

ENTRENAMIENTO FÍSICO PREVIENE LA SARCOPENIA INDUCIDA POR ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA

Tesis entregada para optar al grado de
Doctor en Biomedicina

Andrea Patricia González Rojas

Director de Tesis: Doctor Claudio Cabello Verrugio

Santiago, Chile.
marzo / 2023

Agradecimientos

Al Doctor Claudio Cabello Verrugio por permitirme desarrollar esta investigación en el laboratorio de Patologías Musculares, Fragilidad y Envejecimiento de la Universidad Andrés Bello, el cual dirige. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en un área tan diferente a la de mi formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio por todo el apoyo brindado durante estos años. Un agradecimiento especial a Johanna Abrigo, Francisco Aguirre, Vania Morales y Sabrina Conejeros por estar siempre presentes dentro y fuera del laboratorio y por ser personas tan generosas y amigos maravillosos.

A mis amigos y compañeros Germán y Gaby por el apoyo de siempre durante estos 4 largos años.

A mis amigos de la vida, Martina, Isabel y Jorge por estar siempre.

A mis padres, hermanos y sobrinos por el amor, la paciencia y el apoyo permanente. Sin ustedes esto no habría sido posible.

A mi adorada familia. Gracias Oscar, Lei y Amanda y nuestros gatitos por la paciencia y el amor incondicional durante estos 4 años. Gracias por estar aquí juntos a pesar de los momentos difíciles (que han sido muchos) y espero que nuestros momentos maravillosos en común sean infinitos. Los amo tanto y no se imaginan cuanto les agradezco el apoyo y la confianza. Sin ustedes el término de esta etapa no sería posible ni tendría sentido.

Financiamiento

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Patologías Musculares, Fragilidad y Envejecimiento dirigido por el Dr. Claudio Cabello Verrugio, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Vida de la Universidad Andrés Bello. El financiamiento de este trabajo fue el siguiente: Beca de Mantención y Arancel de Doctorado, Universidad Andrés Bello (UNAB), Fondo para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (FONDECYT 1200944) dirigido por el Dr. Cabello, Instituto Milenio de inmunología e inmunoterapia (P09-016-F), CEDENNA AFB180001, Beca de Doctorado Nacional de ANID N°21212286, Beca de gastos operacionales ANID Nº24210215, Beca Proyecto Iniciación a la Investigación Nº DI-06-21/INI y Beca de asistencia a Congresos 2022 de la Dirección General de Investigación UNAB.

Índice general

Resumen i

Abstract ii

Keywords: sarcopenia, chronic liver disease, resistance training, endurance training, concurrent training, strength, muscle mass, physical performance. ii

1. Fundamentos teóricos 3

1.1. Enfermedad hepática crónica (EHC) 3

1.2 Sarcopenia y EHC. 4

1.2.1. Conceptos generales de Sarcopenia. 4

1.2.2. Sarcopenia secundaria a EHC 6

1.2.3. Estrategias para el tratamiento y prevención de la sarcopenia en EHC 13

2. Planteamiento de la hipótesis 23

3.1 Objetivo general 23

3.2 Objetivos específicos 23

4. Materiales y métodos 24

4.1 Diseño y estrategia experimental 24

4.3 Inducción de EHC 29

4.4 Protocolos de entrenamiento físico 29

4.5 Evaluaciones *in vivo* 33

4.5.1 Pruebas funcionales 33

4.5.2 Composición corporal 35

4.6 Evaluaciones *ex vivo* 35

4.6.1 Eutanasia y toma de muestras. 35

4.6.2 Determinación de la fuerza muscular en músculo aislado 36

4.6.3 Análisis histológicos: determinación del diámetro de las fibras 37

4.6.4 Obtención de extractos proteicos de músculo y determinación de proteínas 37
4.6.5 Nivel de proteínas estructurales del sarcómero y de la ruta de síntesis.... 38
4.7 Marcadores de EHC 39
4.8 Efectividad del EF y ER 40
4.9 Análisis estadístico 40
5.1 Objetivo 1. Determinar y comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado sobre la fuerza muscular del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC. 41
Resumen objetivo específico 1 49
5.2 Objetivo 2. Determinar y comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado sobre la masa muscular del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC. 50
Resumen objetivo específico 2 66
5.3 Objetivo 3. Determinar y comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado sobre función física del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC..... 68
Resumen Objetivo Específico 3 78
5.3 Otros parámetros de la Enfermedad hepática crónica..... 79
6. Discusión..... 84
6.1 Modelo de sarcopenia por EHC colestásica 84
6.2 Modelo de entrenamiento físico..... 86
6.3 Fuerza muscular 87
6.4 Masa muscular 91
6.5 Función física relacionada a la movilidad 98
6.6 Limitaciones del estudio..... 100

7. Conclusiones 103
8. Proyecciones 104
9. Referencias 107
10. Anexos 125

Índice de Figuras

Figura 1. Sarcopenia en EHC..... 12
Figura 2. Diseño experimental..... 25
Figura 3. Estrategia experimental..... 26
Figura 4. Ladder Climb..... 30
Figura 5. Características del entrenamiento físico 32
Figura 6. EF, ER y EC previenen la disminución de la fuerza muscular de las patas delanteras en animales con EHC. 46
Figura 7. EF, ER y EC previenen la disminución de la fuerza de prensión en las patas delanteras y traseras en animales con EHC 47
Figura 8. EF, ER y EC previenen la caída de la fuerza muscular del Tibial Anterior (TA) aislado en animales con EHC 48
Figura 9. EF, ER y EC previenen la disminución del diámetro de las fibras musculares del Sóleo en animales con EHC 57
Figura 10. EF, ER y EC previenen la caída del diámetro de las fibras musculares del Tibial Anterior en animales con EHC 58
Figura 11. EF, ER y EC previenen la disminución en el diámetro de fibras musculares del Sóleo en ratones con EHC..... 60
Figura 12. EF, ER y EC previenen la disminución en el diámetro de fibras musculares del Tibial Anterior en ratones con EHC..... 61
Figura 13. EF, ER y EC previenen la disminución del nivel de Troponina del TA en EHC..... 63
Figura 14. EF, ER y EC previenen la disminución del nivel de MHC del TA en animales con EHC 64
Figura 15. EF, ER y EC previenen la disminución del nivel de p70S6K total del TA en animales con EHC 65
Figura 16. ER y EC, pero no EF previenen la disminución de la función física asociada a la movilidad de alto esfuerzo en EHC..... 75
Figura 17. EF, ER y EC previenen la disminución de la función física asociada a la movilidad de moderado esfuerzo en EHC..... 76

Figura 18. EF y ER, pero no EC previenen la disminución de la función física asociada a la movilidad de bajo esfuerzo en EHC 77
Figura 19. EF, ER y EC no previenen la hepatomegalia que caracteriza la EHC 82
Figura 20. EF, ER y EC no previenen el aumento de la concentración de ácidos biliares en suero que caracteriza la EHC 83
Figura 21. Modelo gráfico de la investigación 106

Índice de Tablas

Tabla 1. Protocolo para evaluar la capacidad máxima de carrera en treadmill 34
Tabla 2. Efecto de la EHC, del entrenamiento físico y la interacción entre ambos sobre la fuerza muscular 42
Tabla 3. Comparación de la fuerza muscular de animales sanos y con EHC, sedentarios y con EF, ER y EC 45
Tabla 4. Efecto sobre la masa muscular, diámetros de fibras y niveles de proteínas de la EHC, del entrenamiento físico y la interacción entre ambos 51
Tabla 5. Masa muscular evaluada mediante Bioimpedanciometría (BIA), masa de músculos y diámetro de fibras musculares en animales controles y con EHC, sedentarios, con EF, ER y EC..... 56
Tabla 6. Efecto de la EHC, del entrenamiento físico y la interacción entre ambos sobre la función física..... 69
Tabla 7. Función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo de animales sanos y con EHC, sedentarios y con EF, ER y EC 72
Tabla 8. Peso del hígado y niveles de ácidos biliares en suero en animales sanos y con EHC, sedentarios y con EF, ER y EC..... 81

Índice de abreviaturas

AB: ácidos biliares

Ang-II: angiotensina II

AVD: actividades de la vida diaria

BCAA: branched-chain amino acids

BCA: ensayo de ácido bicinconínico

BIA: *bioelectrical impedance análisis* (bioimpedanciometría)

CA: ácido cólico

CSA: área de sección transversal

CT: *computed tomography* (tomografía computarizada)

CTRL: control

4E-BP1: *4E-binding protein*

DCA: ácido desoxicólico

DDC: hepatotoxina 5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine

DEIS: departamento de estadísticas e información en salud del Ministerio de Salud de Chile

DXA: dual-energy X-ray absorptiometry

EC: entrenamiento combinado

EDL: extensor largo de los dedos

EF: entrenamiento de fuerza

EHC: enfermedad hepática crónica

ER: entrenamiento de resistencia

EWGSOP2: european working group on sarcopenia in older people 2

FoxO: *Forkhead box O*

GA: gastrocnemio

IGF-1: insulin-like growth factor I

IL-6: interleuquina 6

INF-γ: *interferon-gamma*

MAFbx: *muscle atrophy F-box*

mTOR: mamalian target of rampamicyn

MRI: *magnetic resonance imaging* (resonancia magnética)

MuRF-1: *muscle RING finger 1*

NAFLD: *non-alcoholic fatty liver disease* (hígado graso no alcohólico)

NF-κβ: nuclear factor κβ

PC: peso corporal.

p70S6K: *protein S6 kinase*

PI3K: fosfatidilinositol- 3-kinasa

PKB: proteína quinasa B

RM: repetición máxima

ROS: especies reactivas de oxígeno

RPM: revoluciones por minuto

SAR: sistema renina-angiotensina

SED: sedentario

SOL: Sóleo

SDH: succinato deshidrogenasa

TA: tibial anterior

TGR5: *takeda G protein-coupled receptor 5*

TNF-α: tumor necrosis factor α

US: ultrasonido

VO_{2max}: consumo máximo de oxígeno

Resumen

La enfermedad hepática crónica (EHC) produce sarcopenia secundaria a la disfunción del hígado, que se caracteriza por disminución de la fuerza muscular, masa muscular y función física y es un predictor independiente de mortalidad pre y post trasplante hepático. El entrenamiento físico de resistencia (ER), fuerza (EF) o entrenamiento combinado (EC), puede ser una herramienta no farmacológica que prevenga y trate la sarcopenia en EHC, sin embargo, no existen estudios comparativos al respecto. La hipótesis planteada es que la sarcopenia secundaria a EHC es prevenida en mayor grado por el EC, respecto al EF o ER, en un modelo preclínico. El objetivo es comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, resistencia y EC, sobre la sarcopenia inducida por EHC en un modelo murino. Ratones C57BL6 sanos (controles) y con EHC, se subdividieron en grupos sedentarios (SED), EF, ER y EC. La intervención experimental con dieta y entrenamiento se realizó por 6 semanas, este último a intensidad moderada-vigorosa. Se evaluó fuerza muscular *in vivo* y *ex vivo*, masa muscular general, masa de músculos, diámetro de fibras y niveles de proteínas Troponina, cadena pesada de la miosina y p70S6K total, y función física de alto, moderado y bajo esfuerzo. Los resultados indican que, durante la EHC, la pérdida de fuerza in *vivo* y *ex vivo*, es prevenida por los tres tipos de entrenamiento físico. La pérdida de masa muscular general no es prevenida por el entrenamiento físico en animales con EHC, pero si existe un efecto preventivo de los tres entrenamientos sobre la disminución de la masa de los músculos, el diámetro de las fibras musculares del TA y SOL y el nivel de las proteínas analizadas. La pérdida de la función física es prevenida en mayor medida por el ER y EC. En conjunto, los datos nos permiten concluir que el EF, ER y EC tienen efectos preventivos sobre la disminución de la fuerza, la masa muscular y la función física que caracterizan la EHC. El EC podría ser una buena opción para tratar y prevenir la sarcopenia en EHC, respecto al EF y el ER por sí solos.

Palabras claves: Sarcopenia, enfermedad hepática crónica, entrenamiento físico de fuerza, entrenamiento físico de resistencia, entrenamiento físico combinado.

Abstract
Chronic liver disease (CLD) induces sarcopenia secondary to liver dysfunction. In sarcopenia, muscle strength, muscle mass, and physical performance decrease, and it is an independent predictor of mortality before and after liver transplantation. Physical resistance training (RT), endurance (ET), or concurrent training (CT) can be a non-pharmacological tool that prevents and treats sarcopenia in CLD. However, there are no comparative studies in this regard. The proposed hypothesis is that sarcopenia secondary to CLD is prevented to a greater degree by CT, compared to RT or ET, in a preclinical model. To compare the effects of RT, ET, and CT on CLD-induced sarcopenia in a mouse model. control and CLD C57BL6 mice (induced by hepatotoxin in the diet) were subdivided into sedentary (SED) and RT, ET, and CT. The experimental intervention with diet and training was carried out for 6 weeks, the latter at moderate-vigorous intensity. The following were evaluated: muscle strength *in vivo* and *ex vivo* (Tibialis anterior electrophysiology), muscle mass (general muscle mass*,* muscle mass, Tibialis anterior (TA) and Soleus (SOL) fiber diameter, and troponin, MHC, and total p70S6K protein levels) and physical performance (maximal, moderate, and low intensity). During CLD, the loss of strength in *vivo and ex vivo* is prevented by RT, ET, and CT. The loss of general muscle mass is not precluded by physical training. The general loss of muscle mass is not prevented by physical training in animals with CLD. Still, the three training sessions have a preventive effect on the decrease in muscle mass, the diameter of the TA and SOL muscle fibers, and the level of the analyzed proteins. Loss of physical function in CLD is prevented to a greater extent by ET and CT. Conclusion: RT, ET, and CT have preventive effects on the decrease in strength, muscle mass, and physical function that characterize CLD. Compared to the RT and the ET alone, the CT could be an excellent option to treat and prevent sarcopenia in CLD.

Keywords: sarcopenia, chronic liver disease, resistance training, endurance training, concurrent training, strength, muscle mass, physical performance.

1. Fundamentos teóricos

1.1. Enfermedad hepática crónica (EHC)

Las enfermedades crónicas del hígado corresponden a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una disminución de la función hepática como resultado de inflamación crónica o daño al tejido hepático (1). Las causas más comunes de enfermedad hepática crónica (EHC) son: hepatitis viral tipo B (29%) y C (9%), enfermedad hepática relacionada al alcohol (2%) y enfermedad por hígado graso no alcohólico (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD)) (60%) (1-4). En su etapa más avanzada, la EHC (de cualquier origen) conduce al desarrollo de cirrosis, definida como un daño irreversible en la arquitectura del hígado por alteraciones hepatocelulares, fibrosis y nódulos anormales (1). Dependiendo de la gravedad de la disfunción del hígado en la cirrosis, el tiempo de vida de los pacientes es diferente: aquellos con cirrosis compensada tienen una supervivencia promedio es de 12 años, pero en aquellos con cirrosis descompensada esta es de 1,8 años (5, 6).

Aproximadamente 5,5 millones de personas sufren de EHC en todo el mundo y hasta 40.000 personas morirán por su curso natural o por complicaciones asociadas (1). En Latinoamérica, la cirrosis hepática, presenta una de las tasas de mortalidad más altas con 20,8 muertes por 100.000 habitantes el año 2004, 23,6 el año 2011 y se espera que siga aumentando (7, 8). En Chile, según los últimos datos publicados por el Departamento de Estadísticas e Información en Salud (DEIS) del Ministerio de Salud, de un total de 94.985 defunciones, un 5,2% corresponde a patologías hepáticas, ubicándose después de las patologías isquémicas del corazón y cerebrovasculares (7).

Dentro de las EHC no alcohólicas, un tipo altamente prevalente es la EHC de origen colestásico. La colestasis es un deterioro en la formación de bilis y/o en el flujo biliar, que puede presentarse clínicamente con fatiga, prurito e ictericia (9-12) y su prevalencia es de 1,9-40,2 por 100.000 habitantes (2, 10, 13). La colestasis se puede clasificar como intrahepática (que puede ocurrir por un defecto funcional hepatocelular o por lesiones obstructivas de los tractos biliares intrahepáticos distales a los

canalículos biliares) y extrahepática (que ocurre debido a una obstrucción biliar causada por cálculos, tumores, quistes o estenosis) (9).

La EHC puede presentar múltiples complicaciones, como ascitis, hipertensión portal, disfunción renal, encefalopatía, cáncer hepático, malnutrición, anormalidades metabólicas y del sistema inmune, síndrome hepatorrenal y fragilidad. Una de las complicaciones más comunes y que afecta la calidad de vida y sobrevida de los pacientes que la padecen, es la **sarcopenia** (14-16).

1.2 Sarcopenia y EHC.

1.2.1. Conceptos generales de Sarcopenia.

Definición

En la actualidad la definición más aceptada y utilizada es la del Grupo de Trabajo Europeo sobre Sarcopenia en Personas Mayores (EWGSOP2) en el consenso del año 2019, donde se entiende sarcopenia como un "síndrome con pérdida progresiva y generalizada de la masa muscular esquelética, la fuerza y la función física, que a su vez se asocia con un mayor riesgo de resultados adversos, como discapacidad física, pobre calidad de vida y mayor mortalidad" (17-19).

Según EWGSOP2, determinar la existencia de sarcopenia se basa en la presencia de tres criterios o parámetros: i) pérdida de fuerza muscular (principal indicador de sarcopenia), ii) disminución de la cantidad o calidad de la masa muscular, y iii) baja función o rendimiento físico (17, 18, 20-22).

Diagnóstico de sarcopenia

El diagnóstico de sarcopenia debe considerar la evaluación de los tres parámetros que la componen, es decir la fuerza muscular, la masa muscular y la función física asociada a la movilidad. A continuación, se describen las evaluaciones tanto clínicas como de laboratorio, que pueden ser efectuadas para cada criterio de sarcopenia.

Fuerza muscular: definida como la fuerza generada mediante la contracción muscular frente a una carga externa (23). Clínicamente se puede evaluar mediante: prueba de

sentarse y pararse la silla (18, 24, 25); 1 repetición máxima (1RM) (21, 26, 27)) y fuerza prensil. Este último método es el método recomendado por EWGSOP2 y evalúa la fuerza de prensión de la mano con un dinamómetro, cuyos resultados tienen una correlación moderada con la fuerza de brazos y piernas, por lo que es posible su uso de forma confiable como determinante de la fuerza general de un sujeto. Además, es un fuerte predictor hospitalizaciones prolongadas, baja calidad de vida relacionada a la salud, limitaciones funcionales y riesgo de muerte (18, 28-33). En modelos animales esta prueba se reproduce mediante la prueba de fuerza prensil de las patas delanteras y traseras de los animales, donde se realizan tracciones al dinamómetro que permiten calcular su fuerza máxima (34-36).

Masa muscular: se define como la parte de la masa corporal total compuesta por tejido musculoesquelético (37). La masa muscular se puede evaluar directamente con mediciones *ex vivo* e indirectamente con métodos imagenológicos y clínicos, tanto en humanos como en animales. Los métodos más utilizados son: Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) (18, 19, 38); Tomografía computarizada (CT)), Resonancia Magnética (MRI)); (18, 39, 40); Ultrasonido (US) (18, 19, 38) y Bioimpedanciometría (Bioelectrical impedance analysis (BIA)) (41-44). De estos métodos, MRI es utilizado también en animales, pero debido a su elevado costo no es de fácil acceso. BIA también es un método ampliamente utilizado en animales dado su bajo costo en comparación con otros métodos, pero sus resultados deben ser interpretados con precaución. Al respecto, BIA puede ser poco preciso cuando existe edema como en el caso de la EHC.

Función física: es definida como la función de todo el cuerpo relacionada a la movilidad y locomoción, que permite la realización de actividades funcionales en la vida diaria, de tipo físico y de forma independiente (18, 21, 41). Normalmente, se evalúa con pruebas que involucran desplazamiento, como: velocidad de marcha (18, 21, 24, 25, 32, 45) que en animales se puede replicar evaluando la velocidad que el animal alcanza en una prueba de carrera en *treadmill*; Timed-Up and Go test que es una prueba para evaluar balance dinámico y la marcha (18, 21, 41, 46) y en animales se puede replicar por ejemplo, con una prueba en Rotarod; y sentarse y pararse la silla

en 30 segundos que es una prueba para evaluar potencia y resistencia, no replicable en animales (21, 47).

Tipos de sarcopenia

La sarcopenia puede ser primaria, asociada al envejecimiento, o secundaria asociada a movilidad limitada, desnutrición o enfermedades crónicas, principalmente aquellas que se acompañan de procesos inflamatorios crónicos (18, 48). Respecto a la sarcopenia secundaria, una revisión sistemática y metaanálisis de Pacifico et al en 2020, mostró una prevalencia de sarcopenia de entre un 26 y 31% en pacientes que padecían algunas de las patologías crónicas más comunes, como enfermedades cardiovasculares, demencia, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes mellitus (49). Algunas posibles causas de esta interacción entre sarcopenia y patologías crónicas, podrían ser procesos inflamatorios crónicos en ambas condiciones, así como también aumento del estrés oxidativo, malnutrición, inactividad física y sedentarismo (49).

Entre las patologías crónicas relacionadas directamente con la sarcopenia, se destaca la EHC. La sarcopenia se ha asociado en forma directamente proporcional al estado de avance de la EHC y la severidad de ésta, además de ser un factor de riesgo para su inicio y una herramienta que permite predecir el pronóstico de la patología en el corto plazo (90 días) (16, 50-53).

1.2.2. Sarcopenia secundaria a EHC

La prevalencia de sarcopenia en EHC es alta y se ha demostrado que existe pérdida de masa muscular desde etapas tempranas de la patología, condición que empeora proporcionalmente a la gravedad de ésta (54, 55). En etapas finales de la EHC, la prevalencia de sarcopenia varía entre 40 y 70%, lo que se asocia a descompensaciones de la patología hepática y mayor morbimortalidad (5, 14, 54-59). De hecho, al comparar la sobrevida de pacientes con EHC a 1, 3 y 5 años, aquellos con sarcopenia tienen una sobrevida de 76,6%, 64,3% y 45,3% respectivamente, a diferencia de quienes no tienen sarcopenia, donde la sobrevida es considerablemente mayor (93,4%, 82% y 74,2% respectivamente) (5).

La sarcopenia es un elemento clave en las EHC, ya que se considera un determinante de la fragilidad que conduce a pérdida de autonomía y funcionalidad en las actividades de la vida diaria (AVD), hospitalización e institucionalización de quien la padece (60). También se asocia con un aumento del riesgo de caídas, de fracturas, menor la calidad de vida relacionada a la salud, descompensación aguda de la patología hepática, insuficiencia hepática aguda sobre crónica y mayor riesgo de muerte en pacientes con cirrosis (5, 18, 61-66). En esta enfermedad, la sarcopenia, además, es un predictor independiente de mortalidad post trasplante hepático, con 2,4 veces más riesgo de morir, respecto a quienes no la presentan (15, 67-74). Además, tener sarcopenia aumenta el riesgo de muerte mientras la persona se encuentra en lista de espera para el trasplante de hígado (58, 69, 75, 76).

Mecanismos fisiopatológicos y moleculares de la sarcopenia en EHC

Existen diversos mecanismos fisiopatológicos y moleculares asociados al desarrollo de sarcopenia y aunque la mayoría ha sido estudiado en sarcopenia primaria, en sarcopenia secundaria asociada a EHC se han identificado algunos que afectan directa o indirectamente el balance entre la síntesis y degradación de proteínas musculares, produciendo efectos negativos en la masa muscular y la fuerza, así como también otros mecanismos relacionados al músculo esquelético que pueden afectar la función física. A continuación, se describen los principales mecanismos asociados a sarcopenia relacionada a EHC (Figura 1):

A. Desbalance en las vías de control de la masa muscular

El músculo esquelético es el mayor reservorio de proteínas del cuerpo humano, las cuales son de tipo contráctil o estructural (63, 77). En condiciones normales, las características morfo-funcionales del músculo esquelético son aseguradas por un balance entre los procesos de síntesis y degradación de proteínas (78). En sarcopenia primaria y secundaria existe un desbalance en las vías de control de la masa muscular, que favorece la degradación de proteínas musculares y reduce la síntesis (57, 78). Esto afecta directamente al músculo esquelético, disminuyendo el diámetro de las

fibras musculares y con ello el área de sección transversal (CSA) del músculo, influyendo negativamente en la masa y la fuerza muscular (57).

En cuanto a la vía de síntesis de proteínas musculares, en condiciones normales la síntesis proteica es inducida por diversos estímulos (por ejemplo, los estímulos mecánicos del ejercicio físico e *Insulin-like growth factor I* (IGF-1)), que activan fosfatidilinositol- 3-kinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (PKB, también llamada Akt), para posteriormente activar *mamalian target of rampamicyn* (mTOR) (79-82). mTOR2 prolonga la actividad de Akt y mTOR1 fosforila directamente a *protein S6 kinase 1* (p70S6K) y *4E-binding protein* (4E-BP1), favoreciendo la síntesis de proteínas (57, 78, 83-85). Es importante destacar que PI3K/Akt puede a su vez, inhibir los factores de transcripción *Forkhead box O* (FoxO) y con ello inhibir la transcripción de E3 ubiquitin ligasas en el músculo esquelético, inhibiendo la degradación proteica y de esta forma, regulando positivamente la masa muscular (86). El hígado es el principal tejido que secreta IGF-1, por lo que en EHC la disminución en la producción y secreción de IGF-1 se debe principalmente a la falla de la función hepática asociada a la patología. Por otra parte, la reducción de niveles de IGF-1 también contribuyen al desarrollo de inflamación y un estado oxidativo que se asocia a pérdida de la masa muscular (87-91).

En relación con la vía de degradación de proteínas musculares, en condiciones normales está regulada por 3 sistemas: Sistema Ubiquitina Proteosoma (UPS) caspasas y autofagia, activados principalmente por el aumento de citoquinas proinflamatorias, glucocorticoides, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. **UPS**, poliubiquitiniza proteínas blanco, que posteriormente serán degradadas mediante proteosoma (92-94). Las principales E3 ubiquitin ligasas asociadas a atrofia muscular son Atrogin-1 (también llamada *Muscle Atrophy F-box* (MAFbx)) y *Muscle RING Finger 1* ((MuRF-1) (también llamada TRIM63), que inducen proteólisis lo que se traduce en reducción del tamaño y número de fibras musculares (57, 78, 83). En EHC el sistema UPS puede ser activado por ácidos biliares, hiperamonemia, inflamación e incluso inactividad física asociada a estados avanzados de la patología (79, 95). Las **caspasas** en condiciones de pérdida de masa muscular tienen la función de acelerar

la proteólisis, favorecer la pérdida de proteínas musculares mediante vías de apoptosis asociadas a mitocondrias (por activación de la caspasa 3) y entregar sustratos proteicos a UPS (96-99). Al respecto, en animales con EHC de origen colestásico, se ha observado aumento de la apoptosis mionuclear (apoptosis específica del músculo esquelético), junto a un aumento de la expresión y actividad de las caspasas y del número de núcleos apoptóticos, favoreciendo la pérdida de la masa muscular (100). La **autofagia** en el músculo esquelético es la encargada de renovar las organelos dañados o agregados de proteínas, mediante la formación de autofagosomas que posteriormente se unen a los lisosomas para degradarlos. En EHC, la autofagia es uno de los principales mecanismos de pérdida de masa muscular y algunos de sus activadores son ácidos biliares, miostatina e hiperamonemia, que aumentan su nivel en la patología, alterando el balance de la masa muscular como se detallará más adelante (62, 101, 102).

B. Disfunción mitocondrial

Se caracteriza por cambios en la morfología de las mitocondrias, modificaciones en los componentes de OXPHOS, menor biomasa mitocondrial, potencial de membrana alterado y aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el músculo esquelético (103). En modelos murinos, fibras aisladas y modelos celulares de EHC colestásica, se ha observado que el aumento de ácidos biliares en plasma puede afectar la función y estructura mitocondrial en el músculo esquelético, produciendo un aumento del estrés oxidativo (con aumento de ROS). También los ácidos biliares pueden inducir disminución de la masa mitocondrial, de la tasa de consumo de oxígeno celular y de los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones, lo que, sumado a un aumento de la proteólisis, disminución del diámetro de la fibras musculares y transición en el tipo de fibras, favorece el desarrollo de sarcopenia (95, 104, 105).

Mediadores hígado-músculo que favorecen el desarrollo de sarcopenia en EHC

En la EHC se ve severamente afectado el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos debido a la falla hepática, lo cual tiene como consecuencia una desregulación del suministro de proteínas, además de la existencia de hiperamonemia, lo que inevitablemente va a desregular la homeostasis del músculo esquelético (57, 62, 106). En la actualidad, se conocen algunos factores que alteran el eje hígado-músculo y que pueden favorecer el desarrollo de sarcopenia en EHC. Entre ellos se encuentran: (Figura 1)

A. Aumento de ácidos biliares plasmáticos

La EHC colestásica tiene la característica de presentar un nivel elevado de ácidos biliares (AB) en sangre, causado primordialmente por la oclusión de los conductos biliares, lo que bloquea el paso de la bilis hacia el intestino delgado. Este bloqueo, aumenta el nivel de AB en los hepatocitos, desde donde forzosamente refluyen (son liberados) a la circulación sistémica directamente o bien por vía linfática en concentraciones elevadas, afectando diversos tejidos, entre ellos el músculo esquelético (107-112). A la fecha, el único receptor descrito para ácidos biliares en el músculo esquelético es *Takeda G protein-coupled receptor 5* (TGR5). En trabajos recientemente publicados por nuestro laboratorio en modelo murino y modelos celulares, se determinó que los ácidos biliares cólico (CA) y desoxicólico (DCA) en el músculo esquelético alteran la función mitocondrial disminuyendo la masa mitocondrial, alterando el ADN mitocondrial, reduciendo la tasa de consumo de oxígeno en la cadena transportadora de electrones y aumentando la generación de ROS y que este efecto ocurre mediado por TGR5 (105). También se observó una disminución del diámetro de las fibras musculares, en el nivel MHC y un aumento en los niveles de MuRF-1 y Atrogin-1, induciendo atrofia muscular (104).

B. Aumento de la inflamación y estrés oxidativo

En pacientes con EHC se ha visto un estado de elevado estrés oxidativo e inflamación crónica (101). NAFLD, insulino resistencia y muchas veces la obesidad asociada a estos estados patológicos, producen un estado inflamatorio crónico de bajo

grado que estimula la actividad de macrófagos y linfocitos, produciendo aumento de citoquinas proinflamatorias en la sangre como interleukina 6 (IL-6), *interferon-gamma* (INF-γ) y *tumor necrosis factor α* (TNF-α), así como también un aumento del péptido vasoactivo Angiotensina II (Ang-II) parte del sistema renina-angiotensina (113-115). TNF-α y Ang-II inducen atrofia muscular mediante la activación de UPS favoreciendo la proteólisis. TNF-α estimula la vía de señalización de *nuclear factor κβ* (NF-κβ) que lleva a la activación de UPS y Ang-II, estimula la ruta de señalización dependiente de AT1, que también activa UPS (114, 116-119).

En cuanto al estrés oxidativo, existe un aumento de ROS asociado a la EHC que afecta la masa muscular, ya sea por aumento de radicales libres o por daño en los sistemas antioxidantes (101). Al respecto, Ang-II aumenta la producción de ROS, así como también lo hacen citoquinas proinflamatorias como TNF-α e IL6 favoreciendo la proteólisis del músculo esquelético (120-123). Además, en modelos animales de sarcopenia por EHC se ha observado aumento de proteínas carboniladas y 4HNE, así como de la apoptosis mionuclear, favoreciendo la atrofia muscular (101, 103, 124).

C. Hiperamonemia

Se sabe que, en cirrosis hepática, debido a la disfunción de los hepatocitos y el *shunt* portosistémico, la eliminación del amoníaco mediante la ureagénesis realizada por los hepatocitos, no ocurre o no es completamente funcional, por lo que se acumula amoníaco induciendo citotoxicidad (101, 125, 126). En el músculo esquelético, la hiperamonemia induce disminución de la síntesis de proteínas y aumento de la proteólisis mediante autofagia debido a que sobre regula la transcripción de miostatina (77, 127-130).

D. Disminución de hormonas anabólicas

La testosterona es una hormona relevante en cirrosis hepática, ya que sus bajos niveles son un predictor independiente de mortalidad, además de asociarse a mayor necesidad de trasplante y riesgo de infección (131-133)**.** Esta hormona es un mediador de la regulación de la masa muscular, estimulando la síntesis de proteínas en condiciones normales, pero en cirrosis hepática, sus niveles se encuentran

disminuidos, lo que favorece una menor masa muscular (133, 134), probablemente debido al aumento de miostatina (62, 77, 135). La hormona del crecimiento por su parte es un inhibidor de la expresión y señalización de miostatina y puede estimular IGF-1, favoreciendo la síntesis proteica en condiciones normales. En cirrosis hepática, la secreción de hormona del crecimiento se ve disminuida, lo que podría influir en la disminución de la masa muscular debido a una menor síntesis de proteínas musculares, y probablemente también al aumento de miostatina (62, 135, 136)

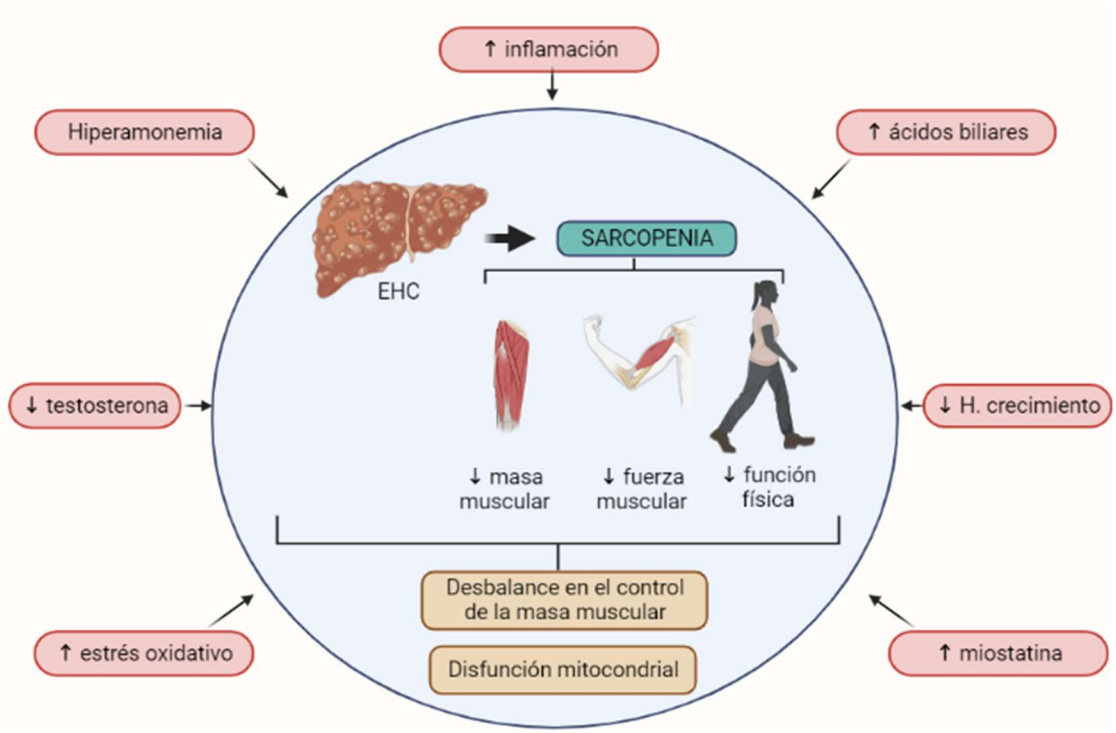


Figura 1. Sarcopenia en EHC

Principales mecanismos moleculares por los que se desarrolla sarcopenia secundaria a enfermedad hepática crónica (EHC), junto a las alteraciones de la comunicación hígado-músculo que los favorecen.

