

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
PROGRAMA DE DOCTORADO: MEDICINA INTERNA  
2004-2007**

**Efecto de la administración de triglicéridos de cadena media y ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 en la prevención y tratamiento de la fibrosis hepática en un modelo murino (ratones C57BL/6) de esteatohepatitis no alcohólica**

Lic. Nut. María del Pilar Milke García, N.C.

Dirigido por:

Dr. Eduard Cabré Gelada  
Dr. Miquel Angel Gassull i Duro

Esta investigación se llevó a cabo gracias al apoyo de Laboratorios Grifols, S.A. en los laboratorios de investigación del Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona).

## INDICE

Acrónimos

Indice de figuras

Indice de tablas

Indice de anexos

Resumen

### **1. Introducción.**

1.1. Ácidos grasos.	1
1.1.1. Definición.	1
1.1.2. Clasificación.	1
1.1.3. Fuentes.	4
1.1.4. Funciones.	6
1.1.4.1.Energía.	6
1.1.4.2.Estructura.	6
1.1.4.3.Segundos mensajeros.	7
1.1.5. Emulsificación, hidrólisis y absorción.	7
1.1.6. Transporte.	7
1.1.7. Metabolismo.	9
1.1.7.1.Degradación: lipólisis, $\beta$ -oxidación y $\omega$ -oxidación.	9
1.1.7.2.Lipogénesis: síntesis de triglicéridos.	16
1.1.7.3.Síntesis de eicosanoides	18
1.1.8. Regulación metabólica.	20
1.1.8.1.Factores de transcripción.	20
1.1.8.2.Insulina: la gran reguladora metabólica.	23
1.1.9. Requerimientos.	24

1.2.	Enfermedad por hígado graso no alcohólico.	24
1.2.1.	Definición.	24
1.2.1.1.	Esteatohepatitis alcohólica vs. esteatohepatitis no alcohólica.	25
1.2.2.	Prevalencia.	26
1.2.3.	Factores de riesgo.	26
1.2.3.1.	Obesidad.	27
1.2.3.2.	Resistencia a la insulina y diabetes mellitus.	28
1.2.3.3.	Dislipidemias.	28
1.2.3.4.	Otros factores de riesgo.	29
1.2.4.	Fisiopatología	31
1.2.4.1.	Resistencia a la insulina e implicación de las adipocitocinas: esteatosis.	31
1.2.4.2.	Esteatohepatitis: estrés oxidativo, lipoperoxidación, inflamación y fibrogénesis.	40
1.2.5.	Cuadro clínico y diagnóstico.	46
1.2.6.	Historia natural: indicadores de progresión, complicaciones y pronóstico. Implicaciones clínicas.	48
1.2.7.	Tratamiento de la enfermedad por hígado graso no alcohólico	49
1.2.7.1.	Agonistas de los PPARs e inhibidores de la SREBP-1c.	50
1.3.	Modelos animales de enfermedad por hígado graso no alcohólico.	51
1.3.1.	Importancia de los modelos animales.	51
1.3.2.	Características de los modelos y aplicaciones.	52
1.3.2.1.	Clasificación de los modelos murinos.	52
1.3.2.2.	Aplicaciones de los modelos murinos.	65
1.3.3.	Tratamiento de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en modelos murinos.	66

1.3.3.1.Acidos grasos: una alternativa de tratamiento para la enfermedad por hígado graso no alcohólico.	72
<b>2. Planteamiento del problema.</b>	<b>78</b>
<b>3. Justificación.</b>	<b>80</b>
<b>4. Hipótesis.</b>	<b>81</b>
<b>5. Objetivos.</b>	<b>82</b>
5.1. Objetivo general.	82
5.2. Objetivos específicos.	82
<b>6. Material y métodos.</b>	<b>84</b>
6.1. Diseño experimental.	84
6.2. Metodología.	84
6.2.1. Experimentación con ratones.	84
6.2.1.1.Inducción de la hepatopatía.	84
6.2.1.2.Maniobra preventiva.	84
6.2.1.3.Maniobra terapéutica.	85
6.2.2. Sacrificio.	85
6.2.3. Análisis de parámetros.	86
6.2.3.1.Pruebas de función hepática.	86
6.2.3.2.Química sanguínea.	86
6.2.3.3.Hormonas en plasma: insulina, leptina y adiponectina.	86
6.2.3.4.Carnitina y acilcarnitina en plasma.	93
6.2.3.5.Actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 en hígado.	95
6.2.3.6.Malondialdehido.	97
6.2.3.7.Citocinas en plasma.	100
6.2.3.8.Triglicéridos hepáticos.	103
6.2.3.9.Acidos grasos en membrana eritrocitaria.	104

6.2.3.10	Histología.	106
6.3.	Material.	109
6.4.	Análisis estadístico.	109
7.	<b>Resultados.</b>	113
7.1.	Efectividad de la dieta DCM para producir NAFLD.	113
7.2.	Diferencias bioquímicas e histológicas entre los dos tiempos de estudio.	128
7.3.	Efecto de los diferentes ácidos grasos en la prevención de la enfermedad.	136
7.4.	Efecto de los diferentes ácidos grasos en el tratamiento de la enfermedad.	147
7.5.	Correlación de las variables indicadoras de esteatosis y esteatohepatitis en el modelo estudiado.	159
7.6.	Incorporación de los ácidos grasos en la membrana eritrocitaria.	160
8.	<b>Discusión.</b>	161
8.1.	Validación del modelo.	161
8.2.	Desarrollo de alteraciones bioquímicas e histológicas a las 6 y 10 semanas.	169
8.3.	Efecto profiláctico de los ácidos grasos en el desarrollo de la NAFLD.	170
8.4.	Efecto terapéutico de los ácidos grasos en la NAFLD.	174
8.5.	Correlación de las variables que participan en la NAFLD.	176
8.6.	Incorporación de los ácidos grasos a la membrana de eritrocitos.	176
9.	<b>Conclusiones.</b>	178
9.1.	Validación del modelo.	178
9.2.	Efecto profiláctico de los ácidos grasos en el desarrollo de la NAFLD.	178

