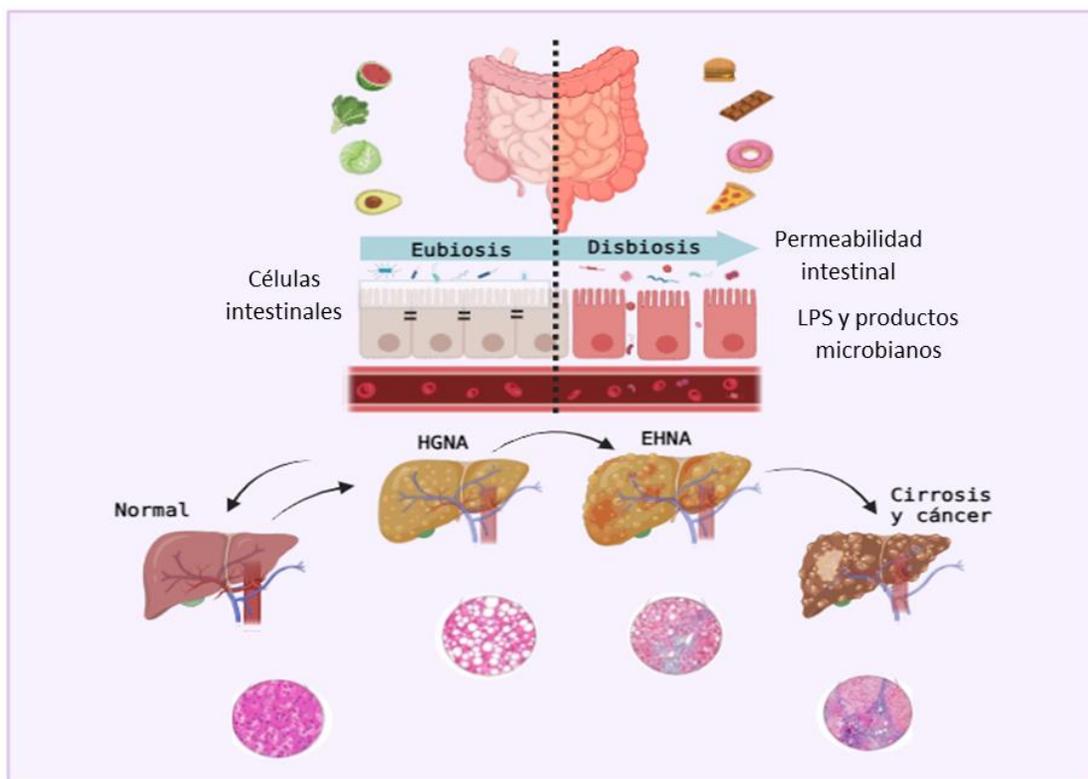


Figura 3. Mecanismos que vinculan la microbiota intestinal en el desarrollo de HGNA. Un desequilibrio en la composición o función de la microbiota intestinal puede provocar un aumento en la permeabilidad intestinal y permitir el paso lo LPS al torrente sanguíneo. Elaboración propia.

La acumulación excesiva de lípidos en el hígado en la EHGNA es el resultado del desequilibrio de entrada/salida de los ácidos grasos, asociados con una alta ingesta de energía. El aumento en la absorción de ácidos grasos libres en el hígado es a causa de la ingesta de una dieta rica en energía, al incremento de la lipólisis del tejido adiposo y lipogénesis hepática *de novo*, además de los mecanismos insuficientes para compensar la acumulación de los triglicéridos por medio de la oxidación de los ácidos grasos y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (20).

El daño en el hígado puede ser debido a diversos factores. Uno de ellos es el causado por la oxidación de lípidos que aumentan el estrés oxidativo o bien por la lipotoxicidad hepática debida a un aumento del estrés del retículo endoplásmico, inducido por los ácidos grasos saturados en el hígado. Otro factor, es la inflamación hepática fomentada por el cambio en la microbiota lo que causa una baja producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), el aumento de la permeabilidad intestinal y la translocación de bacterias luminales o sus productos al hígado. En consecuencia, las células estrelladas hepáticas se activarán y liberarán colágeno, contribuyendo a la fibrosis y a la progresión de la EHGNA. Una ingesta excesiva de grasas y carbohidratos constituye uno de los factores de riesgo en el cambio de la dinámica en la composición de la microbiana intestinal (27). Debido a que la microbiota intestinal desempeña un papel esencial en la progresión de la EHGNA, el eje intestino-hígado es considerado una posible estrategia terapéutica (28).

- **Probióticos y la enfermedad del HGNA**

La microbiota intestinal desempeña un papel importante en la progresión de la EHGNA, por lo tanto, comprender los mecanismos involucrados en el eje intestino-hígado lo promueve como una posible estrategia terapéutica (28).

Las estrategias terapéuticas centradas en el eje y la microbiota intestinal para la EHGNA se basa principalmente en la modulación de la microbiota mediante el uso de probióticos. Los probióticos son bacterias vivas administradas en cantidades adecuadas para proporcionar beneficios en la salud del huésped (29).

Cada vez se ha encontrado más evidencia de estudios preclínicos y clínicos que demuestran que una disbiosis intestinal es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la patogénesis de la EHGNA (29); esto debido a la interacción que existe entre la luz intestinal y el hígado. Los beneficios que proporcionan los probióticos sobre la salud incluyen la mejora de la barrera intestinal, la estimulación intestinal del sistema inmunológico y la protección contra patógenos. Para que esto ocurra, los microorganismos deben ser capaces de mantenerse viables y en cantidad suficiente al llegar al intestino. De acuerdo con los estudios clínicos y preclínicos, los probióticos se han mostrado prometedores para corregir la disbiosis intestinal y marcadores de EHNA. Por ello equilibrar la disbiosis a través de probióticos es una terapia potencial (30).

Se ha descubierto que ciertas cepas bacterianas como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila* y *Bacteroides uniformis*, tienen efectos protectores en la EHGNA. Estos probióticos promueven un efecto antiinflamatorio y así como el crecimiento y supervivencia del epitelio intestinal para contrarrestar poblaciones bacterianas (12).

Una dieta rica en grasas no solo aumenta la translocación intestinal de endotoxinas, sino también reduce la concentración entérica de *bifidobacterias*, un grupo de bacterias que se ha demostrado que reducen los niveles intestinales de LPS y mejoran la función de la barrera mucosa. Algunos estudios han demostrado que existe un potencial probiótico del género *Bifidobacterium* para la EHGNA, *Bifidobacterium*, tienen varios efectos: ayuda a controlar la permeabilidad de otras bacterias, nutrientes de los alimentos y moléculas resultantes del metabolismo celular. Además, produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que desempeñan un papel importante en el metabolismo del hígado; también ayudan en el control de la proliferación de bacterias patógenas. Sin embargo, en otras investigaciones sobre la microbiota en pacientes con EHGNA se ha observado que los niveles de *Bifidobacterium* se reducen. Por lo tanto, aún faltan investigaciones en las que se estudie el potencial de *Bifidobacterium* como probiótico (31).

- **Prebióticos y la enfermedad del HGNA**

Otros nutrientes que son degradados por la microbiota intestinal son los prebióticos. Los prebióticos son definidos como "un grupo de nutrientes que producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal para el beneficio en la salud del huésped". Un prebiótico se caracteriza por: a) debe resistir al pH del estómago; b) no debe ser degradado por enzimas digestivas; c) no debe ser absorbido en el tracto gastrointestinal; d) puede ser fermentado por la microbiota intestinal y e) el crecimiento y / o actividad de las bacterias intestinales puede ser promovido por estos compuestos (32). Los prebióticos estimulan el crecimiento de las bacterias beneficiosas y pueden ser tanto polisacáridos (inulina, celulosa, hemicelulosa, pectinas) como oligosacáridos (fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, isomaltooligosacáridos, xilooligosacáridos, lactulosa y oligosacáridos de soja) (33).

Los prebióticos tienen efectos beneficiosos puesto que promueven la proliferación selectiva de bacterias benéficas y mejoran la función de la barrera intestinal. En modelos animales con acumulación de triglicéridos en los hepatocitos, debidos a la fructuosa, se ha demostrado que la suplementación con prebióticos reduce la vía de síntesis de ácidos grasos asociada a la disminución en la expresión genética de enzimas que regulan la lipogénesis hepática, como la acetil Co-A carboxilasa y la ácido graso sintasa. Además, la oligofruktuosa modifica la microbiota intestinal a favor de *Bifidobacterium*, mejorando la función de la barrera mucosa y reduciendo el nivel de endotoxinas. La administración de prebióticos podría reducir la inflamación del hígado a través de un efecto dependiente del péptido similar al glucagón 2 sobre la barrera intestinal; sin embargo, aún se necesitan más estudios para determinar los mecanismos por los cuales podrían ser beneficiosos en la EHGNA (12).

Se ha observado que la inulina (INU), un tipo de fibra dietética no digerible que se encuentra en la alcachofa de Jerusalén, muestra un efecto beneficioso en la regulación de la microbiota intestinal. Un gran número de estudios han demostrado que la INU restaura la composición de la microbiota intestinal y disminuye los trastornos metabólicos al mejorar los lípidos séricos, la glucosa en la sangre en ayunas y la resistencia a la insulina (34).

- **Metabolismo en el hígado**

El hígado es el órgano que participa en la captación, la síntesis, el almacenamiento, la secreción y el catabolismo de los ácidos grasos y los triglicéridos (35). Los alimentos que consumimos se dirigen al tracto gastrointestinal y al ser digeridos se obtienen la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos que son absorbidos y pasan al torrente sanguíneo para ser transportados al hígado a través del sistema de circulación de la vena porta (36). En el contexto de una sobre nutrición y obesidad, el metabolismo de los ácidos grasos hepáticos se altera, lo que comúnmente conduce a la acumulación de triglicéridos dentro de los hepatocitos y se establece una condición clínica conocida como la EHGNA (37).

Después de comer, la glucosa es condensada en glucógeno y se convierte en ácidos grasos o aminoácidos en el hígado. Los aminoácidos son metabolizados para proporcionar energía o para sintetizar proteínas, glucosa y otras moléculas bioactivas (38). En los hepatocitos, los ácidos grasos libres son esterificados con glicerol-3-fosfato para generar triacilglicerol (TAG). El TAG puede ser almacenado en gotitas de lípidos en los hepatocitos o pueden ser secretado en la circulación como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (38).

El metabolismo energético del hígado está estrictamente controlado. Se han identificado múltiples mecanismos que involucran señales hormonales, neuronales y de nutrientes para la regulación del metabolismo de la glucosa, los lípidos y los aminoácidos en el hígado. Una anomalía en la señalización y el metabolismo del hígado puede provocar o predisponer a la EHGNA (39).