E. Aumento de miostatina

Su función en condiciones normales es regular la homeostasis del músculo esquelético. miostatina es producida y secretada por el músculo esquelético y actúa localmente de forma autocrina o paracrina, activando UPS e induciendo la proteólisis

del músculo esquelético, así como también bloqueando la síntesis de proteínas musculares mediante la regulación a la baja de la señalización de mTORC1. Procesos de inflamación aguda o crónica, aumento del estrés oxidativo, elevados niveles de Ang-II y de glucocorticoides, entre otros estímulos, pueden aumentar la síntesis de miostatina favoreciendo la atrofia muscular (98, 129, 137, 138). En EHC, el aumento de amoníaco estimula a miostatina lo que estimula la autofagia e inhibe la ruta de IGF-1/PI3K/Akt/mTORC1, disminuyendo la masa muscular (79, 81, 139-141)

1.2.3. Estrategias para el tratamiento y prevención de la sarcopenia en EHC

Se han descrito diversas estrategias para prevenir y tratar la sarcopenia por EHC, entre ellas intervenciones nutricionales, con fármacos y entrenamiento físico (62, 67, 98, 142-144). Es importante destacar que una mejoría en los resultados no sólo debe considerar mejorar la masa muscular, sino también el aumento de la fuerza muscular y de la función física asociada a la movilidad y locomoción, que finalmente se traducirán en mejoras en las actividades de la vida diaria. A continuación de describen las intervenciones recomendadas para tratar la sarcopenia en EHC:

A. Intervenciones nutricionales

Considerando que en cirrosis hepática la ingesta calórica y proteica está disminuida, una primera recomendación nutricional es entregar alimentación con cantidades adecuadas de calorías y proteínas, ya sea mediante alimentación frecuente, suplementos dietéticos orales o nutrición enteral o parenteral (62, 143, 145-147). La suplementación con proteínas para mantener una disponibilidad adecuada de aminoácidos esenciales es utilizada en cirrosis hepática y estados de hiperamonemia, pero acelera el catabolismo de los aminoácidos, produciendo más amoníaco en el músculo esquelético, lo que podría disminuir la síntesis de proteínas y aumentar la autofagia (62). Al respecto, las proteínas de origen animal no son recomendadas ya que son ricas en aminoácidos aromáticos, los que no pueden ser metabolizados en el músculo esquelético. Las proteínas de origen vegetal pueden tener un efecto beneficioso ya que contienen Aminoácidos de cadena ramificada (*Branched-Chain Amino Acids* (BCAA)), y el organismo puede eliminar amoníaco gracias a BCAA, por

lo que su uso podría ser positivo en el control de la hiperamonemia. A pesar de lo anterior, no existe evidencia clara sobre los efectos beneficiosos de la intervención nutricional en sarcopenia por EHC (148-152).

B. Hormonas anabólicas

La testosterona y la hormona del crecimiento se han utilizado en cirrosis hepática para intentar mejorar el estado nutricional y con ello la masa muscular, pero los resultados no han sido favorables. El problema principal es que la aromatasa aumenta su actividad en cirrosis hepática, favoreciendo la conversión de testosterona en estradiol, reduciendo su efecto. Oxandrolona, un andrógeno resistente a la aromatasa, no ha tenido los efectos terapéuticos esperados, lo que podría deberse a alteraciones en la señalización, por ejemplo, de mTORC1 que caracterizan la patología y afectan negativamente el control de la masa muscular (62, 153, 154).

C. Fármacos

Algunos blancos de la terapia farmacológica para mejorar la síntesis de proteínas y disminuir la proteólisis en EHC son, por ejemplo, miostatina, la terapia hormonal y el uso de L-Carnitina (aminoácido fundamental en la oxidación de ácidos grasos). Todas estas opciones podrían tener resultados positivos en reducir la proteólisis y favorecer la síntesis proteica, pero los resultados son incipientes aún (20, 155, 156).

D. Entrenamiento físico

Tanto guías clínicas, asociaciones internacionales, revisiones sistemáticas y metaanálisis, recomiendan la realización de entrenamiento físico, como una terapia para el tratamiento y la prevención de la EHC (157-162). De hecho, el entrenamiento físico se considera la forma más eficaz de tratar la sarcopenia primaria y secundaria debido a sus múltiples beneficios locales y sistémicos como aumento del flujo sanguíneo, del consumo de oxígeno, disminución del estrés oxidativo, así como su efecto antinflamatorio (92, 98).

A la fecha, las mayores dificultades de las intervenciones con entrenamiento físico para tratar la EHC y la sarcopenia en EHC que deben ser consideradas son:

a) los ensayos clínicos aleatorizados (ECA) y preclínicos son pocos y con tamaños muestrales pequeños, lo que limita la posibilidad de asegurar una prescripción del ejercicio efectiva respecto a: frecuencia, intensidad, tipo (resistencia, fuerza o entrenamiento combinado), tiempo de duración, y progresión.
b) las evaluaciones utilizadas para medir los criterios de sarcopenia son variadas y heterogéneas, por lo que tampoco es posible concluir al respecto. Se evalúa generalmente la función física y la masa muscular, pero solo existe un ECA que evalúa la fuerza muscular en humanos (163) y un estudio en animales (164).
c) mayoritariamente se aplica entrenamiento de resistencia y entrenamiento combinado, existiendo solo un ECA que aplica entrenamiento de fuerza en pacientes con cirrosis (163) y un estudio pre-clínico que lo aplica en animales (164), lo que limita poder identificar el tipo de entrenamiento adecuado (17, 165-167).

Debido a lo anterior, es fundamental continuar investigando al respecto, con el fin de lograr definir las características específicas más efectivas para el adecuado entrenamiento físico, enfocado a tratar la sarcopenia secundaria a EHC.

Tipos de entrenamiento físico recomendado en EHC

Dentro de los tipos de entrenamiento físico principalmente recomendados para tratar las EHC se encuentran el entrenamiento de fuerza, el entrenamiento de resistencia y el entrenamiento combinado, los cuales se describen a continuación.

Entrenamiento de fuerza (EF)

Es un tipo de entrenamiento donde se utilizan métodos de resistencia (peso corporal o cargas externas como pesos libres o máquinas) para aumentar la capacidad de ejercer o resistir la fuerza. Ejemplos de EF son levantar pesas o hacer sentadillas (168-170). La Intensidad en el EF se gradúa según el porcentaje de 1 repetición máxima (1RM), siendo 1RM la máxima resistencia (cantidad de peso o carga) que una persona puede mover en una sola oportunidad o repetición, con un rango completo de movimiento, buena postura y de forma controlada. La intensidad del EF en humanos puede ser: baja (< 30% de 1RM), ligera (30-49% de 1RM), moderada (50-69%de 1RM), vigorosa (70-84% de 1RM) o máxima (> 85% de 1RM) (169, 171). En animales la

intensidad se determina con un porcentaje del peso corporal del animal, siguiendo los mismos rangos antes mencionados para humanos (172, 173) y dependiendo de ello, puede tener efectos diferentes en el músculo esquelético (34, 172-174). Al respecto, intensidad baja a moderada, permite realizar más de 12 repeticiones desarrollando principalmente fuerza resistencia (soporte de una carga en el tiempo); intensidad moderada a vigorosa, permite realizar entre 6 a 12 repeticiones para lograr hipertrofia muscular e intensidad máxima, permite realizar 4 a 6 repeticiones para desarrollar fuerza máxima (175)

Según el Colegio Americano de Medicina del Deporte (2009), el EF una de las intervenciones más potentes para aumentar el tamaño del músculo esquelético en sujetos sanos, así como en sarcopenia por envejecimiento, debido a que estimula la síntesis de proteínas miofibrilares (por ej. MHC y Troponina) para producir hipertrofia muscular y aumento del área de sección transversal (CSA) del músculo, aumentando así la fuerza y la masa muscular con menor consumo energético comparado con el entrenamiento de resistencia (83, 157, 176-178). Al respecto, intensidades bajas y ligeras (<40% de 1RM), no producen cambios detectables en la síntesis proteica, en tanto intensidades moderadas, vigorosas y máximas (> 60% de 1RM), la aumentan 2 a 3 veces (177) . El EF favorece la síntesis de proteínas debido a que aumenta la expresión y actividad de IGF-1 por un mecanismo dependiente de una mayor expresión de PGC-1α4 y disminución de miostatina (176, 179). Dos efectores rio abajo en la ruta IGF-1/Akt/mTOR, las proteínas p70S6K y 4E-BP1, son claves en la hipertrofia del músculo esquelético (83). En cuanto a la vía de degradación proteica, el EF, mediante el aumento de la actividad del eje IGF-1/PI3K/Akt, bloquea a FOXO y con ello, la degradación de proteínas musculares (78).

El EF también tiene un efecto sobre el tipo de fibras musculares en sujetos sanos, ya que favorece la transición desde fibras intermedias (IIX) a fibras tipo IIB, que generan mayor fuerza muscular (180).

En EHC, el EF es uno de los tipos de entrenamiento físico que podría tener un efecto benéfico sobre la sarcopenia asociada (159, 161). Al respecto, el EF ha

mostrado que favorece la recuperación de las actividades de la vida diaria en pacientes con EHC, sobre todo si presentan una capacidad cardiorrespiratoria reducida o baja tolerancia al esfuerzo (como ocurre en etapas avanzadas de la patología) (157, 159). Respecto a los criterios o parámetros de sarcopenia, un estudio de Aammann et al. (2020) en pacientes con cirrosis hepática, mostró que el EF tuvo efectos positivos en la fuerza y la masa muscular, pero no sobre la función física (163). En otro estudio de Aamman et al. (2018) en un modelo animal donde ligó los ductos biliares para inducir EHC, encontró aumento de la fuerza muscular luego de 18 semanas de EF (164).

Respecto a su efecto sobre parámetros funcionales hepáticos, aún no se ha encontrado un efecto positivo del EF sobre enzimas hepáticas, concentración de ácidos biliares o bilirrubina, pero esto podría deberse a la escasa cantidad de estudios que han aplicado EF y evaluado estos parámetros (164). A pesar de los efectos beneficiosos propuestos del EF sobre la sarcopenia primaria y que posiblemente podrían observarse en sarcopenia secundaria a EHC, es importante considerar que: a) en EHC, la presión portal se encuentra aumentada debido a disfunción endotelial, disfunción de la microcirculación, desregulación venosa y fibrosis hepática, que llevan a aumentar la resistencia vascular intrahepática e inducen hipertensión portal (181). El entrenamiento de fuerza en sujetos sanos puede aumentar la presión arterial, debido principalmente a compresión mecánica producida por los músculos esqueléticos involucrados en el ejercicio que, junto a la maniobra de Valsalva (aguantar el aire, sin dejar que se escape por nariz o boca), causarían una tensión vascular elevada (182). Lo anterior, podría generar un riesgo en sujetos con EHC, debido a las alteraciones hemodinámicas que caracterizan la patología y que llevan por ejemplo a ascitis que a su vez puede producir várices esofágicos y gástricos que podrían romperse y generar una hemorragia al realizar EF sin una prescripción adecuada (183); y b) las investigaciones que aplican EF a la fecha son solo las dos mencionadas de Aamman (2018 y 2020) en humanos y animales, lo que dificulta enormemente poder concluir sobre su real efecto en sarcopenia por EHC (17, 57, 161, 184, 185).

Entrenamiento de resistencia (ER)

Corresponde a contracciones de grandes grupos musculares repetidas en el tiempo, de intensidad submáxima, cuyo objetivo es tolerar el ejercicio en el tiempo, mejorando la tolerancia al esfuerzo en la realización de actividades de la vida diaria. Ejemplos de ER son andar en bicicleta, correr o nadar (83, 170, 186-188). El ER se realiza a menor intensidad que el EF, pero por tiempos mayores, pudiendo desarrollarse entre 30 minutos a varias horas (en deportistas). La intensidad en este tipo de entrenamiento está determinada por el porcentaje del consumo máximo de oxígeno (VO2max) que el sujeto alcance en una prueba de esfuerzo hasta el agotamiento en treadmill o cicloergómetro (169, 170). De no contar con el equipamiento para determinar VO2max, también puede ser utilizado un porcentaje de la velocidad máxima alcanzada en una prueba de carrera hasta el agotamiento en treadmill tanto en humanos como animales.

Este tipo de entrenamiento tiene como efecto principal aumentar la capacidad de resistencia al esfuerzo (con aumento del VO2máx), la mitogénesis y la angiogénesis en sujetos sanos (189-191). Estos efectos del ER podrían deberse a que induce aumento de hasta en 40% en la expresión de proteínas mitocondriales y de la capacidad respiratoria de las mitocondrias en el músculo esquelético (189, 192). También aumenta la expresión de PGC-1α (regulador maestro de la biogénesis mitocondrial) (193) y la actividad de OXPHOS y succinato deshidrogenasa (SDH), mejorando la capacidad oxidativa mitocondrial y con ello la tolerancia al esfuerzo (194-198). Lo anterior, induce a su vez la activación de fibras musculares lentas (fibras tipo I y IIA), favoreciendo la transición hacia este tipo de fibras a partir de fibras intermedias (IIX) (193, 199-201). Las fibras lentas de tipo I, tienen un CSA menor a las fibras tipo II y están asociadas a mayor eficiencia mecánica en el tiempo y alta resistencia al esfuerzo físico (202). Es importante destacar que CSA es inversamente proporcional a la capacidad oxidativa de las fibras musculares, lo que explicaría la predominancia de fibras tipo I con ER (194, 196, 203).

El ER también induce síntesis de proteínas tanto miofibrilares (sobre todo en intensidades altas), como mitocondriales, siendo estas últimas las que mayoritariamente aumentan (177, 204-206). En cuanto a la degradación de proteínas musculares, se ha encontrado aumentada durante y posterior a la realización de ER. Al respecto, se ha observado sobre activación de genes de autofagia, así como aumento de la actividad enzimática de calpaínas y de los niveles de MuRF1 y Atrogin-1, dando como resultado fibras musculares más pequeñas, pero que facilitan la difusión de oxígeno a las mitocondrias. Esta proteólisis podría también tener como función el uso de aminoácidos libres como sustrato energético (177, 207-210).

En **EHC**, la tolerancia al esfuerzo es baja debido principalmente a un fenómeno conocido como resistencia anabólica y puede ser una limitante importante para realizar ER. La resistencia anabólica corresponde a una respuesta anormal del músculo esquelético a factores anabólicos, que se traduce en menor VO2máx, menor capacidad ventilatoria y disponibilidad de O2 al músculo esquelético, afectando negativamente la masa muscular, la fuerza y la función física y obligando a una adecuada prescripción del ER en rangos seguros (183, 211, 212). A pesar, de lo anterior, este tipo de entrenamiento ha mostrado efectos beneficiosos en la función física de pacientes con EHC, que se han manifestado por el aumento del VO2max (184, 213-215), reflejando una mejoría en la capacidad del sistema cardiorrespiratorio para suministrar O2 a los músculos esqueléticos para generar energía durante el ejercicio, e indicando posibles adaptaciones que favorecen la biogénesis mitocondrial y la densidad capilar (83, 216).

Respecto a variables hepáticas, la aplicación de ER es capaz de mejorar el metabolismo hepático, disminuyendo la grasa hepática y los ácidos grasos libres (217, 218). En cuanto a la fuerza muscular, no se ha encontrado información suficiente a la fecha para concluir si existe aumento de ésta con ER, ya que suele no ser evaluada en investigaciones sobre EHC. Con respecto a la masa muscular, se han observado resultados contradictorios, con publicaciones en pacientes con cirrosis hepática que no han mostrado un efecto positivo, mientras que otros trabajos si lo han descrito (163, 167, 219). Es importante considerar que al igual que el EF, la información disponible a

la fecha no permite aún determinar las características del ER que puede generar mayores beneficios en los criterios de sarcopenia por EHC. Además, debido a la importante limitación en la tolerancia al esfuerzo causada principalmente por la resistencia anabólica en EHC, su realización podría necesitar mayores resguardos y precauciones en su planificación y ejecución (183).

Entrenamiento combinado (EC)

Corresponde a una combinación de ejercicios de fuerza y de resistencia realizados repetidamente como parte de un programa de entrenamiento físico (220). En este tipo de entrenamiento, los efectos obtenidos del componente de resistencia pueden mejorar, pero podría no ocurrir lo mismo con los efectos del componente de fuerza (como el aumento de la masa muscular y la fuerza) por un fenómeno denominado "efecto de interferencia o efecto del entrenamiento concurrente o combinado" (183). Este efecto ocurriría debido a que el ER activa a AMPK la que a su vez puede inhibir la vía mTOR (que es activada por EF), lo que reduciría la señalización de la ruta de síntesis de proteínas musculares, afectando negativamente la masa y la fuerza muscular (221, 222). Sin embargo, este efecto de interferencia puede ser subsanado con tiempos adecuados de descanso entre la realización de EF y ER como parte del EC (6 a 24 horas entre la realización de ambos entrenamientos) (177, 223). Por otra parte, es importante considerar que al realizar un programa de entrenamiento físico de varias semanas (no una sesión aguda), el efecto hipertrófico del EC se mantiene a pesar de sumar ER a EF (177, 216, 223-225).

Este tipo de entrenamiento presenta los beneficios del EF y ER, y dependiendo de la forma de distribuir el EF y ER, será los beneficios que tendrá. Al respecto, un parámetro relevante a la hora de programar EC es la proporción de cada entrenamiento dentro de la planificación. Normalmente se utiliza una proporción de 1:2 o 1:3, donde la mayor proporción se le da al objetivo del entrenamiento, es decir, si se quiere aumentar la resistencia, la mayor proporción debe ser de ER y si el objetivo es aumentar la fuerza y/o la masa muscular, la mayor proporción debe ser de EF (183). Existe limitada información sobre el efecto del EC sobre parámetros musculares y

cardiovasculares, por lo que es fundamental aplicar este tipo de entrenamiento para determinar sus efectos sobre los criterios de sarcopenia.

En EHC, específicamente cirrosis hepática, se ha observado que el EC mejora la calidad de vida de los pacientes, aumenta la capacidad ventilatoria, disminuye la presión portal y la frecuencia cardíaca, así como también disminuye la masa grasa, aumenta la masa muscular y parece ser mejor tolerado, debido a que produce aumento del VO2máx (185, 226, 227). La fuerza muscular no es habitualmente evaluada, por lo que existe escasa información respecto el efecto del EC sobre este criterio de sarcopenia (184, 228, 229). Al respecto, solo dos investigaciones a la fecha han aplicado EC y evaluado la fuerza muscular en pacientes con cirrosis hepática en espera de trasplante de hígado: Debette-Gratien et al, aplicó EC por 12 semanas mostrando mejorías en la fuerza muscular y la función física (230) y Williams et al aplicó EC basado en ejercicio en casa por 12 semanas, pero no evaluó la fuerza muscular directamente, sino mediante la mejoría de la funcionalidad general al realizar actividades de la vida diaria (231). Respecto a su efecto sobre variables hepáticas, no existe a la fecha información suficiente para concluir al respecto (227).

Considerando la información mencionada, lamentablemente a la fecha no es posible identificar qué tipo de entrenamiento físico puede tener mejores efectos sobre la sarcopenia secundaria a EHC. Si bien, se conocen efectos beneficiosos del ER sobre la función física y posiblemente sobre la masa muscular, se debe considerar como limitación en su aplicación la baja capacidad de tolerar el esfuerzo físico en EHC, debido al estado de resistencia anabólica que caracteriza la patología. El EF por su parte, ha sido aplicado solo en dos investigaciones, por lo que es difícil confirmar si los efectos positivos sobre la masa y la fuerza muscular identificados en sujetos sanos y en sarcopenia por envejecimiento, se replican en EHC. La principal limitación de su uso es que puede aumentar la presión portal en EHC, aumentando el riesgo de hemorragias abdominales. El EC en tanto, ha mostrado tener buenos resultados clínicos en EHC, mejorando la calidad de vida, la resistencia al esfuerzo y siendo mejor tolerado que el EF y ER por sí solos al alternar los días de trabajo de fuerza y resistencia. Además, existe información (aunque bastante limitada), que podría

aumentar la fuerza muscular, pero no la presión portal como el EF y podría ayudar a tolerar mejor el esfuerzo físico que el ER, ya que se trabaja alternando resistencia con fuerza (183). Considerando lo anterior, el EC puede ser una excelente opción para tratar la sarcopenia en EHC.

Resumen de antecedentes

1. La sarcopenia debido a EHC, afecta la calidad de vida y es un determinante de la fragilidad que conduce a pérdida de autonomía y funcionalidad en las actividades de la vida diaria (60). Además, la sarcopenia por EHC es considerada un predictor independiente de mortalidad pre y post trasplante hepático (15, 67, 68).
2. La sarcopenia se caracteriza por la presencia de tres criterios: disminución de la fuerza muscular, la masa muscular y la función física relacionada a la movilidad que afectan la realización de las actividades diarias.
3. Para el tratamiento de la sarcopenia por EHC, el entrenamiento físico podría ser una herramienta no farmacológica recomendada por sus amplios beneficios, pero a pesar de ello, a la fecha no existe claridad sobre el tipo (EF, ER o EC) y las características del entrenamiento más efectivo (17, 167, 219).
4. El entrenamiento combinado podría ser el tipo de entrenamiento físico que produzca mejores efectos sobre los criterios de sarcopenia en EHC, dado que no presenta las limitaciones descrita para el EF (como el aumento de la presión portal) y el ER (baja tolerancia al esfuerzo que limita su realización) y ha mostrado ser mejor tolerado en sujetos con EHC.

2. Planteamiento de la hipótesis

Dada la importancia de la sarcopenia como complicación de la EHC, y principalmente, como predictor de éxito o fracaso de un trasplante hepático, es necesario contar con terapias que puedan prevenir dicha condición o que permitan, tratarla de forma efectiva. Es por ello que la hipótesis de esta investigación es:

"La fuerza muscular, la masa muscular y la función física son mejoradas en mayor grado por el entrenamiento combinado, respecto al entrenamiento de fuerza o de resistencia, en un modelo preclínico (murino) de sarcopenia secundaria a EHC".

3. Objetivos General y Específicos

3.1 Objetivo general

Comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado sobre la sarcopenia inducida por EHC en un modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

Determinar y comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado, sobre:

1. La **fuerza muscular** del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC.

2. La **masa muscular** del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC.

3. La **función física** del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC.

4. Materiales y métodos

4.1 Diseño y estrategia experimental

En la Figura 2, se muestra un esquema general del diseño experimental de la investigación. Dos grandes grupos de animales, **sin EHC** (llamado **grupo control (CTRL) o sano**, alimentado con dieta estándar de laboratorio) y **con EHC** (grupo alimentado con dieta suplementada con hepatotoxina 5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)), se subdividieron en: sedentarios (SED) (sin entrenamiento físico), entrenamiento de fuerza (EF), entrenamiento de resistencia (ER) y entrenamiento combinado (EC).

Las intervenciones experimentales con dieta y entrenamiento físico fueron realizadas simultáneamente y tuvieron una duración de 6 semanas.

El EF se realizó en un plano inclinado y con una intensidad determinada en base a un porcentaje del peso corporal del animal.

El ER se realizó en un *treadmill* y la intensidad fue determinada en base a un porcentaje de la velocidad máxima de carrera que el animal logró en una prueba de capacidad máxima de carrera hasta el agotamiento.

El EC (EF+ER) se realizó tanto en un plano inclinado como en *treadmill*. La intensidad fue determinada, en el caso del componente de fuerza, por un porcentaje del peso corporal del animal y en el caso del componente de resistencia, por un porcentaje de la velocidad máxima de carrera.

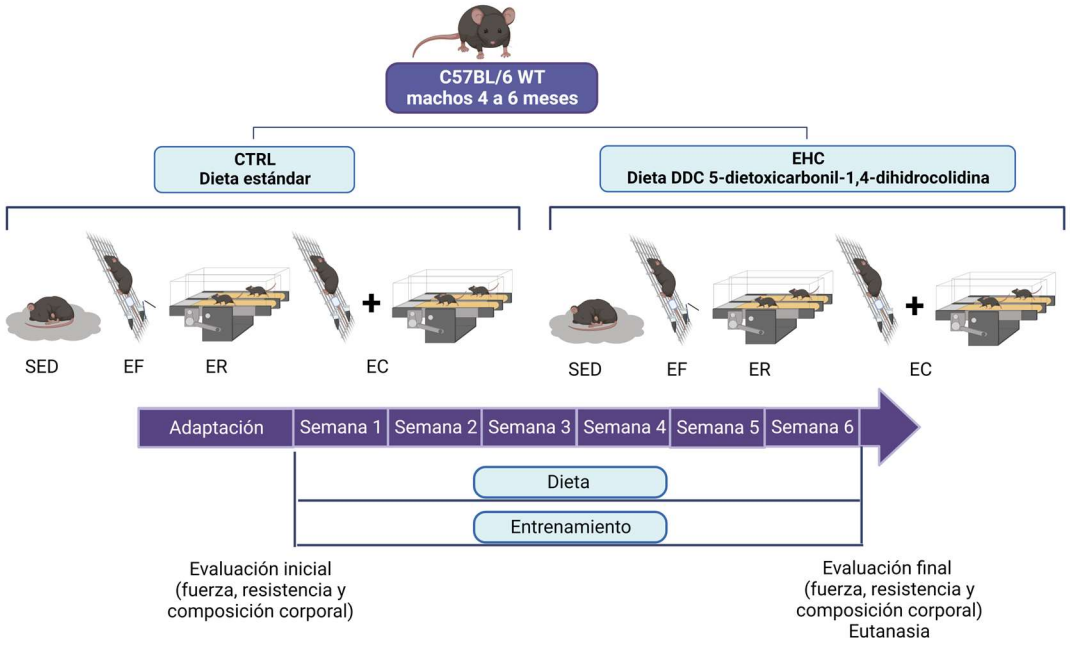


Figura 2. Diseño experimental

En la Figura se muestran los grupos experimentales con sus subdivisiones, así como los tiempos de las evaluaciones iniciales y finales y la duración de la intervención con dieta y entrenamiento físico en los animales. CTRL: grupo control sano; DDC: dieta suplementada con la hepatotoxina 5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; EHC: grupo con enfermedad hepática; SED: grupo sedentario; EF: grupo con entrenamiento de fuerza; ER: grupo con entrenamiento de resistencia; EC: grupo con entrenamiento combinado; WT: ratones wild type.

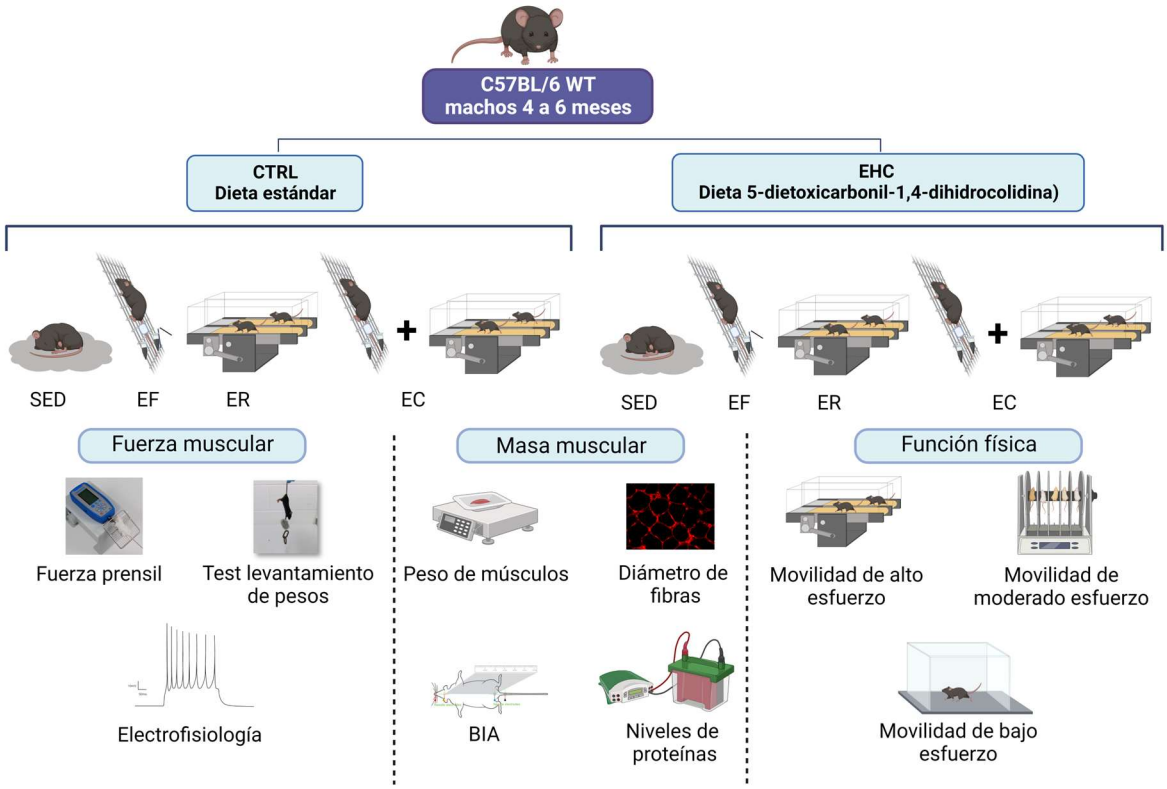


Figura 3. Estrategia experimental

Pruebas y evaluaciones funcionales y de laboratorio asociadas a los objetivos específicos de la investigación: objetivo 1 (fuerza muscular), objetivo 2 (masa muscular) y objetivo 3 (función física). BIA: bioimpedanciometría; CTRL: grupo control sano; DDC: dieta suplementada con la hepatotoxina 5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; EHC: grupo con enfermedad hepática; SED: grupo sedentario; EF: grupo con entrenamiento de fuerza; ER: grupo con entrenamiento de resistencia; EC: grupo con entrenamiento combinado; WT: ratones wild type.

En la Figura 3, se detalla la estrategia experimental para evaluar los efectos del EF, ER y EC sobre los criterios de sarcopenia. Las evaluaciones de **fuerza muscular** fueron *in vivo* (Fuerza de prensión de patas delanteras y traseras y Test de levantamiento de peso) y *ex vivo* (electrofisiología del músculo Tibial anterior (TA)). La evaluación de la **masa muscular** fue realizada mediante análisis de la composición corporal (Bioimpedanciometría y peso de músculos *ex vivo*), histología de TA y Sóleo (SOL) y niveles de proteínas estructurales del sarcómero y una proteína representativa de la ruta de síntesis de proteínas musculares (p70S6K) en extractos proteicos del TA. La **función física** relacionada a la movilidad fue determinada por una prueba de capacidad máxima de carrera en *treadmill* (hasta el agotamiento) para evaluar la movilidad de alto esfuerzo, por un protocolo acelerado en Rotarod para evaluar la movilidad de moderado esfuerzo, y una prueba de movilidad espontánea para evaluar la movilidad de bajo esfuerzo (*Open field test*).

4.2. Animales

Para determinar la cantidad mínima de animales que se necesitan para llevar a cabo esta investigación, se utilizó la calculadora de tamaño muestral GRANMO, versión 7.12 para 8 grupos de estudio descritos a continuación:

Grupo control (sano) (CTRL)	Grupo con Enfermedad hepática crónica (EHC)
Control sedentario	EHC sedentario
Control + entrenamiento de fuerza	EHC + entrenamiento de fuerza
Control + entrenamiento de resistencia	EHC + entrenamiento de resistencia
Control + entrenamiento combinado	EHC+ entrenamiento combinado

Aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta inferior al 0,05 en un contraste bilateral, se necesitan 2 animales para detectar una diferencia igual o superior a 0,5 unidades, asumiendo una desviación estándar de 0,15, con una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%.

Considerando lo anterior:

(8 grupos de estudio x 2 animales por grupo) x n:3= 48 animales

Por lo tanto, el número mínimo de animales para la realización de la investigación es de 48 animales. Cabe destacar, que la totalidad de los animales se utilizaron para el cumplimiento del objetivo 1, 2 y 3 de la investigación, es decir, un mismo animal será utilizado para la obtención de los resultados de los tres objetivos de la tesis.

Finalmente, un total de 49 ratones de la cepa C57BL/6J silvestres fueron utilizados en esta investigación, obtenidos de *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). Los animales (machos de 4 a 6 meses de edad y 25-30 g de peso), se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello, a temperatura controlada (22-24°C), con comida y agua ad-libitum y ciclos invertidos de luz/oscuridad de 12 horas (Luz: 8 PM a 8 AM), con el objetivo de realizar los experimentos durante su fase activa. Se trabajó solo con machos debido a que el modelo de EHC inducido por la hepatotoxina DDC publicado por nuestro laboratorio, solo ha sido probado en machos y es posible que condiciones hormonales de las hembras puedan influir en los resultados de la fuerza muscular, la masa muscular y el rendimiento en pruebas físicas fundamentales en esta investigación. Además, considerando que no teníamos información sobre cómo se comportarían los animales con EHC frente al entrenamiento físico, decidimos trabajar solo con machos que es el modelo ya probado en nuestro laboratorio y en el que conocíamos el comportamiento en el curso de la patología. Por otra parte, trabajar con hembras significaría duplicar el número de animales para que los resultados sean representativos.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Vida de la Universidad Andrés Bello (Nº015/2019) (Anexo 4).

Como se mencionó anteriormente, los animales se separaron en 2 grandes grupos: un grupo sano o CTRL alimentado con dieta estándar de laboratorio y un grupo

con EHC alimentado con dieta suplementada con la hepatotoxina DDC (35, 36). Tanto el grupo sano como el grupo con EHC, se subdividieron en 4 subgrupos cada uno: SED, EF, ER y EC. Las intervenciones experimentales con dieta y entrenamiento físico tuvieron una duración de 6 semanas (Figura 2) y todos los animales fueron adaptados las 2 semanas previas al inicio de la intervención experimental, tanto a la manipulación de los investigadores, como a las evaluaciones de capacidad máxima de carrera y protocolo acelerado en Rotarod, así como al tipo de entrenamiento que será aplicado durante el experimento (Anexo 1).

4.3 Inducción de EHC

Para inducir la patología hepática, los ratones de los grupos con EHC consumieron una dieta molida suplementada con 0.1% (1 mg/kg) de la hepatotoxina 5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (232) por 6 semanas (35, 36). Los ratones sanos (CTRL), consumieron una dieta molida estándar de laboratorio. Los animales fueron adaptados a la comida molida, dos semanas antes del comienzo de las intervenciones experimentales.

4.4 Protocolos de entrenamiento físico

Los animales pertenecientes a los grupos con entrenamiento físico recibieron los siguientes tipos de entrenamiento según corresponda:

Entrenamiento de fuerza (EF): consistió en subir un plano inclinado llamado *Ladder Climb*, que cuenta con una superficie porosa para un adecuado agarre del animal, por el cual el ratón debe ascender hasta una caja oscura ubicada en la parte superior (Figura 4). La caja se adaptó en base a lo descrito en la literatura (172, 233). Una luz en la parte inferior es el estímulo para que el animal suba por el plano inclinado, hasta una caja oscura ubicada en la parte superior. Para el trabajo de fuerza, se adhirieron pesos en la cola del ratón, mediante una cinta adhesiva hipoalergénica, los que se determinaron respecto a un porcentaje de su peso corporal (PC). Se trabajó con el

modelo de entrenamiento de fuerza debido a que es el modelo que produce menor estrés en los animales y logra su objetivo de aumentar la fuerza muscular (173, 233).

La intensidad inicial del EF fue 30 % del PC y aumentó 10 % del PC del animal cada semana, por 6 semanas, finalizando con un 80 % del PC en la sexta semana de entrenamiento. Los animales entrenaron 3 series de 10 repeticiones cada una, con 2 a 5 minutos de descanso entre series, 3 veces por semana (Figura 5A) (34, 173, 233, 234). Se trabajó con una intensidad baja a moderada y fue aumentando hasta finalizar en la semana 6 con una intensidad moderada a vigorosa de acuerdo con las recomendaciones para la realización segura de actividad física en sujetos con EHC y lo reportado en animales a los que se les ha aplicado EF, logrando un aumento efectivo de la fuerza muscular (17, 163, 164, 172, 173, 233).

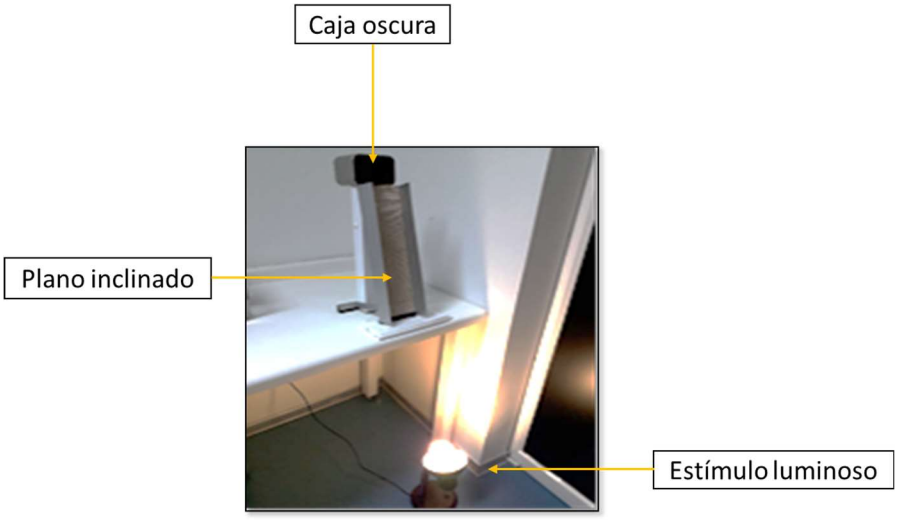


Figura 4. Ladder Climb

La Figura muestra el plano inclinado y la luz en la parte inferior que es el estímulo para que el animal suba por el plano inclinado, hasta la caja oscura ubicada en la parte superior.