9.3.	Efecto terapéutico de los ácidos grasos en la NAFLD.	179
9.4.	Correlación de las variables que participan en la NAFLD.	179
<b>10.</b>	<b>Recomendaciones, limitaciones y últimas consideraciones.</b>	<b>180</b>
	<b>Bibliografía.</b>	<b>183</b>
	<b>Anexos.</b>	

## Acrónimos

- AA:** arachidonic acid (ácido araquidónico).
- ACAT:** acil-CoA colesterol aciltransferasa.
- ACC:** acetil-CoA carboxilasa.
- ACO:** acil CoA oxidasa
- ACS:** acil-CoA sintetasa
- AFLD:** alcoholic fatty liver disease (enfermedad por hígado graso alcohólico).
- ALA:** alpha-linolenic acid (ácido alfa-linolénico o ácido  $\alpha$ -linolénico)
- AMPK:** AMP kinase (AMP cinasa).
- AP-1:** activator protein-1 (proteína activadora-1)
- ALT:** alanino aminotransferasa.
- ASH:** alcoholic steatohepatitis (esteatohepatitis alcohólica)
- AST:** aspartato aminotransferasa.
- ATP:** adenosín-trifosfato
- BD:** bilirrubina directa.
- BT:** bilirrubina total.
- Bcl-2:** B cell lymphoma-2.
- CAR:** constitutive androstane receptor (receptor constitutivo para androstano)
- CAT:** carnitín-acetiltransferasa.
- CATR:** carnitín-acilcarnitina translocasa
- C/EBP- $\beta$ :** CCAAT/enhancer binding protein- $\beta$  (proteína aumentadora de unión a CCAAT  $\beta$ ).
- ChREBP:** carbohydrate responsive element-binding protein (proteína de unión de elementos en respuesta a carbohidratos).
- CLA:** conjugated linoleic acid (ácido linoléico conjugado).
- CoA:** coenzima A
- COT:** carnitín-octanoil transferasa
- CPT:** carnitín-palmitoil transferasa
- CRP:** C reactive protein (proteína C reactiva)
- DCM:** deficiente en colina y metionina.
- DGLA:** dihomogamma linolenic acid (ácido dihomo-gamma linolénico)
- DGAT:** diacylglycerol:acyl-CoA transferase (diacil glicerol: acil-CoA transferasa)
- DHA:** docosahexaenoic acid (ácido docosahexaenóico)
- E-KO:** *knockout* para apolipoproteína ApoE
- EPA:** eicosapentaenoic acid (ácido eicosapentaenóico)
- FA:** fosfatasa alcalina.
- FABP:** fatty acid binding protein (proteína ligante de ácidos grasos).
- FAS:** fatty acid synthetase (ácido graso sintetasa)
- FFA:** free fatty acids (ácidos grasos libres).
- GLP-1:** glucagon-like peptide-1 (péptido parecido al glucagon-1).
- GSH:** glutatión reducido
- GSH-Px:** glutatión peroxidasa
- HDL:** highdensity lipoproteins (lipoproteínas de alta densidad)
- HMGCoA:** hidroximetil glutaril CoA
- HSL:** hormone sensitive lipase (lipasa sensible a hormonas)
- ICAM:** intracellular adhesion molecule (molécula de adhesión intracelular).
- IDL:** intermediate density lipoproteins (lipoproteínas de densidad intermedia)
- IGF:** insulin growth factor (factor de crecimiento insulínico).
- I $\kappa$ B:** inhibidor del NF- $\kappa$ B
- I $\kappa$ K $\beta$ :** inhibitor  $\kappa$  Kinase  $\beta$  (inhibidor  $\kappa$  cinasa  $\beta$ )

**IL:** interleucina  
**iNOS:** inducible nitric oxide synthetase (sintetasa de óxido nítrico inducible)  
**IRS:** insulin-receptor substrate (sustrato del receptor de insulina)  
**JNK:** Jun-N terminal kinase C (cinasa C-Jun N-terminal)  
**LA:** linoleic acid (ácido linoléico)  
**LCFA:** long-chain fatty acid (ácidos grasos de cadena larga)  
**L-CPT:** liver carnitin-palmitoyl transferase (carnitín-palmitoil transferasa de hígado).  
**LDL:** low density lipoproteins (lipoproteínas de baja densidad)  
**L-FABP:** liver fatty acid binding protein (proteína ligante de ácidos grasos del hígado).  
**LPL:** lipoprotein lipase  
**LT:** leucotrieno  
**LX:** lipoxina  
**MCT:** medium-chain triglycerides (triglicéridos de cadena media)  
**MDA:** malondialdehído  
**MEOS:** microsomal ethanol oxidizing system (sistema microsómico de oxidación de etanol).  
**M-FABP:** membrane fatty acid binding protein (proteína ligante de ácidos grasos de la membrana).  
**MMP:** matrix metalloproteinase (metaloproteinasas de matriz)  
**mRNA:** RNA mensajero  
**MUFA:** monounsaturated fatty acids (ácidos grasos monoinsaturados).  
**MTP:** mitochondrial trifunctional protein (proteína mitocondrial trifuncional)  
**MTTP:** microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) (proteína microsomal de transferencia de triglicéridos)  
**NAFLD:** non-alcoholic fatty liver disease.(enfermedad por hígado graso no alcohólico).  
**NASH:** non-alcoholic steatohepatitis (esteatohepatitis no alcohólica).  
**NF- $\kappa$ B:** nuclear factor  $\kappa$  B (factor nuclear  $\kappa$  B).  
**NO:** nitric oxide (óxido nítrico)  
**PG:** prostaglandina  
**PPARs:** peroxisome proliferator-activated receptors (receptores activados por el proliferador peroxisómico).  
**PUFA:** polyunsaturated fatty acids  
**ROS:** reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno).  
**SFA:** saturated fatty acids (ácidos grasos saturados).  
**SCD:** stearoyl-CoA desaturase (estearoil-CoA desaturasa)  
**SOD:** superóxido dismutasa  
**SREBP:** sterol regulatory element binding proteins (proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides)  
**TBARS:** thiobarbituric acid reactive substances  
**TIMP:** tissue inhibitor of metalloproteinase (inhibidor tisular de metaloproteinasas).  
**TGF:** transforming growth factor (factor de crecimiento transformante).  
**TNF:** tumour necrosis factor (factor de necrosis tumoral).  
**TX:** tromboxano.  
**UPC:** uncoupling protein C (proteína desacopladora C)  
**VCAM:** vascular adhesion molecule (molécula de adhesión vascular).  
**VLDL:** very low density lipoproteins (lipoproteínas de