El hígado es el órgano central que controla la homeostasis de los lípidos mediante vías bioquímicas, de señalización y celulares complejas, pero reguladas con precisión. El hígado está conformado por células parenquimales y no parenquimales. Las células parenquimatosas del hígado son los hepatocitos, y son los que controlan las funciones bioquímicas y metabólicas del órgano, incluido el metabolismo de los triglicéridos. Los tipos de células no parenquimatosas incluyen colangiocitos, células de Kupffer, células estrelladas y células endoteliales, cada una de las cuales tiene funciones especializadas en patología hepática (37).

- **Metabolismo de lípidos: metabolismo de los ácidos grasos**

El hígado es el órgano central para el metabolismo de los ácidos grasos. Los ácidos grasos se acumulan en el hígado por absorción proveniente del plasma o por la biosíntesis *de novo*. y son eliminados por oxidación o por secreción en el plasma mediante VLDL ricas en triglicéridos Cuando existe una sobre nutrición y obesidad, el metabolismo de los ácidos grasos (AG) hepáticos se altera y esto comúnmente conduce a una acumulación de TAG dentro de los hepatocitos y a una condición clínica como la EHGNA (37).

Cuando los carbohidratos abundan, el hígado no sólo utiliza la glucosa como principal combustible metabólico, sino que también la convierte en ácidos grasos. Después de consumir alimentos, la grasa se digiere principalmente en el intestino delgado. Los TAG son emulsionados por los ácidos biliares dentro de la luz intestinal y absorbidos por los enterocitos. Los TAG se empaquetan en quilomicrones y son secretados en el sistema linfático y finalmente llegan al plasma. Gran parte de los quilomicrones son absorbidos por el músculo y el tejido adiposo debido a la actividad de la lipoproteína lipasa, que se expresa en las superficies lumenales de las células endoteliales capilares de estos tejidos. (37).

Los quilomicrones llegan al hígado a través de la circulación y liberan ácidos grasos no esterificados (NEFA, por sus siglas en inglés), mediante lipólisis mediada principalmente por la lipoproteína lipasa (LPL) (37,38).

- **Fuentes de ácidos grasos hepáticos**

Las tres fuentes principales de ácidos grasos (AG) hepáticos son los lípidos de la dieta, los AG derivados del tejido adiposo y los AG sintetizados *de novo*. Después de una comida, los lípidos de la dieta se hidrolizan en la luz intestinal, y tras su absorción se esterifican para formar moléculas de TAG, que se empaquetan en quilomicrones y se

suministran principalmente al músculo y al tejido adiposo. Los TAG restantes presentes en los restos de quilomicrones se transportan al hígado y se procesan intracelularmente, lo que lleva a la liberación de AG dentro de los hepatocitos. Los carbohidratos, particularmente la glucosa, se utilizan en la lipogénesis hepática de novo (DNL) para la producción de AG (40).

La lipogénesis de *novo* es una vía metabólica clave para la homeostasis energética. El flujo lipogénico está estrictamente controlado por condiciones hormonales y nutricionales; por lo tanto, cuándo las dietas son ricas en carbohidratos inducen la lipogénesis *de novo* y el ayuno o alimentación con grasas la inhiben; esto se debe principalmente a la concentración de insulina y de la sensibilidad a la insulina de los tejidos. En circunstancias normales en humanos, las vías de la síntesis de ácidos grasos de novo hepática ocurren con moderación, sin embargo, un aumento en la síntesis puede contribuir primordialmente a la esteatosis hepática (37).

Para ser metabolizados, los AG se activan para formar moléculas de acil-CoA, que pueden sufrir oxidación o incorporarse a lípidos complejos. Los TAG sintetizados localmente pueden almacenarse en gotitas de lípidos (LD) intracelulares o empaquetarse en VLDL y secretarse al plasma. Cuando hay sobre nutrición y resistencia a la insulina, los niveles hepáticos de AG aumentan debido a una mayor lipólisis dentro de los adipocitos, lo que conduce a un aumento de los niveles circulantes de AG en el torrente sanguíneo y a un aumento de la lipogénesis *de novo* hepática. El exceso de AG no puede ser metabolizado por vías oxidativas, por lo tanto, se sintetizan los TAG y se almacenan en el hígado promoviendo una sobreproducción de VLDL (Fig. 4) (41).

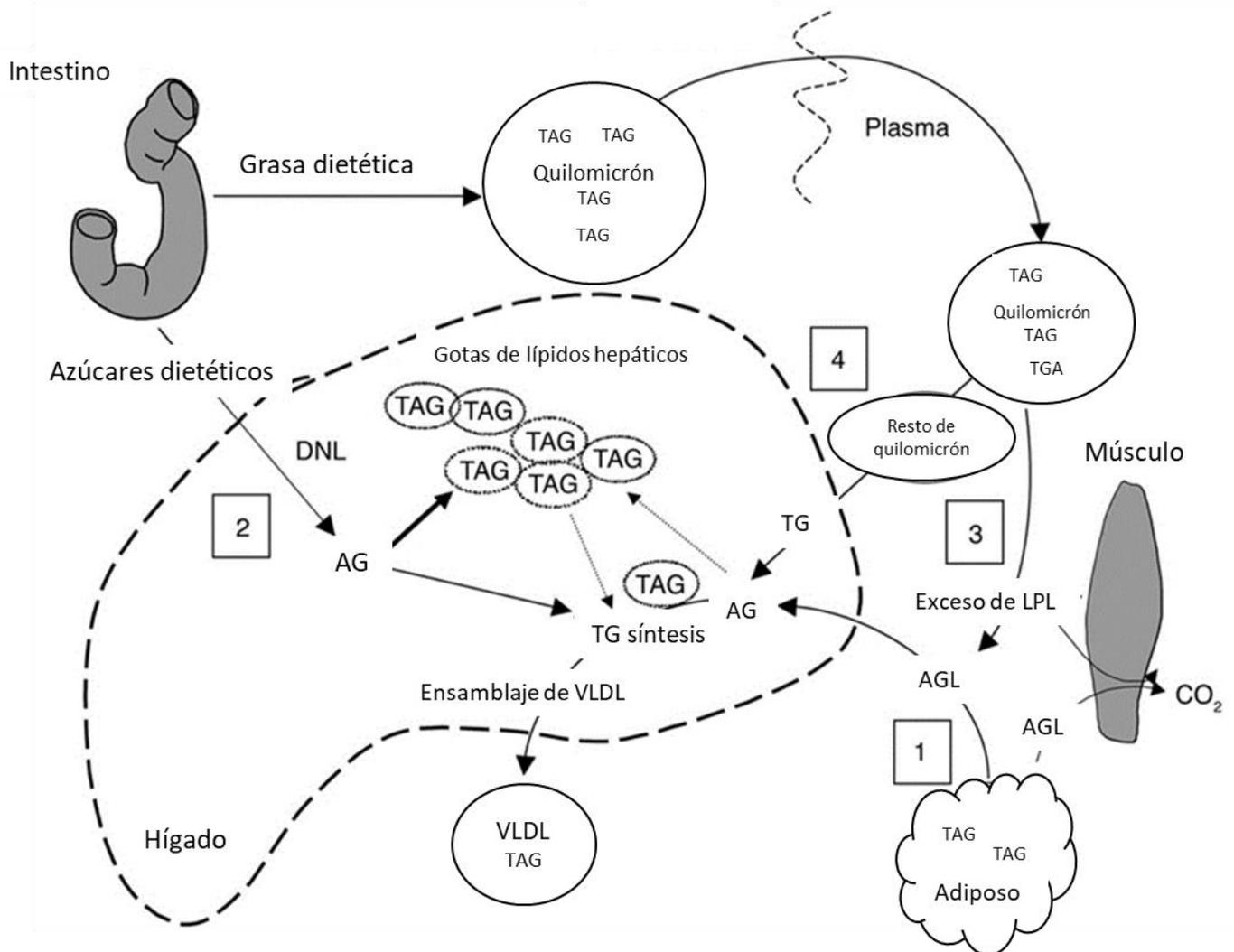


Figura 4. Fuentes de ácidos grasos hepáticos. Tomado de: Donnelly et al., 2005

- **Lipogénesis de novo**

La síntesis *de novo* de los AG en el hígado implica un proceso de polimerización citosólica en el que el acetil-CoA se convierte en malonil-CoA (2, 44). Cuando los carbohidratos están en abundancia, el hígado se encarga de convertir la glucosa en AG, mediante síntesis *de novo*. Esta síntesis, puede desempeñar un papel importante en la acumulación de lípidos en el hígado durante la EHGNA (28); DNL es una vía altamente regulada, que depende de una serie de pasos, en la que las enzimas que están involucradas regulan positivamente la EHGNA (40).

El proceso de la síntesis comienza cuando el acetil-CoA se convierte en malonil-CoA mediante la acción de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). FASN condensa malonil-CoA con varios restos de acetil-CoA para producir una acil-CoA palmítica de 16 carbonos. Tres acil-CoA grasos están unidos a una cadena principal de glicerol para formar un TAG. Los hepatocitos absorben la glucosa y la fructosa y pueden metabolizarse a piruvato para la formación de energía en la mitocondria o a glicerol-3-fosfato para la síntesis de TAG. La glucosa también se puede almacenar como glucógeno dentro de las células del hígado. Los TAG se combinan con apoB y se empaquetan en VLDL para su secreción en el torrente sanguíneo. La malonil-CoA también inhibe la CPT1, suprimiendo la absorción de ácidos grasos en las mitocondrias y la β -oxidación. Los hepatocitos también absorben los ácidos grasos de la dieta y los convierten en acil-CoA grasa que puede oxidarse o usarse para la síntesis de TAG (no se muestra). Se utilizan marcadores de isótopos estables como ^{13}C -acetato y $^2\text{H}_2\text{O}$ para determinar la tasa de síntesis de *novo* mediante la incorporación en palmitato de VLDL. ACC, acetil-CoA carboxilasa; ACS, acetil-CoA sintasa; ApoB, apolipoproteína B; CPT1, carnitina palmitoil transferasa 1; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; FASN, ácido graso sintasa; GA-3-P, gliceraldehído-3-fosfato; P, fosfato; TCA, el ciclo del ácido cítrico; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad (Fig. 5) (43).