Entrenamiento de resistencia (ER): Se realizó un entrenamiento en *treadmill* 5 días a la semana, por 30 minutos continuados cada día, durante 6 semanas. La intensidad se inició la primera semana al 50 % de la velocidad máxima de carrera alcanzada en la prueba de capacidad máxima de carrera (mencionada posteriormente), sin inclinación. La intensidad se incrementó un 5 % cada semana, finalizando en la sexta semana con una intensidad del 75 % de la velocidad máxima de carrera (Figura 5B) (235, 236). Se efectuó entrenamiento en *treadmill* de intensidad baja a moderada para progresar a intensidad moderada a vigorosa en la semana 6. Esta intensidad y tiempo de entrenamiento se determinó en base a los recomendado para la realización de actividad física segura en sujetos con EHC y la información publicada en modelos animales para ER (167, 184, 235, 237).

Entrenamiento combinado (EC): consistió en combinar EF con ER. La proporción utilizada fue de 1:2 con mayor proporción de ER que EF con el objetivo de aumentar principalmente la resistencia al esfuerzo físico (183). El componente de fuerza del EC se realizó con las mismas características del EF original, es decir, en *laddel climb,* 3 series de 10 repeticiones o ascensos, con pesos adheridos en la cola de los animales cuya intensidad varió de 30 % del PC la primera semana, hasta finalizar la semana 6 con el 80 % del PC. El componente de fuerza del EC se realizó 2 días por semana y no 3 como en el EF (Figura 5C). El componente de resistencia del EC se realizó con las mismas características que el ER original, es decir, 30 minutos de entrenamiento en *treadmill*, con una intensidad de inició del 50 % de la velocidad máxima de carrera alcanzada en la prueba de capacidad máxima de carrera y sin inclinación para finalizar la semana 6 con un 75 % de la velocidad máxima de carrera. En el componente de resistencia del EC, los animales entrenaron 3 días por semana y no 5 como en el ER (Figura 5C) (183). Se planificó un EC con predominio del componente de resistencia, de acuerdo con la información publicada a la fecha sobre EC en sujetos con EHC (183, 185, 226).

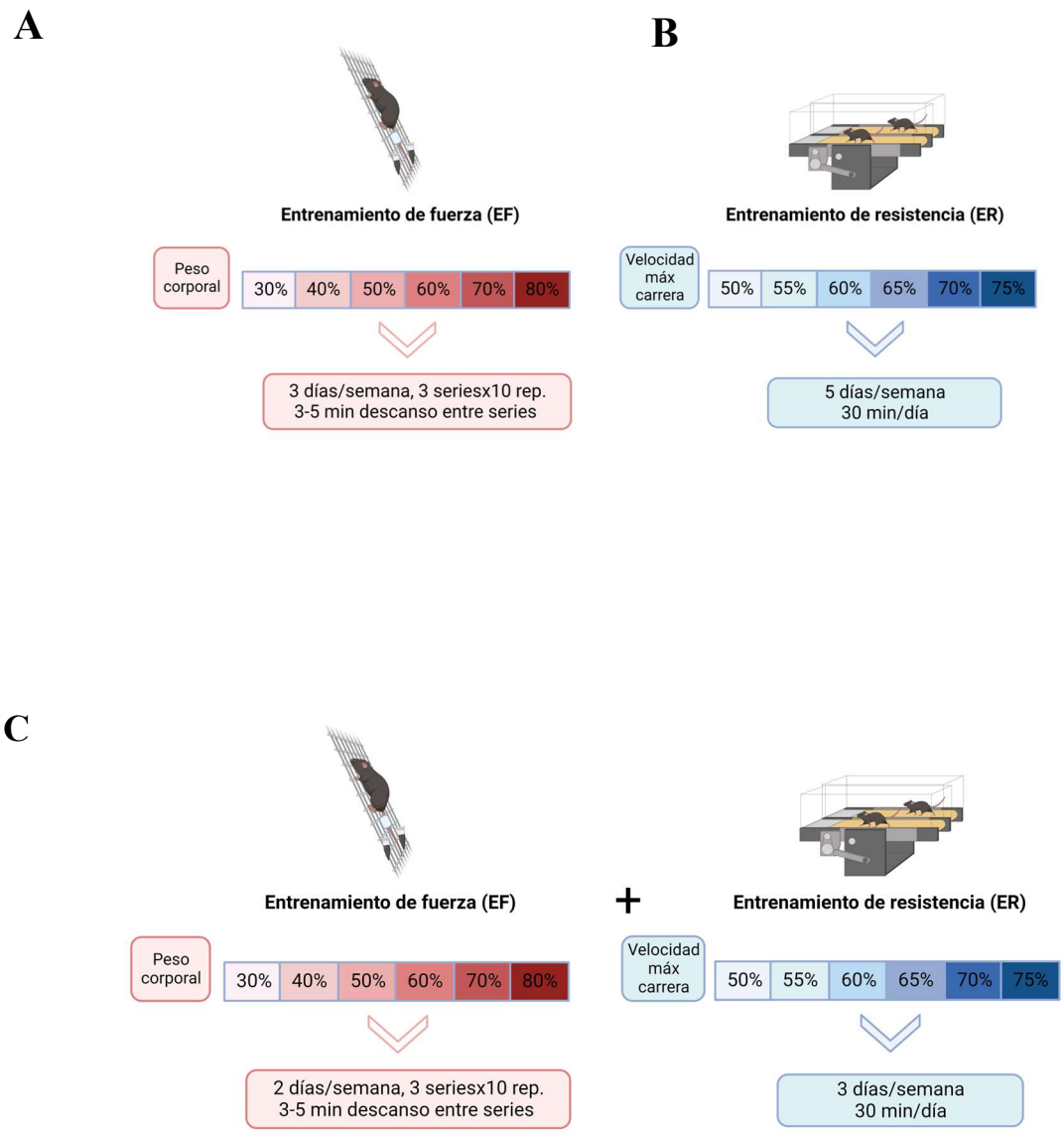


Figura 5. Características del entrenamiento físico

(A) Entrenamiento de fuerza (EF), (B) Entrenamiento de resistencia (ER) y (C) entrenamiento combinado (EC). min: minutos; %: porcentaje; rep: repeticiones.

4.5 Evaluaciones *in vivo*

4.5.1 Pruebas funcionales

Con el fin de determinar cambios en la fuerza muscular y la función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo producidos por la intervención experimental con entrenamiento físico, se realizaron pruebas funcionales antes de partir y una vez finalizada la intervención. Antes de la primera evaluación, los animales se adaptaron a dichas evaluaciones durante 3 a 4 días según cada protocolo como se detalla en el Anexo 1. Las pruebas funcionales efectuadas se describen a continuación:

Fuerza muscular

Para evaluar la fuerza muscular de las patas delanteras y traseras de los animales, aplicamos dos pruebas que se detallan a continuación:

Fuerza de prensión: con el objetivo de determinar la fuerza máxima de las patas delanteras y traseras de los animales se aplicó la prueba de fuerza prensil. Se realizaron 15 tracciones al dinamómetro (47200 Grip-Strength Meter, Ugo Basile, Italia) en las patas delanteras y traseras de los animales, que permiten calcular la fuerza máxima de estos (34-36). El valor final fue expresado como fuerza prensil de las patas delanteras y traseras normalizado por la longitud de la tibia de los animales.

Test de levantamiento de pesos*:* esta es otra prueba que se utilizó para determinar la fuerza de las patas delanteras de los animales. En esta prueba el animal debe mantener con sus patas delanteras, eslabones adheridos en cadena con pesos crecientes que van entre 15,5 y 54,1 g. Se evalúa el tiempo en segundos (de 0 a 3 s) que el animal es capaz de mantener el peso. A cada peso sostenido, se le asignó un puntaje para luego sumar los puntajes de los productos entre el score de los pesos y el tiempo que el animal sostenía dicho peso. El puntaje final corresponde al promedio de 3 evaluaciones, normalizadas por la longitud de la tibia del animal (35, 36, 238, 239).

Función física

Para determinar la función física relacionada a la movilidad de los animales, aplicamos pruebas de movilidad de alto esfuerzo, de moderado esfuerzo y de bajo esfuerzo, las cuales se detallan a continuación:

Movilidad de alto esfuerzo: se determinó la capacidad máxima de carrera hasta el agotamiento mediante una prueba incremental maximal en *treadmill*. En esta prueba el animal se ubica en un carril del *treadmill* (LE8610MTS, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, España) y debe correr en la cinta rodante sin inclinación, según la velocidad ascendente determinada por el protocolo descrito en la Tabla 1. El animal corre hasta la fatiga, la cual es determinada por la carencia de respuesta al estímulo motivacional (flujo de aire) por 10 segundos seguidos (236).

Tabla 1. Protocolo para evaluar la capacidad máxima de carrera en *treadmill*

Fases de la prueba	Aumento de la carga (velocidad)
Fase 1	12 cm/s por 2 minutos.
Fase 2	15 cm/s por 3 minutos.
Fase 3 en adelante	aumenta 2 cm/s cada 1 minuto hasta la fatiga.

cm: centímetros; s: segundos

Movilidad de moderado esfuerzo: se determinó mediante una protocolo acelerado en Rotarod, donde se ubicó al animal en el cilindro del equipo (LE8205, Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, España) a 4 revoluciones por minuto (RPM) y se fue aumentando la velocidad progresivamente, hasta alcanzar 25 RPM, velocidad en la cual el animal permaneció hasta completar 5 minutos. La prueba fue grabada con una cámara ubicada en la parte superior del equipo. Una vez obtenida la grabación, se analizó para determinar el número de caídas del animal desde el cilindro y el tiempo que el animal permaneció en sobre él durante los 5 minutos (35, 36, 240).

Movilidad de bajo esfuerzo: se determinó mediante la movilidad espontánea de los animales en la caja del *Open Field test*. Se ubicó al animal dentro de una caja transparente de 50 cm de largo x 30 cm de ancho x 20 cm de alto para que se mueva libremente. El animal fue grabado con una cámara ubicada en la parte superior, permitiendo la visión de la totalidad de la caja. Una vez obtenida la grabación y analizada, se determinó la distancia recorrida en centímetros, a través del análisis del desplazamiento con el *software* Kinovea (Campos et al., 2018).

4.5.2 Composición corporal

Bioimpedancia (BIA): Es un método seguro y mínimamente invasivo para determinar la composición del animal *in vivo.* Se utilizó un bioimpedanciómetro (ImpediVET Vet BIS 1, Australia) para determinar masa grasa y masa muscular de los animales, según el protocolo descrito por el fabricante.

4.6 Evaluaciones *ex vivo*

4.6.1 Eutanasia y toma de muestras.

Luego de la intervención experimental y la realización de las pruebas funcionales y de composición corporal, se realizó la eutanasia de los animales en una cámara individual con isofluorano al 5 % (R580S, RWD Life Science, China) y posterior dislocación cervical con el animal anestesiado. Luego se extrajeron los tejidos y órganos para análisis de laboratorio, como se describe a continuación:

Extracción de sangre: a los animales anestesiados mediante una máscara facial, se les extrajo sangre de la zona retro-orbital con capilares con heparina, para posteriormente ser eutanasiados. El suero se separó del resto de los componentes sanguíneos por centrifugación a 4.000 RPM por 10 minutos a 4 °C (241).

Extracción de tejidos: Los músculos Tibial anterior (TA), Sóleo (SOL), Gastrocnemio (GA) y Extensor largo de los dedos (EDL), fueron removidos de las patas traseras de los animales. Para el músculo TA se evaluó la longitud con un segmómetro (*Electronic digital calliper*) y el peso húmedo con una balanza digital (*Portable Jewelry Scale*)

debido a que esta información se utiliza para la determinación de la fuerza mediante electrofisiología que se describe más adelante. Para el resto de los músculos, se determinó solo el peso húmedo (164). El hígado también fue removido y pesado con una balanza digital (*Portable Jewelry Scale*).

Los músculos TA y SOL, fueron almacenados según su uso posterior: congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 ºC hasta su uso para Western blot o congelados en isopentano enfriado en nitrógeno líquido y almacenados a -80 ºC hasta su uso para cortes histológicos.

Medición de la longitud de la tibia: Luego de la extracción de los músculos de las patas traseras de los animales, se determinó la longitud de la tibia con un segmómetro (*Electronic digital calliper*) fijado desde la posición más proximal de la meseta tibial externa hasta la posición más distal del maléolo externo del animal (242).

4.6.2 Determinación de la fuerza muscular en músculo aislado

El músculo Tibial anterior (TA), fue extraído para determinar sus propiedades contráctiles mediante electrofisiología como se describe en trabajos previos de nuestro laboratorio (Márquez-Miranda et al., 2017). El músculo fue sumergido en solución de Krebs-Ringer oxigenada. Posteriormente se ató el músculo a nivel del tendón inferior y a nivel de la rótula para ser posicionado en el transductor de fuerza isométrica el que se encuentra conectado a un amplificador de señal (ADInstruments, Power Lab 4/35, Ilinois, USA). Pulsos eléctricos cuadrados fueron entregados al músculo mediante un estimulador Grass (S48 Square Pulse Stimulator, A-M SYSTEMS, Washington USA). Luego se determinó la longitud óptima de mayor contracción (Lo), y el voltaje por micro manipulación del largo del músculo para producir la máxima fuerza isométrica. Los estímulos fueron entregados en frecuencias de entre 1 y 150 Hz, con 0,2 ms de duración y 2 minutos de descanso entre cada estímulo. La masa y la longitud óptima del músculo se utilizaron para calcular la fuerza neta específica (fuerza normalizada por área de sección transversal total (mN / mm^2) (35, 36, 240, 243-245).

4.6.3 Análisis histológicos: determinación del diámetro de las fibras

Posteriormente a la extracción de los músculos TA y SOL, aquellos que fueron congelados en isopentano, fueron utilizados para su análisis histológico. Para ello, criosecciones de 10 µm del TA y SOL, se lavaron con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ($CaCl_2$ 13 mM, KCl 50 mM, KH_2PO_4 3 mM, $MgCl_2$ x $6H_2O$ 5 mM, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 4 mM, NaCl 1,379 M, Na_2HPO_4 x $7H_2O$ 3 mM, D-glucosa 56 mM), para posteriormente ser incubados y teñidos con *Wheat germ agglutinin (WGA)* Alexa-Fluor® 594 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (1:200 diluido en HBSS) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, cada corte fue nuevamente lavado con HBSS y fijado con medio de montaje. Posteriormente se obtuvieron imágenes en el microscopio de fluorescencia (BA310 Motic, Hong Kong), para luego determinar el diámetro de las fibras mediante análisis con el *software Image J* (NIH, Bethesda, Maryland, USA), como se ha descrito en trabajos previos del laboratorio (95, 246, 247). En imágenes de todo el corte transversal del músculo de cada condición experimental, las fibras fueron seleccionadas de forma semiautomática para determinar el diámetro mínimo de Feret y el área de sección transversal (36, 248).

4.6.4 Obtención de extractos proteicos de músculo y determinación de proteínas

El músculo TA de cada animal que fue congelado para Western Blot, fue homogenizado con ultraturrax hasta obtener un tejido completamente disgregado. Para ello se introdujo el músculo en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, EDTA 10 mM pH 8) con inhibidores de fosfatasas (NaF 1 mM, pirofosfato de sodio 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM) y de proteasas (PMSF 1 mM, cocktail de inhibidores de proteasas 1 mM) en frio. Posteriormente, al homogenizado se le agregó 1 volumen de buffer de tratamiento 2X (Tris 0,125 M pH 6,8, SDS 4 %, glicerol 20 %) y la mezcla se incubó 20 minutos a 50 ºC. Luego las muestras se centrifugaron a 13.000 x g, a 4 ºC por 20 minutos para extraer el sobrenadante, alicuotarlo en volúmenes de 200 µL y almacenarlos a -20 ºC hasta su uso (249).

Luego de la obtención de los extractos proteicos de TA, se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) según lo descrito por Smith y cols.,1985. Para ello se utilizó el *kit* comercial *BCA protein assay kit* (micro BCATM Protein Assay Kit catálogo 23235, sustrato quimioluminiscente Super Signal TM West Pico PLUS catálogo 23235, sustrato de duración ampliada Super Signal TM West Dura catálogo 34075 y sustrato de máxima sensibilidad Super Signal TM West Femto catálogo 34095; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). determinando la DO_{505nm} en el lector de placas (ELx800, BioTek Instruments Inc. Vermont, USA). Posteriormente los valores de absorbancia que se obtuvieron se corrigieron por los valores de los blancos correspondientes, realizando una curva de calibración preparada a partir de una solución de BSA de concentración ya conocida.

4.6.5 Nivel de proteínas estructurales del sarcómero y de la ruta de síntesis.

Para el análisis de Western Blot, el musculo TA fue homogenizado en Buffer Tris–EDTA con un cocktail de inhibidores de proteasas y PMSF 1 mM. Entre 20 y 30 µg de proteínas fueron utilizados por muestra, las que se mezclaron con 1/5 de su volumen en una solución de carga (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 25 %, SDS 2 %, ß-mercaptoetanol 0,7 M, azul de bromofenol 0,1 %), para posteriormente realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida-0,1 % dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las proteínas separadas en el gel SDS-PAGE, luego fueron transferidas a una membrana de PDVF (Immobilon-P, PVDF; 0,45 µm, rollo de 26,5 cm x 3,75 m, IPVH00010. Merck millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda) Posteriormente la membrana fue bloqueada durante 1 hora, para luego ser incubada overnight a 4 °C en agitación constante con anticuerpo primario para detectar: **GAPDH** (1:5.000, sc-322331; Santa Cruz Biotechology, Dallas, Texas, USA) (control de carga), **MHC** (1:1000 MF-20; Developmental Studies, Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa, USA) y **Troponina I** (1:1.000, sc-374549; Santa Cruz Biotechology, Dallas, Texas, USA) (proteínas del sarcómero) y **p70S6K total** (1:1000, 2708; Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) (proteína representativa de la ruta de síntesis de proteínas musculares). Una vez finalizada la incubación con anticuerpo primario, la membrana se lavó 3 veces por 5

minutos con TBS-Tween 20 al 0,1 % (TBS: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5). Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (mouse o rabbit) por al menos 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Para finalizar las membranas se lavaron nuevamente 3 veces por 5 minutos con TBS-Tween 0,1 % en agitación. Todas las inmunoreacciones de las proteínas a analizar se visualizaron por quimioluminiscencia (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a través del sistema de imágenes Fotodyne (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La cuantificación de las bandas se efectuó mediante el análisis de densidad con el *software Image J* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) y normalizadas respecto al control de carga respectivo de cada muestra y al control sedentario (36, 95, 250).

4.7 Marcadores de EHC

Con el objetivo de confirmar la existencia de EHC, se determinó la concentración de ácidos biliares en suero, así como el peso del hígado, como se describe a continuación:

Niveles de ácidos biliares: Para determinar los niveles totales de ácidos biliares plasmáticos se efectuó un ensayo colorimétrico (BI3863; Randox Laboratories Ltd., Kearneysville, West Virginia, USA). Para su realización, se ubicó al animal con la máscara de anestesia y se le extrajo sangre desde el seno retro-orbital (150-200 µL aproximadamente) (241). La sangre extraída posteriormente fue centrifugada a 1.500 x g por 10 minutos a 4 ºC en centrifuga, para luego separar el suero que se utilizó en el ensayo colorimétrico (251). Se midió la absorbancia de las muestras a 405 nm a los 60 (A1) y 120 segundos (A2), y también la del calibrador (proporcionado por el kit) y se calculó la diferencia entre ambos valores (ΔA = A2 - A1). La concentración de ácidos biliares totales se determinó en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{calibrador1}}} \times [\text{calibrador}] = [\text{muestra}]\ \mu\text{mol/L}$$

Peso del hígado: El hígado fue removido de los ratones y se evaluó su peso húmedo (balanza digital *Portable Jewelry Scale*).

4.8 Efectividad del EF y ER

Para determinar si el EF aumenta la fuerza muscular de los animales y el ER aumenta la capacidad de carrera, manifestada en la distancia máxima que los animales corren en una prueba de carrera hasta la fatiga, se realizaron las siguientes evaluaciones en animales control o sanos:

Entrenamiento de fuerza: para determinar la efectividad del EF se evalúo el aumento de la fuerza muscular de las patas delanteras y traseras de los animales sanos (CTRL), mediante la prueba de fuerza prensil y la prueba de levantamiento de pesos.

Entrenamiento de resistencia: para determinar la efectividad del ER se evaluó el aumento de la distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera en *treadmill* en animales sanos (CTRL), así como el número de caídas y el tiempo sobre el cilindro del treadmill y la distancia que los animales recorren espontáneamente en la caja del Open Field Test.

4.9 Análisis estadístico

Se registraron los datos en Microsoft Excel y los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism 9.3 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). La variable independiente corresponde al entrenamiento físico (EF, ER y EC) y las variables dependientes corresponden a los criterios o parámetros de sarcopenia, es decir, la fuerza muscular, la masa muscular y la función física relacionada a la movilidad.

Se determinó la normalidad de los datos con la prueba Shapiro-Wilk. Para identificar diferencias entre los ocho grupos de la investigación, se realizó ANOVA de 2 vías, con una prueba de Tukey *post hoc.* El nivel de significancia estadística establecido es $p<0,05$, con un intervalo de confianza del 95 %.

5. Resultados

Los resultados de las pruebas funcionales iniciales, es decir, previas al comienzo de la intervención experimental, no indican diferencias entre los grupos de animales incluidos en la investigación (Anexo 5).

Para determinar si el EF, ER o EC tiene un efecto preventivo sobre los parámetros que definen la sarcopenia en un modelo de EHC, se evaluó su efecto sobre la **fuerza muscular** (objetivo específico 1), **masa muscular** (objetivo específico 2) y **función física** (objetivo específico 3), tal como se detalla a continuación:

5.1 Objetivo 1. Determinar y comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado sobre la fuerza muscular del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC.

El primer criterio o parámetro de sarcopenia secundaria a EHC es la disminución de la fuerza muscular. En esta investigación, evaluamos la fuerza muscular de las patas delanteras de los animales con la prueba de levantamiento de pesos y la fuerza prensil de las patas delanteras y traseras.

En primer lugar, evaluamos el efecto del entrenamiento físico y de la hepatotoxina DDC por separado, así como la interacción entre ambos, sobre la variable dependiente, en este caso la fuerza muscular. Al respecto en la evaluación de la fuerza muscular de las patas delanteras mediante la prueba de levantamiento de pesos y la prueba de fuerza prensil, observamos que la interacción del entrenamiento físico y la hepatotoxina DDC tiene un efecto mayor que ambos por separado, por lo tanto, se potencian. En el caso de la evaluación de fuerza prensil de las patas traseras de los animales, observamos que los efectos son independientes entre sí, es decir, no hay inhibición ni sinergia entre ellos (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la EHC, del entrenamiento físico y la interacción entre ambos sobre la fuerza muscular

Fuerza patas delanteras	**% variación total**	**Valor p**
Interacción	7,809	0,018*
EHC	50,32	<0,0001*
Entrenamiento físico	3,874	0,0234*
Fuerza prensil patas delanteras		
Interacción	13,73	<0,0001*
EHC	20,58	<0,0001*
Entrenamiento físico	41,38	<0,0001*
Fuerza prensil patas traseras		
Interacción	2,791	0,1693
EHC	35,64	<0,0001*
Entrenamiento físico	27,06	<0,0001*

Nivel de significancia estadística (*) p<0,05 con intervalo de confianza del 95 %. Diferencia determinada mediante ANOVA de 2 vías con test de Tuckey post hoc. EHC: enfermedad hepática crónica.

En segundo lugar, era fundamental confirmar si los animales con EHC tenían menor fuerza de las patas traseras y delanteras que aquellos animales sanos (CTRL). Para ello calculamos el porcentaje de cambio de la fuerza muscular de los animales sedentarios enfermos (EHC-SED) respecto al grupo sedentario sano (CTRL-SED) y aplicamos las pruebas estadísticas correspondientes (ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc para comparar los 8 grupos y a partir de ello, extraer la información de los animales sedentarios enfermos y sanos). Al respecto, determinamos que los animales EHC-SED, tienen un 35 % menos de fuerza que los animales CTRL-SED en las patas delanteras al evaluar con la prueba de levantamiento de pesos (Tabla 3 y Figura 6) y un 32 % menos de fuerza al evaluar con la prueba de fuerza prensil (Tabla 3 y Figura 7A). En las patas traseras, los animales EHC-SED tienen un 26 % menos de fuerza prensil que aquellos animales CTRL-SED (Tabla 3 y Figura 7B). Con estos resultados, confirmamos que aquellos animales EHC-SED, presentan pérdida de la fuerza muscular tanto en las patas delanteras como traseras, al compararlos con el grupo CTRL-SED.

En tercer lugar, debíamos confirmar que el EF es el principal tipo de entrenamiento que aumenta la fuerza muscular de los animales, tal como se ha reportado previamente en la literatura (34, 172-174, 233). Para ello comparamos la fuerza de los animales sanos (CTRL) sedentarios con aquellos ratones sanos que recibieron EF, ER y EC (Tabla 3 y Figuras 6 y 7) y calculamos el porcentaje de cambio. Nuestros resultados indican que hubo un aumento de la fuerza muscular con EF de un 29 %, 25 % y 19,6 % en la prueba de levantamiento de pesos y fuerza prensil de patas delanteras y traseras, respectivamente. En las mismas pruebas, el EC aumentó la fuerza muscular en animales control en 30 %, 17,7 % y 18,2 % respectivamente, mientras que el ER no aumentó la fuerza muscular en animales sanos (Tabla 3 y Figuras 6 y 7). Con estos resultados podemos confirmar que el EF aumenta la fuerza muscular en las patas delanteras y traseras de los animales sanos y el EC (probablemente debido a su componente de fuerza), produce un efecto similar. Por el contrario, el ER no aumenta la fuerza muscular en animales sanos.

Posterior a los controles internos del experimento, se quiso determinar el efecto de los distintos entrenamientos físicos (EF, ER o EC) en aquellos animales con EHC, y si eran capaces de prevenir la pérdida de la fuerza muscular que caracteriza la patología. Para ello calculamos el porcentaje de cambio de los grupos con EHC entrenados respecto al grupo EHC-SED e hicimos las comparaciones entre los grupos, tal como se observa en la Tabla 3 y Figuras 6 y 7. Al respecto, tanto en las patas delanteras como traseras, el EF, ER y EC previenen la pérdida de fuerza muscular en animales con EHC. Al observar el detalle de los resultados de la fuerza muscular evaluada mediante la prueba de levantamiento de pesos y la fuerza prensil de las patas delanteras y traseras de los animales, el EF previno la caída de la fuerza muscular en un 75 %, 30 % y 37 % respectivamente. El ER por su parte, tuvo una prevención del 52 %, 46 % y 21,4 %, en tanto el EC tuvo un efecto preventivo del 120 %, 40 % y 38,3 % respectivamente (ver diferencias estadísticas en Tabla 3 y Figuras 6 y 7).

Posteriormente, evaluamos la fuerza muscular del músculo TA aislado, mediante electrofisiología con el objetivo de identificar la fuerza muscular sin el componente neural y motivacional de los animales. Al respecto, nuestros resultados indican que la fuerza muscular del TA del grupo EHC-SED fue 63,1 % más baja que la de animales CTRL-SED. Luego, al comparar los animales EHC que recibieron EF, ER y EC y los sedentarios, observamos que los tres tipos de entrenamiento tuvieron un efecto preventivo, con un porcentaje de cambio respecto al grupo EHC-SED de 229,5 % con EF, 113,7 % con ER y 301,1 % con EC (Tabla 3 y Figura 8).

Con estos resultados confirmamos que el EF, ER y EC tienen un efecto preventivo en la caída de la fuerza muscular en animales con EHC, en diferente porcentaje, pero sin diferencias estadísticas entre sí, excepto en la fuerza de las patas delanteras y la fuerza del TA aislado, donde se observa un mayor efecto preventivo del EC por sobre el ER. Considerando estos resultados, para la disminución de la fuerza muscular que caracteriza a la EHC, sería igualmente efectivo aplicar EF, ER o EC para prevenir la disminución de este criterio de sarcopenia en animales con EHC.

Tabla 3. Comparación de la fuerza muscular de animales sanos y con EHC, sedentarios y con EF, ER y EC

	SED		EF		ER		EC	
	CTRL	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**
Fuerza patas delanteras (Score/mm)	22,0 ± 3,2	14,3 ± 1,7[a]	28,5 ± 2,4[a,c]	25,1 ± 5,8[b,f]	21,9 ± 3,9	21,9 ± 4,5[b,f]	28,8 ± 3,3[a,c]	31,5 ± 2,6[b]
Fuerza prensil patas delanteras (GF/mm)	6,1 ± 0,6	4,1 ± 0,5[a]	7,6 ± 0,4[a,c]	5,3 ± 0,9[b,g]	6,2 ± 0,7	5,9 ± 0,8[b]	7,1 ± 0,2[a,c]	5,7 ± 0,3[b,e]
Fuerza prensil patas traseras (GF/mm)	8,8 ± 0,4	6,5 ± 0,9[a]	10,6 ± 0,9[a,c]	8,9 ± 1,0[b,g]	8,9 ± 1,1	7,9 ± 0,8[b]	10,4 ± 0,4[a,c]	9,0 ± 0,9[b]
Fuerza del TA aislado (AUC)	1.660 ± 140,6[c]	623,8 ± 45,5[a]	1.930 ± 116,6[c]	2.020 ± 192,7[b]	1.574 ± 135,5[a]	809,9 ± 60,02[b,c]	2.517 ± 226,2[c]	2.343 ± 217,3[b,d]

Unidades: Score/milímetros (Score/mm) para prueba de levantamiento de pesos; GF/mm para prueba de fuerza prensil; área bajo la curva (AUC) para la fuerza del Tibial Anterior (TA) aislado. EHC: enfermedad hepática crónica; EF entrenamiento de fuerza; Entrenamiento de resistencia; EC: entrenamiento combinado.

Valores expresados en promedio ± desviación estándar. n=3-13 animales por condición (ver detalles en las figuras 6, 7 y 8). Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %.

Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [b]EHC-SED; [c]CTRL-ER; [d]EHC-ER; [e]CTRL-EC; [f]EHC-EC; [g]CTRL-EF.

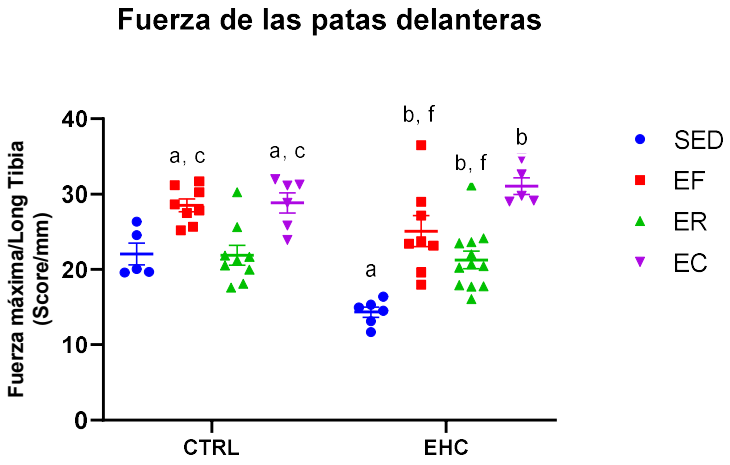


Figura 6. EF, ER y EC previenen la disminución de la fuerza muscular de las patas delanteras en animales con EHC.

Fuerza muscular (evaluada mediante prueba de levantamiento de pesos) de animales de animales control (CTRL) y con EHC, sedentario (SED), con entrenamiento de fuerza (EF), con entrenamiento de resistencia (ER) y entrenamiento combinado (EC) luego de 6 semanas de intervención. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=5-12 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk *test.* Diferencias entre grupos determinadas mediante ANOVA de 2 vías y *Test* de Tukey *post hoc*. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{b}EHC-SED; ^{c}CTRL-ER; ^{f}EHC-EC.

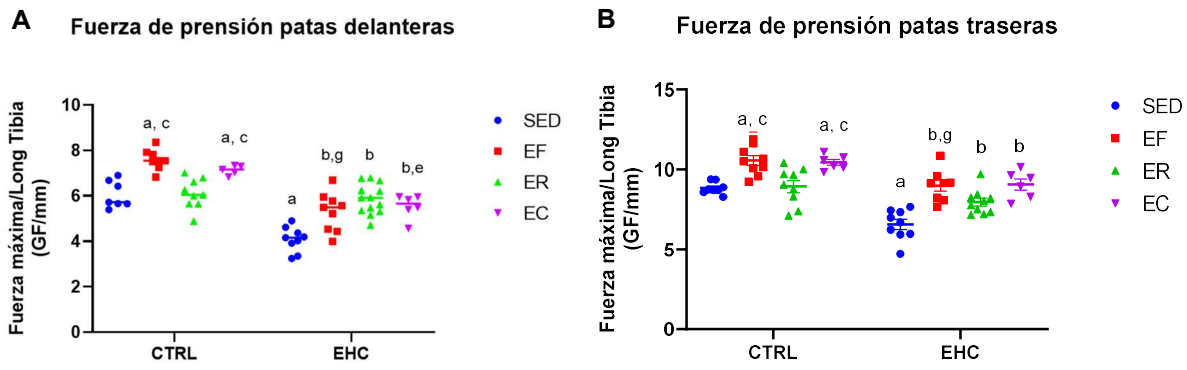


Figura 7. EF, ER y EC previenen la disminución de la fuerza de prensión en las patas delanteras y traseras en animales con EHC

(A) Fuerza prensil de las patas delanteras y (B) traseras de animales de animales con sanos (CTRL) y con EHC, sedentario (SED), con entrenamiento de fuerza (EF), con entrenamiento de resistencia (ER) y entrenamiento combinado (EC) luego de 6 semanas de intervención. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=5-13 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk *test.* Diferencias entre grupos determinadas mediante ANOVA de 2 vías y *Test* de Tukey *post hoc*. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{b}EHC-SED; ^{c}CTRL-ER; ^{e}CTRL-EC; ^{g}CTRL.EF.

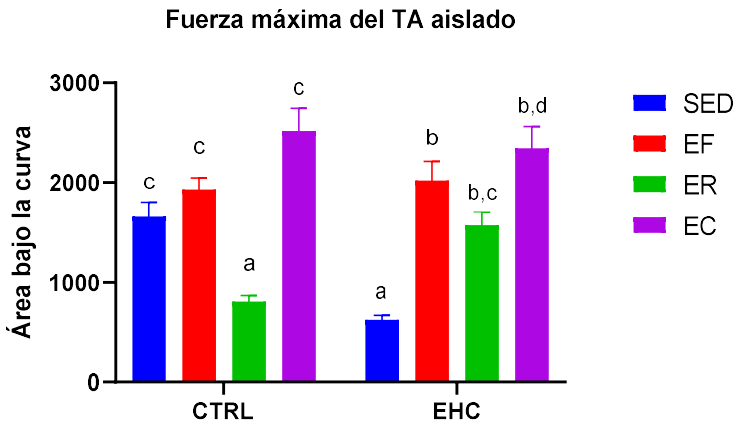


Figura 8. EF, ER y EC previenen la caída de la fuerza muscular del Tibial Anterior (TA) aislado en animales con EHC

Fuerza muscular del TA aislado en animales sanos (CTRL) y con EHC, sedentarios (SED), con entrenamiento de fuerza (EF), con entrenamiento de resistencia (ER) y entrenamiento combinado (EC) luego de 6 semanas de intervención. Valores expresados en área bajo la curva. n=3-7 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk *test.* Diferencias entre grupos determinadas mediante ANOVA de 2 vías y *Test* de Tukey *post hoc*. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{b}EHC-SED; ^{c}CTRL-ER, ^{d}EHC-ER.

Resumen objetivo específico 1

En relación con la disminución de la fuerza muscular que caracteriza los animales con sarcopenia secundaria a EHC, los protocolos de EF, ER y EC utilizados previenen la pérdida de la fuerza muscular en las patas delanteras y traseras de los animales.

Al evaluar la fuerza de las patas delanteras con la prueba de levantamiento de pesos, los tres entrenamientos tienen un efecto preventivo, pero el EC tiene mayor efecto preventivo que el ER, pero sin diferencias con EF (Tabla 3 y Figura 6).

En la evaluación de la fuerza prensil de las patas delanteras y traseras de los animales, no se observaron diferencias en el efecto preventivo de los tres tipos de entrenamiento (Tabla 3 y Figura 7).

La disminución de la fuerza del TA aislado es prevenida por los tres tipos de entrenamiento, pero el EC tiene mayor efecto preventivo que el ER, sin diferencias con EF (Tabla 3 y Figura 8).

Por lo tanto, tanto el EF como el ER y el EC previenen la disminución de la fuerza muscular que caracteriza la EHC en el modelo murino de inducción de EHC con la hepatotoxina DDC.

5.2 Objetivo 2. Determinar y comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado sobre la masa muscular del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC.

El segundo criterio o parámetro de sarcopenia secundaria a EHC es la disminución de la masa muscular. Determinamos la masa muscular y la masa grasa evaluando la composición corporal mediante Bioimpedanciometría (BIA). Además, evaluamos la masa de los músculos de las patas traseras de los animales (TA, SOL, GA y EDL). Dado que la EHC se caracteriza por cambios en el balance hídrico (llevando por ejemplo a tener edema periférico y ascitis) que pueden afectar las mediciones de BIA y la masa de músculos, es necesario complementar la información con mediciones histológicas y moleculares que sean representativas de los cambios en la masa muscular. Debido a esto, se determinó el diámetro de las fibras musculares del TA y SOL y el nivel de proteínas estructurales del sarcómero (Troponina y MHC) y de una proteína representativa de la vía de síntesis de proteínas musculares (p70S6K) en el TA.