## Indice de figuras

1. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados.	3
2. Papel de la carnitín-palmitoil transferasa (CPT) en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga.	12
3. Biosíntesis de los eicosanoides.	20
4. Participación del PPAR- $\alpha$ y del PPAR- $\gamma$ en el metabolismo hepático de los lípidos.	22
5. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina asociada a la NAFLD.	37
6. Diseño experimental.	108
7. Crecimiento ponderal de los ratones STD y DCM (seguimiento: 6 semanas).	114
8. Crecimiento ponderal de los ratones STD y DCM (seguimiento: 10 semanas).	121
9. Comparación del grado de esteatosis en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.	132
10. Comparación del grado de inflamación lobulillar en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.	133
11. Comparación de la cantidad de lipogranulomas en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.	134
12. Comparación del grado de fibrosis perisinusoidal en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.	135
13. Crecimiento ponderal de todos los ratones (seguimiento: 6 semanas).	137
14. Comparación del grado de esteatosis en la fase de prevención.	143
15. Comparación del grado de inflamación lobulillar en la fase de prevención.	144
16. Comparación de la cantidad de lipogranulomas en la fase de prevención.	145
17. Comparación del grado de fibrosis perisinusoidal en la fase de prevención.	146
18. Crecimiento ponderal de todos los ratones (seguimiento: 10 semanas).	148

19. Comparación del grado de esteatosis en la fase de tratamiento.	154
20. Comparación del grado de inflamación lobulillar en la fase de tratamiento.	155
21. Comparación de la cantidad de lipogranulomas en la fase de tratamiento.	156
22. Comparación del grado de fibrosis perisinusoidal en la fase de tratamiento.	157

## Indice de tablas

1. Patrón de ácidos grasos en las grasas y aceites (porcentaje aproximado sobre el contenido total de ácidos grasos).	5
2. Características de las CPT mitocondriales.	13
3. Diferencias en la expresión de adipocitocinas entre el tejido adiposo visceral (V) y el tejido adiposo subcutáneo (S) en el hombre.	27
4. Condiciones asociadas a la esteatohepatitis no alcohólica.	30
5. Efectos metabólicos, inflamatorios y fibrogénicos de la dieta deficiente en colina y metionina.	62
6. Comparación de los factores de riesgo para la NAFLD humana en diferentes modelos murinos.	63
7. Peso semanal (g) de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM durante 6 semanas.	113
8. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	115
9. Pruebas de función hepática de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	115
10. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	116
11. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	116
12. Concentración de carnitina libre, acilcarnitinas y acilcarnitinas (AC)/ carnitina total (CT) total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa II (CPT II) en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	116
13. Concentración de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	117
14. Contenido de malondialdehído y triglicéridos en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	117
15. Lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	118

16. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.	119
17. Peso semanal (g) de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM durante 10 semanas.	120
18. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	122
19. Pruebas de función hepática de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	122
20. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	123
21. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	123
22. Concentración de carnitina libre, acilcarnitinas y acilcarnitinas (AC)/ carnitina total (CT) total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa II (CPT II) en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	124
23. Concentración de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	124
24. Contenido de malondialdehído y triglicéridos en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	124
25. Lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	126
26. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.	127
27. Peso corporal y hepático, y parámetros bioquímicos e histológicos de los ratones alimentados con dieta estándar y dieta DCM a las 6 y 10 semanas (con respecto a la dieta DCM).	128
28. Comparación del peso y de los parámetros bioquímicos e histológicos de los ratones alimentados con dieta DCM a las 6 y 10 semanas.	129
29. Peso semanal (g) de los ratones durante la fase de prevención.	136
30. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones en la fase de prevención.	138