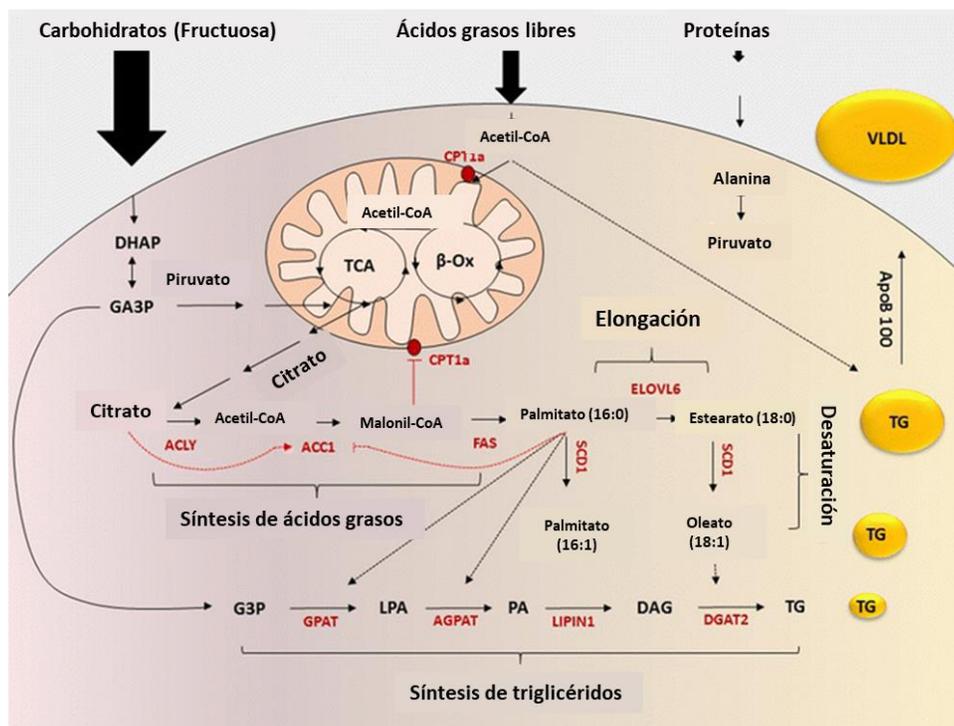


Figura 5. Lipogénesis de novo. Tomado de: Softic et al., 2016.

- **FASN: sintasa de ácidos grasos**

La ácido graso sintasa (FASN) es una enzima multifuncional, y cataliza la biosíntesis de *novo* de los ácidos grasos saturados de cadena larga a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y de reductores en forma de NADPH, produciendo principalmente ácido palmítico (80%), ácido esteárico (10%) y ácido mirístico (10%). La enzima FASN tiene siete dominios catalíticos donde se llevan a cabo reacciones de, condensación, transacilación, reducción y deshidratación. En los seres humanos, el gen que codifica para la enzima FASN se localiza en el cromosoma 17q25; con una longitud aproximada de 20 kb y contiene 43 exones, 42 intrones, 3 sitios de iniciación y 3 promotores (Fig. 6A). En los mamíferos, FASN es un dímero funcional compuesto por dos cadenas peptídicas idénticas con un peso molecular de aproximadamente 260 kDa cada una. La región N-terminal tiene tres dominios catalíticos (cetoacil-sintasa, deshidrasa y monoacil/acetiltransferasa), mientras que la región C-terminal tiene los cuatro dominios restantes cuyas actividades son: alcohol reductasa, cetoacil-reductasa, proteína transportadora de acilo y tioesterasa. La región central de la enzima está compuesta por 600 residuos de aminoácidos (Fig. 6B) (44).

Durante el proceso de la glucólisis, que ocurre en el citoplasma celular, se extrae energía de la glucosa mediante una serie de reacciones que finaliza con su ruptura para formar dos moléculas de tres carbonos llamado piruvato. El piruvato entra en la mitocondria y es descarboxilado para convertirse en acetil-CoA, esta conversión es el punto de partida para el ciclo del ácido cítrico. El ciclo del ácido cítrico es la vía metabólica que unifica el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, mediante una sucesión de reacciones químicas (43).

La lipogénesis *de novo* consiste en la síntesis de ácidos grasos a partir de los carbohidratos. La síntesis *de novo*, se inicia al utilizar el acetil CoA generado en la mitocondria durante el ciclo del ácido cítrico. Una vez en el citoplasma, el acetil CoA es carboxilado para formar malonil CoA. Esta reacción de carboxilación es la que regula la velocidad de síntesis de los ácidos grasos y es dependiente de NADPH. La actividad de FASN cataliza todos los pasos en la síntesis de palmitato a partir de acetil CoA y malonil

CoA en presencia de NADPH Los ácidos grasos sintetizados se almacenan como triglicéridos en el tejido adiposo. (Fig. 6D) (44).

La enzima es considerada una proteína de mantenimiento en el hígado, ya que produce grasa para almacenar energía cuando existe un exceso de nutrientes (35). Se encarga de controlar el mecanismo de los triglicéridos hepáticos. Cuando los carbohidratos abundan, la glucosa se convierte en AG con la ayuda de FASN, posteriormente los AG se ensamblan en triglicéridos que pueden almacenarse en forma de gotas de lípidos en el hígado o secretarse como lipoproteínas de muy baja densidad (45).

La actividad lipogénica de FASN se encuentra restringida en el hígado y el tejido adiposo, donde convierte el exceso de carbohidratos en AG, que posteriormente son esterificados como reservas de triglicéridos para su posterior suministro de energía mediante la β -oxidación (46).

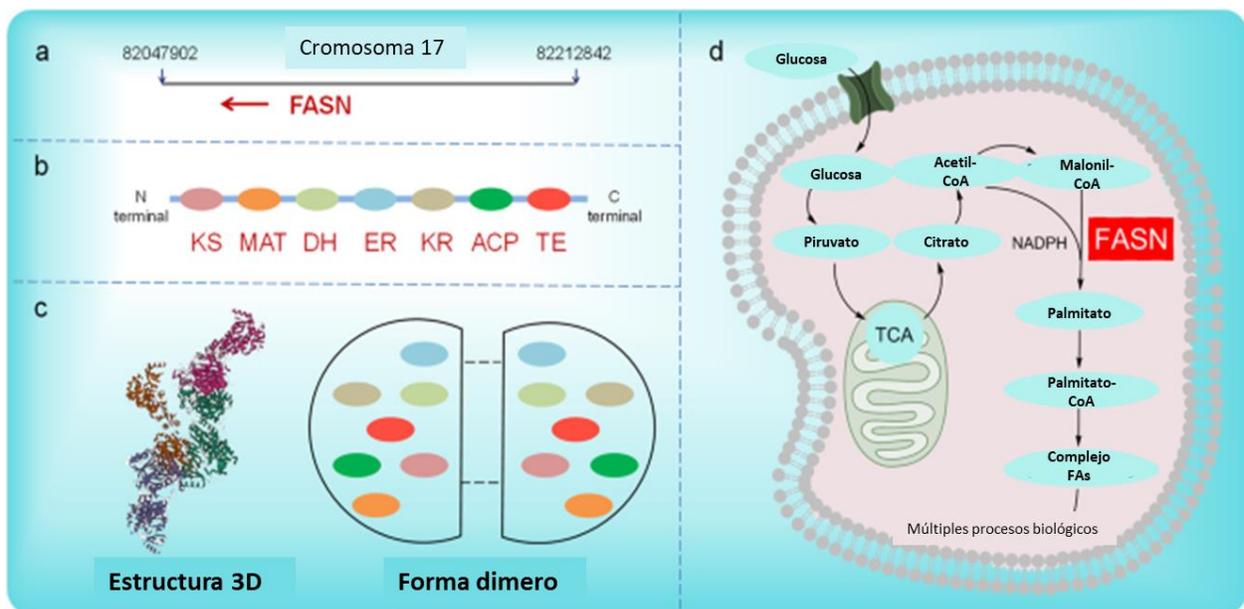


Figura 6. Información sobre el gen y la proteína y la función de FASN. Ubicación del gen FASN (A), Mapa de dominio lineal generalizado de FASN animal (B), Estructura básica de la estructura 3D de la proteína FASN humana (C), Ruta de biosíntesis de ácidos grasos mediada por FASN (D). Tomada de: Xiao et al., 2024.

Objetivos

- **Objetivo general**

Analizar la expresión del gen FASN en el hígado de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y probióticos, por medio de PCR en tiempo real.

- **Objetivos específicos.**

Inducir la enfermedad de hígado graso no alcohólico en ratas, mediante una dieta alta en grasa y fructosa.

Observar el efecto de la administración de bifidobacterias, en la formación de vesículas lipídicas en el hígado.

Analizar la expresión del gen FASN en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

Establecer la relación entre la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y la formación de vesículas de grasa en el hígado.

Materiales y Métodos

- **Microorganismo y medio de cultivo**

La cepa *Bifidobacterium* sp. se cultivó en medio MRS suplementado con el 0.05% de HCl-cisteína (MRS-C). Para cultivar *Bifidobacterium* sp en condiciones anaerobias, se desplazó el oxígeno al burbujear CO₂ en el interior de los frascos del medio de cultivo, que fueron sellados herméticamente con tapones de hule y arillo de metal. Posteriormente, los medios de cultivo se esterilizaron a 15 lb/in² de presión por 15 min.

- **Activación de *Bifidobacterium* sp.**

Una alícuota de 1.5 mL de *Bifidobacterium* sp., que se encontraba preservada en glicerol al 30% a -70 °C fue descongelada, y para eliminar el exceso de glicerol las bacterias fueron reconstituidas en MRS-C. La suspensión fue centrifugada a 10,000 rpm por 5 minutos, este procedimiento fue realizado dos veces para garantizar la eliminación del glicerol.

Una vez eliminado el glicerol, las bacterias fueron adicionadas a 40 mL de medio MRS-C para cultivarlas, incubándolas a 37°C con agitación orbital constante de 180 rpm por 48 horas.

- **Preparación de suspensiones de *Bifidobacterium* sp.**

El cultivo bacteriano resultante fue empleado para obtener suspensiones de *Bifidobacterium* sp, para ser administradas a los animales de experimentación. Por lo tanto, se inocularon 80 mL de medio MRS-C con cultivo bacteriano obteniendo una concentración final del 10% (v/v). Los medios inoculados se incubaron a las mismas condiciones experimentales del cultivo bacteriano. Una vez terminada la incubación, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación y reconstituidas en 1 mL de agua.

Para garantiza una administración de 1×10^8 UFC se determinó la viabilidad bacteriana. Para cada suspensión se realizaron diluciones decimales seriadas 10^1 - 10^8 , que fueron plaqueadas por triplicado en cajas de Petri con agar MRS suplementado con 0.05% de HCl cisteína que se incubaron en cámara de anaerobiosis a 37 °C durante 48 h. Pasado

el tiempo, se contabilizó el número de colonias en las diferentes diluciones; para determinar la concentración de bacterias en los cultivos, expresada en [UFC/ mL].

Diseño experimental

- **Inducción de hígado graso y administración de probióticos y prebióticos**

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial promedio de 150-180 gramos procedentes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio-Bioterio de la UAM-Xochimilco. El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética de dicha institución. Las ratas fueron mantenidas en condiciones óptimas de temperatura y ciclos de 12 h de luz/oscuridad, y en todo momento fueron manipuladas de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

NOTA: Aunque el protocolo experimental consideraba un total de 40 ratas, solo fue posible contar con un total de 20. Por lo tanto, se tomó la decisión de iniciar los grupos con dieta alta en grasa.