Lo primero que debíamos determinar era el efecto del entrenamiento físico, de la hepatotoxina DDC y de su interacción, sobre la variable dependiente, que en este caso corresponde a la masa muscular (Tabla 4). Al respecto, en cuanto a la evaluación de la masa muscular mediante BIA, observamos que los efectos son independientes entre sí, es decir, no hay inhibición ni sinergia entre ellos. En el caso de la masa grasa evaluada mediante BIA, no se identifica un efecto del entrenamiento físico, de la hepatotoxina, ni de la interacción de ambos sobre la masa muscular, por lo tanto, no influyen sobre esta variable. Respecto a la masa de los músculos TA, SOL, GA y EDL, el diámetro de las fibras del TA y SOL, así como los niveles de proteínas Troponina y MHC, observamos un efecto mayor cuando interactúa el entrenamiento físico con la hepatotoxina DDC, por lo tanto, ambos factores potencian su efecto sobre estas variables. En cuanto al nivel de la proteína p70S6K, los efectos del entrenamiento físico y la hepatotoxina DDC son independientes entre sí, es decir, no hay inhibición ni sinergia entre ellos (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto sobre la masa muscular, diámetros de fibras y niveles de proteínas de la EHC, del entrenamiento físico y la interacción entre ambos		
Masa muscular (BIA)	**% variación total**	**Valor p**
Interacción	14,43	0,0937
EHC	17,18	0,0085*
Entrenamiento físico	35,59	0,0055*
Masa grasa (BIA)		
Interacción	8,13	0,5436
EHC	5,95	0,2182
Entrenamiento físico	3,62	0,8061
Masa Tibial Anterior (TA)		
Interacción	19,38	0,0005*
EHC	13,63	0,0003*
Entrenamiento físico	5,47	0,1283
Masa Sóleo (SOL)		
Interacción	15,83	0,0124*
EHC	10,98	0,0057*
Entrenamiento físico	12,95	0,0285*
Masa Gastrocnemio (GA)		
Interacción	9,58	0,0024*

EHC	43,42	<0,0001*
Entrenamiento físico	7,32	0,0099*
Masa Extensor largo de los dedos (EDL)		
Interacción	23,43	0,0014*
EHC	4,99	0,0564
Entrenamiento físico	4,45	0,3448
Diámetro Tibial Anterior		
Interacción	2,55	<0,0001*
EHC	1,00	<0,0001*
Entrenamiento físico	6,76	<0,0001*
Diámetro Sóleo		
Interacción	1,19	<0,0001*
EHC	6,86	<0,0001*
Entrenamiento físico	2,01	<0,0001*
Nivel proteína Troponina		
Interacción	36,2	<0,0001*
EHC	1,48	0,0772
Entrenamiento físico	25,8	<0,0001*
Nivel proteína MHC		
Interacción	28,84	<0,0001*

EHC	3,76	0,0372*
Entrenamiento físico	41,24	<0,0001*
Nivel proteína p70S6K		
Interacción	7,94	0,0579
EHC	6,65	0,0131*
Entrenamiento físico	54,67	<0,0001*
Nivel de significancia estadística (*) p<0,05 con intervalo de confianza del 95 %. Diferencia determinada mediante ANOVA de 2 vías con test de Tuckey post hoc. BIA: Bioimpedanciometría; EHC: enfermedad hepática crónica.		

En segundo lugar, debíamos confirmar que los animales con EHC tienen una menor masa muscular que los animales sanos (CTRL). Para ello calculamos el porcentaje de cambio de las variables masa muscular, masa grasa, masa de los músculos de las patas traseras, diámetro de fibras y niveles de Troponina, MHC y p70S6K de los animales con EHC respecto al grupo sedentario sano. Al respecto, identificamos que, al evaluar con BIA, la masa muscular de los animales EHC-SED disminuyó 18,4 % y la masa grasa disminuyó 41,6 % respecto a los animales CTRL-SED (Tabla 5). La masa de los músculos también disminuyó en animales con EHC-SED (27,1 % TA; 38 % SOL; 40,9 % GA y 34,4 % EDL) (Tabla 5), así como el diámetro de las fibras musculares del SOL (21 %) y TA (12,7%) (Tabla 5 y Figuras 9 y 10). El nivel de la proteína Troponina disminuyó 70 % en animales con EHC-SED respecto al grupo CTRL-SED, en tanto el nivel de MHC disminuyó 72 % y el de p70S6K 76 % (Figuras 13, 14 y 15).

Con estos resultados, confirmamos que aquellos animales con EHC presentan pérdida de la masa muscular evaluada mediante composición corporal, masa de músculos, diámetro de fibras musculares y niveles de proteínas Troponina, MHC y p70S6K.

Posteriormente, necesitábamos determinar que en aquellos animales con EHC, el entrenamiento físico, ya sea EF, ER o EC, tuvo un efecto preventivo de la pérdida de la masa muscular que caracteriza la patología. Para ello calculamos el porcentaje de cambio de los grupos entrenados con EHC respecto al grupo sedentario con EHC e hicimos las comparaciones, tal como se observa en la Tabla 5 y Figuras 9 y 10.

Los resultados indican que la disminución de la **masa muscular** evaluada mediante BIA no fue prevenida por el entrenamiento físico. Adicionalmente, se observó que la disminución de la masa grasa solo fue prevenida (34 %) por EC en animales con EHC (Tabla 5).

En relación con la **masa de los músculos**, en el músculo TA, el EF tuvo un efecto preventivo de 23 % y el EC de 26,4 %, en tanto el ER no presentó dicho efecto. En el músculo SOL, el ER previno la disminución de su masa en 56 % y el EC en 70,7 %, no así el EF. En el músculo GA, los tres tipos de entrenamiento mostraron un efecto preventivo con 31,5 % EF, 38,2 % ER y 40,4 % EC. Finalmente, en el músculo EDL solo el EF tuvo un efecto preventivo (47,1 %) (Tabla 5). Con estos resultados confirmamos que el EF, ER y EC tienen un efecto preventivo en la masa de los músculos en animales con EHC, pero este efecto es músculo específico, favoreciendo un efecto preventivo en aquellos músculos que debido a sus tipos de fibras, pueden ser susceptibles a aumentar la fuerza (como el TA y EDL, formados mayoritariamente por fibras tipo II), la resistencia (como el SOL, donde predominan las fibras tipo I) o ambas (como el GA, que es un músculo mixto, con una zona central donde predominan las fibras tipo I y zonas laterales con predominio de fibras tipo II).

Respecto a la disminución del **diámetro de las fibras musculares** del SOL en animales con EHC, tanto el EF, como ER y EC tuvieron un efecto preventivo similar, con porcentajes de 16,5 %, 17,5 % y 15 % respectivamente, sin diferencias entre sí (Tabla 5 y Figura 9). En cuanto a la disminución del diámetro del TA en animales con EHC, el EF tuvo el mayor efecto preventivo (27,4 %), seguido del ER (12,3 %) y EC (9,4 %) (Tabla 5 y Figura 10).

Tabla 5. Masa muscular evaluada mediante Bioimpedanciometría (BIA), masa de músculos y diámetro de fibras musculares en animales controles y con EHC, sedentarios, con EF, ER y EC

	SED		EF		ER		EC	
BIA (n=3-6)	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**
Masa Grasa (g/mm)	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1[a]	0,6 ± 0,1[b]	0,3 ± 0,1[d]	0,7 ± 0,1[b]	0,4 ± 0,1[c]	0,4 ± 0,1[b]	0,5 ± 0,1[b]
Masa muscular (g/mm)	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,1[a]	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2[a]	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Masa de músculos (n= 6-13)								
Tibial anterior (TA) (mg/mm)	3,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2[a]	3,4 ±0,4[e]	3,1 ± 0,5[b]	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3[c]	2,9 ± 0,5[a]	3,2 ± 0,3[b]
Sóleo (SOL) (mg/mm)	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1[a]	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1[b]	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1[b]
Gastrocnemio (GA) (mg/mm)	10,3 ± 0,6	6,1 ± 1,7[a]	10,6 ± 0,8	8 ± 1,3[b,g]	10,1 ± 0,7	8,4 ± 0,9[b,c]	9,6 ± 0,8	8,5 ± 0,3[b]
Extensor largo de los dedos (EDL) (mg/mm)	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1[a]	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1[b]	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Diámetro de fibras musculares (n=3-6)								
Sóleo (SOL) (µm)	37,7 ± 12,5	29,8 ± 9,1[a]	41,2 ± 9,4	34,7 ± 8,5[b,g,e]	36,4 ± 11,4	35 ± 8,3[b]	38,7 ± 10,2	34,3 ± 7,6[b,e]
Tibial anterior (TA) (µm)	39,5 ± 9,9	34,4 ± 9,1[a]	42,5 ± 9,4	43,9 ± 17,4[b,d,f]	45,6 ± 10,9	38,7 ± 7,7[b,c]	36,3 ± 8,2	37,7 ± 8,1[b]

Unidades: Bioimpedanciometría (BIA): gramos/milímetros (g/mm); Masa de músculos: milígramos/milímetros (mg/mm); Diámetro de fibras: micrómetros (µm). CTRL: control; EHC: enfermedad hepática crónica; EF: entrenamiento de fuerza; ER: entrenamiento de resistencia; EC: entrenamiento combinado. Valores expresados en promedio ± desviación estándar. Nivel de significancia estadística p<0,05 con intervalo de confianza del 95 %. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [b]EHC-SED; [c]CTRL-ER; [d]EHC-ER; [e]CTRL-EC; [f]EHC-EC; [g]CTRL-EF.

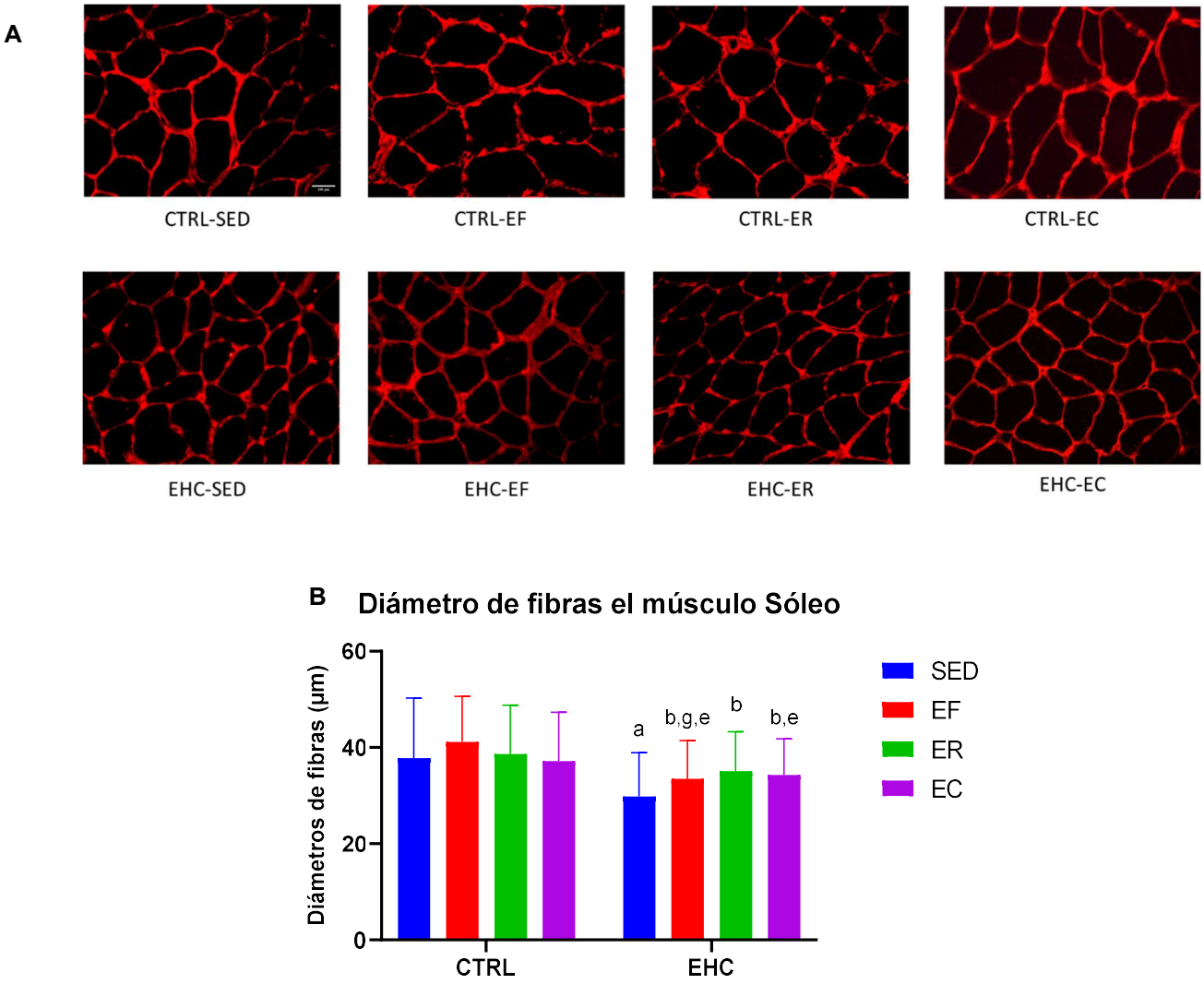


Figura 9. EF, ER y EC previenen la disminución del diámetro de las fibras musculares del Sóleo en animales con EHC

(A) Tinción de *Wheat germ agglutinin* (WGA) para determinar el diámetro de las fibras musculares del músculo Sóleo (SOL) en los grupos sanos (CTRL) y con EHC, sedentarios (SED) y con entrenamiento de fuerza (EF), entrenamiento de resistencia (ER) y entrenamiento combinado (EC). (B) Cuantificación del diámetro de las fibras musculares del SOL de animales control y con EHC. En los animales con EHC, el EF, ER y EC previenen la caída en el diámetro de las fibras musculares del SOL. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=5-6 animales por condición. Barra de escala igual a 100 µm. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{b}EHC-SED; ^{e}CTRL-EC; ^{g}CTRL-EF.

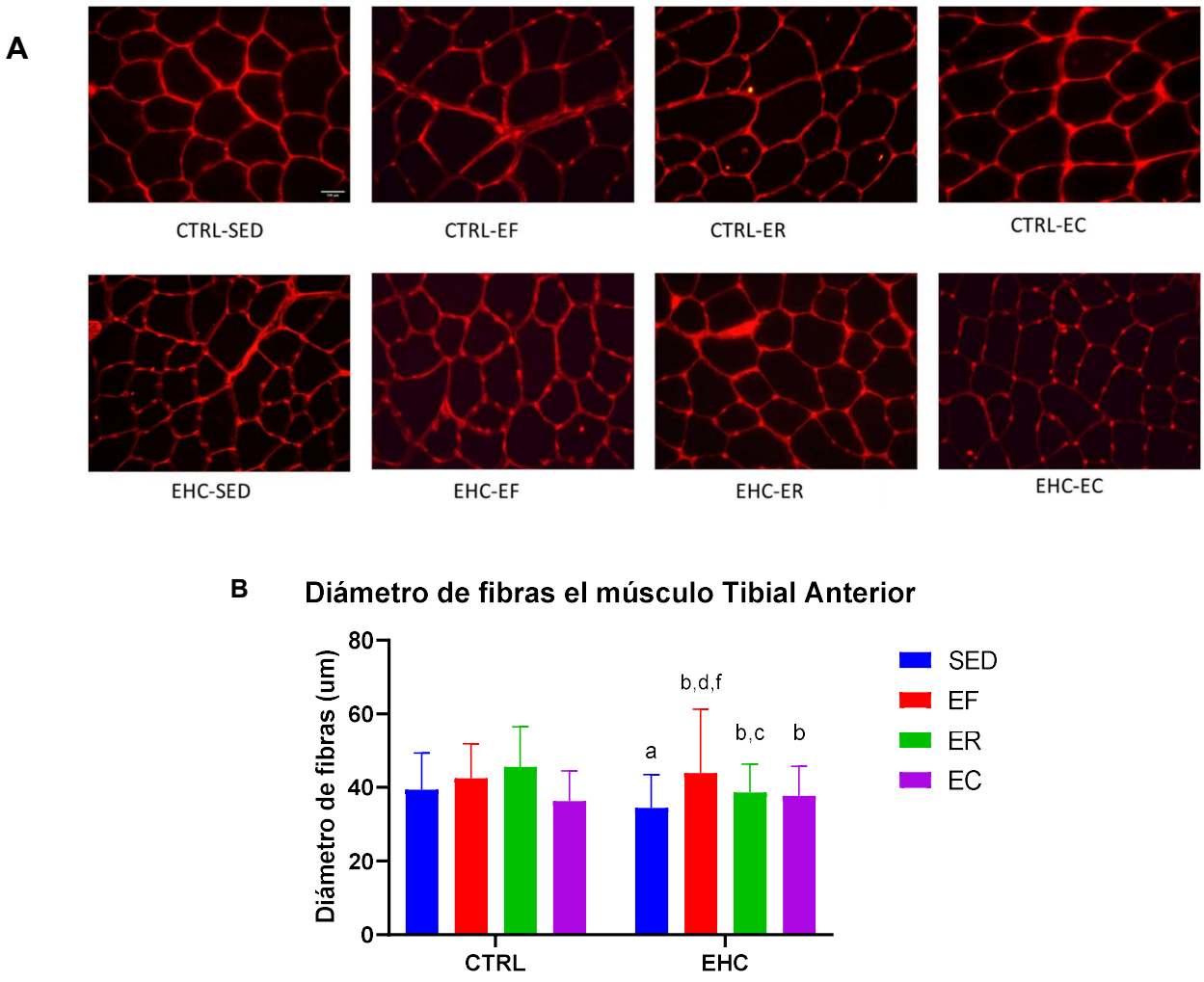


Figura 10. EF, ER y EC previenen la caída del diámetro de las fibras musculares del Tibial Anterior en animales con EHC

(A) Tinción de *Wheat germ agglutinin* (WGA) para determinar el diámetro de las fibras musculares del músculo Tibial Anterior (TA) en los grupos sanos (CTRL) y con EHC, sedentarios (SED) y con entrenamiento de fuerza (EF), entrenamiento de resistencia (ER) y entrenamiento combinado (EC). (B) Cuantificación del diámetro de las fibras musculares del TA de animales control y con EHC. En los animales con EHC, el EF, ER y EC previenen la caída en el diámetro de las fibras musculares del TA. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=5-6 animales por condición. Barra de escala igual a 100 µm. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{b}EHC-SED; ^{c}CTRL-ER; ^{d}EHC-ER; ^{f}EHC-EC.

Posteriormente, los diámeros de las fibras musculares las graficamos como frecuencias acumuladas expresadas en porcentaje (%) de fibras del SOL y del TA según rangos de diámetro en micrómetros (µm). Al respecto, en el caso del SOL, observamos que en animales sedentarios sanos (CTRL-SED) el 50% de las fibras aproximadamente, se encuentran en rangos inferiores a 40 µm de diámetro, en tanto en animales sedentarios enfermos (EHC-SED), el 90 % de las fibras se encuentran bajo 40 µm de diámetro. Cuando analizamos el comportamiento de los porcentajes de las fibras del SOL de animales con EHC que realizaron EF, ER y EC, encontramos que el porcentaje de fibras con diámetros bajo 40 µm baja de 90 % aproximadamente a 78 % con EF y ER y a 82 % con EC, por lo tanto la prevención es de un 12 % con EF y ER y 8 % con EC (Figura 11).

En el caso del TA, se puede apreciar que, en animales CTRL-SED el 39% de las fibras aproximadamente se encuentran en rangos inferiores a 40 µm de diámetro, en tanto en animales EHC-SED el 72 % de las fibras se encuentran bajo 40 µm de diámetro. Cuando analizamos el comportamiento de los porcentajes de las fibras del TA de animales con EHC que realizaron EF, ER y EC, encontramos que el % de fibras con diámetros bajo 40 µm disminuye de 72 % a 52 % con EF, a 60 % con ER y a 68 % con EC, por lo tanto la prevención es de aproximadamente 20 % con EF, 8 % con ER y 4 % con EC (Figura 12).

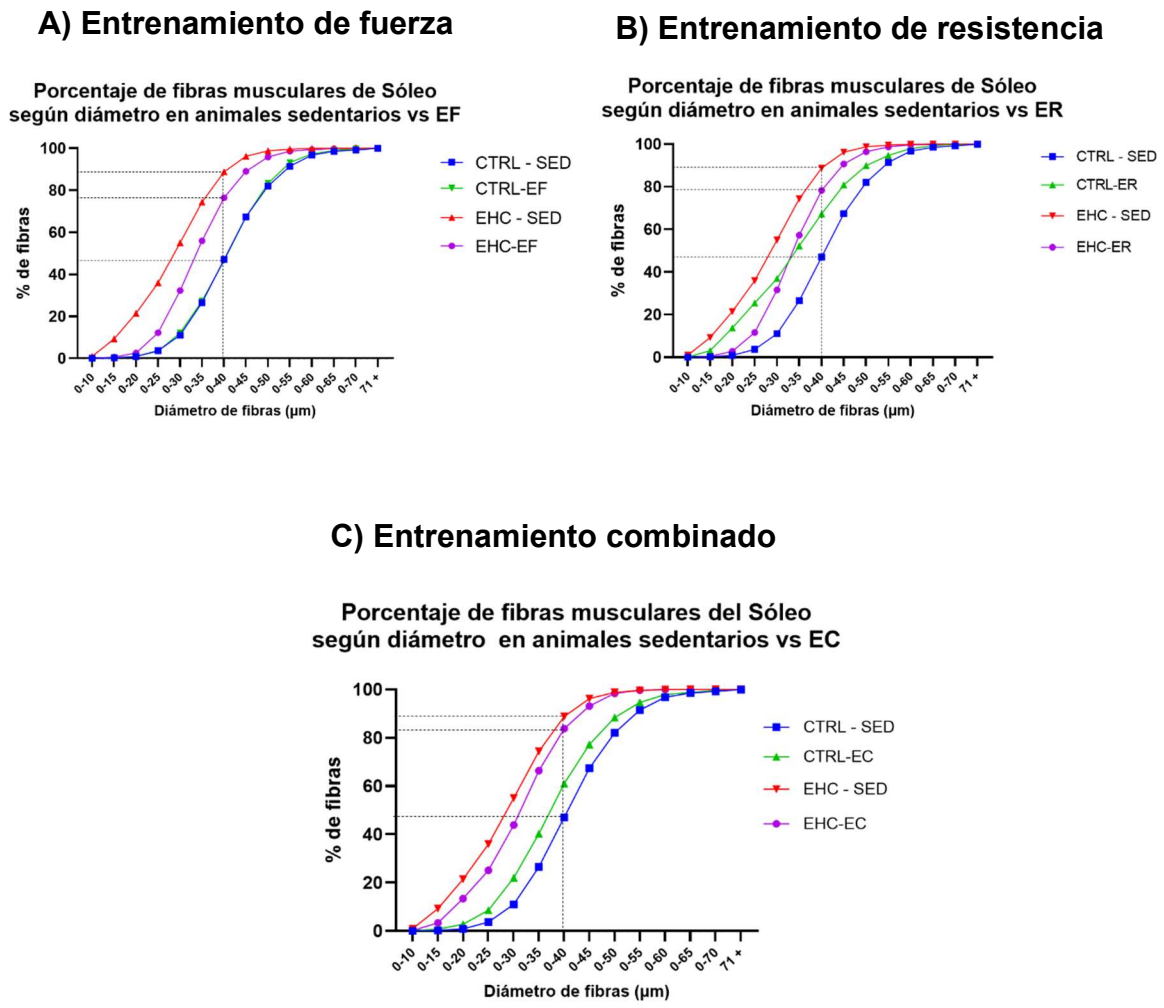
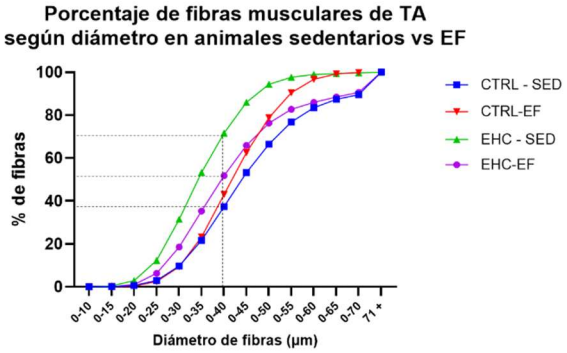


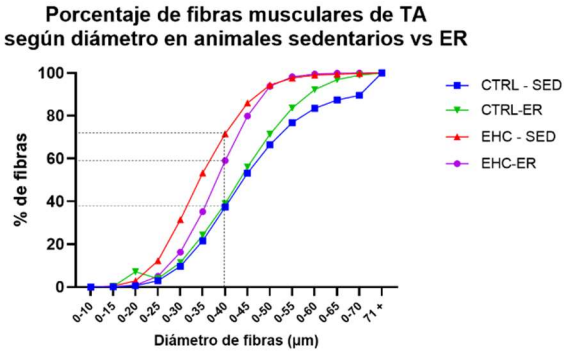
Figura 11. EF, ER y EC previenen la disminución en el diámetro de fibras musculares del Sóleo en ratones con EHC

Frecuencia acumulada de abundancia de fibras musculares en el Sóleo (SOL) según rango de diámetro y expresada en porcentaje (%) en ratones CTRL y con EHC, sin entrenamiento (SED) y con EF (A), ER (B) y EC (C). Valores expresados en promedio ± error estándar. n=5-6 animales por condición.

A) Entrenamiento de fuerza



B) Entrenamiento de resistencia



C) Entrenamiento combinado

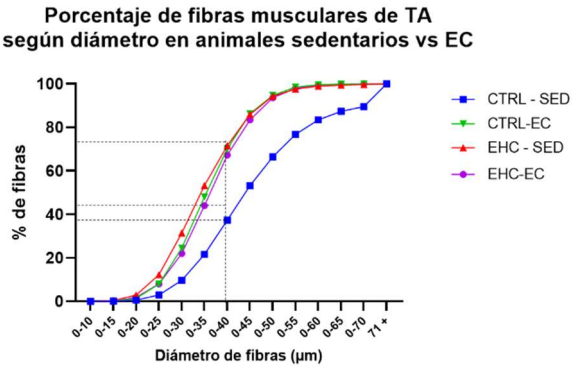


Figura 12. EF, ER y EC previenen la disminución en el diámetro de fibras musculares del Tibial Anterior en ratones con EHC

Frecuencia acumulada de abundancia de fibras musculares en el Tibial Anterior (TA) según rango de diámetro y expresada en porcentaje (%) en ratones CTRL y con EHC, sin entrenamiento (SED) y con EF (A), ER (B) y EC (C). Valores expresados en promedio ± error estándar. n=5-6 animales por condición.

Finalmente, observamos el efecto de los entrenamientos físicos sobre los **niveles de dos proteínas** estructurales del sarcómero (Troponina y MHC) y una proteína representativa de la vía de síntesis de proteínas musculares (p70S6K).

En relación con el nivel de Troponina en animales con EHC, identificamos que el EF tuvo un efecto preventivo de la caída en los niveles de esta proteína de 219 %, el ER de 231 % y el EC de 252,2 %, sin identificar diferencias en el efecto preventivo de los tres tipos de entrenamiento físico (Figura 13). En cuanto a los niveles de la proteína MHC, el efecto preventivo del EF fue de 175 %, el ER de 369 % y el EC de 214,2 %, sin diferencias estadísticas entre sí (Figura 14). Finalmente, el efecto preventivo de la caída en los niveles de la proteina p70S6K total animales con EHC, fue de 304,3 % con EF, 306 % con ER y de 598,1 % con EC, sin diferencias estadísticas entre sí (Figura 15).

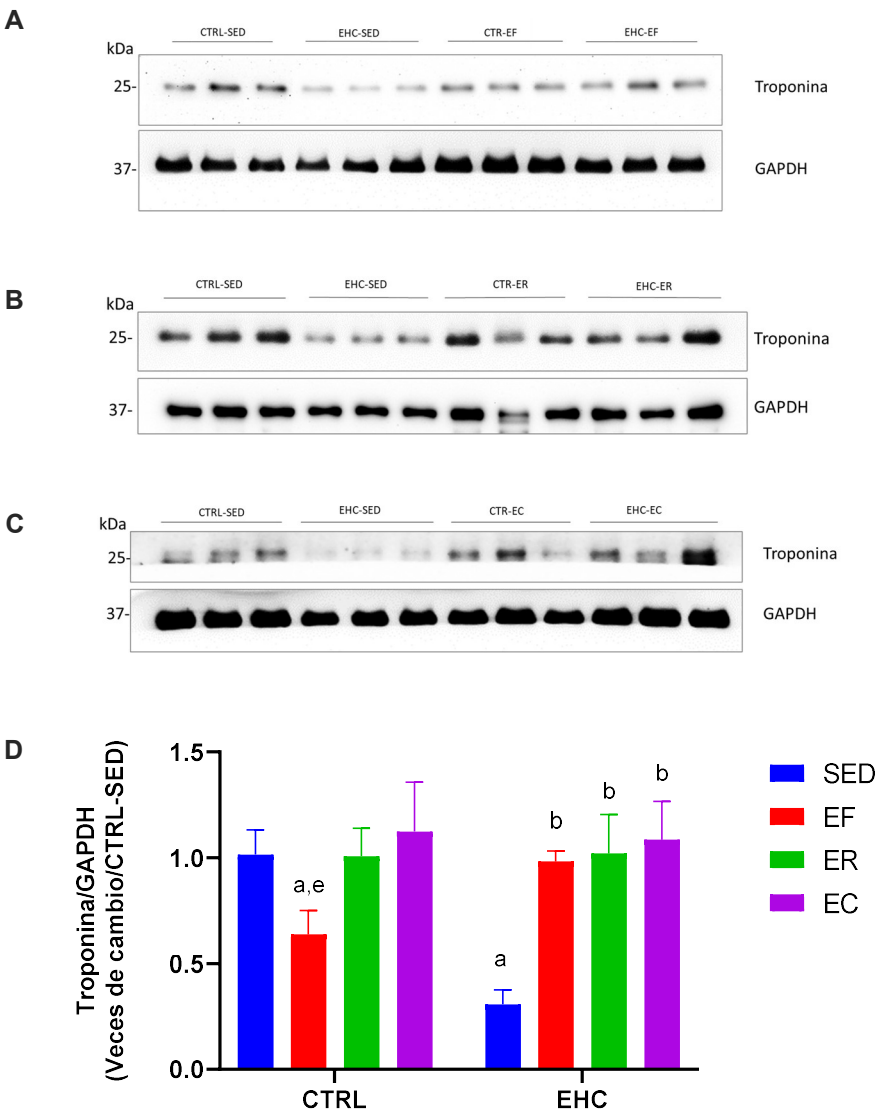


Figura 13. EF, ER y EC previenen la disminución del nivel de Troponina del TA en EHC

(A) Nivel de Troponina del TA de animales sedentarios y entrenados con EF, tanto sanos como con EHC. (B) Nivel de Troponina del TA de animales sedentarios y entrenados con ER, tanto sanos como con EHC. (C) Nivel de Troponina del TA de animales sedentarios y entrenados con EC, tanto sanos como con EHC. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=3 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [b]EHC-SED; [e]CTRL-EC.

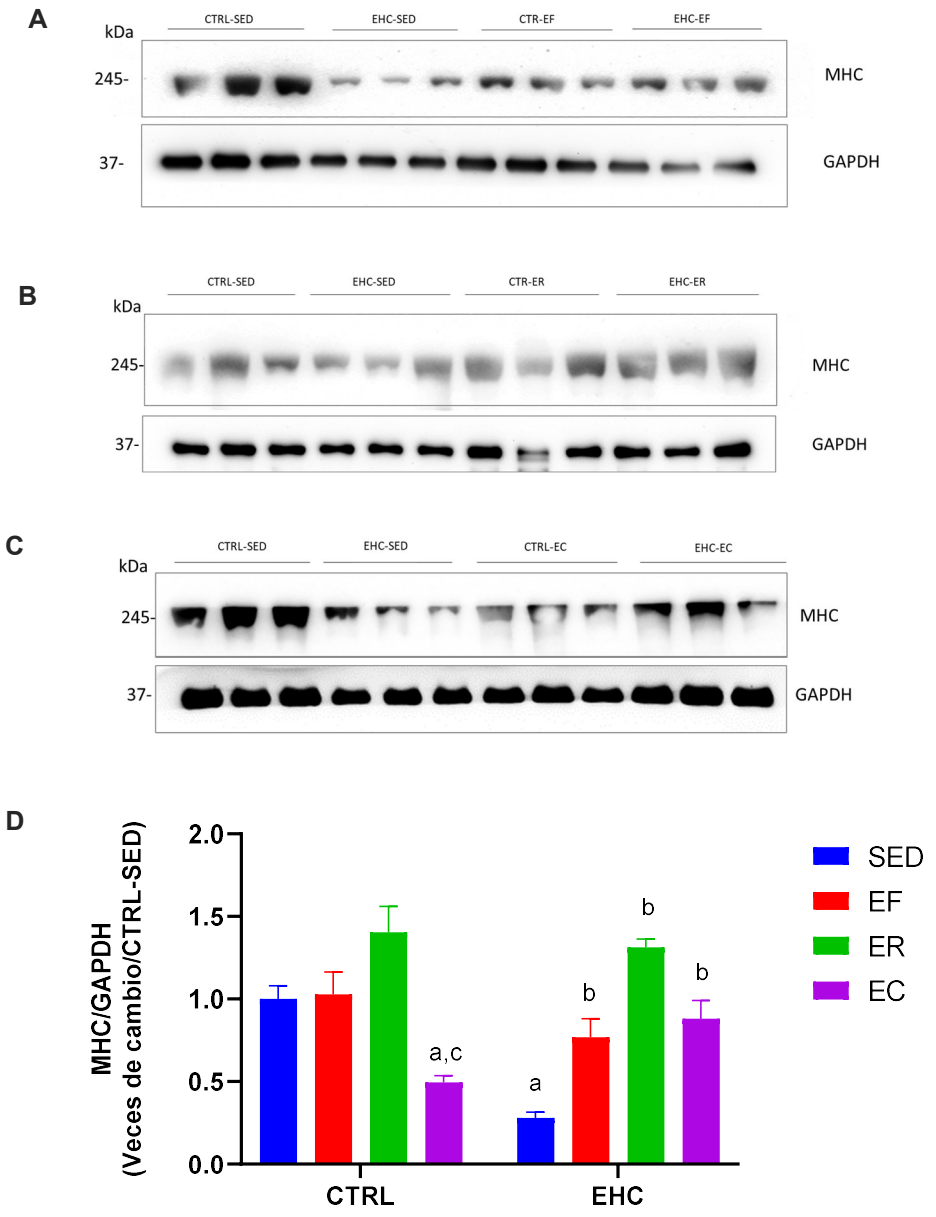


Figura 14. EF, ER y EC previenen la disminución del nivel de MHC del TA en animales con EHC

(A) Nivel de MHC del TA de animales sedentarios y entrenados con EF, tanto sanos como con EHC. (B) Nivel de MHC del TA de animales sedentarios y entrenados con ER, tanto sanos como con EHC. (C) Nivel de MHC del TA de animales sedentarios y entrenados con EC, tanto sanos como con EHC. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=3 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [b]EHC-SED; [c]CTRL-ER.