31. Pruebas de función hepática de los ratones en la fase de prevención.	138
32. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones en la fase de prevención.	139
33. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones en la fase de prevención.	139
34. Concentración de carnitina libre, acilcarnitinas y acilcarnitinas (AC)/ carnitina total (CT) total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa II (CPT II) en hígado de los ratones en la fase de prevención.	139
35. Concentración de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ en plasma de los ratones en la fase de prevención.	140
36. Contenido de malondialdehído y triglicéridos en hígado de los ratones en la fase de prevención.	140
37. Lesiones histológicas de los ratones en la fase de prevención.	141
38. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones en la fase de prevención.	142
39. Peso semanal (g) de los ratones durante la fase de tratamiento.	147
40. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones en la fase de tratamiento.	149
41. Pruebas de función hepática de los ratones en la fase de tratamiento.	149
42. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones en la fase de tratamiento.	150
43. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones de la fase de tratamiento.	150
44. Concentración de carnitina libre, acilcarnitinas y acilcarnitinas (AC)/ carnitina total (CT) total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa II (CPT II) en hígado de los ratones en la fase de tratamiento.	150
45. Concentración de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ en plasma de los ratones en la fase de tratamiento.	151
46. Contenido de malondialdehído y triglicéridos en hígado de los ratones en la fase de tratamiento.	151
47. Lesiones histológicas de los ratones en la fase de tratamiento.	152

48. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones en la fase de tratamiento.	153
49. Peso corporal y hepático, y parámetros bioquímicos e histológicos de los ratones en las fases de prevención y tratamiento.	159
50. Incorporación de ácidos grasos en membrana membrana eritrocitaria (mg/g proteína).	160

## **Indice de anexos**

Anexo 1: Ratones C57/BL6.

Anexo 2: Cálculo de la formulación y composición media de la dieta deficiente en colina y metionina (DCM) y sus variantes.

Anexo 3: Medición de la concentración insulina, leptina y adiponectina en plasma.

Anexo 4: Medición de la concentración de carnitina libre y acilcarnitina en suero.

Anexo 5: Medición de la actividad de la carnitín-palmitoil transferasa 2 en hígado.

Anexo 6: Medición de la concentración hepática de malondialdehido.

Anexo 7: Citometría de flujo. Medición de la concentración sérica de citocinas proinflamatorias (IL-1  $\alpha$  , IL-6 y TNF- $\alpha$ ).

Anexo 8: Medición de la concentración de triglicéridos en hígado.

Anexo 9: Histología hepática.

## Resumen

La patogénesis de la enfermedad por hígado graso no alcohólico (Non Alcoholic Fatty Liver Disease o NAFLD) involucra un mecanismo multifactorial en el que, en el contexto de un hígado graso, la alteración en el metabolismo de lípidos, el estrés oxidativo y la alteración en la producción de citocinas, entre otros factores, causan daño hepático, provocando inflamación y fibrosis.

La obesidad y diabetes son dos enfermedades cuya prevalencia constituye un motivo de preocupación sanitaria a nivel mundial, y se asocian a cambios en la histología hepática que incluyen desde la esteatosis simple hasta el desarrollo de necroinflamación y fibrosis, manifestándose como esteatohepatitis no alcohólica (Non Alcoholic SteatoHepatitis o NASH), una de las manifestaciones de la NAFLD. Cada vez con mayor frecuencia se reconoce que la NASH es precursora de enfermedad hepática grave y que en ocasiones evoluciona a la llamada "cirrosis criptogénica". La prevalencia de NAFLD y NASH es de 20 y 2-3%, respectivamente. En la actualidad –y dado su carácter multifactorial- no se ha destacado claramente la efectividad de un tratamiento en particular. Sin embargo, el conocimiento de su fisiopatología (resistencia a la insulina, seguida de una lipoperoxidación hepática con afectación del parénquima) ha permitido sugerir el uso de hipoglucemiantes y antioxidantes como tratamiento de primera línea, además de la pérdida de peso.

Existe una gran cantidad de publicaciones sobre la etiología, fisiopatología y tratamiento de la NASH y se han desarrollado algunos modelos experimentales en roedores acerca de estos aspectos. Los modelos animales de esteatohepatitis, obesidad, resistencia a la insulina y dislipidemia son importantes para estudiar la patogénesis y tratamiento de la NAFLD así como su relación con el síndrome metabólico. La obesidad y resistencia a la insulina, mediada por adipocitocinas como el TNF- $\alpha$ , aumentan la liberación de FFA de los adipocitos con el consecuente aumento de su concentración en hígado. Los FFA inducen estrés oxidativo y favorecen la lipoperoxidación y, como consecuencia, estimulan la expresión de TNF- $\alpha$  en hepatocitos y adipocitos, induciendo así la resistencia a la insulina y fibrogénesis. Sin embargo, casi siempre han fallado en definir claramente los cambios moleculares y fisiológicos que median la transición entre la esteatosis y la esteatohepatitis debido a la falta de un modelo animal que presente todas las características clave humanas para el desarrollo de la NAFLD. Muchos modelos desarrollan esteatosis; sin embargo, pocos progresan a esteatohepatitis y, si lo hacen, es de formas diversas. Los modelos animales, además, tampoco reflejan el escenario etiológico multifactorial de la NAFLD.

La investigación en animales ha reconocido la importancia de los componentes dietéticos en la patogenia de la resistencia a la insulina y en el hígado graso; frecuentemente se utilizan dietas ricas en sacarosa o grasa para inducir obesidad, diabetes mellitus tipo II y esteatosis hepática en roedores. Los estudios de patología inducida por dieta son ilustrativos porque demuestran que los factores ambientales interactúan para causar enfermedades y que ciertas especies de roedores son más vulnerables a enfermedades inducidas por la dieta que otras.

Los modelos de animales para NASH han identificado la deficiencia de leptina y el estrés oxidativo como los principales factores en la patogénesis de la esteatosis y esteatohepatitis, y por ello debe sospecharse la presencia de NASH en casos de deficiencia de leptina, como en la obesidad; o de un aumento en el estrés oxidativo hepático y/o producción de citocinas proinflamatorias (desnutrición, edad avanzada, sobrecarga hepática de hierro, consumo habitual de alcohol, exposición crónica a toxinas o medicamentos que induzcan enzimas oxidativas, sobrecrecimiento bacteriano intestinal, errores innatos del metabolismo de ácidos grasos).