Las 20 ratas fueron divididas en cuatro grupos experimentales. El grupo HFD (n=4) alimentadas con dieta alta en grasa; el grupo HFD+BB (n=5), además de ser alimentadas con una dieta alta en grasa fueron administradas tres veces por semana con *Bifidobacterium* sp, vía intragástrica, a una concentración de 1×10^8 UFC; el grupo HFD+INU (n=5) alimentadas con una dieta alta en grasa y administradas con inulina (Orafti-GR), tres veces por semana vía intragástrica, a una dosis de 150 mg/kg de peso; y finalmente el grupo HFD+BB+INU (n=5) alimentadas con una dieta alta en grasa, y administradas tanto con *Bifidobacterium* sp., a una concentración de 1×10^8 e inulina a 150 mg/kg de peso tres veces por semana, vía intragástrica (Fig.7).

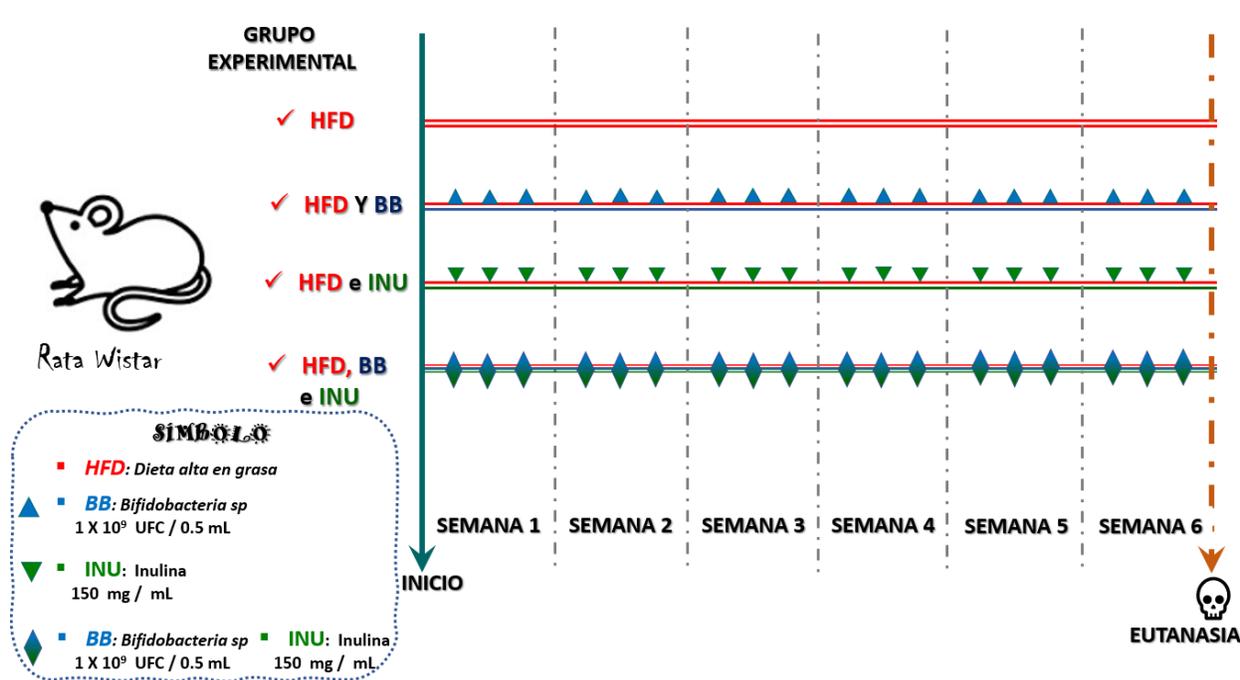


Figura 7. Grupos formados en el experimento, abreviatura con la cual se identificaron y su dosis.

- **Composición de la dieta alta en grasa (HFD)**

La dieta alta en grasa tuvo la siguiente composición: Cada kilogramo de dieta contuvo 160 gramos de fructuosa cristalina, 160 gramos de manteca de cerdo, 220 gramos de caseína ácida, 1 gramo de mezcla de vitaminas y minerales, 459 gramos de croqueta molido (RatDiet). Todos los ingredientes fueron pesados y mezclados, agregando por último la manteca para dar consistencia a la dieta. En todo momento la dieta estuvo conservada en refrigeración.

- **Obtención de las muestras biológicas**

Para la toma de muestras, cada una de las ratas fue anestesiada mediante inhalación de isoflurano (Baxter), una vez que hizo efecto, se registró su peso y posteriormente se colocaron en una cama de cirugía sujetando las patas a los extremos; con unas tijeras se realizó un corte desde el área pélvica hasta el área abdominal. Se tomaron 5 mL de sangre por punción cardiaca e inmediatamente después se cortó la vena cava para desangrar a la rata. Se escindió el hígado y fue registrado su peso y sus características macroscópicas. Cada uno de los lóbulos del hígado se seccionaron en trozos pequeños y parte de ellos fueron fijados en corchos utilizando el adhesivo Tissue-Tek O.C.T (Sakura), e inmediatamente congelados en 2-metilbutano (J.T Baker) y almacenados a -

70°C hasta su posterior análisis. Un trozo de hígado se colocó en formalina cubriendo completamente el tejido para su posterior inclusión en parafina.

La sangre obtenida fue centrifugada a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C para obtener el suero sérico.

Los residuos biológicos fueron manejados de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Análisis de la expresión del gen *fasn* por PCR en tiempo real

- **Extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó a partir de aproximadamente 50 mg de hígado congelado por cada muestra, mediante el kit de extracción RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen). El procedimiento utilizado fue el siguiente: Los 50 mg de tejido fueron triturados en un mortero que se encontraba previamente congelado en hielo seco. Una vez triturado se adicionaron 600 µL el buffer RLT con β-mercaptoetanol (buffer de lisis), que contiene tiocianato de guanidina. El tejido lisado se transfirió a un micro tubo de 1.5 mL y se homogeneizó con la ayuda de una micropipeta, se agregó el lisado a columna de retención de ADNg, dejando permear por 5 minutos y se centrifugó 30 s a 10,000 rpm. Se recuperó el filtrado y se mezcló con 600 µL de etanol al 70% grado biología molecular, esta mezcla se colocó en una columna para retener el ARN y se dejó permear por 5 minutos a temperatura ambiente, después del tiempo se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el filtrado y se agregaron 600 µL de buffer de lavado a la columna dejando permear por 5 minutos a temperatura ambiente. Al término del tiempo se centrifugó durante 30 segundos a 10,000 rpm; después se adicionaron 500 µL de solución RPE en la membrana y de inmediato se centrifugó durante 30 segundos a 10,000 rpm se desechó el filtrado, se repitió el paso anterior con 500 µL de RPE centrifugando 2 minutos a 10,000 rpm; al termino de esto se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. La columna se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL colocando 35 µL de agua libre de RNasa y se dejó permear por 1.5 minutos para después centrifugar 1 minuto a 10,000 rpm a temperatura ambiente (este último paso se repitió colocando el filtrado nuevamente en la columna).

- **Cuantificación de ARN**

El ARN eluído de la columna, se cuantificó en Nanodrop® y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, bajo un campo eléctrico de 80 V por 10 minutos para garantizar la entrada de la muestra en el pozo y posteriormente 40 minutos a 100 V para la electroforesis. Se cargó 1 µL por muestra y 2 µL de buffer de carga. Luego fue visualizado con luz U.V. observándose la (Fig. 7) para algunas muestras al azar.

- **Obtención de ADNc**

A partir del ARN total obtenido, se utilizaron 750 ng para sintetizar ADNc de acuerdo a las instrucciones del Kit *High-Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems), y se mezcló con los demás componentes (Tabla 1).

Tabla1. Componentes de la reacción para la obtención de ADNc a partir de ARN total extraído de muestras de hígado.

Componente	Volumen
2X RT buffer mix	10 µL
20X RT enzyme mix	1 µL
ARN muestra (750 ng)	9 µL
Volumen total de reacción	20 µL

Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 60 min y posteriormente a 95 °C durante 6 minutos (Fig. 8). Al término de la reacción se colocaron 180 µl de agua MiliQ en cada muestra y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

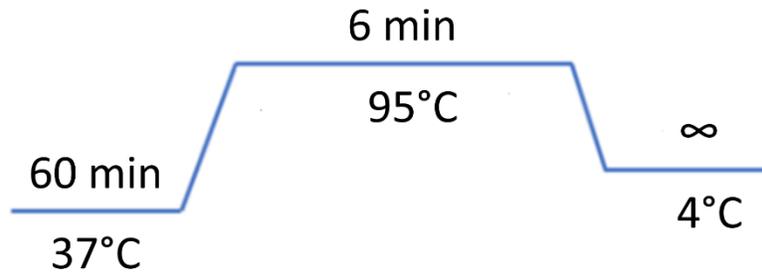


Figura 8. Condiciones de temperatura y tiempo para la obtención de ADNc.

- **PCR en tiempo real**

El ADNc sintetizado fue amplificado por PCR en tiempo real, utilizando 2 sondas TaqMan de genes específicos (Tabla 2), marcadas con el fluorocromo FAM. Para el análisis, de cada muestra se prepararon reacciones por duplicado a un volumen final de 15 μ l y contenían: 1.0 μ l de 20X *TaqMan fasn*, 7.5 μ l de *TaqMan Universal PCR Master Mix* y 6.5 μ l de ADNc. Adicionalmente se preparó por duplicado una reacción con la sonda del gen 18S como control y un control negativo (NTC) (Tabla 3).

Tabla 2. Sondass TaqMan utilizadas.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Identificador TaqMan
FASN	Fatty acid synthase	Rn00569117_m1
18S	Ribosomal 18S	Rn03928990_g1

Tabla 3. Componentes de reacción para PCR en tiempo real.

Componente	Volumen (μL)
Universal PCR Master Mix	7.5 μL
Sonda TaqMan	0.75 μL
ADNc	6.75 μL
Volumen total	15 μL

Se utilizó un termociclador *Step One Plus* de Applied Biosystems con las siguientes condiciones de amplificación (Fig. 9).

Al finalizar se analizó la expresión mediante el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ y análisis unidireccional de varianza (ANOVA), con una significancia de $p < 0.05$ y posterior prueba de Tukey.

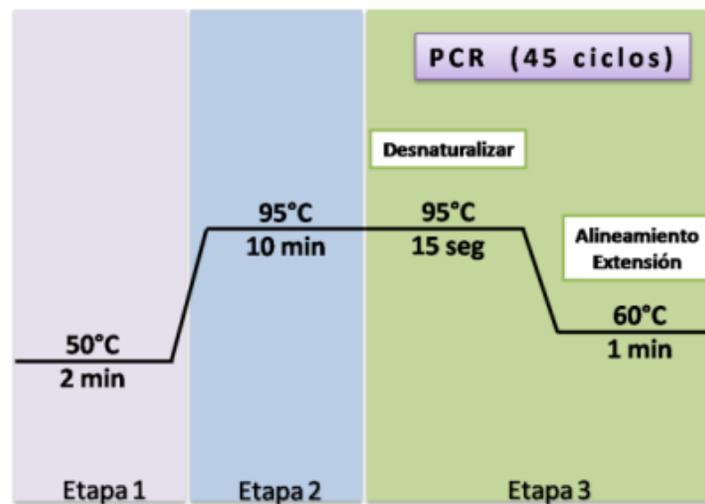


Figura 9. Condiciones de temperatura y tiempo para PCR en tiempo real.