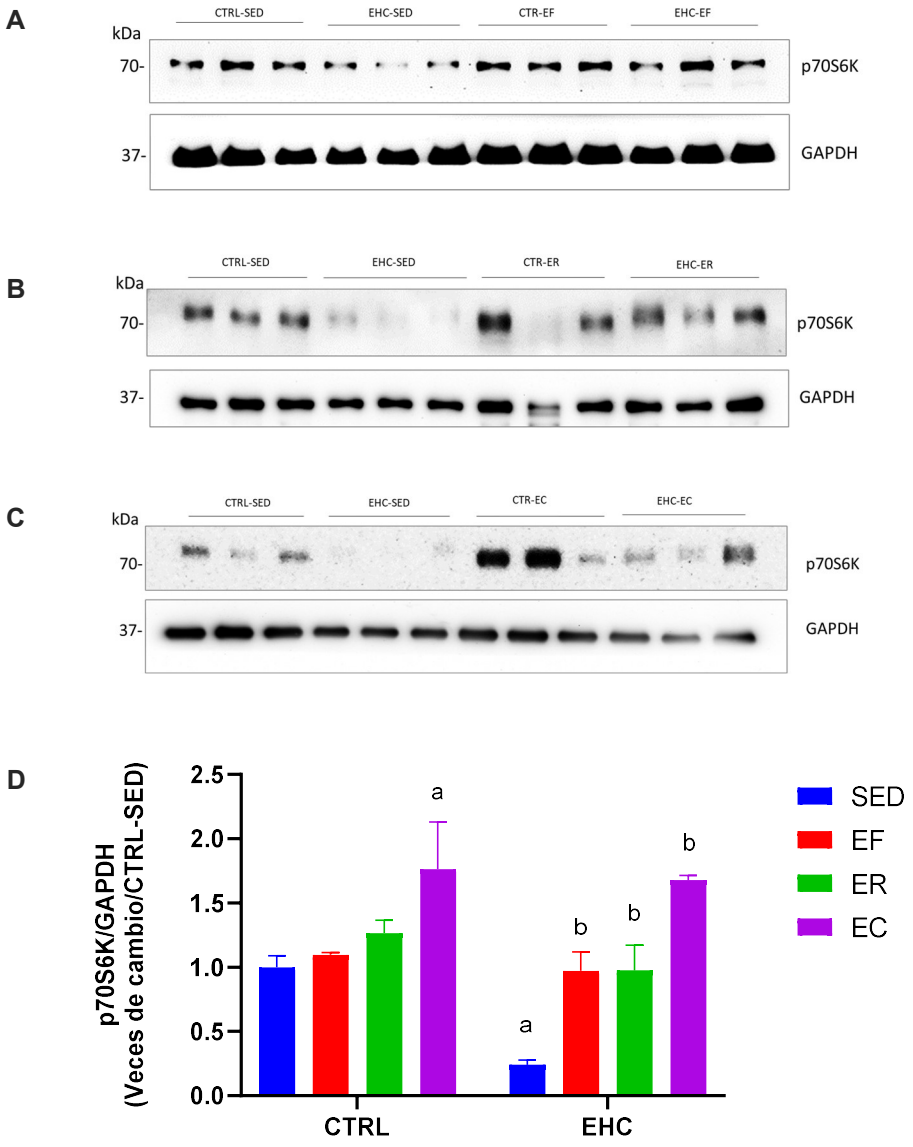


Figura 15. EF, ER y EC previenen la disminución del nivel de p70S6K total del TA en animales con EHC

A) Nivel de p70S6K del TA de animales sedentarios y entrenados con EF, tanto sanos como con EHC. (B) Nivel de p70S6K del TA de animales sedentarios y entrenados con ER, tanto sanos como con EHC. (C) Nivel de p70S6K del TA de animales sedentarios y entrenados con EC, tanto sanos como con EHC. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=3 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [b]EHC-SED.

Resumen objetivo específico 2

En cuanto a la masa muscular, se evaluó la composición corporal mediante bioimpedancoometría (BIA) para determinar la masa muscular y la masa grasa de los animales de los grupos experimentales, así como la masa de los músculos de las patas traseras (TA, SOL, GA y EDL). También se evaluó el diámetro de los músculos Sóleo (SOL) y Tibial Anterior (TA) y se determinó el nivel de proteínas del sarcómero (Troponina y MHC), así como una proteína representativa de la vía de síntesis de proteínas musculares (p70S6K total).

Con relación a la composición corporal evaluada mediante BIA, no se observó un efecto preventivo del entrenamiento físico de fuerza, resistencia o combinado en la masa muscular de los animales con EHC al finalizar la intervención experimental (Tabla 5). La disminución de la masa grasa fue prevenida solo por EC en animales con EHC (Tabla 5).

En cuanto a la masa de los músculos de las patas traseras de los animales con EHC, el EF y EC previenen la pérdida de la masa muscular del músculo TA, en tanto el ER y el EC previene la pérdida de peso del SOL (Tabla 4). Los 3 tipos de entrenamiento previenen la pérdida de la masa muscular del GA y en el caso del EDL, solo el EF previene la caída del peso (Tabla 5).

Respecto al diámetro de las fibras del músculo SOL, tanto el EF, ER y EC previenen la disminución del diámetro de las fibras musculares que caracteriza la EHC, sin diferencias entre sí (Tabla 5 y Figura 9). Un comportamiento similar, observamos respecto a la disminución del diámetro de las fibras del TA, donde los 3 tipos de entrenamiento previenen la disminución del diámetro de las fibras del TA, pero en mayor medida lo hace el EF (Tabla 5 y Figura 10).

Finalmente, en cuanto a los niveles de proteínas Troponina y MHC del músculo TA, se ven disminuidos en EHC y tanto el EF como el ER y el EC, sin diferencias entre sí, previenen dicha disminución (Figuras 13 y 14). En el caso de p70S6K total, una

proteína representativa de la vía de síntesis de proteínas musculares también disminuye sus niveles en animales con EHC, lo cual es prevenido tanto por EF como ER y EC, sin diferencias entre sí (Figura 15).

En base a la información obtenida respecto a la pérdida de la masa muscular en animales con EHC, los tres tipos de entrenamiento indican un efecto preventivo. Es fundamental eso sí, considerar el método de evaluación de la masa muscular utilizado, ya que si bien no obtuvimos un efecto preventivo del entrenamiento físico en la pérdida de la masa muscular y la masa grasa de los animales con EHC evaluada mediante BIA, este resultado puede ser influenciado por las limitaciones del instrumento asociadas a la menor sensibilidad de éste cuando existe edema periférico y ascitis (que son características de la EHC y que muy probablemente los animales de esta investigación también presenten). Por ello, los resultados de la masa de los músculos de las patas traseras, así como el diámetro de fibras musculares y los niveles de proteínas estructurales del sarcómero y de la ruta de síntesis de proteínas musculares, son indicadores confiables del efecto preventivo de los entrenamientos físicos aplicados en esta investigación sobre la pérdida de la masa muscular que caracteriza la EHC.

5.3 Objetivo 3. Determinar y comparar el efecto de los entrenamientos de fuerza, de resistencia y combinado sobre <u>función física</u> del músculo esquelético sarcopénico en un modelo murino de EHC

El tercer parámetro o criterio de la sarcopenia secundaria a EHC es la disminución de la función física relacionada a la movilidad.

En esta investigación, evaluamos la función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo. La movilidad de alto esfuerzo la evaluamos mediante la prueba de carrera hasta el agotamiento en *treadmill,* donde determinamos la distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera. La movilidad de moderado esfuerzo la determinamos mediante un protocolo acelerado en Rotarod donde identificamos el número de caídas desde el cilindro y el tiempo que el animal permanece sobre éste. Finalmente, la movilidad de bajo esfuerzo, la identificamos mediante la distancia que los animales recorren espontáneamente en la caja del *Open Field test*.

En primer lugar, determinamos el efecto del entrenamiento físico y de la hepatotoxina DDC, además de su interacción, sobre la variable dependiente, que en este caso corresponde a la función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo (Tabla 6). Al respecto, en cuanto a la distancia, velocidad y tiempo máximos de carrera, la hepatotoxina DDC y el entrenamiento físico tienen un efecto por separado, indicando que los efectos sobre la función física de alto esfuerzo son independientes entre sí, es decir, no hay inhibición ni sinergia entre ellos. En el caso del número de caídas desde el cilindro del Rotarod, el tiempo que los animales se mantienen sobre el cilindro y la distancia que recorren de forma espontánea en la caja del Open Field Test, existe un efecto mayor cuando interactúa el entrenamiento físico y la hepatotoxina DDC, por lo tanto, ambos factores potencian su efecto sobre estas variables.

Tabla 6. Efecto de la EHC, del entrenamiento físico y la interacción entre ambos sobre la función física		
Distancia máxima de carrera	**% variación total**	**Valor p**
Interacción	1,70	0,3827
EHC	6,80	0,0008*
Entrenamiento físico	57,14	<0,0001*
Velocidad máxima de carrera		
Interacción	3,39	0,1029
EHC	7,19	0,0005*
Entrenamiento físico	55,6	<0,0001*
Tiempo máximo de carrera		
Interacción	3,64	0,0836
EHC	7,43	0,0004*
Entrenamiento físico	55,3	<0,0001*
Número de caídas desde el cilindro del Rotarod		
Interacción	29,33	0,0002*
EHC	0,68	0,4385
Entrenamiento físico	28,82	0,0002*
Tiempo sobre el cilindro del Rotarod		
Interacción	21,80	0,0032*

EHC	0,46	0,5588
Entrenamiento físico	25,90	0,0012*
Distancia recorrida espontáneamente		
Interacción	20,99	0,0158*
EHC	1,72	0,327
Entrenamiento físico	23,75	0,0093*
Nivel de significancia estadística (*) p<0,05 con intervalo de confianza del 95 %. Diferencia determinada mediante ANOVA de 2 vías con test de Tuckey post hoc. EHC: enfermedad hepática crónica.		

En segundo lugar, confirmamos que los animales con EHC tenían una menor función física que aquellos animales sanos (CTRL). Para ello calculamos el porcentaje de cambio de la distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera, así como del número de caídas y tiempo sobre el cilindro del Rotarod y la distancia que caminan espontáneamente los animales sedentarios con EHC respecto al grupo sedentario sano.

En relación con la distancia máxima de carrera, identificamos que los animales sedentarios con EHC, presentan una distancia de carrera 58 % más baja que los animales sedentarios sanos, así como también la velocidad de carrera es 32 % menor y el tiempo máximo de carrera es 47 % más bajo (Tabla 7 y Figura 16). En cuanto a la movilidad de moderado esfuerzo, los animales con EHC, se caen 46 % más que aquellos sedentarios sanos y permanecen un 42 % menos de tiempo sobre el cilindro del Rotarod (Tabla 7 y Figura 17). Respecto a la movilidad de bajo esfuerzo, los animales con EHC sedentarios caminan espontáneamente un 55 % menos distancia que aquellos sedentarios sanos (Tabla 7 y Figura 18). Con estos resultados, confirmamos que los animales con EHC presentan pérdida de la función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo.

Tabla 7. Función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo de animales sanos y con EHC, sedentarios y con EF, ER y EC

	SED		EF		ER		EC	
	CTRL	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**
Distancia máxima de carrera (cm)	113,2 ± 36,7	46,7 ± 28,7[a]	122 ± 30,1[c]	84,8 ± 30,5[d,f]	217,8 ± 70,8[a]	191,8 ± 51,2[b]	177,3 ± 18,3[a]	160,3 ± 20[b]
Velocidad máxima de carrera (cm/s)	27 ± 5,1	18,2 ± 5[a]	28,1 ± 4[c]	23 ± 5,1[d,f]	37 ± 5,4[a]	35,4 ± 5[b]	34,3 ± 2,4	32,7 ± 2,3[b]
Tiempo máximo de carrera (s)	614 ± 136	324 ± 181[a]	666 ± 111,2[c]	514 ± 156[d,f]	956,2 ± 192,2[a]	882 ± 147,2[b]	836 ± 118,2	801 ± 63,3[b]
Número de caídas (N°)	11,2 ± 3,1	16,2 ± 2,4[a]	10,2 ± 1,7[e]	10,2 ± 2,7[b]	10 ± 2,4[e]	7,7 ± 2[b]	16,4 ± 2	9,8 ± 3,3[b,e]
Tiempo sobre el cilindro (s)	190 ± 22,4	111 ± 10,4[a]	212 ± 26,1	213 ± 27,2[b]	185,4 ± 42	223,2 ± 35,4[b]	181 ± 37,2	198 ± 47,4[b]
Distancia recorrida espontáneamente (cm)	1.551 ±157,1	700 ± 274,6[a]	1.405 ± 420	1.626 ± 246,1[b]	1.801,3 ± 368,2	1.668 ± 688[b]	1.134,3 ± 524,4	1.396 ± 223

Unidades: centímetros (cm) para distancia máxima de carrera, centímetros/segundo (cm/s) para velocidad máxima de carrera, segundos (s) para tiempo máximo de carrera, número de caídas (N°) desde el cilindro del Rotarod, segundos (s) para tiempo sobre el cilindro del Rotarod y centímetros (cm) para la distancia recorrida espontáneamente en la caja del Open Field test. CTRL: control; EHC: enfermedad hepática crónica; EF: entrenamiento de fuerza; ER: entrenamiento de resistencia; EC: entrenamiento combinado. Valores expresados en promedio ± desviación estándar. n=4-13 animales por condición. Nivel de significancia estadística p<0,05 con intervalo de confianza del 95%. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías con test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [b]EHC-SED; [c]CTRL-ER; [d]EHC-ER; [e]CTRL-EC; [f]EHC-EC.

En tercer lugar, debíamos confirmar que el ER aumentaba la capacidad de carrera de los animales más que el EF y EC con el objetivo de validar el modelo de entrenamiento de resistencia utilizado en esta investigación (235, 237). Para ello comparamos los animales sanos (CTRL) que recibieron EF, ER y EC con los animales sedentarios sanos y calculamos el porcentaje de cambio. Nuestros resultados indican que, al evaluar con la prueba de carrera hasta el agotamiento, el ER aumentó en un 92 % la distancia máxima de carrera, en un 38 % la velocidad máxima de carrera y en un 56 % el tiempo máximo de carrera. El EC por su parte, aumentó 57 %, 28 % y 36 % la distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera respectivamente, en tanto el EF produjo un cambio en las variables mencionadas de 8 %, 5 % y 8,4 % respectivamente, porcentajes que no aumentaron significativamente la distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera en animales sanos (ver tabla 7 y Figura 16). Con estos resultados confirmamos que el ER aumenta la capacidad máxima de carrera de los animales sanos y que el EC, debido al componente de resistencia, produce un efecto similar, aunque con porcentajes menores. El EF no tiene un efecto significativo en el aumento de la capacidad máxima de carrera en animales sanos.

En cuarto y último lugar, debíamos determinar que en aquellos animales con EHC, el entrenamiento físico (EF, ER o EC), tuvo un efecto preventivo sobre la pérdida de la función física que caracteriza la patología. Para ello calculamos el porcentaje de cambio de los grupos con EHC entrenados respecto al grupo con EHC sedentario e hicimos las comparaciones tal como se observa en la Tabla 7 y Figura 16, 17 y 18.

Al respecto, en la función física relacionada a la **movilidad de alto esfuerzo**, el ER y EC previenen la caída de la distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera en animales con EHC. Al analizar en detalle estos datos, observamos que el ER previene en 310 % la disminución de la distancia máxima de carrera, en 94 % la caída de la velocidad máxima de carrera y en 172 % la caída del tiempo máximo de carrera. El EC por su parte, previene en 243 %, 79 % y 147 % la caída de la distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera en animales enfermos, respectivamente. El EF, a pesar de tener porcentajes de 81,5 %, 26 % y 59 %, no tuvo un efecto preventivo significativo

en los parámetros de distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera en animales enfermos (ver significancias en Tabla 7 y Figura 16).

En la función física relacionada a la **movilidad de moderado esfuerzo**, tanto EF, ER y EC mostraron un efecto preventivo en el número de caídas desde el cilindro del Rotarod, así como en el tiempo que los animales con EHC permanecen sobre este. Respecto al número de caídas desde el cilindro, el EF disminuyó el número de caídas en 35 %, el ER lo hizo en 53 % y el EC en 40 %. En cuanto al tiempo que los animales se mantuvieron sobre el cilindro, el EF aumentó este tiempo en 92 %, el ER en 101 % y el EC en 78 %. Estos resultados indican una prevención de la disminución en la movilidad de moderado esfuerzo que caracteriza los animales con EHC, tanto con EF, como con ER y EC (ver significancias en Tabla 7 y Figura 17).

Finalmente, en cuanto a la función física relacionada a la **movilidad de bajo esfuerzo**, el EF y ER, previenen la disminución de la distancia que los animales caminan espontáneamente. Al respecto, la distancia recorrida por los animales aumentó en 132 % con EF y 138 % con ER, en tanto, con EC el aumento fue de 98 % respecto a los animales con EHC sedentarios. En el caso del EC, a pesar de mostrar aumento en el porcentaje de distancia recorrida, los resultados no son estadísticamente significativos (ver diferencias estadísticas en Tabla 7 y Figura 18). Estos resultados indican que el EF y ER previenen la disminución de la distancia que caminan espontáneamente los animales con EHC.

Considerando estos resultados, los tres tipos de entrenamiento muestran un efectos preventivo sobre la disminución de la función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo, pero es necesario considerar que la pérdida de la movilidad de alto esfuerzo es prevenida por ER y EC, pero no por EF y la movilidad de bajo esfuerzo por EF y ER, pero no por EC.

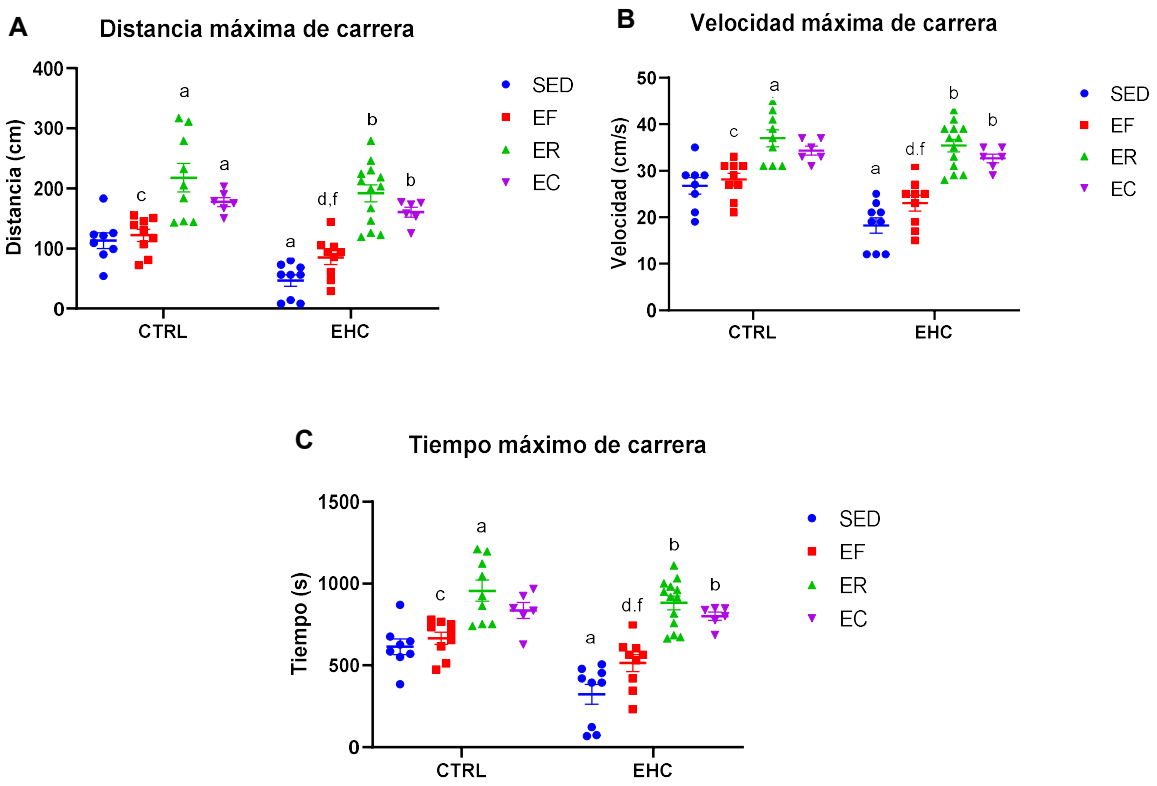


Figura 16. ER y EC, pero no EF previenen la disminución de la función física asociada a la movilidad de alto esfuerzo en EHC

(A) Distancia, (B) velocidad y (C) tiempo máximo de carrera de los animales con EHC sedentarios (SED), con entrenamiento de fuerza (EF) y entrenamiento de resistencia (ER), con entrenamiento combinado (EC), así como los animales sanos (CTRL), luego de 6 semanas de intervención. Valores expresados en promedio ± error estándar. Función física de alto esfuerzo evaluada mediante una prueba de carrera incremental maximal en *treadmill*. n=6-13 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y Test de Tukey post hoc. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{b}EHC-SED; ^{c}CTRL-ER; ^{d}EHC-ER; ^{f}EHC-EC.

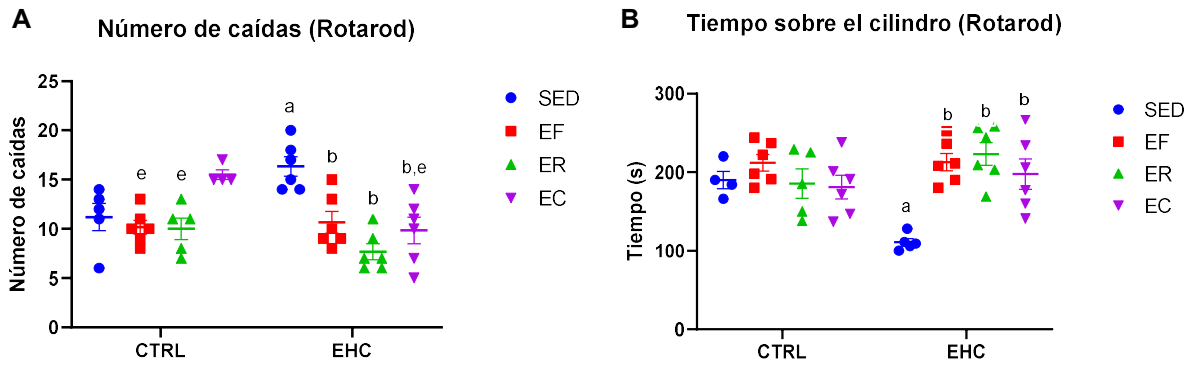


Figura 17. EF, ER y EC previenen la disminución de la función física asociada a la movilidad de moderado esfuerzo en EHC

(A) número de caídas y (B) tiempo sobre el cilindro del Rotarod en animales con EHC sedentarios (SED), con entrenamiento de fuerza (EF), entrenamiento de resistencia (ER) y con entrenamiento combinado (EC), así como animales sanos (CTRL). Valores expresados en promedio ± error estándar. n=5-6 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y Test de Tukey post hoc. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{b}EHC-SED; ^{e}CTRL-EC.

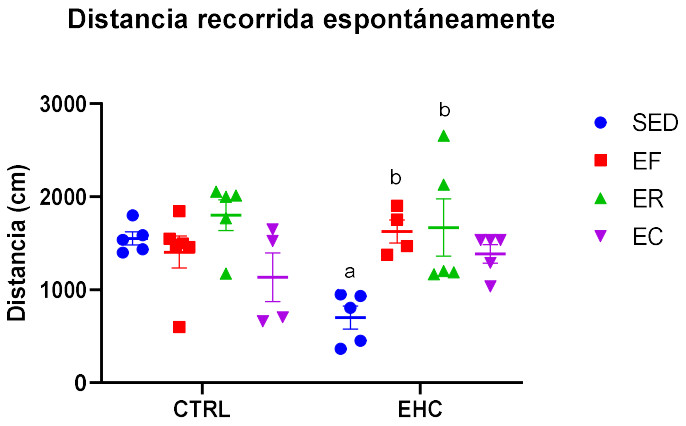


Figura 18. EF y ER, pero no EC previenen la disminución de la función física asociada a la movilidad de bajo esfuerzo en EHC

Distancia recorrida espontáneamente por los animales con EHC sedentarios (SED), con entrenamiento de fuerza (EF), entrenamiento de resistencia (ER) y entrenamiento combinado (EC), así como los animales sano (CTRL). Tanto el EF como el ER previenen la disminución de la movilidad de bajo esfuerzo en animales con EHC, no así el EC. Valores expresados en promedio ± error estándar. n=4-5 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y Test de Tukey post hoc. Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [b]EHC-SED.

Resumen Objetivo Específico 3

Respecto a la función física asociada a la movilidad, los resultados son diferentes en base al nivel de esfuerzo de la movilidad evaluada.

En cuanto a la movilidad de alto esfuerzo evaluada mediante una prueba de carrera hasta el agotamiento, el ER y EC, sin diferencias entre sí, pero no el EF previenen la pérdida de la capacidad máxima de carrera que caracteriza la EHC (manifestada en la distancia, la velocidad y el tiempo máximo de carrera de los animales) (Tabla 7 y Figura 16).

En relación con la función física asociada a la movilidad de moderado esfuerzo, los 3 tipos de entrenamiento (EF, ER y EC), sin diferencias entre sí, previenen el aumento en el número de caídas y la disminución del tiempo sobre el cilindro del Rotarod que caracteriza la EHC (Tabla 7 y Figura 17).

Finalmente, en cuanto a la función física asociada a la movilidad de bajo esfuerzo, EF y ER, sin diferencias entre sí, pero no EC, previenen la disminución de la distancia que los animales recorren espontáneamente en la caja del Open Field test que caracteriza la EHC (Tabla 7 y Figura 18).

Considerando estos resultados, los tres tipos de entrenamiento muestran un efectos preventivo sobre la disminución de la función física relacionada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo, pero este efecto preventivo depende del nivel del esfuerzo evaluado.

5.3 Otros parámetros de la Enfermedad hepática crónica

Para que la hepatotoxina 5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) induzca EHC y de acuerdo a lo reportado previamente por nuestro laboratorio (36), deben ocurrir cambios estructurales en el hígado (hepatomegalia), así como el aumento en los ácidos biliares. Al respecto nuestros resultados indican:

Hepatomegalia: en la Tabla 8 y Figura 19 se observa el aumento de aproximadamente del doble del peso del hígado de los animales sedentarios con EHC respecto a los animales del grupo control sedentario. La hepatomegalia es una de las alteraciones que permiten caracterizar y confirmar el daño hepático inducido por la hepatotoxina DDC. Este aumento del peso del hígado podría deberse a la inflamación crónica del órgano, dilatación de los conductos biliares, tapones de protoporfirina, así como a un cambio progresivo en el tejido hepático debido a fibrosis y cirrosis que puede afectar el tamaño y peso del órgano (232, 252). Al analizar lo que ocurre con el peso del hígado al realizar entrenamiento físico (EF, ER y EC), no se observan cambios en animales con EHC, manteniéndose la hepatomegalia observada en animales con EHC sedentarios, a pesar de haber realizado entrenamiento físico (Tabla 8 y Figura 19).

Aumento de la concentración de ácidos biliares en suero: en la Tabla 8 y Figura 20 se observa la concentración de ácidos biliares de animales sedentarios sanos y con EHC. Luego de las 6 semanas de intervención con dieta suplementada con hepatotoxina DDC, se observa un aumento significativo de la concentración de ácidos biliares séricos en animales con EHC-SED respecto a los animales control (CTRL-SED) que caracteriza el modelo de EHC inducida por hepatotoxina DDC. Estos resultados fueron anteriormente reportados por nuestro laboratorio (36). Al analizar si el EF, ER o EC modifican la concentración de ácidos biliares en suero en animales con EHC, identificamos que permanecen elevados independiente de haber realizado entrenamiento físico. Se observa que los grupos EHC-ER y EHC-EC no presentan

diferencias estadísticas respecto a sus respectivos controles, lo que podría deberse a las elevadas desviaciones estándar que presentan.

En base a la información mencionada, podemos sugerir que el EF, ER y EC no tienen un efecto sobre el peso del hígado ni sobre la concentración de ácidos biliares en animales con EHC.

Tabla 8. Peso del hígado y niveles de ácidos biliares en suero en animales sanos y con EHC, sedentarios y con EF, ER y EC

	SED		EF		ER		EC	
	CTRL	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**
Peso del hígado (g)	70 ± 10,5	123 ± 20[a]	68 ± 8	115,4 ± 21,3[a,g]	64 ± 7,4	115,3 ± 35[a,c]	73 ± 7,4	133,1 ± 14[a,e]
Concentración de ácidos biliares en suero (µmol/L)	18 ± 9,8	231 ± 73[a]	15,5 ± 7	213 ± 69[g]	33,7 ± 24,5	165,1 ± 141,4	14,4 ± 5	109,1 ± 102,6

Unidades: gramos (g) para peso del hígado; micromol/litro (µmol/L) para la concentración de ácidos biliares en suero. CTRL: control; EHC: enfermedad hepática crónica; EF: entrenamiento de fuerza; ER: entrenamiento de resistencia; EC: entrenamiento combinado. Valores expresados en promedio ± desviación estándar. Valores expresados en promedio ± desviación estándar. n = 4-13 animales por condición para peso del hígado y n=3-5 animales por condición para la concentración de ácidos biliares en suero. Nivel de significancia estadística p<0,05 con intervalo de confianza del 95 %. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías con test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: [a]CTRL-SED; [c]CTRL-ER; [e]CTRL-EC; [g]CTRL-EF.

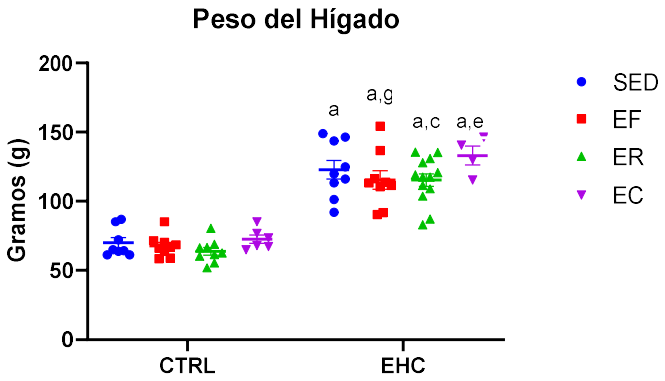


Figura 19. EF, ER y EC no previenen la hepatomegalia que caracteriza la EHC

Peso del hígado de animales sanos y con EHC, sedentarios (SED) y entrenados con entrenamiento de fuerza (EF), de resistencia (ER) y combinado (EC). (B) Valores expresados en promedio ± error estándar. n=8-9 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk *test*. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y Test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{c}CTRL-ER; ^{e}CTRL-EC; ^{g}CTRL-EF

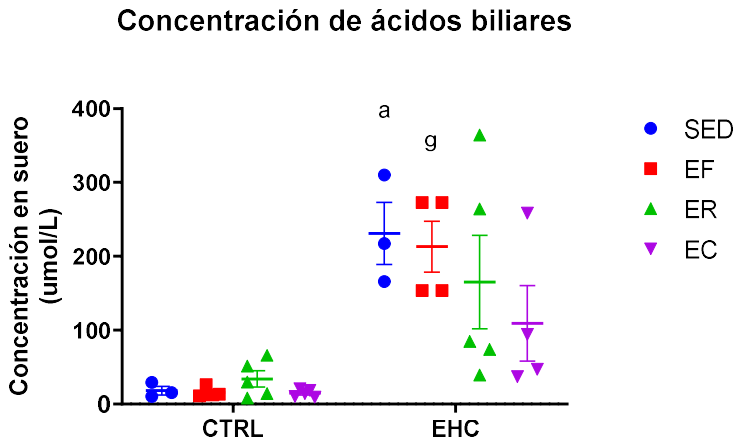


Figura 20. EF, ER y EC no previenen el aumento de la concentración de ácidos biliares en suero que caracteriza la EHC

Concentración de ácidos biliares en suero de los animales sanos y con EHC sedentarios (SED) y con entrenamiento físico de fuerza (EF), resistencia (ER) y combinado (EC). Valores expresados en promedio ± error estándar. n=3-5 animales por condición. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95 %. Normalidad de los datos determinada mediante Shapiro-Wilk test. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y Test de Tuckey post hoc. Diferencias respecto a: ^{a}CTRL-SED; ^{g}CTRL-EF.

6. Discusión

El objetivo de esta investigación fue comparar el efecto de los EF, ER y EC sobre la sarcopenia inducida por EHC en un modelo murino. Al respecto evaluamos el efecto de tres protocolos que abarcan los 3 tipos de entrenamiento más comunes sobre los criterios que determinan la sarcopenia, es decir, la fuerza muscular, la masa muscular y la función física relacionada a la movilidad. Nuestros resultados indican que tanto el EF, ER y EC tienen efectos preventivos en la sarcopenia secundaria a EHC de tipo colestásica en animales C57BL/6J.

6.1 Modelo de sarcopenia por EHC colestásica

En investigaciones previas de nuestro laboratorio, se describió la presencia de sarcopenia en un modelo de EHC colestásica en animales sedentarios, indicando alteraciones en parámetros hepáticos, pérdida de fuerza y masa muscular, así como también de la actividad física (35, 36). Al respecto, en un trabajo de Campos et al. en 2018, se determinó la presencia de elevados niveles de ácidos biliares y enzimas hepáticas en plasma en animales con EHC, así como también disminución de la fuerza muscular de las patas delanteras y traseras de los animales y del Gastrocnemio (GA) evaluado mediante electrofisiología. En esa misma investigación, los autores observaron disminución del diámetro de las fibras musculares y transición en el tipo de fibras con menor proporción de fibras IIB y aumento de fibras I. También encontraron aumento de los niveles de proteínas de UPS (Murf-1 y Atrogina-1), así como disminución del nivel de MHC en el músculo GA. Los autores identificaron que los animales sedentarios con EHC, disminuyeron la actividad física, pero no la movilidad espontánea (36). Aguirre et al. en 2020, en una investigación sobre el efecto protector del péptido Angiotensina-(1-7) en EHC, también evaluaron animales sedentarios con EHC colestásica. Los resultados de esta tesis fueron similares a los de Campos en 2018, donde animales con EHC, disminuyeron la actividad física, la fuerza muscular y el diámetro de las fibras del GA. También observaron transición en el tipo de fibras musculares, aumento en el nivel de proteínas de UPS y disminución del nivel de MHC (35, 240). Otra tesis del laboratorio liderada por Abrigo et al. en 2020, también identificó

aumento de la actividad de UPS, así como disminución del diámetro de las fibras y transición de éstas en el músculo TA. Los animales también presentaron menor fuerza, masa muscular y actividad física (95).

Considerando lo anterior, replicamos el modelo de EHC colestásica ya publicado por nuestro laboratorio en los artículos de Campos, Aguirre y Ábrigo y confirmamos que el comportamiento del modelo se repite adecuadamente en los animales sedentarios de nuestra investigación, con niveles de ácidos biliares en plasma aumentados, disminución de la fuerza muscular de las patas delanteras y traseras, de la fuerza muscular aislada y de la masa muscular y la función física.

En EHC, el modelo de inducción de la patología mediante el uso de la hepatotoxina DDC suplementada en el alimento de los animales, es recomendado debido a que tiene bajo impacto en el bienestar del animal, es fácilmente reproducible y seguro, además induce la mayoría de las alteraciones que caracterizan la patología (252, 253). Su forma de acción es un taponamiento y obstrucción de los ductos biliares por cristales de protoporfirina, lo que acumula pigmentos en el lumen del árbol biliar entregando una coloración oscura al hígado y aumentando los ácidos biliares en plasma (253), tal como se observó en esta investigación. Este modelo es utilizado para reproducir no solo EHC de origen colestásico, sino que también para enfermedad hepática metabólica y esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica, aunque principalmente para determinar los efectos de la EHC colestásica (254). A diferencia del modelo de ligadura de los ductos biliares, donde tanto en ratas como en ratones las tasas de mortalidad son altas (debido a la fuga de bilis y posibles rupturas de la vesícula biliar); existen diferencias en los resultados obtenidos entre diferentes especies y cepas; y a que es un procedimiento invasivo, el modelo DDC es seguro y tiene baja mortalidad. Además, aplicar el modelo de ligadura de ductos biliares es procedimentalmente muy difícil de realizar en ratones y no produce cirrosis, a diferencia del modelo DDC donde se combina la toxina hepática en la dieta. Modelos genéticos como ratones ABCB4L/L, podrían ser una buena alternativa para estudiar EHC colestásica y fibrosis biliar, pero el acceso a la cepa de animales dificulta su

aplicación (255). Es importante considerar que ningún modelo animal a la fecha puede reproducir la totalidad de las alteraciones propias de la EHC en humanos, pero dentro de los modelos existentes de colestasis, el modelo DDC es uno de los más seguros y utilizados (252).

De esta forma podemos afirmar que el modelo de inducción de EHC mediante la hepatotoxina DDC es un modelo adecuado de EHC, robusto y seguro, con mínimas consecuencias para el bienestar del animal y fácilmente reproducible.

6.2 Modelo de entrenamiento físico

Con el fin de identificar posibles formas de tratar la sarcopenia secundaria a EHC y debido a la falta de investigaciones existentes en el tema, a la falta de consenso respecto al tratamiento más eficiente de ésta y a que a pesar de que se recomienda utilizar entrenamiento físico en EHC, no existe claridad respecto a la prescripción de éste, aplicamos protocolos de los tres tipos de entrenamiento más representativos actualmente descritos: EF, ER y EC de moderada intensidad con progresión a intensidad vigorosa en base a lo descrito en la literatura (157-159, 162, 172, 173, 235, 237) y comparamos sus efectos sobre los criterios de sarcopenia en EHC.

El EF no es habitualmente utilizado en EHC, así como la fuerza muscular no es evaluada en sujetos con la patología (17). Solo los trabajos de Aamann et al en 2020 en pacientes con cirrosis y de Aamann et al. en 2018 en ratas con EHC, aplicaron EF y sus resultados indicaron aumento de la fuerza muscular (163, 164). Nuestros resultados son similares a los de Aamann en animales, indicando que el EF tiene un efecto como era esperado, tanto en animales con EHC como en animales control (172, 173).