Los modelos más ilustrativos y que desarrollan esteatohepatitis (macro y microvesicular), proliferación de macrófagos y nódulos inflamatorios son: a) Ratones *ob/ob* y ratas *fa/fa*— genéticamente obesos, b) Ratones lipoatróficos, c) Roedores con una dieta deficiente en colina y metionina (DCM), d) Sobrealimentación y alimentación muy alta en grasa, e) Ratones *knockout* para apo E (alimentados con colesterol y dieta alta en grasa). Todos estos modelos se fundamentan en la hipótesis del “hit” (“impacto” o factor agresor) múltiple para el desarrollo de NAFLD, que sugiere que el hígado graso es especialmente vulnerable a oxidantes y a desarrollar esteatohepatitis cuando estos factores agresores generan suficientes oxidantes como para causar muerte de hepatocitos e inflamación. Así, la esteatohepatitis incrementa la sensibilidad a otros factores agresores que inducen fibrosis hepática, promoviendo la evolución hacia cirrosis. No obstante, de todos estos modelos el más estudiado es el de la dieta DCM; este modelo ha proporcionado importante información en lo que respecta al aumento en la actividad del CYP 2E1 en los hepatocitos e, indudablemente, subraya la importancia del stress oxidativo (independientemente de la obesidad) en la patogénesis de la esteatosis y NASH.

Con respecto a la histología hepática, se ha demostrado que la sustitución de los ácidos grasos de cadena larga por triglicéridos de cadena media (medium-chain triglycerides o MCT) contribuyen en el mejoramiento de la hepatitis alcohólica. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)  $\omega$ -3, por otro lado, mejoran la resistencia a la insulina, aumentan la  $\beta$ -oxidación (por inducción del PPAR- $\alpha$ ) y disminuyen la lipogénesis (por inhibición de la actividad de la SREBP-1). La combinación de ambos facilita la incorporación de PUFA a las membranas celulares de los órganos clave y, con ello, pueden lograrse con mayor eficiencia los beneficios de la administración de PUFA  $\omega$ -3.

La presente investigación tuvo como objetivo principal el observar el efecto de los MCT y PUFA  $\omega$ -3 en la prevención y tratamiento de la fibrosis hepática en un modelo murino (ratones C57/BL6 de NASH inducido por dieta DCM). Se estudiaron 46 ratones durante 6 semanas (fase de prevención, administrando DCM junto con MCT, PUFA o su combinación) y 46 ratones durante 10 semanas (fase de tratamiento: 6 semanas de inducción con dieta DCM, y 4 de tratamiento con MCT, PUFA o su combinación).

El modelo logró replicar la mayoría de los hallazgos publicados (pérdida de peso, alteraciones en la función hepática, disminución en las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol, triglicéridos e insulina así como esteatosis,

inflamación y fibrosis) pero no se constató un incremento en el contenido hepático de malondialdehído. En cambio –y como aportación al estudio de la fisiopatología de la NAFLD- se encontró una disminución en la concentración plasmática de leptina y un aumento en la de la adiponectina, aún en los casos con evidente inflamación. A pesar de ello, se corroboró el papel antiinflamatorio de la adiponectina en la fase de prevención y el proinflamatorio de la leptina en la fase de tratamiento. Otra aportación de esta investigación fue el haber estudiado la variación en las concentraciones de carnitina (libre y acilada) y en la actividad de la CPT-2, una de las enzimas involucradas en su metabolismo en la mitocondria.

Con respecto al papel *profiláctico* de los MCT y PUFA  $\omega$ -3, no se pudo corroborar un beneficio en la esteatosis hepática; por otra parte, los PUFA en forma aislada y en combinación produjeron inflamación aunque no particularmente fibrosis en las 6 semanas de experimentación. En cuanto a su efecto *terapéutico*, curiosamente los MCT produjeron más inflamación que los PUFA  $\omega$ -3 aislados o en combinación, aunque ambos ácidos grasos afectaron negativamente el índice histológico hepático.

Esta investigación permitió, por tanto, evaluar el efecto de los MCT y PUFA  $\omega$ -3 en la prevención y tratamiento de la NAFLD en un modelo animal y, a su vez, destacó algunos aspectos como la relación de la leptina y adiponectina con esta enfermedad, que podrán ser estudiados más ampliamente en un futuro.

## 1.1. Ácidos grasos.

### 1.1.1. Definición.

La grasa de la dieta es un componente fundamental en la alimentación humana. Proporciona más de la mitad de las necesidades energéticas de algunos órganos, particularmente del hígado, corazón y músculo en reposo (1). Las grasas o lípidos son fuentes concentradas de energía y portadoras de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y de ácidos grasos indispensables, de los que se derivan importantes compuestos que intervienen en multitud de funciones en el organismo.

Los lípidos son todos aquellos compuestos que son solubles en grasas. Esta amplia clasificación engloba a los triglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos, vitaminas liposolubles y otros compuestos de menor abundancia.

### 1.1.2. Clasificación.

Los lípidos se clasifican en *hidrolizables* (lípidos simples y compuestos), cuando tienen enlaces éster; y *no hidrolizables* (terpenos, terpenoides, esteroides y esteroides), en caso contrario. Los lípidos *hidrolizables*, a su vez, pueden ser:

1. Lípidos *simples*: incluyen los triglicéridos y las ceras. Gran parte de los lípidos de la dieta se encuentran como triglicéridos, esto es, tres ácidos grasos (una cadena hidrocarbonada alifática sin o con dobles enlaces y terminando en un grupo carboxilo  $-\text{COOH}$ ) unidos a un glicerol a través de enlaces éster. Como promedio, un 40% del aporte energético de la dieta humana en los países industrializados son triglicéridos.