Análisis histológico

- **Inclusión de tejidos en parafina**

Las porciones de hígado preservadas en formalina fueron procesadas hasta ser incluidas en parafina realizando el siguiente procedimiento: Se colocó el tejido en alcohol al 96% por 1 hora en agitación, este paso se realizó 2 veces, posteriormente se pasó el tejido al alcohol anhidro por 1 hora en agitación dos veces y finalmente se colocó el tejido en xilol por 1 hora en agitación dos veces. Este proceso se realizó para deshidratar y la dispersión de la parafina por todo el tejido. Por último, el tejido se colocó en parafina líquida con incubaciones sucesivas para favorecer una completa sustitución del líquido intermediario (xilol) por la parafina; la incubación fue a 68°C. Tras la infiltración completa de la muestra se vertió la parafina líquida en un molde, se introdujo la muestra y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

- **Tinción de hematoxilina y eosina en tejido incluido en parafina**

Se realizaron cortes de 3 μm del tejido incluido en parafina con la ayuda de un micrótopo rotatorio (Ecoshelsku). Los cortes tuvieron el siguiente tratamiento: aclaración de tejido; se sumergieron las laminillas en xilol 2 veces por 10 min.; se dejaron secar por un minuto; rehidratación de tejido; se sumergieron las laminillas en alcoholes de diferentes concentraciones (100, 96, 70 y 50%) por 5 min. 2 veces cada concentración; se les agregó alcohol isopropílico al 60% por goteo durante 20 seg.; se sumergieron las laminillas en hematoxilina de Harris al 40% durante 5 min.; se quitó el excedente; se realizó un lavado con agua de la llave por 1 min.; se dejó secar y se colocó una gota de medio de montaje Crystal Mount Aqueos, Sigma para colocar un cubre objeto sobre el medio (se debe ejercer presión para que no queden gotas de aire).

- **Tinción de hematoxilina y eosina en tejido fresco**

Se realizaron cortes histológicos de 10 μm de tejido fresco con la ayuda de un criostato (Leica) a -17°C. Los cortes tuvieron el siguiente procedimiento: se dejaron secar los tejidos de los portaobjetos (Deltalab) por 10 minutos a temperatura ambiente; se fijaron

los tejidos con formalina al 10% por 10 minutos; se hicieron lavados con agua destilada de 1 min y con alcohol isopropílico de la marca Across al 40% 10 segundos; hematoxilina de Harris (Hycel) al 40% por 2 minutos; lavado con agua de la llave de 1 min. alcohol isopropílico al 40% 10 segundos; lavados con agua destilada; posteriormente se agregó eosina 0.5% (alcohólica) por 2 min; se lavó con agua de la llave por 1 minuto; se dejó secar y se colocó una gota de medio de montaje Crystal Mount Aqueos, Sigma para colocar un cubre objeto sobre el medio (se debe ejercer presión para que no queden gotas de aire).

- **Análisis de datos**

Se registró el peso de cada rata semanalmente y se promedió por grupo para observar los cambios en los pesos de cada grupo experimental.

Los cambios en los metabolitos séricos fueron analizados mediante un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), con una significancia de $p < 0.05$ y posterior prueba de Tukey para comparar si hay cambios estadísticamente significativos.

Para calcular los cambios relativos en la expresión de los datos de PCR en tiempo real se realizó mediante la cuantificación relativa utilizando $2^{-\Delta\Delta C_t}$, los datos de la expresión del 18S como control endógeno y la expresión del hígado normal como control común. Para verificar los cambios entre los grupos experimentales se realizó un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), con una significancia de $p < 0.05$ y posterior prueba de Tukey. En el análisis se incluyeron todos los grupos experimentales; HFD, HFD+BB, HFD+INU y HFD+BB+INU.

Resultados

- **Peso corporal**

Se registró el peso de cada una de las ratas semanalmente y se promedió por grupo para observar los cambios en los pesos de cada grupo experimental (Fig. 10). Se observó que a partir de la semana dos todos los grupos experimentales aumentaron de peso. Al final del periodo de experimentación, las ratas del grupo HFD fueron las que tuvieron la mayor ganancia de peso, mientras que las del grupo HFD-BB fueron las que pesaron menos. A pesar de observarse una tendencia, el cambio en el peso no tuvo significancia estadística.

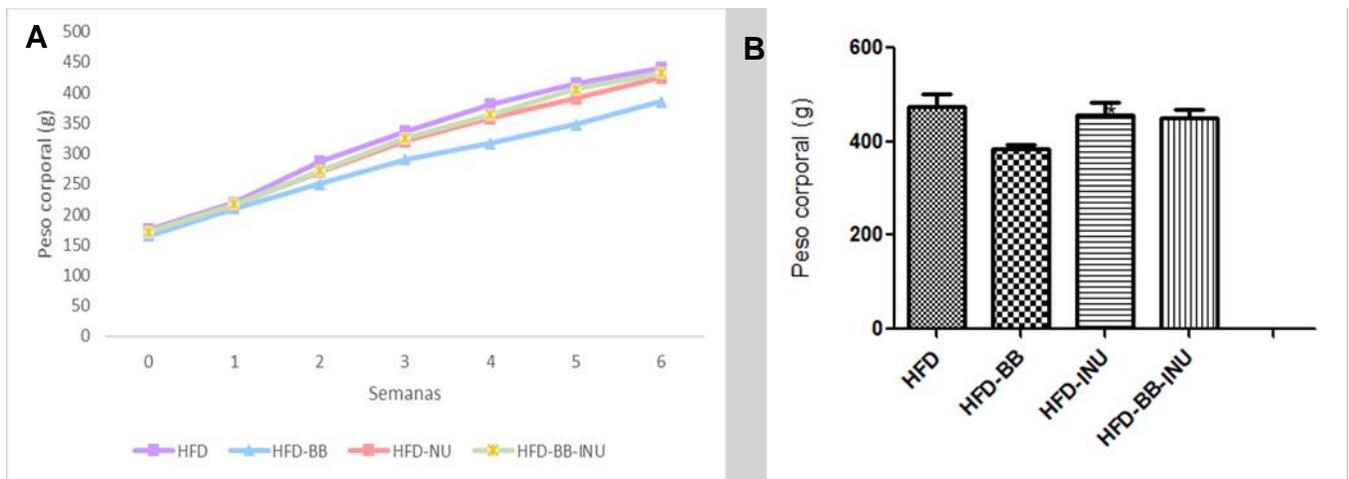


Figura 10. A) Promedio de los pesos obtenidos semanalmente hasta la semana 6. B) ANOVA de peso corporal.

- **Características macroscópicas de los hígados**

Una vez que los hígados fueron extraídos, se lavaron, se pesaron y se registraron las observaciones macroscópicas enlistadas en la tabla 4

Tabla 4 Características macroscópicas de los hígados de rata.

Grupo	Rata	Peso de rata (g)	Peso de hígado (g)	% peso de hígado/ peso rata	Características macroscópicas del hígado
HFD control negativo	1	521	19.94	3.784	Apariencia lisa, algunas partes del lóbulo tuvieron una tonalidad más clara.
	2	400	16.11	4.028	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos tuvieron una tonalidad más clara.
	3	495	18.47	3.731	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos tuvieron una tonalidad más clara.
HFD-BB	1	349	14.99	4.295	Apariencia un poco porosa, la punta del lóbulo derecho se observó un poco más oscura.
	2	399	16.35	4.098	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos se observaron más claras.
	3	386	14.63	3.790	Apariencia un poco porosa, algunas partes de los lóbulos se observaron más claras.
	4	396	14.64	3.697	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos se observaron más claras.
	5	494	17.33	3.508	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos se observaron más claras.
HFD- INU	1	404	14.76	3.653	Apariencia lisa y con una tonalidad más oscura.
	3	512	17.43	3.404	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos se observaron más claras.
	4	494	18.25	3.694	Apariencia lisa, se observó de una tonalidad clara
	5	418	12.3	2.943	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos se observaron más claras.
HFD- BB- INU	1	438	15.35	3.505	Apariencia lisa, algunas partes de los lóbulos se observaron más claras.
	2	509	16.51	3.244	Apariencia lisa, se observó de una tonalidad oscura.
	3	408	13.82	3.387	Hígado con apariencia lisa y algunos lóbulos tuvieron pequeños nódulos.
	4	475	14.01	2.949	Apariencia lisa, se observó de una tonalidad oscura.

	5	423	13.23	3.128	Apariencia lisa, se observó de una tonalidad oscura.
--	---	-----	-------	-------	--

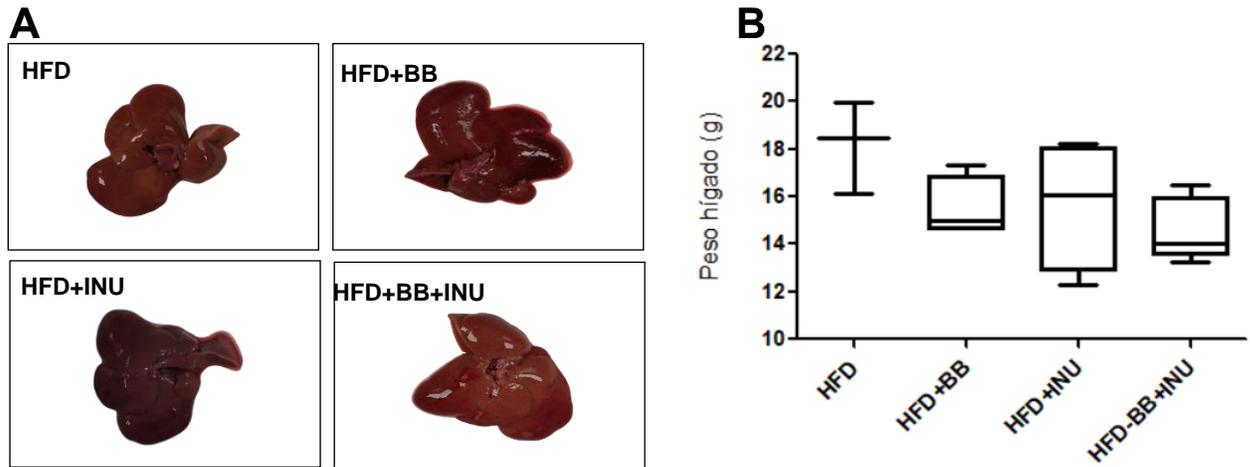


Figura 11. A) Imágenes representativas de los hígados de los diferentes grupos experimentales B) peso promedio de los hígados de cada grupo.

En la figura 11A, se observa que los hígados de los grupos de HFD + INU y HFD+ INU+BB mostraron una apariencia similar, con aspecto liso y una tonalidad roja comparados con los hígados de los grupos HFD y HFD+BB que, aunque tuvieron una apariencia lisa algunos de sus lóbulos tuvieron un matiz más claro. En cuanto al peso, los hígados del grupo HFD tuvieron más gramos que los hígados de los otros tres grupos, y aunque hubo una tendencia a la disminución en los gramos, ninguno de ellos mostró una diferencia significativa entre los grupos (Fig. 11B).