El ER tanto en sujetos sanos como con EHC, mejora la resistencia y tolerancia al esfuerzo, lo que se ha manifestado por el aumento de la capacidad aeróbica que determina una mejoría en la función física (228, 256). En modelos animales, ER en *treadmill* mejora la capacidad máxima de carrera (237). Nuestros resultados indican

una importante mejoría de la función física tanto en animales sanos como con EHC al aplicar ER en *treadmill*, coincidiendo con lo reportado en la literatura.

El EC a pesar de ser menos estudiado a la fecha, ha mostrado que aumenta la función física en pacientes con cirrosis hepática (185, 226, 227). La fuerza muscular no es habitualmente evaluada, aunque dos estudios han mostrado aumentos de ésta en pacientes con cirrosis hepática (230, 231). A pesar de ello, la evidencia es limitada aún respecto el efecto del EC sobre este criterio de sarcopenia (184, 228, 229).

Las características del entrenamiento físico utilizado (tiempo, progresión, series, repeticiones, intensidad y descansos), fueron decididas en base a las recomendaciones para el entrenamiento físico en pacientes con EHC (157-162), así como la información reportada en la literatura para el trabajo con animales tanto de fuerza (34, 173, 233, 234), como de resistencia (235, 236).

Considerando lo anterior, podemos decir que nuestro modelo de entrenamiento físico es efectivo en el aumento de la fuerza muscular y de la función física, siendo un método seguro para trabajar con animales.

6.3 Fuerza muscular

Nuestros resultados muestran un efecto preventivo tanto del EF como del ER y EC en la pérdida de la fuerza muscular que caracteriza la EHC. Evaluamos la fuerza en las patas delanteras y traseras de los animales, y los 3 tipos de entrenamiento físico lograron un efecto preventivo, sin diferencias entre sí. Estos resultados son importantes en el estudio del efecto del entrenamiento físico como tratamiento para la sarcopenia por EHC, ya que la fuerza muscular no es habitualmente evaluada en los estudios publicados en humanos y animales con EHC (17, 165, 167, 184), lo cual indica que al parecer es un criterio de sarcopenia que los investigadores suelen excluir. Solo un estudio en animales, realizado por Aamann et al en 2018, evalúa el efecto del entrenamiento físico sobre la fuerza muscular en ratas con EHC inducida ligando los ductos biliares. En dicho trabajo, los animales realizaron 18 sesiones de EF en *Ladder climb*, 5 días a la semana y cuya carga fue graduada en base a un porcentaje del peso

corporal desde 50% a 100%. Los autores evaluaron la fuerza muscular de los animales mediante una prueba de fuerza prensil y sus resultados muestran un aumento de la fuerza muscular de los animales con EHC entrenados respecto a los EHC sin entrenamiento (164). Estos resultados del trabajo de Aamann et al. son similares a nuestros resultados en cuanto a la prevención de la caída de la fuerza muscular en animales con EHC, a pesar de que en nuestra investigación la intensidad del EF y el componente de fuerza el EC fue hasta el 80% del peso corporal y no 100%. Esto indicaría que no es necesario trabajar al 100% del peso corporal para obtener resultados de prevención en la caída de la fuerza de animales con EHC.

Al comparar los resultados de la fuerza muscular con los 3 entrenamientos físicos, esperábamos una diferencia a favor del EF y el EC por sobre el efecto del ER, dados los efectos ampliamente conocidos de estos tipos de entrenamiento en el aumento de la fuerza muscular (83, 157, 177). Sin embargo, los 3 entrenamientos se comportaron de forma similar en cuanto a su efecto preventivo.

En cuanto al efecto preventivo sobre la pérdida de fuerza muscular secundaria a EHC observado al aplicar ER, podría ser explicado considerando que en sujetos sedentarios y con baja capacidad física, este tipo de entrenamiento puede producir un aumento de la masa y la fuerza muscular (177, 204-206). Probablemente esta sea la razón por la que el EC tuvo un comportamiento similar al ER, dado el predominio del componente de resistencia que aplicamos en esta investigación. Este aumento de la fuerza muscular con ER y EC podría deberse al aumento de flujo sanguíneo en el músculo esquelético, lo que lleva consigo aumento de mioglobina y disponibilidad de oxígeno muscular y con ello de energía, para la contracción muscular en animales que, en condiciones patológicas y de sedentarismo, se encuentran físicamente deteriorados (257-261). A nivel molecular, una posible causa de los efectos del ER sobre la fuerza muscular, podría ser el aumento en la expresión del gen PGC-1α, lo que favorecería una mayor síntesis de proteínas mitocondriales y de fibras tipo I (83, 199, 267) De todas formas, este es el primer antecedente que indica que el ER puede aumentar la fuerza muscular en animales con EHC, ya que en las investigaciones publicadas a la

fecha y que han aplicado ER, este criterio no es evaluado, como se ha mencionado anteriormente.

En cuanto al EF y considerando la evidencia existente en sarcopenia primaria y en sujetos sanos, es el tipo de entrenamiento que aumenta la fuerza muscular por excelencia (83, 157, 176-178). Lamentablemente, en EHC, al parecer existe cierto recelo de aplicar EF en humanos y animales, probablemente debido a que es un entrenamiento que debe ser supervisado de forma permanente y estricta, revisando la técnica de ejecución de cada movimiento para evitar lesiones y caídas, pero principalmente debido al riesgo de hemorragia abdominal por aumento de la presión portal en estados avanzados de EHC, lo cual puede ser un tema complejo a la hora de realizar las sesiones de entrenamiento. El efecto preventivo del EF sobre la pérdida de la fuerza muscular en animales con EHC podía deberse a una mayor frecuencia de disparo de la unidad motora y menor tiempo de latencia dado principalmente por el estímulo que este entrenamiento produce en fibras musculares IIB. Por otra parte, y como ya se mencionó anteriormente, el EF favorece la síntesis de proteínas miofibrilares responsables de la hipertrofia muscular, lo que puede ir asociado al aumento en la producción de fuerza contráctil máxima (83, 262)

En cuanto al EC, a la fecha existen solo dos investigaciones en humanos que han evaluado la fuerza muscular luego de programas con este tipo de entrenamiento, indicando mejorías en pacientes con cirrosis que esperan un trasplante de hígado (230, 231). En modelos animales no se encontró información al respecto. A pesar de la limitada información, nosotros aplicamos EC potenciando el efecto del componente de resistencia (3 sesiones a la semana), respecto al de fuerza (2 sesiones a la semana), guiándonos por las recomendaciones de actividad física para la salud en personas con EHC con buenos resultados en la fuerza muscular (157-162). Al respecto, no encontramos diferencias entre EC versus EF a pesar de que, en la programación del entrenamiento utilizada, predomina el componente de resistencia respecto al de fuerza. Este resultado podría deberse al aumento de la masa y la fuerza muscular que se ha observado en sujetos cuya capacidad física es baja o muy baja

(como ocurre en sarcopenia por EHC), luego de recibir entrenamiento con características de resistencia, que sería el caso del EC aplicado en esta investigación (177, 204, 205, 206). Es posible que, debido a un punto inicial de fuerza muscular muy bajo, la mejoría de este criterio de sarcopenia pueda ocurrir con cualquier tipo de entrenamiento físico que produzca contracciones musculares adecuadamente planificadas y programadas dentro de un programa de entrenamiento. Por otra parte, el EC ha mostrado efectos positivos en la fuerza muscular y la funcionalidad en la vida diaria de pacientes con EHC en espera de trasplante de hígado luego de 12 semanas, lo que podría indicar que el EC si es capaz de aumentar la fuerza muscular a pesar de combinar componentes de fuerza y resistencia. Lamentablemente en estas investigaciones no se detalla cual fue la proporción utilizada del componente de fuerza y resistencia, pero en base a las recomendaciones de actividad física en pacientes con EHC, lo más probable es que haya sido 1:2 con predominio de resistencia por sobre fuerza, tal como se aplicó en esta investigación. Sería interesante determinar cómo se comporta este parámetro al potenciar el componente de fuerza por sobre el de resistencia, lo cual podría ser analizado en futuras investigaciones sobre el tema. A nivel molecular, otra posible razón por la cual no se identificaron diferencias entre EF y EC en este criterio de sarcopenia, podría tener relación con PGC-1α4. Este factor de transcripción expresado en el musculo esquelético, tiene directa relación con respuestas adaptativas del músculo al entrenamiento físico particularmente de fuerza, ya que activa la expresión de IGF-1 y suprime la expresión miostatina (83, 179). Al respecto, en biopsias musculares de sujetos sanos se ha observado que luego de realizar EF, ER y EC, solo el EF y el EC produjeron aumentos en la expresión de PGC-1α4, lo que tuvo una correlación directa y alta (R=0,64) con aumento en la fuerza muscular, indicando que ambos tipos de entrenamiento (al tener un componente de fuerza), son capaces de aumentar la fuerza muscular (179)

En relación a la fuerza muscular aislada, investigaciones previas de nuestro laboratorio han reportado una disminución de la fuerza del GA en animales con EHC (35, 36, 100). Nosotros evaluamos la fuerza en el TA y confirmamos esta disminución en animales con EHC sedentarios, lo que fue prevenido por EF, ER y EC, con mayor

efecto preventivo del EC que ER, pero sin diferencias con EF. Esta diferencia con los resultados *in vivo*, donde los efectos preventivos de los tres entrenamientos no fueron diferentes, podría deberse a que, al ser una prueba con músculo aislado, el componente neural y de motivación del animal no está presente. Al respecto, al realizar una evaluación del músculo aislado, el estímulo para la contracción muscular la entrega el electroestimulador directamente al músculo mediante los electrodos ubicados en los extremos de éste, lo que se asemeja a un potencial de acción que genera una contracción máxima. Las ventajas de este método radican principalmente en la eliminación de los componentes neuronales y vasculares del músculo esquelético, lo que permite la evaluación directa de las propiedades intrínsecas del músculo que se contrae (263). Esto podría ser considerado una ventaja dado que las condiciones de la contracción muscular son las mismas para todos los músculos evaluados, pero también podría ser considerado un valor poco representativo del comportamiento natural de la contracción muscular, subestimando o sobreestimando la fuerza generada por ese músculo. Por otra parte, la motivación de los animales afecta directamente la generación de mayor o menor fuerza muscular. Si el animal cuenta con un estímulo motivacional que no genere estrés ni dolor, realizará el gesto generando mayor fuerza(173). Al analizar la fuerza generada por un músculo aislado, ese componente motivacional no existe, lo que podría ser considerado una ventaja ya que todos los animales son evaluados bajo las mismas condiciones, obteniendo un resultado más objetivo de la fuerza muscular.

6.4 Masa muscular

En cuanto a la masa muscular, evaluamos la masa muscular y masa grasa mediante bioimpedanciometría (BIA) y la masa de los músculos de las patas traseras. Nuestros resultados son diferentes al aplicar un método o el otro: los resultados de BIA indican una pérdida de la masa muscular en animales con EHC, lo cual no es prevenido con EF, ER ni EC. En cambio, cuando evaluamos mediante la masa de los músculos, encontramos una caída de éste en animales con EHC y un efecto preventivo diferencial del EF y EC en el TA (que presenta mayor proporción de fibras tipo IIB), del EF en el

EDL y del ER y EC en el SOL (un músculo con mayor cantidad de fibras tipo I). El GA, es un músculo mixto con zonas donde predominan las fibras tipo IIB (zonas laterales) y otras donde predominan las fibras tipo I (zona central) y en este caso los 3 tipos de entrenamiento lograron un efecto preventivo. Al respecto, se sabe que en sujetos sanos, el EF de moderada a máxima intensidad, favorece la hipertrofia muscular sobre todo de las fibras IIB, por lo tanto el EF por sí solo, así como el EC gracias a su componente de fuerza muscular, podrían aumentar la masa de músculos con gran proporción de fibras IIB (175). Además, intensidades de EF sobre el 60% favorecen la síntesis proteica, lo que aumenta el tamaño y peso del músculo (177). En sarcopenia primaria, el EF es considerado el tipo de entrenamiento central para su prevención y tratamiento, ya que puede aumentar la masa muscular y la fuerza debido a su efecto sobre las fibras tipo IIB que se encuentran disminuidas al igual que en EHC (264-267). Por lo tanto, es posible que en sarcopenia secundaria a EHC el comportamiento del EF sea similar a lo descrito en sujetos sanos y aquellos con sarcopenia primaria.

En cuanto al ER, en sujetos sanos a intensidades vigorosas, puede producir aumento de la síntesis de proteínas miofibrilares, pero mayoritariamente aumenta la síntesis de proteínas mitocondriales, mejorando la capacidad oxidativa de las fibras tipo I y aumentando su número, lo que incrementa el peso del músculo y favorece el aumento de la masa muscular. (177, 194, 196, 203-206). En sarcopenia primaria, el ER ha mostrado prevenir la disfunción mitocondrial que la caracteriza, así como también mejora la biogénesis mitocondrial y favorece la síntesis de proteínas mitocondriales en el músculo esquelético, aumentando la masa muscular (267). Un comportamiento similar podríamos esperar en sarcopenia secundaria a EHC la cual también cursa con disfunción mitocondrial como se detalló anteriormente.

En el caso del EC, no existe información sobre su efecto en el tipo de fibras musculares, pero podría ser que, dado su componente de fuerza y resistencia, el efecto sea similar al EF y ER ya descrito tanto en sujetos sanos, como aquellos con sarcopenia primaria y secundaria a EHC.

Estas diferencias en los resultados entre ambos métodos (BIA vs peso de músculos) podrían ser explicados en el caso de BIA, debido a las limitaciones descritas para su uso, donde los resultados son dependientes de la hidratación del sujeto y es menos preciso, lo cual no ocurre al pesar los músculos *ex vivo* (41, 43, 44).

Evaluar la masa muscular es un tema complejo de analizar, debido a que si bien hay métodos recomendados como *gold* estándar (MRI y CT), son altamente costosos, de difícil manejo y aún no existen protocolos estandarizados para su aplicación, ni menos puntos de corte descritos con claridad (19, 268, 269). BIA es un método recomendado debido a su bajo costo, a que es fácil de transportar, fácil de utilizar y evalúa todo el cuerpo de una vez, pero tiene las desventajas ya descritas, siendo menos objetivo que otros métodos como MRI, CT y US, lo que hace que sus resultados sean variables (41, 43, 44). Al respecto, en el estudio de Aamman et al en 2018 en ratas con EHC, evaluaron la masa muscular con MRI después de un período de EF de intensidad moderada a máxima. Sus resultados no indicaron cambios en animales entrenados con EHC respecto a aquellos sedentarios (164). En dicha investigación, a pesar de utilizar uno de los métodos *gold* estándar en la determinación de la composición corporal, no encontraron diferencias entre animales con EHC entrenados versus sedentarios, pero si encontraron diferencias al pesar el músculo GA *ex vivo*. Estos resultados concuerdan con los de nuestra investigación, confirmando que, en modelos animales, una de las formas más objetiva de evaluar la masa muscular es pesando los músculos *ex vivo*.

En esta investigación evaluamos la masa muscular *ex vivo* de las patas traseras de los animales, pero no de las patas delanteras. La razón de realizar la medición de la masa solo de las patas traseras es que en sarcopenia la mayor pérdida de la masa muscular ocurre en las extremidades inferiores, lo que podría ser afectado por la menor movilidad asociada a caminar que se da en personas que la padecen (270). Nosotros observamos esa menor movilidad espontánea de nuestro modelo con la menor distancia recorrida por los animales con EHC en la caja del *Open Field Test*, confirmando la importancia de evaluar las patas traseras de los animales. Por otra

parte, las patas traseras de los animales realizan el gesto de propulsión al subir el *Ladder climb* y en menor medida en el *treadmill*, en tanto las patas delanteras tienen una función principalmente de movilidad, lo que también es un punto relevante para decidir analizar músculos de las patas traseras por sobre las delanteras de los animales en el gesto de ascenso en plano inclinado y de carrera en *treadmill* (21, 83)

Es importante considerar, que los resultados de la masa muscular no siempre son proporcionales con los de fuerza muscular. Al respecto, es destacable que la masa muscular por sí sola no puede explicar completamente la disminución de la fuerza muscular y la función física en sarcopenia primara ni en sujetos sedentarios sanos. La fuerza puede disminuir 2 a 5 veces más que la masa muscular en sarcopenia, lo que podría deberse a que la fuerza muscular, a diferencia de la masa muscular, no depende solamente del componente muscular, sino también del control neural que ejerce un efecto directo en la estimulación del músculo para la generación de fuerza, lo que podría explicar que se pueda tener baja masa, pero elevada fuerza (39, 271, 272).

La evaluación de la masa muscular en EHC puede verse afectada por el desbalance hídrico que caracteriza la patología, donde es común encontrar edema y ascitis que afectan la evaluación con BIA y también pueden afectar las mediciones del peso de los músculos. Es por ello que, para este criterio de sarcopenia, se complementó con la evaluación del diámetro de fibras musculares, el nivel de las proteínas sarcoméricas como Troponina, MHC, y el nivel de una proteínas involucrada en la vía de síntesis proteica como p70S6K. En cuanto al diámetro de fibras musculares, estudios previos de nuestro laboratorio han reportado la disminución de este parámetro en GA (35, 36) y TA (95) de animales con EHC colestásica, pero no se contaba con información del efecto de la EHC en el SOL, por lo que un primer aporte de esta tesis es que describimos la disminución del diámetro de fibras musculares en un músculo de tipo oxidativo como el SOL. En segundo lugar, nuestros resultados muestran que tanto el EF como el ER y EC previenen la caída del diámetro de las fibras del SOL y del TA en animales con EHC. En SOL, los 3 tipos de entrenamiento

tienen efecto preventivo, sin diferencias entre sí y en TA los tres tipos de entrenamiento tienen también un efecto preventivo, pero el mayor efecto se da con EF. El SOL es un músculo que posee mayoritariamente fibras con metabolismo oxidativo que se ven principalmente favorecidas por ER (194, 196, 203). Al respecto, es posible un aumento del tamaño de las fibras musculares del SOL en animales con EHC que recibieron ER, debido a su efecto sobre las fibras tipo I y específicamente al aumento de la síntesis de proteínas miofibrilares y mitocondriales (177, 204-206). Debido a lo anterior, no esperábamos un efecto preventivo en el diámetro de las fibras del SOL con EF, pero su efecto en un músculo susceptible principalmente ER, podría deberse a que la intensidad del EF utilizada fue sub-máxima, (en este caso baja-moderada) en las dos primeras semanas, lo que podría favorecer la mejoría de la fuerza-resistencia más que la fuerza máxima (que se obtiene con intensidades vigorosas que aplicamos en las últimas 2 semanas), potenciando el efecto de este tipo de entrenamiento también sobre un músculo fundamentalmente oxidativo como este (83, 175). A nivel molecular, se ha visto que con la aplicación de entrenamientos de intensidad sub-máxima aumenta la expresión del gen PGC-1α de forma rápida y mantenida en el tiempo y que podría aumentar la formación de fibras fundamentalmente oxidativas, induciendo mejorías en la síntesis de proteínas mitocondriales y aumentando las fibras tipo I y con ello la masa, en este caso del músculo Sóleo (83, 199, 273) En nuestra investigación, decidimos comenzar con intensidades bajas-moderadas, debido a la poca información existente sobre EF y EC en sarcopenia por EHC, por lo que trabajamos en rangos recomendados para pacientes con EHC (157, 159, 161, 162). Sería interesante determinar en futuras investigaciones, como se comportan los animales con EHC entrenando con intensidades moderadas a vigorosas e incluso máximas (sobre 80%) e invirtiendo los días del componente de fuerza y resistencia del EC (con 3 días de componente de fuerza y 2 días de resistencia). Finalmente, el SOL es un músculo motor primario (junto al GA) en el efecto de propulsión al ascender en *Ladder climb* por lo que el EF y el EC pudieron aumentar su diámetro debido a la participación fundamental de este músculo en el gesto del ascenso (21, 83).

El músculo TA por su parte, posee mayoritariamente fibras tipo IIB con metabolismo glicolítico y que se ven favorecidas principalmente con EF (180). Por lo anterior, no es de extrañar que el EF sea el tipo de entrenamiento que logró un mayor efecto preventivo en este músculo. Se sabe que, a intensidades moderadas a vigorosas, el EF aumenta CSA de los músculos entrenados y favorece el aumento de tamaño de las fibras mayoritariamente tipo IIB (180). A pesar de que el TA se ubica en la zona anterior de la pata trasera, donde no se genera la propulsión del animal al subir en el plano inclinado y al correr en el *treadmill*, es posible que de todas formas el gesto requerido por los animales con sus patas traseras haya favorecido el aumento de la masa en este músculo (21, 83). Sería interesante en investigaciones futuras evaluar el efecto de EF, ER y EC sobre el músculo GA para determinar si el efecto es mayor que el del TA debido a su ubicación anatómica en la pata del animal.

Finalmente, el nivel de proteínas del sarcómero Troponina I y MHC disminuye en animales con EHC tal como se ha reportado previamente por nuestro laboratorio (36, 95). Tanto el EF como el ER y EC previenen la disminución del nivel de las proteínas MHC y Troponina del músculo TA de animales con sarcopenia por EHC colestásica, sin diferencias entre sí. El mismo comportamiento observamos en una proteína representativa de la vía de síntesis de proteínas musculares como p70S6K total. Las proteínas miofibrilares son fundamentales en procesos de contracción muscular, por lo que la disminución de sus niveles puede afectar directamente la generación de puentes cruzados durante el proceso de contracción muscular, afectando el desarrollo de fuerza y de masa muscular. Los bajos niveles de la proteína p70S6K en el TA estarían indicando una disminución de la actividad de la ruta de síntesis de proteínas musculares, lo que influye negativamente en la masa muscular y muy probablemente en la fuerza muscular. Siguiendo con lo que previamente realizó Morales et al, en nuestro laboratorio y en base a los resultados de esta investigación, sería interesante evaluar otras proteínas de esta vía como Akt, mTOR y 4EB-P1. Otras proteínas que deberían ser consideradas para futuras investigaciones sobre EHC y entrenamiento físico son las proteínas asociadas a la biogénesis mitocondrial, ya que se ha reportado cambios en sus niveles por efecto principalmente del ER observando

mayor síntesis de éstas, influyendo en la masa muscular y la capacidad oxidativa de los músculos entrenados (177, 204-206). Por otra parte, las proteínas pertenecientes a la vía de degradación como MuRF-1 y Atrogina-1, se esperaría que disminuyan sus niveles con EF (177, 207-210), pero podrían aumentar con ER (78), por lo que determinar su comportamiento con EC sería interesante debido a que probablemente dependa de cuál componente del EC (fuerza o resistencia) sea el que predomine. Considerando que, en esta investigación predomina el componente de resistencia en el EC aplicado, podríamos esperar un "efecto de interferencia" entre ambos entrenamientos, donde el efecto del ER predomine por sobre el efecto hipertrófico y de aumento de fuerza del EF. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, este efecto de interferencia puede ser evitado resguardando tiempos adecuados de descanso entre la realización de EF y ER como parte del EC (6 a 24 horas entre la realización de ambos entrenamientos) (177, 223). En esta investigación el descanso fue de 24 horas entre la aplicación de uno y otro entrenamiento, por lo que ese efecto de interferencia no debería existir. Por otra parte, es importante considerar que la ejecución de entrenamiento físico de varias semanas asegura que el efecto hipertrófico del EC se mantenga a pesar de sumar ER a EF (177, 216, 223-225).

La evaluación de la masa muscular no solo mediante BIA o masa de músculos, sino que también mediante diámetro de fibras musculares y niveles de proteínas miofibrilares y de la vía de síntesis fue una decisión acertada, ya que la probabilidad de que las alteraciones hídricas que caracterizan la EHC afectaran el resultado era real (tal como observamos en nuestros resultados con BIA donde no encontramos diferencias al aplicar EF, ER y EC, respecto a los resultados el evaluar la masa de músculo, el diámetro de fibras y niveles de proteínas, donde los efectos de los entrenamientos físicos se hicieron evidentes). Es importante que en investigaciones preclínicas en EHC, se evalúe la masa muscular no solo por ejemplo con BIA y masa de músculos, sino que se agreguen parámetros histológicos y moleculares que permitan asegurar una visión completa y que no induzca a error por edema periférico o ascitis que caracterizan la EHC.

6.5 Función física relacionada a la movilidad

La función física fue separada en 3 tipos: de alto esfuerzo (evaluada mediante una prueba de carrera en *treadmill* hasta el agotamiento), de moderado esfuerzo (evaluada mediante un protocolo acelerado en Rotarod) y de bajo esfuerzo (evaluada mediante la distancia que recorre espontáneamente el animal en la caja del *Open Field Test*).

La función física de alto esfuerzo puede ser semejante al esfuerzo físico que podría realizar una persona en etapa avanzada de la EHC, por ejemplo, al subir escaleras. Resultados previos de nuestro laboratorio indican una menor actividad física de los animales con EHC, respecto a los controles sanos (35, 36, 95), pero la prueba efectuada en ese momento no determinó la capacidad máxima de los animales, sino más bien, las zonas del carril del *treadmill* donde el animal permanece por mayor tiempo y de esta forma los clasifica en niveles de actividad física alto, moderado o bajo. En esta investigación utilizamos un protocolo de carrera hasta la fatiga que nos permitió determinar la distancia, velocidad y el tiempo máximo de carrera, llevando a los animales a su máximo esfuerzo. En base a la velocidad máxima que cada animal alcanzó en esta prueba hasta el agotamiento, determinamos la intensidad del ER y el componente de resistencia del EC que se realizó durante las 6 semanas de intervención y de ahí también su gran relevancia. Nuestros resultados indican que los animales con EHC, disminuyen drásticamente su capacidad máxima de carrera (menor distancia, velocidad y tiempo máximo de carrera) respecto a los controles sanos. Solo el ER y EC previenen la caída de la capacidad máxima de carrera en animales con EHC. Este resultado podría explicarse dado que el ER y EC (debido a su componente resistencia y a que éste es el predominante en el EC que aplicamos en esta investigación), sería capaz de aumentar la expresión génica de PGC-1α, lo que produce un importante aumento de mitocondrias funcionales y con ello, aumenta el VO_{2max}, así como también la biogénesis mitocondrial, la vascularización, los niveles de mioglobina y por lo tanto la disponibilidad de O_2 en los músculos entrenados, lo que favorece que se tolere el ejercicio en el tiempo (187, 274, 275). Estos cambios también

podrían deberse a que el componente de resistencia en un entrenamiento físico favorece la activación de fibras tipo I, más tolerantes al esfuerzo en el tiempo, debido a su mayor contenido de proteínas mitocondriales y capacidad respiratoria, entregándole al músculo esquelético un perfil oxidativo.(83)

La función física asociada a la movilidad de moderado esfuerzo sería para un paciente con EHC en etapas avanzadas, por ejemplo, realizar labores del hogar como colgar ropa o hacer la cama. Nuestros resultados indican que la movilidad de moderado esfuerzo, manifestada en este caso como el número de caídas desde el cilindro del Rotarod y el tiempo que el animal pasa sobre el cilindro, está negativamente afectada por la EHC, ya que los animales con EHC se caen más que los animales sanos y por lo tanto pasan menor tiempo sobre el cilindro, tal como se había reportado por nuestro laboratorio previamente (36, 95). Tanto el EF, ER y EC, previenen la disminución de la movilidad de moderado esfuerzo en animales con EHC, sin diferencias entre sí. Esperábamos que el ER mejorara en mayor grado esta variable. En el caso del EF y el EC el efecto preventivo podría ser explicado debido a que las intensidades de entrenamiento iniciales fueron bajas-moderadas, favoreciendo la fuerza-resistencia. Este componente inicial podría entregar algunos de los beneficios del trabajo de resistencia (a pesar de ser más localizado), como la mayor vascularización del músculo entrenado, mayores niveles de mioglobina y aumento de la biogénesis mitocondrial, logrando mayor tolerancia al esfuerzo (196).

Finalmente, evaluamos la movilidad de bajo esfuerzo o espontánea, que sería similar a caminar a paso lento para un paciente con EHC en etapas avanzadas. La disminución de la distancia recorrida por animales con EHC, fue prevenida tanto por EF como por ER, sin diferencias entre sí, pero no por EC. Es probable que el hecho de no observar cambios en esta movilidad de bajo esfuerzo con EC podría deberse al bajo número de animales en el grupo con EC.

Este tipo de movilidad es de muy baja intensidad, por lo que los resultados de EF y ER indican que no solo tienen un efecto frente a un esfuerzo físico exigente, sino también frente a una actividad espontánea del animal como caminar. En personas con

sarcopenia primaria y secundaria a EHC, se ha reportado una menor actividad física evidenciando que se genera un círculo vicioso de menor tolerancia al esfuerzo, menor movilidad y capacidad de moverse, afectando la calidad de vida y aumentando el riesgo de complicaciones y de perpetuar la sarcopenia, con mayor riesgo de muerte (49), lo que podría estar siendo replicado parcialmente en los animales.

6.6 Limitaciones del estudio

Una limitación de la estrategia experimental utilizada en esta investigación, y que podría complementarse en futuros trabajos sobre el tema, es el análisis del efecto del entrenamiento físico sobre parámetros hepáticos, tanto funcionales como histológicos. Nosotros evaluamos el peso del hígado y la concentración de ácidos biliares en suero, los cuales aumentaron de forma relevante en EHC. No observamos un efecto preventivo de los protocolos aplicados de EF, ER y EC en el aumento de estas variables, lo cual podría indicar que las alteraciones en el músculo esquelético no son directamente dependientes de las mejorías hepáticas producto del entrenamiento físico. A pesar, de lo anterior, creemos fundamental complementar estos análisis con histología del hígado y otros parámetros de función hepática como bilirrubina directa e indirecta y enzimas hepáticas. A la fecha, existe evidencia sobre el efecto positivo del ER sobre variables hepáticas como ácidos grasos libres y grasa hepática (217), aunque el EF no ha mostrado efectos al respecto (164) y en EC no existe evidencia clara reportada. Particularmente, sería interesante corroborar los niveles circulantes de amoniaco, que tiene un conocido efecto sobre el músculo esquelético como estimulador de miostatina, la cual inactiva a mTOR, disminuyendo la síntesis de proteínas musculares y activando la autofagia (276, 277). Solo los dos estudio de Aamann et al en 2018 en ratas y Aamann et al en 2019 en humanos, han evaluado el nivel de amoníaco en EHC, no encontrando diferencias entre el grupo entrenado respecto al sedentario (163, 164). Al respecto, se ha descrito un posible rol del músculo esquelético en la detoxificación del amonio como parte del eje hígado-músculo. El exceso de amonio podría ser una de las causas de la temprana fatiga muscular que caracteriza la EHC (como parte de la resistencia anaeróbica propia de la patología). Esta temprana fatiga muscular podría deberse a los roles conocidos del

amonio en la disminución de la síntesis de proteínas y el aumento de la autofagia (278, 279). Es posible que dentro de este rol detoxificador, pueda ser fundamental el entrenamiento físico, ya que podría favorecer la eliminación del amonio de forma más rápida (17). Con los resultados de los trabajos de Aamann en 2018 y 2020, queda desmitificado ese rol, ya que luego de un programa de EF el nivel de amonio no disminuyó, pero estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que los autores aplicaron solo EF y no está claro que podría ocurrir al aplicar ER y EC. Por otra parte, en estas investigaciones los niveles de amonio no estaban basalmente elevados en todos los sujetos por lo que los resultados podrían deberse a ello. Considerando lo anterior es fundamental evaluar este parámetro en futuras investigaciones ya sea para descartar la participación del músculo esquelético en ejercicio en este proceso de detoxificación o bien para confirmarla.

Por otra parte, los ácidos biliares también pueden tener un efecto negativo sobre el músculo esquelético en EHC. Al respecto, un estudio de nuestro laboratorio de Abrigo et al en 2020, mostró que el aumento de los ácidos biliares en plasma en animales con EHC y sus efectos negativos sobre la fuerza muscular *in vivo* y *ex vivo*, la masa muscular, el peso de los músculos, el diámetro de las fibras musculares, la transición en el tipo de fibras desde IIB a I, así como niveles de proteínas de UPS aumentadas y actividad física disminuida, ocurren de una forma dependiente del receptor TGR-5. Este receptor es el único reconocido hasta la fecha como receptor de ácidos biliares en el músculo y de él depende el efecto negativo del exceso de ácidos biliares plasmáticos sobre el músculo esquelético (95). Es por ello que, sería interesante determinar el comportamiento de los ácidos biliares en plasma de animales entrenados, para identificar si el efecto del entrenamiento es en el músculo esquelético o también en el hígado, ya que la mejoría de parámetros musculares y funcionales del músculo esquelético podría deberse también a una mejoría de la función de hígado que disminuya el nivel de ácidos biliares circulantes.

Otra evaluación relevante puede ser la determinación del comportamiento de las vías de degradación de proteínas musculares en animales entrenados con EHC. Es posible que debido a una disminución de miostatina, de amoníaco y estrés oxidativo e inflamación producto del entrenamiento físico, se prevengan las alteraciones

musculares y funcionales de los animales con EHC. A la fecha no se tiene claro que tipo de entrenamiento puede disminuir la actividad de la vía de degradación de proteínas musculares de mejor forma, así como tampoco cual ruta podría estar mejorando su funcionamiento para regular la autofagia.

De este modo, existe la posibilidad de que el entrenamiento físico genere sus beneficios a través de mecanismos complejos que incluyen al eje hígado-músculo esquelético, lo cual debería ser objeto de estudio de próximas investigaciones en el área.

7. Conclusiones

El EF, ER y EC previenen la disminución de la fuerza muscular que caracteriza la EHC, así como también la disminución de la masa muscular. La disminución de la función física asociada a la movilidad de alto, moderado y bajo esfuerzo en un modelo murino de EHC, también puede ser prevenida por los tres tipos de entrenamiento físico, aunque la movilidad de alto esfuerzo solo por ER y EC y la de bajo esfuerzo solo por EF y ER.

Considerando lo anterior, el entrenamiento físico de fuerza, de resistencia y combinado, podrían ser una excelente y segura estrategia terapéutica para el tratamiento de la sarcopenia secundaria a EHC dados sus efectos preventivos sobre los tres criterios o parámetros que la caracterizan.

En base a nuestros resultados, el EC podría ser la mejor opción para el tratamiento de la sarcopenia secundaria a EHC, ya que produce un **efecto preventivo** en la mayoría de los parámetros evaluados en esta investigación:

- fuerza muscular *in vivo* y *ex vivo*;
- masa muscular determinada por masa de músculos (en 3 de los 4 músculos evaluados).
- función física de alto y moderado esfuerzo.

En base a estos resultados el EC puede ser considerado el tipo de entrenamiento físico que produce mejores efectos sobre los criterios de sarcopenia en EHC de forma segura.

8. Proyecciones

Esta investigación se basa en determinar y comparar el efecto de protocolos particulares de los tipos de entrenamiento físico de fuerza, resistencia y entrenamiento combinado sobre los criterios de sarcopenia en EHC. Al respecto queda mucho aún por avanzar en la determinación de las características del entrenamiento más efectivo, pero con nuestros resultados hay un pequeño aporte respecto al efecto de estos tipos de entrenamiento aplicados con moderada a vigorosa intensidad, sobre la fuerza, la masa muscular y la función física. Sería interesante saber qué pasa si esas intensidades varían, así como también si diferentes tiempos de entrenamiento, series, repeticiones y progresión pueden tener efectos diferentes.

Sería importante también evaluar otros parámetros relevantes para determinar el efecto de los entrenamientos efectuados como, por ejemplo, proteínas de las vías de degradación de proteínas musculares, otras proteínas de la vía de síntesis, así como también componentes de la biogénesis mitocondrial. El VO_{2max} es un representante de la capacidad cardiorrespiratoria de los sujetos y puede indicar mayor o menor tolerancia al esfuerzo, por lo que debe ser evaluado dado que puede aumentar con entrenamiento físico. Sería interesante también evaluar: el componente neuromuscular, si existen cambios en el tipo de colágeno en la fascia muscular y tendones que pueden influir en la generación de mayor o menor fuerza y la capilarización y disponibilidad de oxígeno de los músculos entrenados.

De forma más amplia, es muy importante considerar la sarcopenia secundaria a EHC con la relevancia que tiene como predictor de mortalidad pre y post trasplante de hígado. Al respecto, sería fundamental considerar evaluar periódicamente la sarcopenia en todos los pacientes con cirrosis hepática y con mayor razón en aquellos candidatos a trasplante de hígado (5). Por otra parte, es importante tener en cuenta que existen algunas características propias de los pacientes con EHC como el edema o sobrehidratación que afectan, por ejemplo, la determinación de la masa muscular, por lo que sería importante avanzar en ajustar los criterios de evaluación de este parámetro de sarcopenia específicamente a EHC.