Los ácidos grasos se representan en forma abreviada con la fórmula general  $\text{CX:YnZ}$ , en donde "X" es el número de carbonos, "Y" el número de dobles enlaces (insaturaciones) y "Z" la posición del primer doble enlace a partir del *metilo* terminal ( $\text{CH}_3-$ ). Ej: el ácido linoléico  $\text{C18:2n6}$  tiene 18 carbonos y dos dobles enlaces, el primero en el carbono 6 a partir del metilo terminal y el segundo en el carbono 9.

Pueden también representarse especificando el número de carbonos, el número de dobles enlaces y los sitios en donde se encuentran a partir del *carboxilo* terminal ( $-\text{COOH}$ ). Ej: el ácido linoleico  $\text{C18 2d 9,12}$  tiene 18 carbonos y dos dobles enlaces en los carbonos 9 y 12 a partir del grupo carboxilo.

Los ácidos grasos normalmente tienen un número par de átomos de carbono, y pueden ser de cadena corta (2 a 4 C), media (6 a 12 C) o larga (14 C o más). Los ácidos grasos pueden ser:

- a) Saturados (SFA): carecen de dobles enlaces.
- b) Insaturados: tienen uno o más dobles enlaces. Estos, a su vez, pueden ser:
  - Monoinsaturados (MUFA): un doble enlace.
  - Poliinsaturados (PUFA): dos o más dobles enlaces.

Los dobles enlaces permiten que los ácidos grasos presenten estereoisómeros en configuración *cis* o *trans*. Los ácidos grasos insaturados, tanto animales como vegetales, están en la forma *cis*. La inestabilidad que produce un doble enlace hace que los PUFA sean mucho más susceptibles a la oxidación.

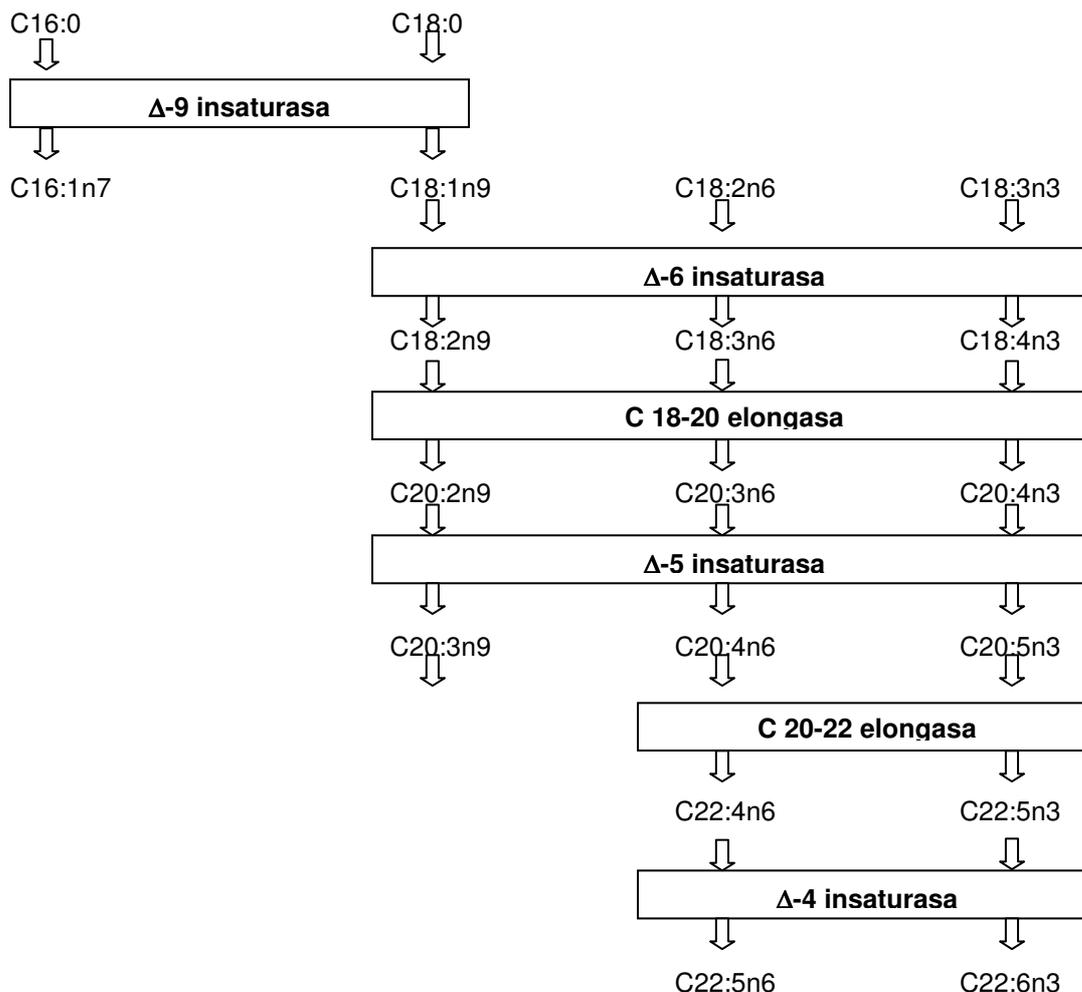
Los PUFA pueden ser elongados y se pueden insertar dobles enlaces en su molécula entre un doble enlace y el *carboxilo* terminal, pero no entre éste y el *metilo* terminal. Así, el ácido oleico (C18:1n9), que tiene un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 -contando a partir del metilo terminal- no puede ser transformado en ácido linoleico (C18:2n6) o ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3) porque en el hombre no existen enzimas capaces de insertar una insaturación a estos niveles (C 12 o C15). De ahí que, por su imposibilidad de síntesis en el organismo humano y por su importancia biológica, se reconozcan a los *ácidos linoleico* y *ácido  $\alpha$ -linolénico* como *indispensables* (2). Es, por ello, necesario consumirlos en la dieta. Al sufrir elongaciones y insaturaciones, forman metabolitos con importantes funciones biológicas.