Se calculó el porcentaje del peso del hígado en relación con el peso del animal, lo cual permite determinar a qué porcentaje del peso corporal del animal corresponde el peso del hígado (Fig. 11B).

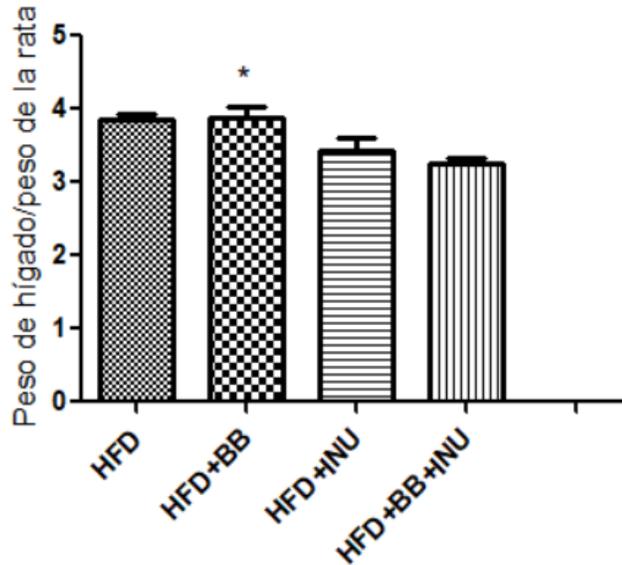


Figura 12. Cociente de los pesos de los hígados sobre el peso final de las ratas de los cinco grupos. HFD+BB* ($p < 0.05$) diferencia estadísticamente significativa vs HFD+BB+INU.

Al graficar estos datos se observa que los grupos HFD y HFD+BB son similares respecto a la relación que existe entre el peso del hígado y el peso del animal, y los grupos HFD+INU y HFD+BB+INU también son similares. El grupo que tuvo una diferencia estadísticamente significativa fue HFD+BB vs HFD+BB+INU (Fig. 12).

Análisis de la expresión del gen *Fasn*

- **Cuantificación de ARN total**

La concentración y pureza del ARN fueron determinadas utilizando un espectrofotómetro de nanofluidos llamado Nanodrop. El equipo proporciona diferentes parámetros tales como; valores numéricos a 260 nm que es la longitud de onda con el pico de adsorción para los nucleótidos; y 280 nm longitud de onda de absorción para la cantidad de proteínas disueltas en el medio. Se determinó el cociente entre la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) sobre la absorbancia a 280 nm (proteínas); la relación de A260/280 su rango de pureza óptima es de entre 1.8-2.0 y para la relación de A260/230 su rango de pureza óptima de 2.0-2.2. Las muestras que cumplen con estas características son consideradas como puras y pueden ser utilizadas para la determinar la expresión de genes. A partir de las concentraciones obtenidas se hicieron las diluciones necesarias para poder obtener el ADNc partiendo de una concentración de 750 ng.

Tabla 5. Concentración de ARN e indicadores de pureza de muestras del hígado de los grupos experimentales.

Grupo	Rata	Concentración (ng/ μ L)	260/280	260/230
HFD	1	365.7	2.11	1.99
	2	577.9	2.11	2.23
	3	387.7	2.13	2.01
HFD+BB	2	876.6	2.11	1.15
	3	457.7	2.12	0.71
	5	292.8	2.14	1.24
HFD+INU	1	481.1	2.10	1.20
	3	540.6	2.08	1.77
	4	642.7	2.09	1.37
HFD+BB+INU	1	1135.7	2.12	2.05
	3	242.9	2.13	0.43
	5	191.0	2.09	1.93

De acuerdo a la tabla 6 se observa que a partir de 50 mg de tejido se obtuvo un promedio de 500 ng por microlitro de ARN. En una muestra se obtuvieron más de 1000 ng y en otra el rendimiento fue bajo, menos de 200 ng, sin embargo, esta cantidad fue suficiente, para la retrotranscripción y obtener ADNc. Se observa que los rangos de pureza del ARN extraído fueron óptimos, ya que la relación 260/280 tuvo un valor promedio de 2.1, y la relación de 260/230 un promedio de 1.3. Aunque las muestras no están en los rangos establecidos de pureza, se considera que son óptimos, ya que los valores que se obtuvieron no están muy alejados de los establecidos y las muestras no tendrán problema en los posteriores análisis (tabla 5).

- **Integridad del ARN**

En la figura 13 se muestra una imagen representativa del ARN de cada grupo experimental, las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal (ARNr). Se consideró un ARN integro por la presencia y proporción 2.0 veces del ARNr 28S versus 1.0 vez del ARNr 18S. Interpretándose que las muestras cuentan con una integridad óptima para ser analizadas por RT-qPCR.

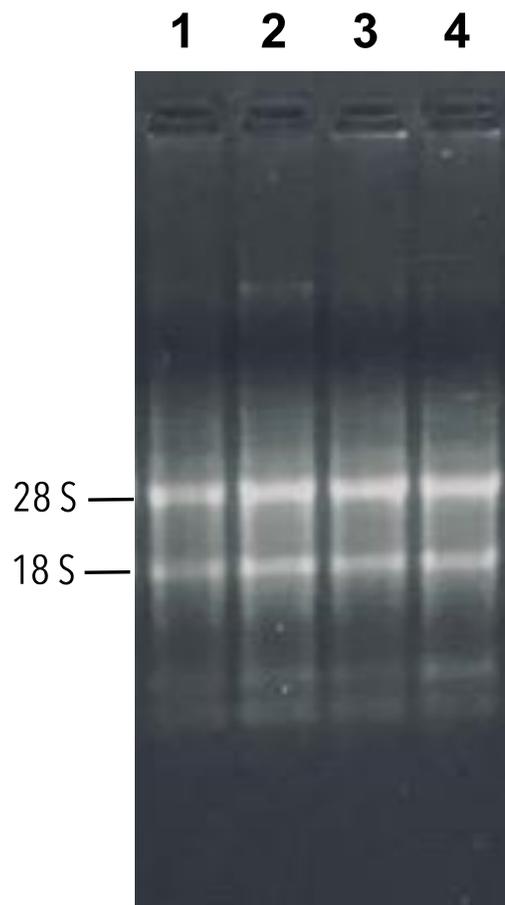


Figura 13. Imagen de electroforesis de diferentes muestras y grupos, se observa que los ARN están íntegros y pueden ser utilizados para ADNc.

- qPCR: gen que codifica para la ácido graso sintasa en los grupos con inulina y combinada con *Bifidobacterium sp.*

Para determinar la expresión del gen *Fasn* fue necesario normalizar su expresión, esto se realizó con la determinación del gen ARNr 18s de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se graficó y se realizó un análisis estadístico (Fig. 14). En el análisis se incluyeron todos los grupos experimentales; HFD, HFD+BB, HFD+INU y HFD+BB+INU.

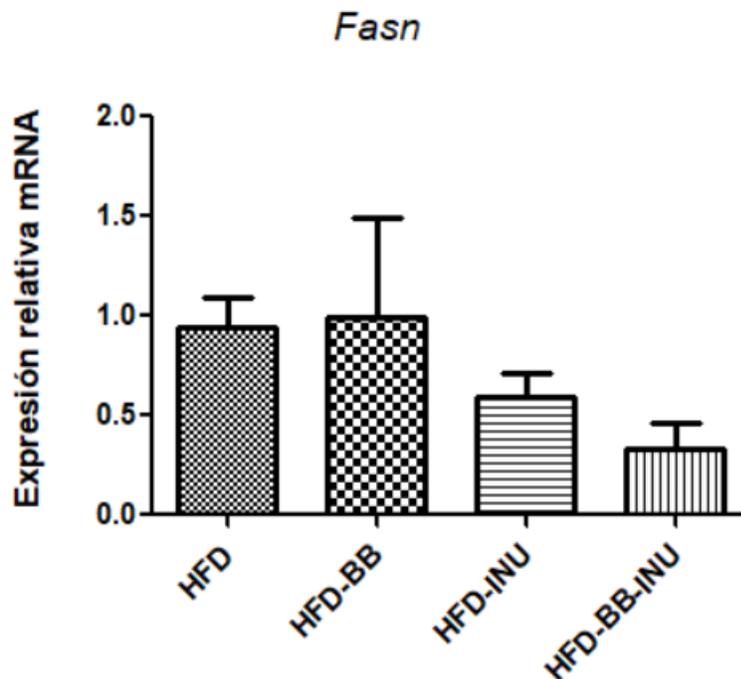


Figura 14. Cambios en la expresión de *Fasn*.

La expresión del gen *Fasn* fue similar para los grupos HFD y HFD-BB, mientras que los grupos HFD-INU Y HFD-BB-INU mostraron una tendencia a la disminución en la expresión, aunque no significativa, respecto al grupo HFD. La expresión disminuyó en más del 50% en el grupo HFD-BB-INU, aunque no mostró una diferencia significativa. (Figura 14)

- **Cambios serológicos de los lípidos y los marcadores hepáticos.**

Se realizó el análisis de las químicas sanguíneas mediante un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), con una significancia de $p < 0.05$ y posterior prueba de Tukey para comparar si hay cambios estadísticamente significativos (Fig. 15).