Son escasos los estudios que han evaluado los criterios de fuerza muscular, masa muscular y función física para diagnosticar sarcopenia en EHC, ya que normalmente evalúan solo la masa muscular. Además, las formas de evaluación de cada criterio aún no están del todo claras y muchas veces son utilizados puntos de corte validados para sarcopenia primaria o para otras patologías como el cáncer (280, 281)

Por lo tanto, son 2 las principales interrogantes respecto a las intervenciones con entrenamiento físico en sarcopenia por EHC que aún deben ser trabajadas: i) las características del ejercicio más efectivo y ii) los resultados en los cuales esa intervención impactará (por ejemplo, hospitalizaciones, complicaciones de la enfermedad, mortalidad, costos asociados, entre otros). Por otra parte, intervenciones de menos de 6 semanas en sarcopenia por EHC, no serían muy útiles dado que, por ejemplo, en países desarrollados un paciente puede pasar 2 meses en la lista de espera para trasplante de hígado (17), tiempo que en países menos desarrollados como el nuestro, puede extenderse por 1 año aproximadamente.

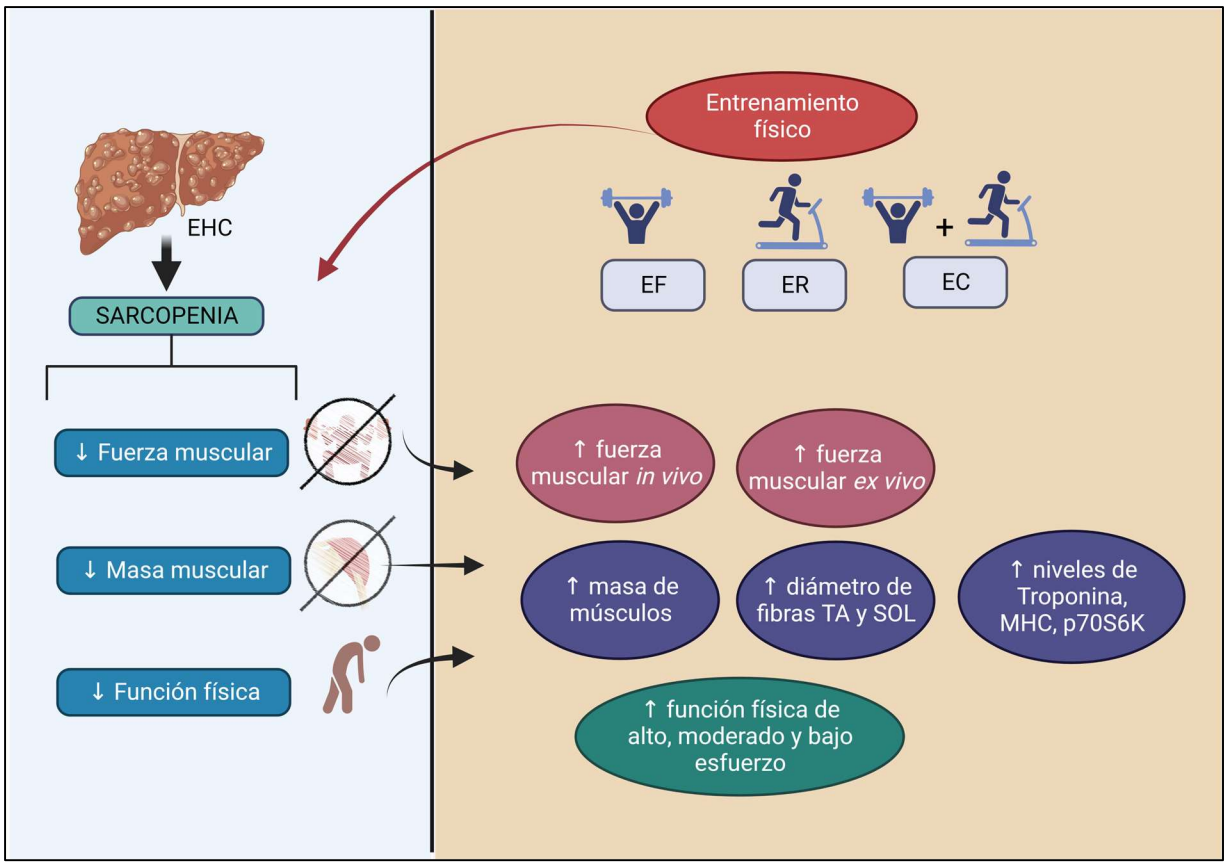


Figura 21. Modelo gráfico de la investigación

En la figura se detalla una propuesta gráfica del modelo y los resultados de esta investigación. EHC: enfermedad hepática crónica; EF: entrenamiento de fuerza; ER: entrenamiento de resistencia; EC: entrenamiento combinado; TA: Tibial Anterior; SOL: Sóleo.

9. Referencias

1. Hope AA, Morrison RS. Chapter 53 - What Is the Clinical Course of Advanced Liver Disease and What Symptoms Are Associated With It? In: Goldstein NE, Morrison RS, editors. Evidence-Based Practice in Palliative Medicine. Philadelphia: W.B. Saunders; 2013. p. 300-7.
2. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. (1542-7714 (Electronic)).
3. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. The Lancet. 2018;392(10159):1789-858.
4. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. 2020;18(1542-7714 (Electronic)).
5. Tantai X, Liu Y, Yeo YH, Praktiknjo M, Mauro E, Hamaguchi Y, et al. Effect of sarcopenia on survival in patients with cirrhosis: A meta-analysis. Journal of Hepatology. 2022;76(3):588-99.
6. D'Amico G, Pasta L, Morabito A, D'Amico M, Caltagirone M, Malizia G, et al. Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: a 25-year inception cohort study of 494 patients. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2014;39(10):1180-93.
7. Deis DdeeiesMdSdC. Defunciones y Mortalidad por causas - DEIS [Oficial Ministerio de salud de Chile]. [updated 2019/12/03/11:11:14. Available from: http://www.deis.cl/defunciones-y-mortalidad-por-causas/.
8. Mario Uribe M RMPA. Guías Clínicas Sociedad Chilena de Trasplante - Capítulo IX - Trasplante Hepático - Sociedad Chilena de Trasplantes 2010 [updated 2010 2019/10/24/11:13:20. Available from: https://www.sociedaddetrasplante.cl/biblioteca/gui-as-cli-nicas-sociedad-chilena-de-trasplante/category/20-capitulo-ix-trasplante-hepatico.html.
9. European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. Journal of Hepatology. 2009;51(2):237-67.
10. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. Journal of Hepatology. 2019;70(1):151-71.
11. Prince M, Chetwynd A, Newman W, Metcalf JV, James OFW. Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: Follow-up for up to 28 years. Gastroenterology. 2002;123(4):1044-51.
12. Hirschfield GM, Beuers U, Corpechot C, Invernizzi P, Jones D, Marzioni M, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. Journal of Hepatology. 2017;67(1):145-72.
13. Boonstra K, Beuers U, Ponsioen CY. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: A systematic review. Journal of Hepatology. 2012;56(5):1181-8.
14. Montano-Loza AJ, Meza-Junco J, Prado CMM, Lieffers JR, Baracos VE, Bain VG, et al. Muscle wasting is associated with mortality in patients with cirrhosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012;10(2):166-73, 73.e1.
15. Bhanji RA, Carey EJ, Yang L, Watt KD. The Long Winding Road to Transplant: How Sarcopenia and Debility Impact Morbidity and Mortality on the Waitlist. Clin Gastroenterol Hepatol. 2017;15(10):1492-7.

16. Gan D, Wang L, Jia M, Ru Y, Ma Y, Zheng W, et al. Low muscle mass and low muscle strength associate with nonalcoholic fatty liver disease. Clinical Nutrition. 2019;0(0).
17. Tandon P, Dunn MA, Duarte-Rojo A. Resistance Training Reduces Risk of Sarcopenia in Patients With Cirrhosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2020;18(5)(1542-7714 (Electronic)):1036-9.
18. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. Age Ageing. 2019;48(1):16-31.
19. Tagliafico AA-O, Bignotti B, Torri L, Rossi F. Sarcopenia: how to measure, when and why. La radiologia medica. 2022;127(1826-6983 (Electronic)):228-37.
20. El Sherif O, Dhaliwal A, Newsome PN, Armstrong MJ. Sarcopenia in nonalcoholic fatty liver disease: new challenges for clinical practice. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. 2020;14(3):197-205.
21. Beaudart C, Rolland Y, Cruz-Jentoft AJ, Bauer JM, Sieber C, Cooper C, et al. Assessment of Muscle Function and Physical Performance in Daily Clinical Practice. Calcified Tissue International. 2019;105(1):1-14.
22. Suchomel TJ, Nimphius S, Stone MH. The Importance of Muscular Strength in Athletic Performance. Sports Medicine (Auckland, NZ). 2016;46(10):1419-49.
23. Suchomel TJ, Nimphius S, Stone MH. The Importance of Muscular Strength in Athletic Performance. Sports Medicine. 2016;46(10):1419-49.
24. Beaudart CA-O, McCloskey E, Bruyère O, Cesari M, Rolland Y, Rizzoli R, et al. Sarcopenia in daily practice: assessment and management. (1471-2318 (Electronic)).
25. Beaudart C, McCloskey E, Bruyère O, Cesari M, Rolland Y, Rizzoli R, et al. Sarcopenia in daily practice: assessment and management. BMC Geriatrics. 2016;16(1):170.
26. Alcazar J, Guadalupe-Grau A, García-García FJ, Ara I, Alegre LM. Skeletal Muscle Power Measurement in Older People: A Systematic Review of Testing Protocols and Adverse Events. The Journals of Gerontology: Series A. 2018;73(7):914-24.
27. Mijnarends DM, Meijers JMM, Halfens RJG, ter Borg S, Luiking YC, Verlaan S, et al. Validity and Reliability of Tools to Measure Muscle Mass, Strength, and Physical Performance in Community-Dwelling Older People: A Systematic Review. Journal of the American Medical Directors Association. 2013;14(3):170-8.
28. Leong DP, Teo KK, Rangarajan S, Lopez-Jaramillo P, Avezum A, Jr., Orlandini A, et al. Prognostic value of grip strength: findings from the Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study. The Lancet. 2015;386(9990):266-73.
29. Roberts HC, Denison HJ, Martin HJ, Patel HP, Syddall H, Cooper C, et al. A review of the measurement of grip strength in clinical and epidemiological studies: towards a standardised approach. Age and Ageing. 2011;40(4):423-9.
30. Han L, Fu S, Li J, Liu D, Tan Y. Association between grip strength and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. (2296-858X (Print)).
31. Studenski SA, Peters Kw Fau - Alley DE, Alley De Fau - Cawthon PM, Cawthon Pm Fau - McLean RR, McLean Rr Fau - Harris TB, Harris Tb Fau - Ferrucci L, et al. The FNIH sarcopenia project: rationale, study description, conference recommendations, and final estimates. (1758-535X (Electronic)).
32. Lauretani F, Russo CR, Bandinelli S, Bartali B, Cavazzini C, Di Iorio A, et al. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. Journal of Applied Physiology. 2003;95(5):1851-60.

33. Dodds RM, Syddall HE, Cooper R, Benzeval M, Deary IJ, Dennison EM, et al. Grip strength across the life course: normative data from twelve British studies. (1932-6203 (Electronic)).
34. Neto W, Caperuto E, Gama E. Resistance Training Design for Animal Research: A Comparative Methodological Study. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2014;7:583-90.
35. Aguirre F, Abrigo J, Gonzalez F, Gonzalez A, Simon F, Cabello-Verrugio CA-O. Protective Effect of Angiotensin 1-7 on Sarcopenia Induced by Chronic Liver Disease in Mice. LID - 10.3390/ijms21113891 [doi] LID - 3891. Int J Mol Sci. 2020;21(11)(1422-0067 (Electronic)).
36. Campos F, Abrigo J, Aguirre F, Garcés B, Arrese M, Karpen S, et al. Sarcopenia in a mice model of chronic liver disease: role of the ubiquitin–proteasome system and oxidative stress. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2018;470(10):1503-19.
37. Heymsfield SB, McManus C, Smith J, Stevens V, Nixon DW. Anthropometric measurement of muscle mass: revised equations for calculating bone-free arm muscle area. The American Journal of Clinical Nutrition. 1982;36(4):680-90.
38. Tagliafico AA-O, Bignotti B, Torri L, Rossi F. Sarcopenia: how to measure, when and why. (1826-6983 (Electronic)).
39. McGregor RA, Cameron-Smith D, Poppitt SD. It is not just muscle mass: a review of muscle quality, composition and metabolism during ageing as determinants of muscle function and mobility in later life. Longevity & Healthspan. 2014;3(1):9.
40. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens Jp Fau - Bauer JM, Bauer Jm Fau - Boirie Y, Boirie Y Fau - Cederholm T, Cederholm T Fau - Landi F, Landi F Fau - Martin FC, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. (1468-2834 (Electronic)).
41. Cruz-Jentoft AJ, Sayer AA. Sarcopenia. The Lancet. 2019;393(10191):2636-46.
42. Sbrignadello SA-O, Göbl C, Tura AA-O. Bioelectrical Impedance Analysis for the Assessment of Body Composition in Sarcopenia and Type 2 Diabetes. LID - 10.3390/nu14091864 [doi] LID - 1864. (2072-6643 (Electronic)).
43. Kikuchi N, Uojima H, Hidaka H, Iwasaki S, Wada N, Kubota K, et al. Evaluation of skeletal muscle mass in patients with chronic liver disease shows different results based on bioelectric impedance analysis and computed tomography. Annals of Nutrition and Metabolism. 2022.
44. Sbrignadello SA-O, Göbl C, Tura AA-O. Bioelectrical Impedance Analysis for the Assessment of Body Composition in Sarcopenia and Type 2 Diabetes. LID - 10.3390/nu14091864 [doi] LID - 1864. Nutrients. 2022;14(2072-6643 (Electronic)).
45. Cesari M, Kritchevsky SB, Newman AB, Simonsick EM, Harris TB, Penninx BW, et al. Added Value of Physical Performance Measures in Predicting Adverse Health-Related Events: Results from the Health, Aging and Body Composition Study. Journal of the American Geriatrics Society. 2009;57(2):251-9.
46. Podsiadlo D, Richardson S. The Timed “Up & Go”: A Test of Basic Functional Mobility for Frail Elderly Persons. Journal of the American Geriatrics Society. 1991;39(2):142-8.
47. Rikli R, Jones J. Development and validation of a functional fitness test for a community-residing adults. Journal of Aging and Physical Activity. 1999;7:129-61.
48. Keller K. Sarcopenia. Wien Med Wochenschr. 2019;169(7-8):157-72.

49. Pacifico J, Geerlings MAJ, Reijnierse EM, Phassouliotis C, Lim WK, Maier AB. Prevalence of sarcopenia as a comorbid disease: A systematic review and meta-analysis. Experimental Gerontology. 2020;131:110801.
50. Yu R, Shi Q, Liu L, Chen L. Relationship of sarcopenia with steatohepatitis and advanced liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. BMC Gastroenterol. 2018;18(1):51.
51. Pan X, Han Y, Zou T, Zhu G, Xu K, Zheng J, et al. Sarcopenia Contributes to the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease- Related Fibrosis: A Meta-Analysis. Dig Dis. 2018;36(6):427-36.
52. Peng H, Zhang Q, Luo L, Lei S, Xiong T, Long L, et al. A prognostic model of acute-on-chronic liver failure based on sarcopenia. (1936-0541 (Electronic)).
53. Peng H, Zhang Q, Luo L, Lei S, Xiong T, Long L, et al. A prognostic model of acute-on-chronic liver failure based on sarcopenia. Hepatology international. 2022;16(1936-0541 (Electronic)):964–72.
54. Kim G, Kang SH, Kim MY, Baik SK. Prognostic value of sarcopenia in patients with liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE. 2017;12(10):e0186990.
55. Hsu C-S, Kao J-H. Sarcopenia and chronic liver diseases. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. 2018;12(12):1229-44.
56. De Bandt J-P, Jegatheesan P, Tennoune-El-Hafaia N. Muscle Loss in Chronic Liver Diseases: The Example of Nonalcoholic Liver Disease. Nutrients. 2018;10(9).
57. Ebadi M, Bhanji RA, Mazurak VC, Montano-Loza AJ. Sarcopenia in cirrhosis: from pathogenesis to interventions. Journal of Gastroenterology. 2019;54(10):845-59.
58. Tandon P, Ney M, Irwin I, Ma MM, Gramlich L, Bain VG, et al. Severe muscle depletion in patients on the liver transplant wait list: Its prevalence and independent prognostic value. Liver Transplantation. 2012;18(10):1209-16.
59. Hanai T, Shiraki M, Ohnishi S, Miyazaki T, Ideta T, Kochi T, et al. Rapid skeletal muscle wasting predicts worse survival in patients with liver cirrhosis. Hepatology Research. 2016;46(8):743-51.
60. Collins BC, Laakkonen EK, Lowe DA. Aging of the musculoskeletal system: How the loss of estrogen impacts muscle strength. Bone. 2019;123:137-44.
61. Lai JA-O, Tandon P, Bernal W, Tapper EA-O, Ekong UA-OX, Dasarathy S, et al. Malnutrition, Frailty, and Sarcopenia in Patients With Cirrhosis: 2021 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. (1527-3350 (Electronic)).
62. Dasarathy S, Merli M. Sarcopenia from mechanism to diagnosis and treatment in liver disease. Journal of hepatology. 2016;65(6):1232-44.
63. Tandon P, Montano-Loza AJ, Lai JC, Dasarathy S, Merli M. Sarcopenia and frailty in decompensated cirrhosis. (1600-0641 (Electronic)).
64. Marasco GA-O, Serenari M, Renzulli M, Alemanni LV, Rossini B, Pettinari I, et al. Clinical impact of sarcopenia assessment in patients with hepatocellular carcinoma undergoing treatments. (1435-5922 (Electronic)).
65. Praktiknjo M, Clees C, Pigliacelli A, Fischer S, Jansen C, Lehmann J, et al. Sarcopenia Is Associated With Development of Acute-on-Chronic Liver Failure in Decompensated Liver Cirrhosis Receiving Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt. (2155-384X (Electronic)).
66. Praktiknjo M, Book M, Luetkens J, Pohlmann A, Meyer C, Thomas D, et al. Fat-free muscle mass in magnetic resonance imaging predicts acute-on-chronic liver failure and survival in decompensated cirrhosis. Hepatology. 2018;67(3):1014-26.

67. Dasarathy S. Treatment to Improve Nutrition and Functional Capacity Evaluation in Liver Transplant Candidates. Current treatment options in gastroenterology. 2014;12(2):242-55.
68. Meeks AC, Madill J. Sarcopenia in liver transplantation: A review. Clinical Nutrition ESPEN. 2017;22:76-80.
69. Ooi PH, Hager A, Mazurak VC, Dajani K, Bhargava R, Gilmour SM, et al. Sarcopenia in Chronic Liver Disease: Impact on Outcomes. Liver Transplantation. 2019;25(9):1422-38.
70. Kalafateli M, Mantzoukis K, Choi Yau Y, Mohammad AO, Arora S, Rodrigues S, et al. Malnutrition and sarcopenia predict post-liver transplantation outcomes independently of the Model for End-stage Liver Disease score. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. 2017;8(2190-6009 (Electronic)):113-21.
71. Harimoto N, Yoshizumi T, Izumi T, Motomura T, Harada N, Itoh S, et al. Clinical Outcomes of Living Liver Transplantation According to the Presence of Sarcopenia as Defined by Skeletal Muscle Mass, Hand Grip, and Gait Speed. Transplantation Proceedings. 2017;49(9):2144-52.
72. Hamaguchi Y, Kaido T, Okumura S, Fujimoto Y, Ogawa K, Mori A, et al. Impact of quality as well as quantity of skeletal muscle on outcomes after liver transplantation. Liver Transplantation. 2014;20(11):1413-9.
73. Masuda T, Shirabe K, Ikegami T, Harimoto N, Yoshizumi T, Soejima Y, et al. Sarcopenia is a prognostic factor in living donor liver transplantation. Liver Transplantation. 2014;20(4):401-7.
74. DiMartini A, Cruz Jr RJ, Dew MA, Myaskovsky L, Goodpaster B, Fox K, et al. Muscle mass predicts outcomes following liver transplantation. Liver Transplantation. 2013;19(11):1172-80.
75. Montano-Loza AJ, Duarte-Rojo A, Meza-Junco J, Baracos VE, Sawyer MB, Pang JX, et al. Inclusion of Sarcopenia Within MELD (MELD-Sarcopenia) and the Prediction of Mortality in Patients With Cirrhosis. Clinical and Translational Gastroenterology. 2015;6(2155-384X (Print)).
76. van Vugt JLA, Alferink LJM, Buettner S, Gaspersz MP, Bot D, Darwish Murad S, et al. A model including sarcopenia surpasses the MELD score in predicting waiting list mortality in cirrhotic liver transplant candidates: A competing risk analysis in a national cohort. Journal of Hepatology. 2018;68(4):707-14.
77. Tandon P, Montano-Loza AJ, Lai JC, Dasarathy S, Merli M. Sarcopenia and frailty in decompensated cirrhosis. J Hepatol. 2021;75(1600-0641 (Electronic)):S147–S62.
78. Scicchitano BM, Dobrowolny G, Sica G, Musarò A. Molecular Insights into Muscle Homeostasis, Atrophy and Wasting. Curr Genomics. 2018;19(5):356-69.
79. Jindal A, Jagdish RK. Sarcopenia: Ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. (2287-285X (Electronic)).
80. Drummond MJ, Dreyer Hc Fau - Fry CS, Fry Cs Fau - Glynn EL, Glynn El Fau - Rasmussen BB, Rasmussen BB. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. (8750-7587 (Print)).
81. Allen SL, Quinlan JI, Dhaliwal A, Armstrong MJ, Elsharkawy AM, Greig CA, et al. Sarcopenia in chronic liver disease: mechanisms and countermeasures. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2020;320(3):G241-G57.
82. Jewell JL, Russell RC, Guan K-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2013;14(3):133-9.

83. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. Cell. 2014;159(4):738-49.
84. Dasarathy S, Merli M. Sarcopenia from mechanism to diagnosis and treatment in liver disease. (1600-0641 (Electronic)).
85. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2005;37(10):1974-84.
86. Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. Cells [Internet]. 2020; 9(9).
87. Velloso CP. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. British Journal of Pharmacology. 2008;154(3):557-68.
88. Ascenzi F, Barberi L, Dobrowolny G, Villa Nova Bacurau A, Nicoletti C, Rizzuto E, et al. Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia. Aging Cell. 2019;18(3):e12954.
89. Song Y-H, Song JL, Delafontaine P, Godard MP. The therapeutic potential of IGF-I in skeletal muscle repair. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2013;24(6):310-9.
90. de la Garza RG, Morales-Garza LA, Martin-Estal I, Castilla-Cortazar I. Insulin-Like Growth Factor-1 Deficiency and Cirrhosis Establishment. J Clin Med Res. 2017;9(4):233-47.
91. Adamek A, Kasprzak A. Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(5).
92. Yin L, Li N, Jia W, Wang N, Liang M, Yang X, et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. Pharmacological Research. 2021;172:105807.
93. Park J, Cho J, Song EJ. Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. Archives of Pharmacal Research. 2020;43(11):1144-61.
94. Khalil R. Ubiquitin-Proteasome Pathway and Muscle Atrophy. Adv Exp Med Biol. 2018;1088(0065-2598 (Print)):235-48.
95. Abrigo J, Campos F, Gonzalez F, Aguirre F, Gonzalez A, Huerta-Salgado C, et al. Sarcopenia Induced by Chronic Liver Disease in Mice Requires the Expression of the Bile Acids Membrane Receptor TGR5. LID - 10.3390/ijms21217922 [doi] LID - 7922. 2020(1422-0067 (Electronic)).
96. Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. The Journal of Physiology. 2005;565(1):309-23.
97. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. The Journal of Clinical Investigation. 2004;113(1):115-23.
98. Ji Y, Li M, Chang M, Liu R, Qiu J, Wang K, et al. Inflammation: Roles in Skeletal Muscle Atrophy. Antioxidants [Internet]. 2022; 11(9).
99. Plant PJ, Bain JR, Correa JE, Woo M, Batt J. Absence of caspase-3 protects against denervation-induced skeletal muscle atrophy. Journal of Applied Physiology. 2009;107(1):224-34.
100. Abrigo J, Marín T, Aguirre F, Tacchi F, Vilos C, Simon F, et al. N-Acetyl Cysteine Attenuates the Sarcopenia and Muscle Apoptosis Induced by Chronic Liver Disease. Current Molecular Medicine. 2020;20(1):60-71.
101. Barbero-Becerra VJ, López-Méndez I, Romo-Araiza A, Visag-Castillo V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, et al. Sarcopenia in chronic liver diseases: a translational overview. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. 2020;14(5):355-66.

102. Nishikawa H, Enomoto H, Ishii A, Iwata Y, Miyamoto Y, Ishii N, et al. Elevated serum myostatin level is associated with worse survival in patients with liver cirrhosis. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle. 2017;8(6):915-25.
103. Abrigo J, Simon F, Cabrera D, Vilos C, Cabello-Verrugio C. Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle Pathologies. Current Protein & Peptide Science. 2019;20(6):536-46.
104. Abrigo J, Gonzalez F, Aguirre F, Tacchi F, Gonzalez A, Meza MP, et al. Cholic acid and deoxycholic acid induce skeletal muscle atrophy through a mechanism dependent on TGR5 receptor. Journal of Cellular Physiology. 2021;236(1):260-72.
105. Abrigo J, Olguín H, Gutierrez D, Tacchi F, Arrese M, Cabrera D, et al. Bile Acids Induce Alterations in Mitochondrial Function in Skeletal Muscle Fibers. Antioxidants [Internet]. 2022; 11(9).
106. Meyer F, Bannert KA-O, Wiese M, Esau S, Sautter LF, Ehlers L, et al. Molecular Mechanism Contributing to Malnutrition and Sarcopenia in Patients with Liver Cirrhosis. LID - 10.3390/ijms21155357 [doi] LID - 5357. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(1422-0067 (Electronic)).
107. Perino A, Demagny H, Velazquez-Villegas L, Schoonjans K. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. Physiological Reviews. 2020;101(2):683-731.
108. Chiang JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling. Comprehensive Physiology2013. p. 1191-212.
109. Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang DJ, Hylemon PB. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. Gut Microbes. 2016;7 (21)(1949-0984 (Electronic)):22-39.
110. Di Ciaula A, Garruti G, Lunardi Baccetto R, Molina-Molina E, Bonfrate L, Wang DQH, et al. Bile Acid Physiology. Annals of Hepatology. 2017;16:S4-S14.
111. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. Nature Reviews Drug Discovery. 2008;7(8):678-93.
112. Orozco-Aguilar J, Simon F, Cabello-Verrugio C. Redox-Dependent Effects in the Physiopathological Role of Bile Acids. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2021;2021:4847941.
113. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. Gastroenterology. 2002;123(5):1667-76.
114. Casey S, Schierwagen R, Mak KY, Klein S, Uschner F, Jansen C, et al. Activation of the Alternate Renin-Angiotensin System Correlates with the Clinical Status in Human Cirrhosis and Corrects Post Liver Transplantation. J Clin Med. 2019;8(4).
115. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. Clin Rev Allergy Immunol. 2009;36(1):4-12.
116. Cabello-Verrugio C, Córdova G, Salas JD. Angiotensin II: role in skeletal muscle atrophy. Curr Protein Pept Sci. 2012;13(6):560-9.
117. Jackman RW, Cornwell EW, Wu C-L, Kandarian SC. Nuclear factor-κB signalling and transcriptional regulation in skeletal muscle atrophy. Exp Physiol. 2013;98(1):19-24.
118. Thoma A, Lightfoot AP. NF-kB and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. - Abstract - Europe PMC. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2018(1088):267-79.

119. Gonzalez A, Huerta-Salgado C, Orozco-Aguilar J, Aguirre F, Tacchi F, Simon F, et al. Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020;2020:1617805.
120. Langen R, Schols A, Kelders M, van der Velden J, Wouters EFM, Janssen-Heininger Y. Tumor necrosis factor-inhibits myogenesis through redox-dependent and-independent pathways. American journal of physiology Cell physiology. 2002;283:C714-21.
121. Yoshida T, Semprun-Prieto L Fau - Sukhanov S, Sukhanov S Fau - Delafontaine P, Delafontaine P. IGF-1 prevents ANG II-induced skeletal muscle atrophy via Akt- and Foxo-dependent inhibition of the ubiquitin ligase atrogin-1 expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;298(1522-1539 (Electronic)):H1565–H70.
122. Wei Y. SJ, Nistala R., Gong H., et al. Angiotensin II-induced NADPH Oxidase Activation Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. The journal of biological chemistry. 2006;281(46):35137–46.
123. Abid H, Hart C, Lanza I. Effects of local Interleukin-6 on Skeletal Muscle Mitochondrial Physiology. The FASEB Journal. 2018;32(S1):603.7-.7.
124. Abrigo J, Rivera J, Aravena J, Cabrera D, Simon F, Ezquer F, et al. High Fat Diet-Induced Skeletal Muscle Wasting Is Decreased by Mesenchymal Stem Cells Administration: Implications on Oxidative Stress, Ubiquitin Proteasome Pathway Activation, and Myonuclear Apoptosis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016;In press:.
125. Olde Damink SWM, Jalan R, Dejong CHC. Interorgan ammonia trafficking in liver disease. Metabolic Brain Disease. 2009;24(1):169-81.
126. Thapaliya S, Runkana A, McMullen M, Nagy L, McDonald C, V Naga S, et al. Alcohol-induced autophagy contributes to loss in skeletal muscle mass. Autophagy. 2014;10.
127. Qiu J, Thapaliya S Fau - Runkana A, Runkana A Fau - Yang Y, Yang Y Fau - Tsien C, Tsien C Fau - Mohan ML, Mohan Ml Fau - Narayanan A, et al. Hyperammonemia in cirrhosis induces transcriptional regulation of myostatin by an NF-κB-mediated mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;110(1091-6490 (Electronic)).
128. Dasarathy S, McCullough AJ, Muc S, Schneyer A, Bennett CD, Dodig M, et al. Sarcopenia associated with portosystemic shunting is reversed by follistatin. Journal of Hepatology. 2011;54(5):915-21.
129. Lee Y-S, Huynh TV, Lee S-J. Paracrine and endocrine modes of myostatin action. Journal of Applied Physiology. 2016;120(6):592-8.
130. Yang YJ, Kim DJ. An Overview of the Molecular Mechanisms Contributing to Musculoskeletal Disorders in Chronic Liver Disease: Osteoporosis, Sarcopenia, and Osteoporotic Sarcopenia. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2021; 22(5).
131. Sinclair M, Grossmann M, Gow PJ, Angus PW. Testosterone in men with advanced liver disease: Abnormalities and implications. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2015;30(2):244-51.
132. Sinclair M, Gow PJ, Grossmann M, Shannon A, Hoermann R, Angus PW. Low serum testosterone is associated with adverse outcome in men with cirrhosis independent of the model for end-stage liver disease score. Liver Transplantation. 2016;22(11):1482-90.
133. Moctezuma-Velázquez C, Low G, Mourtzakis M, Ma M, Burak KW, Tandon P, et al. Association between Low Testosterone Levels and Sarcopenia in Cirrhosis: A Cross-sectional Study. Annals of Hepatology. 2018;17(4):615-23.

134. Dasarathy S, Mullen KD, Dodig M, Donofrio B, McCullough AJ. Inhibition of aromatase improves nutritional status following portacaval anastomosis in male rats. Journal of Hepatology. 2006;45(2):214-20.
135. Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S. Characterization of 5′-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2001;281(6):E1128-E36.
136. Takahashi Y. The Role of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in the Liver. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2017; 18(7).
137. Verzola D, Barisione C, Picciotto D, Garibotto G, Koppe L. Emerging role of myostatin and its inhibition in the setting of chronic kidney disease. Kidney International. 2019;95(3):506-17.
138. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. The FEBS Journal. 2013;280(17):4294-314.
139. McKay BR, Ogborn DI, Bellamy LM, Tarnopolsky MA, Parise G. Myostatin is associated with age-related human muscle stem cell dysfunction. The FASEB Journal. 2012;26(6):2509-21.
140. Lokireddy S, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R, et al. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. American Journal of Physiology - Cell Physiology. 2011.
141. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2009;296(6):C1258-C70.
142. Dasarathy S. Cause and management of muscle wasting in chronic liver disease. Current opinion in gastroenterology. 2016;32(3):159-65.
143. Dasarathy S. Consilience in sarcopenia of cirrhosis. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. 2012;3(4):225-37.
144. Sinclair M, Gow PJ, Grossmann M, Angus PW. Review article: sarcopenia in cirrhosis – aetiology, implications and potential therapeutic interventions. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2016;43(7):765-77.
145. Koretz RL, Avenell A, Lipman TO. Nutritional support for liver disease. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2012(5).
146. Matsuoka S Fau - Tamura A, Tamura A Fau - Nakagawara H, Nakagawara H Fau - Moriyama M, Moriyama M. Improvement in the nutritional status and clinical conditions of patients with liver failure using a liver diet combined with a branched chain amino acids-enriched elemental diet. Hepatogastroenterology. 2014;61 (133)(0172-6390 (Print)):1308-12.
147. Fialla AD, Israelsen M, Hamberg O, Krag A, Gluud LL. Nutritional therapy in cirrhosis or alcoholic hepatitis: a systematic review and meta-analysis. Liver International. 2015;35(9):2072-8.
148. Nguyen DL, Morgan T. Protein restriction in hepatic encephalopathy is appropriate for selected patients: a point of view. Hepatology International. 2014;8(2):447-51.
149. Metcalfe EL, Avenell A, Fraser A. Branched-chain amino acid supplementation in adults with cirrhosis and porto-systemic encephalopathy: Systematic review. Clinical Nutrition. 2014;33(6):958-65.

150. Gluud LL, Dam G, Borre M, Les I, Cordoba J, Marchesini G, et al. Oral Branched-Chain Amino Acids Have a Beneficial Effect on Manifestations of Hepatic Encephalopathy in a Systematic Review with Meta-Analyses of Randomized Controlled Trials. The Journal of Nutrition. 2013;143(8):1263-8.
151. Carroll B, Korolchuk VI, Sarkar S. Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis. Amino Acids. 2015;47(10):2065-88.
152. Tsien C, Davuluri G, Singh D, Allawy A, Ten Have GAM, Thapaliya S, et al. Metabolic and molecular responses to leucine-enriched branched chain amino acid supplementation in the skeletal muscle of alcoholic cirrhosis. Hepatology. 2015;61(6):2018-29.
153. Orr R, Singh MF. The Anabolic Androgenic Steroid Oxandrolone in the Treatment of Wasting and Catabolic Disorders. Drugs. 2004;64(7):725-50.
154. Rambaldi A, Iaquinto G, Gluud C. Anabolic-Androgenic Steroids for Alcoholic Liver Disease: A Cochrane Review. Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG. 2002;97(7).
155. Carey EJ, Lai JA-O, Sonnenday C, Tapper EB, Tandon P, Duarte-Rojo A, et al. A North American Expert Opinion Statement on Sarcopenia in Liver Transplantation. Hepatology. 2019;70 (5)(1527-3350 (Electronic)):1816-29.
156. García PS, Cabbabe A, Kambadur R, Nicholas G, Csete M. Brief-reports: elevated myostatin levels in patients with liver disease: a potential contributor to skeletal muscle wasting. Anesthesia and analgesia. 2010;111(3):707-9.
157. Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, et al. Aerobic versus Resistance Exercise in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. Journal of Hepatology. 2016;66.
158. Chalasani Naga YZ, Lavine Joel E. , Mae Diehl Anna , Brunt Elizabeth M., Cusi Kenneth, Charlton Michael and Sanyal Arun J. 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 American Gastroenterological Association. Hepatology. 2012;55(6):2005-23.
159. Duarte-Rojo A, Ruiz-Margáin A, Montaño-Loza AJ, Macías-Rodríguez RU, Ferrando A, Kim WR. Exercise and physical activity for patients with end-stage liver disease: Improving functional status and sarcopenia while on the transplant waiting list. Liver Transplantation. 2018;24(1):122-39.
160. Takahashi Y. The Role of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in the Liver. International journal of molecular sciences. 2017;18(7):1447.
161. Williams FR, Berzigotti A, Lord JM, Lai JC, Armstrong MJ. Review article: impact of exercise on physical frailty in patients with chronic liver disease. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2019;50(9):988-1000.
162. Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Implications for liver transplantation. Liver Transpl. 2018;24(2):166-70.
163. Aamann L, Dam G, Borre M, Drljevic-Nielsen A, Overgaard K, Andersen H, et al. Resistance Training Increases Muscle Strength and Muscle Size in Patients With Liver Cirrhosis. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2020;18(5):1179-87.e6.
164. Aamann L, Ochoa-Sanchez R, Oliveira M, Tremblay M, Bémeur C, Dam G, et al. Progressive resistance training prevents loss of muscle mass and strength in bile duct ligated rats. Liver International. 2018;39.