Existen cuatro familias o series de PUFA en el organismo de los mamíferos cuyos precursores son los siguientes:

- a) Serie  $\omega$ 7 o n7, cuyo precursor es el ácido palmitoleico (C16:1n7)
- b) Serie  $\omega$ 9 o n9, cuyo precursor es el ácido oleico (C18:1n9)
- c) Serie  $\omega$ 6 o n6, cuyo precursor indispensable es el ácido linoleico (C18:2n6)
- d) Serie  $\omega$ 3 o n3, cuyo precursor indispensable es el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3).

Las cuatro familias de ácidos grasos emplean las mismas rutas metabólicas y compiten por las mismas enzimas (elongasas e insaturasas), pero no son intercambiables entre sí (*vide infra*).

Los PUFA más importantes de la serie  $\omega$ 6 son su precursor, el ácido linoleico (LA), el ácido dihomogamma-linolénico (DGLA: C20:3n6) y el ácido araquidónico (AA: C20:4n6). Los PUFA más importantes de la serie  $\omega$ 3 son su precursor, el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA: C20:5n3) y el ácido docosahexaenoico (DHA: C22:6n3). En la figura 1 se representa la biosíntesis de PUFA a partir de sus precursores.



**Figura 1. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados. El ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) sufren una primera insaturación. El ácido palmítico forma ácido palmitoléico. Sobre los ácidos grasos C18 con una, dos o tres insaturaciones actúan otras *insaturasas* para producir más dobles enlaces en diferentes posiciones; y *elongasas*, para aumentar la cadena hidrocarbonada en dos carbonos. De esta manera se forman todos los diferentes ácidos grasos poliinsaturados necesarios para todos los seres vivos.**

Además de ser una fuente de energía, los ácidos grasos se incorporan a las membranas de las células, donde determinan su fluidez y la funcionalidad de las proteínas en ellas incluidas. Además algunos PUFA  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3 son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la coagulación de la sangre, la respuesta inmune o la regulación del tono vascular.

En general, los eicosanoides sintetizados a partir de los PUFA  $\omega$ -3 son menos activos (ej: menor actividad proinflamatoria) que los PUFA  $\omega$ -6. Al aumentar el consumo de PUFA  $\omega$ -3 en la dieta, también puede incrementarse la producción de eicosanoides de estas formas menos activas. El consumo de ácidos grasos  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3 determina los tipos y cantidades de eicosanoides en el organismo, lo cual influye potencialmente en todos los procesos.

2. Lípidos *compuestos* (asociados): sus moléculas están formadas por estructuras solubles en grasas unidas a diversos compuestos más o menos polares (hidrosolubles). Así, existen:

- a) Fosfolípidos.
- b) Lipoproteínas.
- b) Glucolípidos.
- c) Esfingolípidos.

entre otros.

Los ácidos grasos, a su vez, se clasifican en *dispensables* e *indispensables* según puedan o no ser sintetizados por un ser vivo. Esta clasificación se originó en 1929 a partir de la observación de que algunos PUFA eran indispensables para el crecimiento de las ratas y para evitar la aparición de un tipo de eczema.

Los ácidos grasos indispensables (LA y ALA) se encuentran mucho más abundantemente en plantas (aceites) que en animales, y tanto ellos como sus derivados de cadena larga constituyen los ácidos grasos predominantes en los ésteres de fosfolípidos y colesterol que componen las membranas celulares y de organelos como la mitocondria. Su bajo punto de fusión contribuye a que las membranas sean menos rígidas y su larga longitud de cadena aumenta su fase hidrofóbica.

### 1.1.3. Fuentes.

La composición química de las grasas está relacionada con las especies biológicas de las que provienen (3). En las plantas y animales de agua dulce abundan los ácidos grasos insaturados C16, C18, C20 y C22 en diferentes proporciones y con diferentes grados de saturación. El ácido palmítico es el ácido graso más abundante y representa el 10 a 18% de todos los ácidos grasos. En los animales marinos, los PUFA de 20 y 22 carbonos con hasta seis insaturaciones son muy comunes. En los animales terrestres, particularmente en los mamíferos, abundan el ácido graso oleico (insaturado) y el ácido palmítico (saturado). En muchos animales, el ácido palmítico constituye el 25-30% de su depósito de grasa. El ácido esteárico, que sustituye parcialmente al ácido oleico, se encuentra en la grasa de los rumiantes. La leche es una de las fuentes más importantes de ácido butírico, un ácido graso de cadena corta.

En las semillas, los ácidos grasos son menos variados, y aunque predominan el ácido oleico y palmítico (al igual que en los animales terrestres) contienen una alta cantidad de LA y ALA. El aceite de coco es la excepción, ya que contiene ácidos grasos de cadena media con muy poco contenido de ácidos oleico y linoleico. El aceite de oliva es muy rico en ácido oleico aunque contiene poco ácido linoleico. En la tabla 1 se muestra el patrón de ácidos grasos en diversas fuentes de grasas y aceites.