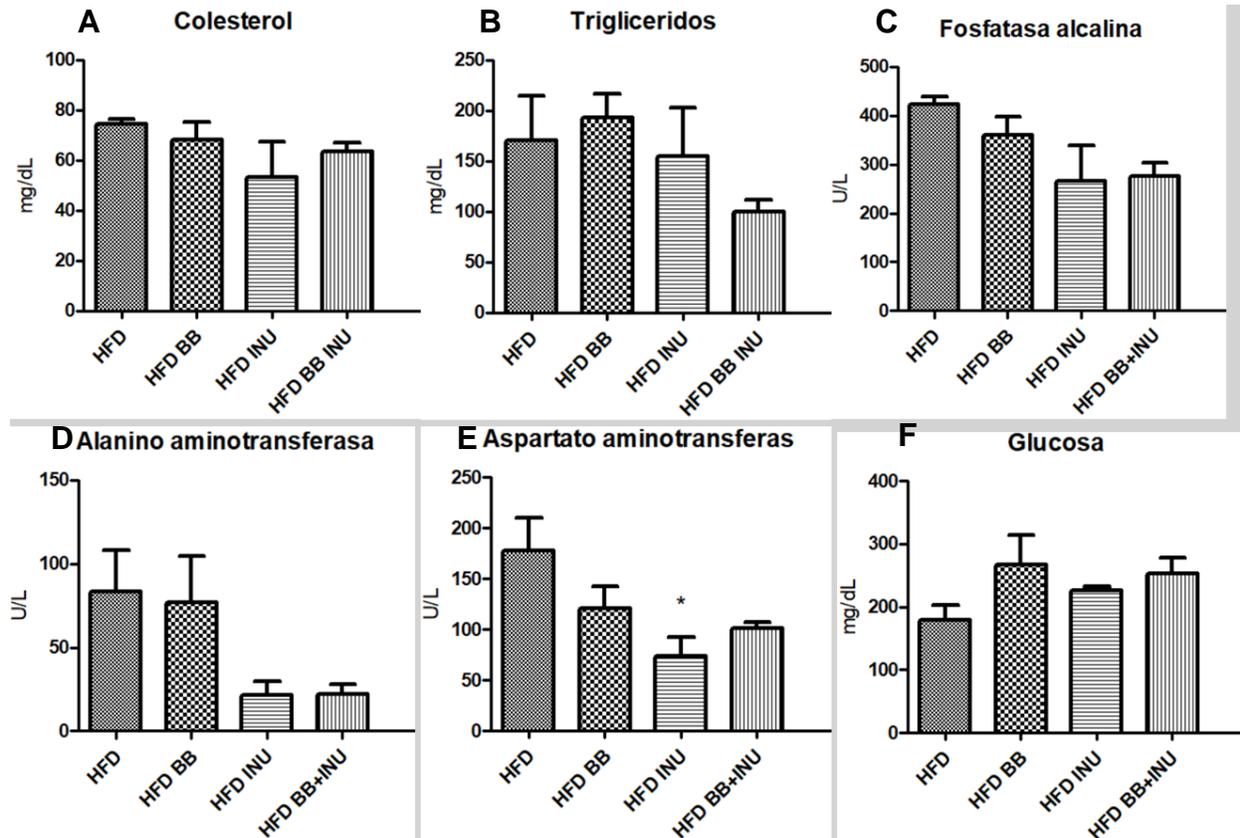


Figura 15. Indicadores serológicos del grupo HFD y grupos experimentales intervenidos. E) Aspartato aminotransferasas HFD* ($p < 0.05$) diferencia estadísticamente significativa vs HFD-INU.

Los cambios serológicos para marcadores relacionados con los lípidos, los asociados con el funcionamiento del hígado y el nivel de glucosa mostraron las tendencias mostradas en las gráficas de la figura 15 y que a continuación se describen. Considerando al grupo HFD como grupo de referencia para los otros grupos experimentales se observó que contuvo la mayor expresión serológica de colesterol, (Fig. 15A) por el contrario el contenido de triglicéridos estuvo aumentado primordialmente en el grupo HFD-BB. El grupo HFD-BB-INU tuvo la mitad de triglicéridos respecto del grupo HFD, pero a pesar de esta disminución el cambio no fue estadísticamente significativo. (Fig. 15B)

Hubo una disminución de los indicadores serológicos relacionados con el funcionamiento hepático, tales como fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, en los grupos experimentales intervenidos comparados con el grupo HFD, La disminución fue hasta del 75% en los grupos HFD-INU y HFD-BB-INU para la alanina aminotransferasa sérica. A pesar de esta disminución tan marcada los cambios no fueron estadísticamente significativos. El cambio estadísticamente significativo se observó para la enzima aspartato aminotransferasa en el grupo HFD-INU. (Fig. 15C-E)

El nivel de glucosa sérica (Fig. 15F) fue menor para el grupo HFD respecto a los grupos experimentales intervenidos. El grupo HFD-BB tuvo un aumento relativo de aproximadamente el 40% respecto al grupo HFD, pero el cambio no fue significativo.

- **Análisis histológico**

Las tinciones de hematoxilina y eosina realizadas en tejido fresco mostraron pequeñas vesículas de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos en el grupo de HFD y en el grupo de HFD-BB-INU también fueron observadas, pero en menor cantidad. Mientras que en los grupos HFD-BB y HFD-INU no se observaron vesículas de lípidos (Fig. 16).

Aunque se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina con tejidos incluidos en parafina, los resultados no fueron adecuados, debido a que el proceso de inclusión dañó el tejido (Fig. 17).

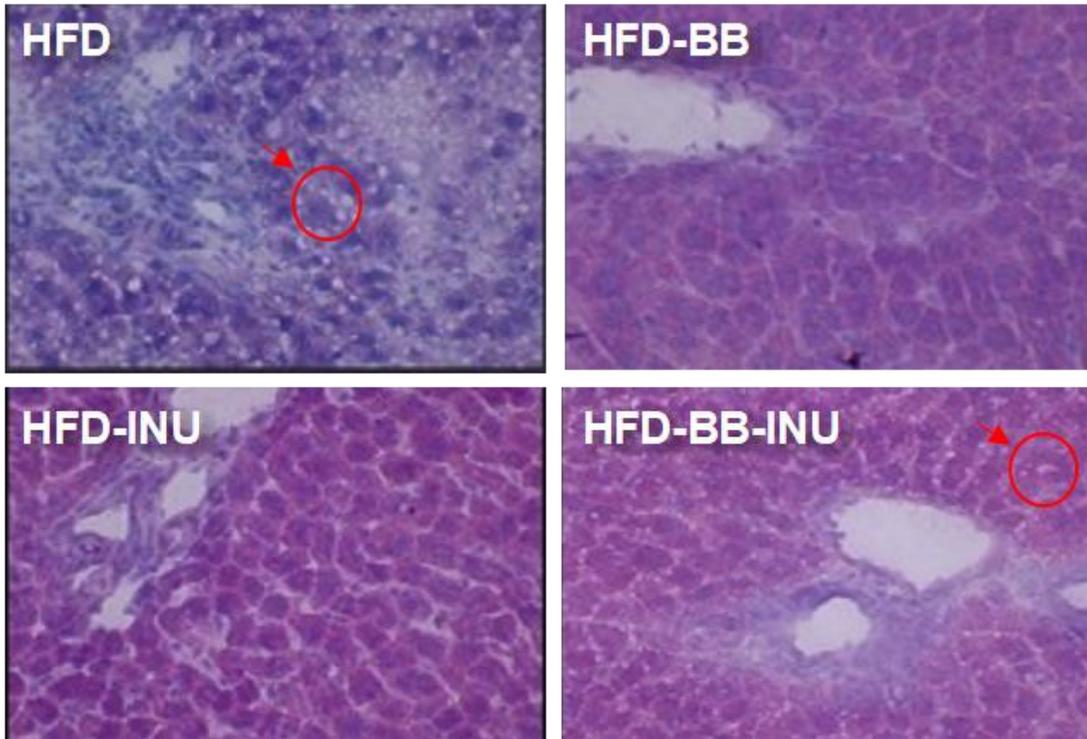


Figura16. Características microscópicas de los hígados de rata con tinción de hematoxilina y eosina en tejido fresco.

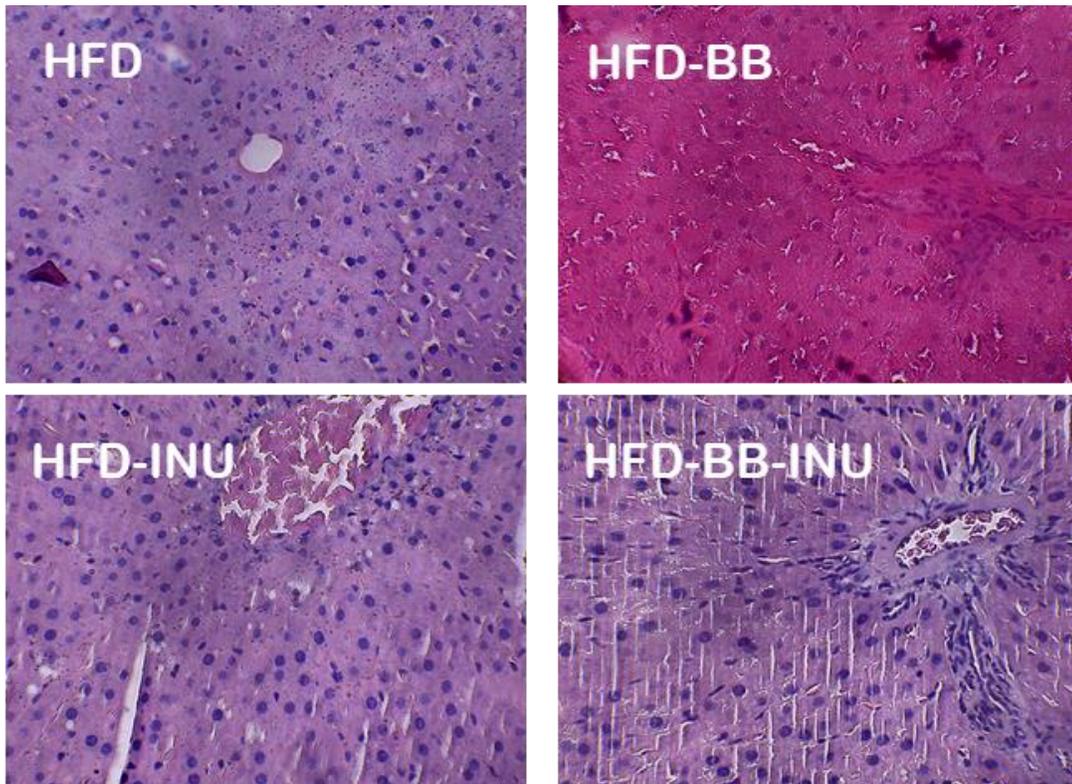


Figura17. Tinción de hígado de rata de hematoxilina y Eosina en tejido en parafina.

Conclusiones

Se observaron vesículas de lípidos en los hepatocitos en las ratas del grupo de una dieta alta en grasa (HFD) y del grupo HFD-BB-INU que también fueron alimentadas con una dieta alta en grasa y administradas con bifidobacterias e inulina.

La administración de bifidobacterias a una concentración de 1×10^8 UFC con inulina y la administración de inulina disminuyó la expresión del gen FASN, pero no se presenta una diferencia estadísticamente representativa.

Solo algunos resultados tuvieron cambios estadísticamente significativos y otros solo mostraron tendencias y requieren ser evaluados nuevamente para verificar estos cambios. En base a la tendencia, a continuación, se muestra una conclusión gráfica de los resultados obtenidos.