165. Moore SA, Hrisos N, Errington L, Rochester L, Rodgers H, Witham M, et al. Exercise as a treatment for sarcopenia: an umbrella review of systematic review evidence. Physiotherapy. 2020;107:189-201.
166. Gonzalez A, Valero-Breton M, Huerta-Salgado C, Achiardi O, Simon F, Cabello-Verrugio C. Impact of exercise training on the sarcopenia criteria in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. European Journal of Translational Myology. 2021;31(4).
167. Aamann L, Dam G, Rinnov AR, Vilstrup H, Gluud LL. Physical exercise for people with cirrhosis. The Cochrane Database of Systematic Reviews. 2018;2018(12).
168. Committee on Sports Medicine and F. Strength Training by Children and Adolescents. Pediatrics. 2001;107(6):1470-2.
169. Ferguson B. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription 9th Ed. 2014. J Can Chiropr Assoc. 2014;58 (3)(0008-3194 (Print)).
170. Khoury SR, Evans NS, Ratchford EV. Exercise as medicine. Vascular Medicine. 2019;24(4):371-4.
171. Cristi-Montero C, Sadarangani K, von Oetinger A, Walbaum M. Recomendaciones de actividad física para personas con comorbilidad - 20172017.
172. Hornberger TA, Jr., Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. Can J Appl Physiol. 2004;29 (1)(1066-7814 (Print)).
173. Strickland JC, Smith MA. Animal models of resistance exercise and their application to neuroscience research. Journal of neuroscience methods. 2016;273:191-200.
174. Neto W, Ciena A, Anaruma C, Gama E, Silva W. Vertical Climbing for Rodent Resistance Training: a Discussion about Training Parameters. International Journal of Sports Science. 2016;2016:36-49.
175. Shephard RJ. Essentials of strength training and conditioning. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2009;34:87.
176. Liu TC-Y, Liu G, Hu S-J, Zhu L, Yang X-B, Zhang Q-G. Quantitative Biology of Exercise-Induced Signal Transduction Pathways. Advances in experimental medicine and biology. 2017;977:419-24.
177. Francaux M, Deldicque L. Exercise and the control of muscle mass in human. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2019;471.
178. Villareal DT, Aguirre L, Gurney AB, Waters DL, Sinacore DR, Colombo E, et al. Aerobic or Resistance Exercise, or Both, in Dieting Obese Older Adults. New England Journal of Medicine. 2017;376(20):1943-55.
179. Ruas Jorge L, White James P, Rao Rajesh R, Kleiner S, Brannan Kevin T, Harrison Brooke C, et al. A PGC-1α Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy. Cell. 2012;151(6):1319-31.
180. Grgic J, Schoenfeld BJ, Latella C. Resistance training frequency and skeletal muscle hypertrophy: A review of available evidence. Journal of Science and Medicine in Sport. 2019;22(3):361-70.
181. Yang Y-Y, Lin H-C. Alteration of intrahepatic microcirculation in cirrhotic livers. Journal of the Chinese Medical Association. 2015;78(8).
182. MacDougall JD, Tuxen D, Sale DG, Moroz JR, Sutton JR. Arterial blood pressure response to heavy resistance exercise. Journal of Applied Physiology. 1985;58(3):785-90.

183. Bellar A, Welch NA-O, Dasarathy S. Exercise and physical activity in cirrhosis: opportunities or perils. J Appl Physiol (1985). 2020;128(1522-1601 (Electronic)).
184. Gonzalez A, Valero-Breton M, Huerta-Salgado C, Achiardi O, Simon F, Cabello-Verrugio C. Impact of exercise training on the sarcopenia criteria in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. European Journal of Translational Myology. 2021;31(1).
185. Berzigotti A, Saran U, Dufour J-F. Physical activity and liver diseases. Hepatology. 2016;63(3):1026-40.
186. Morici G, Gruttad'Auria CI, Baiamonte P, Mazzuca E, Castrogiovanni A, Bonsignore MR. Endurance training: is it bad for you? Breathe (Sheffield, England). 2016;12(2):140-7.
187. Hawley JA, Lundby C, Cotter JD, Burke LM. Maximizing Cellular Adaptation to Endurance Exercise in Skeletal Muscle. Cell Metabolism. 2018;27(5):962-76.
188. Jones AM, Carter H. The Effect of Endurance Training on Parameters of Aerobic Fitness. Sports Medicine. 2000;29(6):373-86.
189. Holloszy JO, Rennie MJ, Hickson RC, Conlee RK, Hagberg JM. PHYSIOLOGICAL CONSEQUENCES OF THE BIOCHEMICAL ADAPTATIONS TO ENDURANCE EXERCISE*. Annals of the New York Academy of Sciences. 1977;301(1):440-50.
190. Holloszy Jo Fau - Coyle EF, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1984;56 (4)(0161-7567 (Print)):831-8.
191. Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. J Biol Chem. 1967;242 (9)(0021-9258 (Print)):2278-82.
192. Lundby C, Jacobs RA. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. Experimental Physiology. 2016;101(1):17-22.
193. Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, Spiegelman BM, et al. Muscle-specific expression of PPARγ coactivator-1α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. Journal of Applied Physiology. 2008;104(5):1304-12.
194. Costill Dl Fau - Daniels J, Daniels J Fau - Evans W, Evans W Fau - Fink W, Fink W Fau - Krahenbuhl G, Krahenbuhl G Fau - Saltin B, Saltin B. Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. J Appl Physiol. 1976;40 (2)(0021-8987 (Print)):149-54.
195. Blomstrand E, Rådegran G, Saltin B. Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. The Journal of Physiology. 1997;501(2):455-60.
196. van der Zwaard S, Brocherie F, Jaspers RT. Under the Hood: Skeletal Muscle Determinants of Endurance Performance. Frontiers in Sports and Active Living. 2021;3.
197. Van der Zwaard S, Ruiter C, Noordhof D, Sterrenburg R, Bloemers F, de Koning J, et al. Maximal oxygen uptake is proportional to muscle fiber oxidative capacity - from chronic heart failure patients to professional cyclists. Journal of Applied Physiology. 2016;121:jap.00355.2016.
198. Jacobs RA, Lundby C. Contextualizing the biological relevance of standardized high-resolution respirometry to assess mitochondrial function in permeabilized human skeletal muscle. Acta Physiologica. 2021;231(4):e13625.
199. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature. 2002;418(6899):797-801.

200. Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, et al. PGC-1α plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2009;298(3):C572-C9.
201. Rowe GC, El-Khoury R, Patten IS, Rustin P, Arany Z. PGC-1α is Dispensable for Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle. PLOS ONE. 2012;7(7):e41817.
202. Horowitz JF, Sidossis LS, Coyle EF. High Efficiency of Type I Muscle Fibers Improves Performance. Int J Sports Med. 1994;15(03):152-7.
203. van Wessel T, de Haan A, van der Laarse WJ, Jaspers RT. The muscle fiber type–fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? European Journal of Applied Physiology. 2010;110(4):665-94.
204. Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA, et al. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. The Journal of Physiology. 2008;586(15):3701-17.
205. Donges CE, Burd NA, Duffield R, Smith GC, West DWD, Short MJ, et al. Concurrent resistance and aerobic exercise stimulates both myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in sedentary middle-aged men. Journal of Applied Physiology. 2012;112(12):1992-2001.
206. Di Donato DM, West DWD, Churchward-Venne TA, Breen L, Baker SK, Phillips SM. Influence of aerobic exercise intensity on myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in young men during early and late postexercise recovery. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2014;306(9):E1025-E32.
207. Carraro F, Stuart CA, Hartl WH, Rosenblatt J, Wolfe RR. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 1990;259(4):E470-E6.
208. Sheffield-Moore M, Yeckel CW, Volpi E, Wolf SE, Morio B, Chinkes DL, et al. Postexercise protein metabolism in older and younger men following moderate-intensity aerobic exercise. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2004;287(3):E513-E22.
209. Pasiakos SM, Carbone JW. Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise. IUBMB Life. 2014;66(7):478-84.
210. Stefanetti RJ, Lamon S, Wallace M, Vendelbo MH, Russell AP, Vissing K. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2015;467(7):1523-37.
211. Morton RW, Traylor DA, Weijs PJM, Phillips SM. Defining anabolic resistance: implications for delivery of clinical care nutrition. Current Opinion in Critical Care. 2018;24(2).
212. Haran P, Rivas D, Fielding R. Role and potential mechanisms of anabolic resistance in sarcopenia. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle. 2012;3:157-62.
213. Sullivan S, Kirk EP, Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S. Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology (Baltimore, Md). 2012;55(6):1738-45.
214. Pugh CJA, Cuthbertson DJ, Sprung VS, Kemp GJ, Richardson P, Margot Umpleby A, et al. Exercise training improves cutaneous microvascular function in nonalcoholic fatty liver disease. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2013;305(1):E50-E8.

215. Pugh CJA, Sprung VS, Kemp GJ, Richardson P, Shojaee-Moradie F, Umpleby AM, et al. Exercise training reverses endothelial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2014;307(9):H1298-H306.
216. Hughes DC, Ellefsen S, Baar K. Adaptations to Endurance and Strength Training. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2018;8(6):a029769.
217. van der Windt DJ, Sud V, Zhang H, Tsung A, Huang H. The Effects of Physical Exercise on Fatty Liver Disease. Gene Expression. 2018;18(2):89-101.
218. Brouwers B, Hesselink MKC, Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling VB. Effects of exercise training on intrahepatic lipid content in humans. Diabetologia. 2016;59(10):2068-79.
219. Naseer M, Turse EP, Syed A, Dailey FE, Zatreh M, Tahan V. Interventions to improve sarcopenia in cirrhosis: A systematic review. World Journal of Clinical Cases. 2019;7(2):156-70.
220. Baar K. Using Molecular Biology to Maximize Concurrent Training. Sports Medicine. 2014;44(2):117-25.
221. Coffey VG, Hawley JA. Concurrent exercise training: do opposites distract? The Journal of Physiology. 2017;595(9):2883-96.
222. Nader GA. Concurrent Strength and Endurance Training: From Molecules to Man. Medicine & Science in Sports & Exercise. 2006;38(11).
223. Murach KA, Bagley JR. Skeletal Muscle Hypertrophy with Concurrent Exercise Training: Contrary Evidence for an Interference Effect. Sports Medicine. 2016;46(8):1029-39.
224. Fyfe JJ, Bishop DJ, Stepto NK. Interference between Concurrent Resistance and Endurance Exercise: Molecular Bases and the Role of Individual Training Variables. Sports Medicine. 2014;44(6):743-62.
225. Lundberg TR, Fernandez-Gonzalo R, Gustafsson T, Tesch PA. Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training. Journal of Applied Physiology. 2012;114(1):81-9.
226. Berzigotti A, Albillos A, Villanueva C, Genescá J, Ardevol A, Augustín S, et al. Effects of an intensive lifestyle intervention program on portal hypertension in patients with cirrhosis and obesity: The SportDiet study. Hepatology. 2017;65(4):1293-305.
227. Macías-Rodríguez RU, Ilarraza-Lomelí H, Ruiz-Margáin A, Ponce-de-León-Rosales S, Vargas-Vorácková F, García-Flores O, et al. Changes in Hepatic Venous Pressure Gradient Induced by Physical Exercise in Cirrhosis: Results of a Pilot Randomized Open Clinical Trial. Clinical and Translational Gastroenterology. 2016;7(7).
228. Hallsworth K, Thoma C, Hollingsworth Kieren G, Cassidy S, Anstee Quentin M, Day Christopher P, et al. Modified high-intensity interval training reduces liver fat and improves cardiac function in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. Clinical Science. 2015;129(12):1097-105.
229. Houghton D, Thoma C, Hallsworth K, Cassidy S, Hardy T, Burt AD, et al. Exercise Reduces Liver Lipids and Visceral Adiposity in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis in a Randomized Controlled Trial. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2017;15(1):96-102.e3.
230. Debette-Gratien M, Tabouret T, Antonini M-T, Dalmay F, Carrier P, Legros R, et al. Personalized adapted physical activity before liver transplantation: acceptability and results. Transplantation. 2015;99(1):145-50.

231. Williams FR, Vallance A, Faulkner T, Towey J, Kyte D, Durman S, et al. Home-based exercise therapy in patients awaiting liver transplantation: protocol for an observational feasibility trial. BMJ Open. 2018;8(1):e019298.
232. Laure-Alix C, Noémi VH, S.H. GA, Rita M, Regina E-S, A. LI. Relevance of the CDE and DDC Mouse Models to Study Ductular Reaction in Chronic Human Liver Diseases, Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy. 2017.
233. Lourenço Í, Krause Neto W, dos Santos Portella Amorim L, Moraes Munhoz Ortiz V, Lopes Geraldo V, Henrique da Silva Ferreira G, et al. Muscle hypertrophy and ladder-based resistance training for rodents: A systematic review and meta-analysis. Physiological Reports. 2020;8(17):e14502.
234. Hornberger TA, Jr., Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. (1066-7814 (Print)).
235. Américo ALV, Muller CR, Vecchiatto B, Martucci LF, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. PloS one. 2019;14(4):e0215896-e.
236. Tanner CB, Madsen SR, Hallowell DM, Goring DMJ, Moore TM, Hardman SE, et al. Mitochondrial and performance adaptations to exercise training in mice lacking skeletal muscle LKB1. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2013;305(8):E1018-E29.
237. Martinez-Huenchullan SF, Shipsey I, Hatchwell L, Min D, Twigg SM, Larance M. Blockade of High-Fat Diet Proteomic Phenotypes using Exercise as Prevention or Treatment. Molecular & Cellular Proteomics. 2020:mcp.TIR120.002343.
238. Au - Deacon RMJ. Measuring the Strength of Mice. JoVE. 2013(76):e2610.
239. Deacon RMJ. Measuring the strength of mice. Journal of visualized experiments : JoVE. 2013(76):2610.
240. Aguirre F, Abrigo J, Gonzalez F, Gonzalez A, Simon F, Cabello-Verrugio C. Protective Effect of Angiotensin 1-7 on Sarcopenia Induced by Chronic Liver Disease in Mice. International journal of molecular sciences. 2020;21(11):3891.
241. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics. 2010;1(2):87-93.
242. Zhang P, Hamamura K, Turner CH, Yokota H. Lengthening of mouse hindlimbs with joint loading. Journal of Bone and Mineral Metabolism. 2010;28(3):268-75.
243. Márquez-Miranda V, Abrigo J, Rivera JC, Araya-Durán I, Aravena J, Simon F, et al. The complex of PAMAM-OH dendrimer with Angiotensin (1-7) prevented the disuse-induced skeletal muscle atrophy in mice. International journal of nanomedicine. 2017;12:1985-99.
244. Acuña MJ, Pessina P, Olguin H, Cabrera D, Vio CP, Bader M, et al. Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF-β signalling. Human Molecular Genetics. 2014.
245. Morales MG, Cabrera D, Céspedes C, Vio CP, Vazquez Y, Brandan E, et al. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme decreases skeletal muscle fibrosis in dystrophic mice by a diminution in the expression and activity of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2). Cell and Tissue Research. 2013;353(1):173-87.
246. Cisternas F, Morales MG, Meneses C, Simon F, Brandan E, Abrigo J, et al. Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. Clinical Science. 2015.

247. Meneses C, Morales MG, Abrigo J, Simon F, Brandan E, Cabello-Verrugio C. The angiotensin-(1–7)/Mas axis reduces myonuclear apoptosis during recovery from angiotensin II-induced skeletal muscle atrophy in mice. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2015;467(9):1975-84.
248. McClung JM, Kavazis AN, DeRuisseau KC, Falk DJ, Deering MA, Lee Y, et al. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. American journal of respiratory and critical care medicine. 2007;175(2):150-9.
249. Morales M. VY, Acuña M., et al. Angiotensin II-induced pro-fibrotic effects require p38MAPK activity and transforming growth factor beta 1 expression in skeletal muscle cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2012;44(2012):1993– 2002.
250. Morales MG, Abrigo J, Acuña MJ, Santos RA, Bader M, Brandan E, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates disuse skeletal muscle atrophy in mice via its receptor, Mas. Disease models & mechanisms. 2016;9(4):441-9.
251. Thavasu PW, Longhurst S, Joel SP, Slevin ML, Balkwill FR. Measuring cytokine levels in blood: Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. Journal of Immunological Methods. 1992;153(1):115-24.
252. Liu Y, Meyer C, Xu C, Weng H, Hellerbrand C, ten Dijke P, et al. Animal models of chronic liver diseases. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2012;304(5):G449-G68.
253. Laure L, Danièle N, Suel L, Marchand S, Aubert S, Bourg N, et al. A new pathway encompassing calpain 3 and its newly identified substrate cardiac ankyrin repeat protein is involved in the regulation of the nuclear factor-κB pathway in skeletal muscle. The FEBS Journal. 2010;277(20):4322-37.
254. Fickert P, Trauner M, Fuchsbichler A, Stumptner C, Zatloukal K, Denk H. Bile Acid-Induced Mallory Body Formation in Drug-Primed Mouse Liver. The American Journal of Pathology. 2002;161(6):2019-26.
255. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2011;25(2):319-33.
256. Finucane FM, Sharp SJ, Purslow LR, Horton K, Horton J, Savage DB, et al. The effects of aerobic exercise on metabolic risk, insulin sensitivity and intrahepatic lipid in healthy older people from the Hertfordshire Cohort Study: a randomised controlled trial. Diabetologia. 2010;53(4):624-31.
257. Bishop DJ, Girard O, Mendez-Villanueva A. Repeated-Sprint Ability Part II: Recommendations for Training. Sports medicine (Auckland, NZ). 2011;41:741-56.
258. Blagrove RC, Howatson G, Hayes PR. Effects of Strength Training on the Physiological Determinants of Middle- and Long-Distance Running Performance: A Systematic Review. Sports Medicine. 2018;48(5):1117-49.
259. Girard O, Mendez-Villanueva A, Bishop DJ. Repeated-Sprint Ability Part I: Factors Contributing to Fatigue. Sports medicine (Auckland, NZ). 2011;41:673-94.
260. Sloth M, Sloth D, Overgaard K, Dalgas U. Effects of sprint interval training on VO2max and aerobic exercise performance: A systematic review and meta-analysis. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports. 2013;23(6):e341-e52.
261. Taylor J, Macpherson T, Spears I, Weston M. The Effects of Repeated-Sprint Training on Field-Based Fitness Measures: A Meta-Analysis of Controlled and Non-Controlled Trials. Sports Medicine. 2015;45(6):881-91.

262. Philp A, Hamilton DL, Baar K. Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1. Journal of Applied Physiology. 2010;110(2):561-8.
263. Au - Park KH, Au - Brotto L, Au - Lehoang O, Au - Brotto M, Au - Ma J, Au - Zhao X. Ex Vivo Assessment of Contractility, Fatigability and Alternans in Isolated Skeletal Muscles. JoVE. 2012(69):e4198.
264. Fragala MS, Cadore EL, Dorgo S, Izquierdo M, Kraemer WJ, Peterson MD, et al. Resistance Training for Older Adults: Position Statement From the National Strength and Conditioning Association. The Journal of Strength & Conditioning Research. 2019;33(8).
265. Valenzuela PL, Castillo-García A, Morales JS, Izquierdo M, Serra-Rexach JA, Santos-Lozano A, et al. Physical Exercise in the Oldest Old. Comprehensive Physiology2019. p. 1281-304.
266. Izquierdo M, Merchant RA, Morley JE, Anker SD, Aprahamian I, Arai H, et al. International Exercise Recommendations in Older Adults (ICFSR): Expert Consensus Guidelines. The journal of nutrition, health & aging. 2021;25(7):824-53.
267. Papadopoulou SK. Sarcopenia: A Contemporary Health Problem among Older Adult Populations. Nutrients. 2020;12(5):1293.
268. Erlandson MC, Lorbergs AL, Mathur S, Cheung AM. Muscle analysis using pQCT, DXA and MRI. European Journal of Radiology. 2016;85(8):1505-11.
269. Guerri S, Mercatelli D, Gómez MPA, Napoli A, Battista G, Guglielmi G, et al. Quantitative imaging techniques for the assessment of osteoporosis and sarcopenia. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery; Vol 8, No 1 (February 2018): Quantitative Imaging in Medicine and Surgery (Imaging and Diagnostics of Osteoporosis and Sarcopenia Special Issue). 2018.
270. Janssen I, Heymsfield SB, Wang Z, Ross R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. Journal of Applied Physiology. 2000;89(1):81-8.
271. Dey DK, Bosaeus I, Lissner L, Steen B. Changes in body composition and its relation to muscle strength in 75-year-old men and women: a 5-year prospective follow-up study of the NORA cohort in Göteborg, Sweden. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif). 2009;25(6):613-9.
272. Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, et al. The Loss of Skeletal Muscle Strength, Mass, and Quality in Older Adults: The Health, Aging and Body Composition Study. The Journals of Gerontology: Series A. 2006;61(10):1059-64.
273. Mathai A, Bonen A, Benton C, Robinson DL, Graham T. Rapid exercise-induced changes in PGC-1 mRNA and protein in human skeletal muscle. Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985). 2008;105:1098-105.
274. Bouchard C, Rankinen T. Individual differences in response to regular physical activity. Medicine & Science in Sports & Exercise. 2001;33(6).
275. Montero D, Lundby C. Refuting the myth of non-response to exercise training: 'non-responders' do respond to higher dose of training. The Journal of Physiology. 2017;595(11):3377-87.
276. Qiu J, Thapaliya S, Runkana A, Yang Y, Tsien C, Mohan ML, et al. Hyperammonemia in cirrhosis induces transcriptional regulation of myostatin by an NF-κB-mediated mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(45):18162-7.

277. Qiu J, Thapaliya S, Runkana A, Yang Y, Tsien C, Mohan ML, et al. Hyperammonemia in cirrhosis induces transcriptional regulation of myostatin by an NF-κB–mediated mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(45):18162-7.
278. Qiu J, Tsien C, Thapalaya S, Narayanan A, Weihl CC, Ching JK, et al. Hyperammonemia-mediated autophagy in skeletal muscle contributes to sarcopenia of cirrhosis. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2012;303(8):E983-E93.
279. Dam G, Keiding S, Munk O, Ott P, Buhl M, Vilstrup H, et al. Branched-chain amino acids increase arterial blood ammonia despite enhanced intrinsic muscle ammonia metabolism in patients with cirrhosis and healthy subjects. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2011;301:G269-77.
280. Son SW, Song DS, Chang UI, Yang JM. Definition of Sarcopenia in Chronic Liver Disease. Life [Internet]. 2021; 11(4).
281. Chen L-K, Woo J, Assantachai P, Auyeung T-W, Chou M-Y, Iijima K, et al. Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 Consensus Update on Sarcopenia Diagnosis and Treatment. Journal of the American Medical Directors Association. 2020;21(3):300-7.e2.

10. Anexos

Anexo 1. Detalles de la adaptación a las evaluaciones (Rotarod y Treadmill) y al entrenamiento de fuerza (Ladder Climb), que realizaron los animales previo al inicio de la intervención experimental.

Días	Rotarod	Treadmill	Ladder Climb
Día 1	2 minutos a 4 RPM	5 minutos sin movimiento + 5 minutos a 10 cm/s de velocidad. Sin inclinación	Subir la escalera con el PC. 10 repeticiones
Día 2	4 minutos desde 4 a 15 RPM	4 minutos a 10 cm/s de velocidad + 5 minutos a 15 cm/s de velocidad Sin inclinación	Subir la escalera con 1 g adherido en la cola 1 serie x 10 repeticiones
Día 3	5 minutos desde 4 a 20 RPM	5 minutos a 15 cm/s + 5 minutos a 20 cm/s de velocidad. Sin inclinación	Subir la escalera con 5% del peso corporal 1 serie x 10 repeticiones
Día 4	5 minutos desde 4 a 25 RPM		
Observaciones	En caso de caer, el animal se vuelve a ubicar en el cilindro		
Referencias	Modificado de Campos, 2018	Modificado de Tanner, 2013	Modificado de Neto, 2013 y 2016; Sheffer, 2012 y Hornberger, 2004

RPM: revoluciones por minuto; PC: peso corporal; cm/s: centímetros /segundo; g: gramo; %: porcentaje.

Anexo 2. Productividad

a) Artículos relacionados a los objetivos de la tesis:

Andrea González, Mayalen Valero Bretón, Camila Huerta Salgado, Oscar Achiardi, Felipe Simon, Claudio Cabello Verrugio (2021). Impact of exercise training on the sarcopenia associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in humans: a systematic review and meta-analysis. Eur J Transl Myol 31 (1): 9630, 2021 doi: 10.4081/ejtm.2021.9630 (Scopus). (Objetivo 1, 2 y 3 de la tesis)

b) Artículos no relacionados con los objetivos de la tesis.

Andrea González, Oscar Achiardi, Martina Valencia, Felipe Simon,Claudio Cabello-Verrugio (2022). Physical Activity, Burnout, and Engagement in Latin American Students of Higher Education during the COVID-19 Pandemic. Advances in Experimental Medicine and Biology. Aceptado.

Vania Morales, **Andrea González**, Felipe Simon, Claudio Cabello-Verrugio, Upregulation of CCL5/RANTES gene expression in the diaphragm of mice with cholestatic liver disease. Advances in Experimental Medicine and Biology. Aceptado.

Andrea Gonzalez, Felipe Simon, Oscar Achiardi, Cristian Vilos, Daniel Cabrera, Claudio Cabello-Verrugio, "The Critical Role of Oxidative Stress in Sarcopenic Obesity", Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2021, Article ID 4493817, 14 pages, 2021. https://doi.org/10.1155/2021/4493817 (ISI).

Andrea González, Josué Orozco Aguilar, Oscar Achiardi, Felipe Simon, Claudio Cabello Verrugio (2020). SARSCoV-2/Renin–Angiotensin System: Deciphering the Clues for a Couple with Potentially Harmful Effects on Skeletal Muscle, International Journal of Molecular Sciences, 21, 21, ISSN: 1422-0067, 2020, 1-18, DOI/URL: 10.3390/ijms21217904 (ISI)

Andrea González, Camila Huerta Salgado, Josué Orozco Aguilar, Francisco Aguirre, Franco Tacchi, Felipe Simon, Claudio Cabello Verrugio (2020). Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 1-16, DOI/URL: 10.1155/2020/1617805 (ISI)

Johanna Abrigo, Fabián Campos, Francisco Gonzalez, Francisco Aguirre, **Andrea González**, Camila Huerta-Salgado, Sabrina Conejeros, Felipe Simon, Marco Arrese, Daniel Cabrera, Alvaro A. Elorza, Claudio Cabello-Verrugio (2020). Sarcopenia Induced by Chronic Liver Disease in Mice Requires the Expression of the Bile Acids Membrane Receptor TGR5, International Journal of Molecular Sciences, 21, 21, ISSN: 1422-0067, 2020, 1-23, DOI/URL: 10.3390/ijms21217922 (ISI).

Johanna Abrigo, Francisco Gonzalez, Francisco Aguirre, Franco Tacchi, **Andrea González**, María Paz Meza, Felipe Simon, Daniel Cabrera, Marco Arrese, Saul Karpen, Claudio Cabello Verrugio (2020). Cholic acid and deoxycholic acid induce skeletal muscle atrophy through a mechanism dependent on TGR5 receptor, Journal of cellular physiology, 2020, 1-13, DOI/URL: 10.1002/jcp.29839 (ISI)

Francisco Aguirre, Johanna Abrigo, Francisco Gonzalez, **Andrea González**, Felipe Simon, Claudio Cabello Verrugio (2020). Protective Effect of Angiotensin 1–7 on Sarcopenia Induced by Chronic Liver Disease in Mice, International Journal Molecular Science, 21, 11, 2020, 1-16, DOI/URL: 10.3390/ijms21113891(ISI)

Javier Aravena, Johanna Abrigo, Francisco Gonzalez, Francisco Aguirre, **Andrea González,** Felipe Simon, Claudio Cabello-Verrugio (2020). Angiotensin (1-7) Decreases Myostatin-Induced NF-kB Signaling and Skeletal Muscle Atrophy, International Journal Molecular Science, 21, 3, 2020, 1-15, DOI/URL: 10.3390/ijms21031167 (ISI)

c) Manuscritos en preparación directamente relacionados a los objetivos de la tesis.

“Resistance training and endurance training improves sarcopenia criteria in animal model of chronic liver disease”.

“Concurrent training improves sarcopenia in a mouse model of cholestatic chronic liver disease”.

Anexo 3. Participación en Congresos

a) Congresos internacionales

27th Annual Congress of the European College of Sport Science (ECSC), Sevilla, España, 29 de agosto al 02 de septiembre de 2022. Presentation oral: “Physical training improves the sarcopenia criteria in a mice model of chronic liver disease”. Autores: **Andrea González**, Vania Morales, Mayalen Valero, Claudio Cabello Verrugio.

XII Simposio internacional de péptidos vasoactivos, Minas Gerais, Brasil, noviembre 2019. Poster “Effect of the administration of Angiotensin-(1-7) on skeletal muscle atrophy in a murine model of chronic liver disease”. Autores: Francisco Aguirre, Johana Abrigo, **Andrea González**, Claudio Cabello Verrugio.

b) Congresos nacionales

XXXVII Reunión anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SChCF), 22-25 de noviembre 2022. Poster “Satellite cell function in chronic liver disease-induced sarcopenia: effect of resistance training as a therapeutical strategy”. Autores: Mayalen Valero Breton, Francisco Aguirre, **Andrea González**, Claudio Cabello Verrugio.

XXXVI Reunión anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SChCF), 29 de noviembre 29 al 03 de diciembre de 2021. Presentación oral “Estudio preclínico comparativo del efecto de entrenamientos físico de resistencia y de fuerza sobre los parámetros de sarcopenia secundaria a enfermedad hepática crónica”. Autores: **Andrea González Rojas,** Vania Morales Villanueva, Claudio Cabello-Verrugio

Anexo 4. Acta de aprobación Bioética.

COMITÉ DE BIOÉTICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA
UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Santiago, 10 de diciembre de 2019.

Acta de Aprobación
015/2019

Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Vida (FCV) constituido en conformidad al Decreto Universitario 1939/2012, 2084/2014 y la resolución 89584/2018 de la Universidad Andrés Bello con fecha 24 de septiembre de 2018.

Revisión de los antecedentes por los miembros del Comité.

Dra. Ana Piñeiro, presidenta del Comité de Bioética de la FCV, investigadora FCV, UNAB.
Dr. Fernando Faunes, investigador FCV, UNAB.

1. **Nombre del proyecto:** Angiotensina 1-7 junto a entrenamiento fuerza tienen un efecto preventivo sobre la sarcopenia que caracteriza al músculo esquelético en la Enfermedad Hepática crónica.
2. **Investigador responsable:** Dr. Claudio Cabello.
3. **Revisión de observaciones**: 27 de noviembre 2019.
4. **Respuesta de observaciones:** 10 de diciembre 2019.

Este informe se refiere a la revisión que este Comité realizó a los protocolos de experimentos de la investigación autofinanciada, junto a la carta de solicitud de evaluación de antecedentes, el formulario de manejo de animales de laboratorio y la hoja de seguimiento de animales con la escala de dolor asociada.

Se evaluaron los siguientes requisitos Bioéticos.

1. El objetivo principal es investigar si el péptido angiotensina 1-7 junto al entrenamiento de fuerza, tienen un mayor efecto preventivo sobre la sarcopenia que caracteriza la Enfermedad hepática crónica (EHC) para la recuperación temprana de la función muscular en un modelo murino al que se le induce la patología mediante la dieta.
2. Se justifica el uso de muestras obtenidas desde animales, en vez de usar modelos alternativos porque el interés de la investigación es cómo el ejercicio muscular (entrenamiento) puede tener un efcto en la recuperación temprana de la función muscular.
3. El investigador propone utilizar 136 individuos de *Mus musculus* vivos, animales juveniles, machos, cuyos cálculos están bien justificados por un cálculo muestral, y asociados al objetivo del estudio, descritos en el Propósito de la Investigación.
4. Los procedimientos clínicos que se van a realizar están bien descritos y son los adecuados para la inducción de la enfermedad hepática crónica en los animales, el

entrenamiento y prueba de fuerza muscular, capacidad aeróbica, balance y coordinación de los roedores.

5. Los procedimientos quirúrgicos son adecuados para la entrega del péptido Angiotensina 1-7 a través de una minibomba subcutánea, así como la eutanasia de los animales.
6. Este Comité estima que los procedimientos metodológicos a utilizar no presentan ninguna objeción bioética.
7. Se presentó a este Comité la **carta de solicitud de evaluación de antecedentes**, el **protocolo de manejo de animales de laboratorio** y la **hoja de seguimiento de animales**; todos los cuales fueron satisfactoriamente recibidos y revisados por el Comité.
8. El Comité estima que el número de grupos de animales para la experimentación es adecuado, así como también los procedimientos utilizados, y cumplen con la regla de las "Tres Rs" de Russell y Burch.
9. El Comité considera que no hay objeciones bioéticas para la propuesta presentada, siendo esta certificación válida para los experimentos que se realizarán en las instalaciones de la UNAB identificadas en el Protocolo de manejo de animales.

Se adjuntan como parte del Acta de Aprobación (1) el Protocolo de manejo de animales silvestres y (2) las hojas de seguimiento de animales.

Si requiere cambiar los protocolos de manejo de animales, modificar el personal autorizado a participar en estos experimentos, o realizar cambios al número de grupos de animales, el investigador deberá solicitar al Comité de Bioética de la FCV la autorización respectiva, vía carta o email a la presidenta, antes de ejecutar dichos cambios.

ESTE ACTA NO REEMPLAZA DE NINGUNA FORMA, LA CERTIFICACIÓN BIOÉTICA DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE LA UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO EN CASO DE QUE LOS PROTOCOLOS O DATOS OBTENIDOS SEAN UTILIZADOS PARA ALGÚN PROYECTO CON FINANCIAMIENTO INTERNO O EXTERNO.

ANA PIÑEIRO MOYÁ

Dra. Ana Piñeiro
Presidenta
Comité de Bioética
Facultad de Ciencias de la Vida
Universidad Andrés Bello

Anexo 5. Comparaciones de las evaluaciones funcionales iniciales de los animales de los grupos de investigación.

Anexo 5. Comparación de los resultados de las pruebas funcionales iniciales (antes de comenzar la intervención experimental) en animales controles y con EHC, sedentarios, con EF, ER y EC.

	SED		EF		ER		EC	
Fuerza muscular	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**	**CTRL**	**EHC**
Fuerza patas delanteras (Score/mm)	22,4 ± 7,2	23 ± 4,3	21,9 ± 5,1	23,6 ± 6,1	20,5 ± 5,5	20,3 ± 4,5	26,6 ± 2,1	27,7 ± 3,4
Fuerza prensil patas delanteras (GF/mm)	6,6 ± 0,9	6,1 ± 0,4	6,2 ± 0,9	6,4 ± 1,2	5,7 ± 0,6	5,8 ± 1,1	5,7 ± 0,3	6 ± 0,3
Fuerza prensil patas traseras (GF/mm)	8,8 ± 0,9	8,8 ± 0,6	8,9 ± 0,9	8,3 ± 0,8	7,8 ± 0,9	8,4 ± 1,8	9,1 ± 0,6	9 ± 0,5
Función física								
Distancia máxima de carrera (cm)	136,3 ± 28,1	140,5 ± 33,2	135,7 ± 36,6	129,3 ± 27,6	148,9 ± 45,6	117,5± 38,4	128,3 ± 25,5	123 ± 26,6
Velocidad máxima de carrera (cm/s)	30,2 ± 3,3	30,1 ± 3,6	29,7 ± 4,1	29,4 ± 3,3	30,8 ± 5	27,6 ± 5,4	29 ± 3,1	28,3 ± 3,3
Tiempo máximo de carrera (s)	721,8 ± 84,9	723,7 ± 118,4	712 ± 124,3	701,6 ± 96,8	755,4 ± 159,9	641,2 ± 163,7	690,7 ± 81,2	677,7 ± 91,5
Número de caídas (N°)	10 ± 3,5	6,6 ± 3,6	12,3 ± 3,3	11,5 ± 5	10,3 ± 4	7,8 ± 1,8	7,8 ± 3	9,8 ± 3,9
Tiempo sobre el cilindro (s)	212,3 ± 42,2	236,4 ± 32,1	210 ± 54,7	233,8 ± 46,3	207,8 ± 29,4	225,2 ± 16,8	230 ± 25,5	205,8 ± 54,9
Distancia recorrida espontáneamente (cm)	1.551 ± 157,1	700 ± 274,6	1.405 ± 420	1.626 ± 246,1	1.801,3 ± 368,1	1.668 ± 688	1.134,3 ± 524,4	1386 ± 223

Unidades: Score/milímetros (Score/mm) para prueba de levantamiento de pesos; GF/mm para prueba de fuerza prensil, centímetros (cm) para distancia máxima de carrera, centímetros/segundo (cm/s) para velocidad máxima de carrera, segundos (s) para tiempo máximo de carrera, número de caídas (N°) desde el cilindro del Rotarod, segundos (s) para tiempo sobre el cilindro del Rotarod. CTRL: control; EHC: enfermedad hepática crónica; EF: entrenamiento de fuerza; ER: entrenamiento de resistencia; EC: entrenamiento combinado. Valores expresados en promedio ± desviación estándar. Nivel de significancia estadística $p<0,05$ con intervalo de confianza del 95%. Diferencia entre grupos determinada mediante ANOVA de 2 vías y test de Tuckey post hoc. No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos antes de iniciar la intervención experimental.