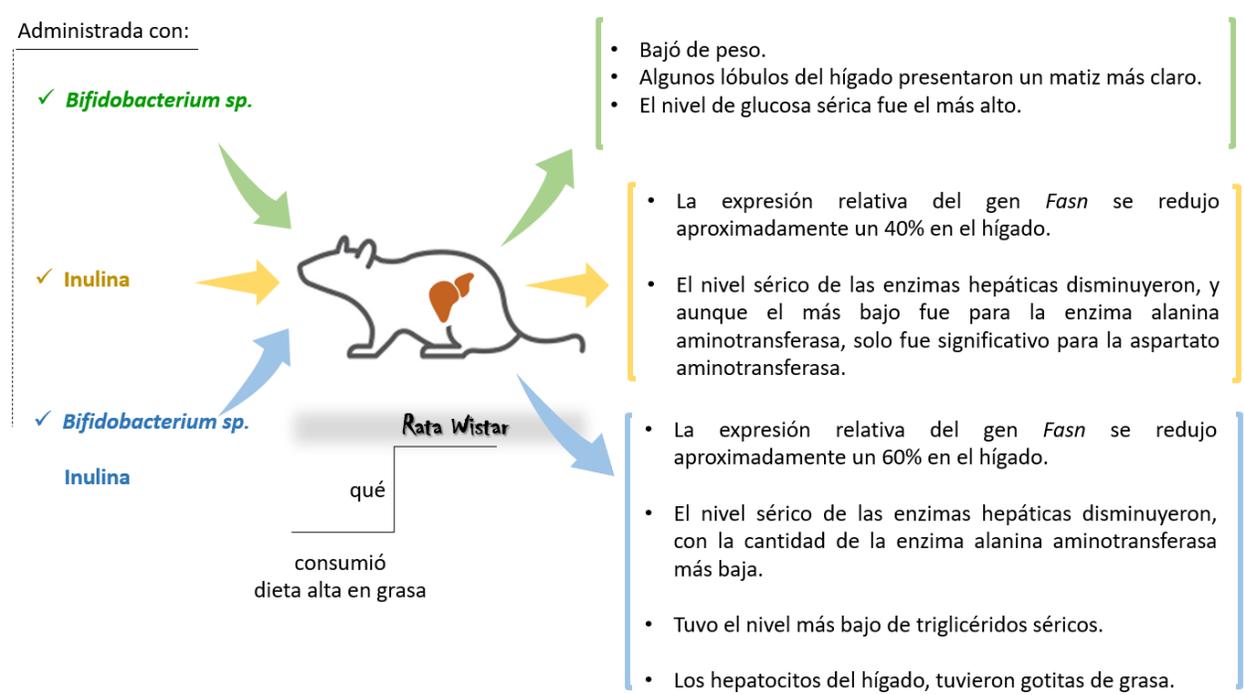


Figura 18. Conclusión gráfica de los resultados obtenidos en este proyecto de investigación.

Referencias

1. Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(8):1541–58. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-019-03011-w>
2. Diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease: practical guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. American Association for the Study of Liver Diseases;
3. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* [Internet]. 2014;510(7503):84–91. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13478>
4. Han H, Jiang Y, Wang M, Melaku M, Liu L, Zhao Y, et al. Intestinal dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): focusing on the gut-liver axis. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2023;63(12):1689–706. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2021.1966738>
5. Au Yeung SL, Borges MC, Wong THT, Lawlor DA, Schooling CM. Evaluating the role of non-alcoholic fatty liver disease in cardiovascular diseases and type 2 diabetes: a Mendelian randomization study in Europeans and East Asians. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2023;52(3):921–31. <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyac212>
6. Carpi RZ, Barbalho SM, Sloan KP, Laurindo LF, Gonzaga HF, Grippa PC, et al. The effects of probiotics, prebiotics and synbiotics in non-alcoholic fat liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(15):8805. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23158805>
7. Yang, M., Qi, X., Li, N., Kaifi, J. T., Chen, S., Wheeler, A. A., Kimchi, E. T., Ericsson, A. C., Rector, R. S., Staveley-O'Carroll, K. F., & Li, G. (2023). Western diet contributes to the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in male mice via remodeling gut microbiota and increasing production of 2-oleoylglycerol. *Nature Communications*, 14(1), 228. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35861-1>
8. Sadowska, J.; Rygielska, M. The effect of high fructose corn syrup on the plasma insulin and leptin concentration, body weight gain and fat accumulation in rat. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2019, 28, 879–884
9. López-Taboada, I., González-Pardo, H., & Conejo, N. M. (2020). Western diet: Implications for brain function and behavior. *Frontiers in psychology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.564413>
10. Yang, M., Qi, X., Li, N., Kaifi, J. T., Chen, S., Wheeler, A. A., Kimchi, E. T., Ericsson, A. C., Rector, R. S., Staveley-O'Carroll, K. F., & Li, G. (2023). Western diet contributes to the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in male mice

via remodeling gut microbiota and increasing production of 2-oleoylglycerol. *Nature Communications*, 14(1), 228.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-35861-1>

11. Kirpich, I. A., Marsano, L. S., & McClain, C. J. (2015). Gut–liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*, 48(13–14), 923–930.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>
12. Mijangos-Trejo A, Nuño-Lambarri N, Barbero-Becerra V, Uribe-Esquivel M, Vidal-Cevallos P, Chávez-Tapia N. Prebiotics and probiotics: Therapeutic tools for nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(19).
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms241914918>
13. Mori, Y. (2013). Anatomía microscópica del hígado: *Clinical Liver Disease*, Vol. 2, No. S1, marzo 2013 Recurso de enseñanza oficial de la AASLD . *Enfermedad hepática clínica* , 2 (S5), 109–112. <https://doi.org/10.1002/cld.287>
14. Stanger, BZ (2015). Homeostasis celular y reparación en el hígado de mamíferos. *Revista anual de fisiología* , 77 (1), 179–200.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170255>
15. Brunt, E. M. (2007). Pathology of fatty liver disease. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20, S40–S48. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800680>
16. Chalasani, N., Wilson, L., Kleiner, D. E., Cummings, O. W., Brunt, E. M., & Ünalp, A. (2008). Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 48(5), 829–834.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.016>
17. Gebhardt, R., & Matz-Soja, M. (2014). Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(26), 8491–8504. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i26.8491>
18. Diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease: practical guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *American Association for the Study of Liver Diseases*;
19. Han H, Jiang Y, Wang M, Melaku M, Liu L, Zhao Y, et al. Intestinal dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): focusing on the gut-liver axis. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2023;63(12):1689–706.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2021.1966738>
20. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. 2002;123(1):134–40. <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2002.34168>

21. Kirpich, I. A., Marsano, L. S., & McClain, C. J. (2015). Gut–liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*, 48(13–14), 923–930. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>
22. Kirpich, I. A., Marsano, L. S., & McClain, C. J. (2015). Gut–liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*, 48(13–14), 923–930. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>
23. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464: 59-65.
24. Xu J, Chen HB, Li SL (2017). Understanding the molecular mechanisms of the interplay between herbal medicines and gut microbiota. *Med Res Rev*, 37: 1140-1185.
25. Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz de Pipaon, M., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y hepatología*, 44(7), 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>
26. Perino A, Demagny H, Velazquez-Villegas L, Schoonjans K (2021). Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. *Physiol Rev*, 101: 683-731.
27. Zhang C, Fang T, Shi L, Wang Y, Deng X, Wang J, et al. The synbiotic combination of probiotics and inulin improves NAFLD through modulating gut microbiota. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2023;125:109546. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109546>
28. Li H, Wang X-K, Tang M, Lei L, Li J-R, Sun H, et al. Bacteroides thetaiotaomicron ameliorates mouse hepatic steatosis through regulating gut microbial composition, gut-liver folate and unsaturated fatty acids metabolism. *Gut Microbes* [Internet]. 2024;16(1). <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2024.2304159>
29. Pezzino S, Sofia M, Mazzone C, Litrico G, Agosta M, La Greca G, et al. Exploring public interest in gut microbiome dysbiosis, NAFLD, and probiotics using Google Trends. *Sci Rep* [Internet]. 2024 [citado el 12 de marzo de 2024];14(1):1–10. <https://www.nature.com/articles/s41598-023-50190-5>
30. Abenavoli L, Scarpellini E, Rouabhia S, Balsano C, Lizza F. Probiotics in non-alcoholic fatty liver disease: which and when. *Ann Hepatol* [Internet]. 2013;12(3):357–63. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)30997-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681(19)30997-4)
31. Hizo GH, Rampelotto PH. The impact of probiotic Bifidobacterium on liver diseases and the Microbiota. *Life (Basel)* [Internet]. 2024 [citado el 12 de marzo de 2024];14(2):239. <https://www.mdpi.com/2075-1729/14/2/239>

32. Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
33. Castillo V, Figueroa F, González-Pizarro K, Jopia P, Ibacache-Quiroga C. Probiotics and prebiotics as a strategy for non-alcoholic fatty liver disease, a narrative review. *Foods [Internet]*. 2021 [citado el 12 de marzo de 2024];10(8):1719. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/8/1719>
34. Bao T, He F, Zhang X, Zhu L, Wang Z, Lu H, et al. Inulin exerts beneficial effects on non-alcoholic fatty liver disease via modulating gut microbiome and suppressing the Lipopolysaccharide-Toll-like receptor 4-M Ψ -Nuclear factor- κ B-nod-like receptor protein 3 pathway via gut-liver axis in mice. *Front Pharmacol [Internet]*. 2020;11. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.558525>
35. Jensen-Urstad, APL y Semenkovich, CF (2012). Sintetasa de ácidos grasos y metabolismo hepático de triglicéridos: ¿Asistente o mensajera? *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821 (5), 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.09.017>
36. Pozo M, & Camello-Almaraz C, & Camello P.J. (2020). Fisiología hepática. Fernández-Tresguerres J.A., & Cachofeiro V, & Cardinali D.P., & Delpón E, & Díaz-Rubio E, & Escriche E, & Juliá V, & Teruel F, & Pardo M(Eds.), Fisiología humana, 5e. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2987§ionid=253376670>
37. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride metabolism in the liver [Internet]. Vol. 8, *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2017 [citado el 12 de marzo de 2024]. p. 1–22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29357123/>
38. Rui L. Energy metabolism in the liver [Internet]. Vol. 4, *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2014 [citado el 12 de marzo de 2024]. p. 177–97. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24692138/>
39. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Bloc'h JL, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) [Internet]*. 2008;92(3):272–83. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>
40. Belew GD, Jones JG. *De novo* lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease: Quantification with stable isotope tracers. *Eur J Clin Invest*. 2022;52(3). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/eci.13733>
41. Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/jci23621>
42. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*

[Internet]. 2011 [citado el 12 de marzo de 2024];54(1):344–53.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21520200/>

43. Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2016). Role of dietary fructose and hepatic DE Novo lipogenesis in fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>
44. Xiao, Y., Yang, Y., Xiong, H., & Dong, G. (2024). The implications of FASN in immune cell biology and related diseases. *Cell Death & Disease*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06463-6>
45. Fhu, C. W., & Ali, A. (2020). Fatty acid synthase: An emerging target in cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17), 3935. <https://doi.org/10.3390/molecules25173935>
46. Menendez, J. A., Cuyàs, E., Encinar, J. A., Vander Steen, T., Verdura, S., Llop-Hernández, À., López, J., Serrano-Hervás, E., Osuna, S., Martin-Castillo, B., & Lupu, R. (2024). Fatty acid synthase (FASN) signalome: A molecular guide for precision oncology. *Molecular Oncology*, 18(3), 479–516. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13582>

Visto bueno de los asesores

Asesor interno



Dra. María Angélica Gutiérrez
Nava
Número económico: 34568
Lab. Ecología Microbiana
UAM-X

Asesor externo



Dra. Julia Esperanza Torres Mena
CVU 98841
Estancia Posdoctoral
Lab. Ecología Microbiana
UAM-X