**Tabla 1. Patrón de ácidos grasos en diferentes grasas y aceites (porcentaje aproximado sobre el contenido total de ácidos grasos).**

	C4-C12 Saturados	C14:0	C16:0	C18:0	C16:1 y C:18:1	C:18:2	Otros PUFAs	Otros ácidos grasos
Mantequilla, crema y leche	13	11	26	11	30	2	1	12
Res		3	29	16	48	2	1	
Tocino y cerdo		2	26	14	50	7	1	
Pollo		1	26	7	45	18	2	
Aceite de pescado		5	15	3	27	7	43 <sup>a</sup>	
Aceite de coco	58	18	10	3	8	2		
Aceite de palma		1	40	4	45	9		
Manteca de cacao			26	35	36	3		
Aceite de colza			3	1	24	15	10 <sup>b</sup>	40 <sup>c</sup>
Aceite de oliva			12	2	73	11	1	
Aceite de ajonjolí			9	5	40	43		
Aceite de semilla de algodón		1	24	2	20	50	1	
Aceite de maíz			12	2	31	53	2	
Aceite de soja			10	4	24	53	7 <sup>b</sup>	
Aceite de semilla de girasol			6	6	33	58		
Aceite de semilla de cártamo			7	2	13	74		
Margarina	3	5	23	9	33	12	1	5
Margarina, poliinsaturada	2	1	12	8	22	52	1	

<sup>a</sup> LCFA (C20 y C22)

<sup>b</sup> C18:3 (ácido  $\alpha$ -linolénico)

<sup>c</sup> C22:1 (ácido erúcico)

Fuente: Passmore R, Eastwood MA. Human nutrition and dietetics. 8th ed. Churchill Livingstone Hong Kong 1986.

El AA raramente se encuentra en los aceites vegetales, pero los animales no tienen problemas en sintetizarlo a partir del LA (PUFA  $\omega$ -6). Las principales fuentes de LA son los aceites de girasol, maíz, soja, cártamo y germen de trigo, y las de ALA (PUFA  $\omega$ -3) son el aceite de linaza (contiene 57% de ALA), seguido por el de colza y también las nueces y los aceites de germen de trigo y de soja (contienen entre 7 y 13%)(4). La carne ya no se considera una fuente de ALA debido a que ahora se alimenta al ganado con cereales ricos en PUFA  $\omega$ -6 en lugar de pienso, rico en PUFA  $\omega$ -3. Asimismo, las principales fuentes de EPA y DHA son los aceites de pescado y el mismo pescado azul, y su concentración varía de acuerdo a la especie del pescado, las aguas de las que proviene y la estación del año.

Los ácidos grasos de cadena media se derivan del aceite de coco fraccionado, y consisten principalmente en C8:0 y C12:0 (3). Se utilizan terapéuticamente porque se hidrolizan por la lipasa pancreática en forma mucho más fácil que otros triglicéridos y porque, una vez absorbidos, se dirigen rápidamente al hígado a través de la vena porta en forma de ácidos grasos sin necesidad de ser incorporados a micelas en la luz intestinal.

#### **1.1.4. Funciones de los ácidos grasos.**

##### **1.1.4.1. Energía.**

Los ácidos grasos son, en primera instancia, fuentes energéticas concentradas. Su almacenamiento como triglicéridos en el organismo es prueba de ello. Una gran parte del aporte energético de la dieta (tanto lípidos como hidratos de carbono) se deposita en el tejido adiposo como triglicéridos (3). El patrón de ácidos grasos de estos triglicéridos refleja parcialmente el aporte dietético de la persona (incluso del propio género de la persona), sobre todo en la proporción de LA. En general, la especie humana tiene un patrón característico de ácidos grasos en el tejido adiposo. Los ácidos grasos C12:0 y C14:0 llegan a formar hasta el 11 y 16% de éste en los polinesios, grandes consumidores de coco, y el C18:2 (LA) hasta el 35% en personas que consumen regularmente aceite de maíz.

Entre comidas, las reservas del tejido adiposo se movilizan para proporcionar energía a músculos y otros tejidos, por lo que los triglicéridos se degradan y se liberan ácidos grasos que se incorporan a la circulación. Esta movilización está regulada por factores hormonales, dietéticos y del sistema nervioso autónomo y por el ejercicio y están relacionados con la homeostasis energética. En la mayoría de los casos se respeta el contenido de ácidos grasos indispensables para mantener intactas sus funciones. La *insulina* estimula la *lipogénesis* o *síntesis de triglicéridos* en el tejido adiposo a partir de glucosa y la *captación de triglicéridos plasmáticos* para incorporarlos al tejido adiposo por medio de la lipoproteína lipasa (LPL). Muchas otras hormonas como las *catecolaminas* y *glucagon* que aumentan durante el ayuno tienen el efecto contrario y favorecen la *lipólisis*.

Recientemente se ha demostrado que el tejido adiposo no es un simple depósito inerte de triglicéridos que provienen del hígado (5), ni tampoco es una simple fuente de ácidos grasos libres (FFA) que llegan al hígado, sino más bien un importante contribuyente del síndrome metabólico porque produce diversas hormonas y citocinas importantemente vinculadas a su desarrollo (6).

##### **1.1.4.2. Estructura.**

Los lípidos no sólo constituyen el tejido adiposo, sino que también se integran en muchos otros órganos y tejidos. Además, los ácidos grasos son componentes fundamentales de la membrana celular y las intracelulares (las de los organelos). La importancia de las membranas no sólo radica en conferir una estructura a la célula y ser un elemento de barrera, sino que permite la individualización, la distribución de metabolitos y la compartimentalización de las diversas funciones celulares y de los organelos. El carácter anfipático que le confieren los fosfolípidos que la componen permite la inclusión de compuestos de importancia fisiológica como el colesterol y diversas proteínas, y la variación en su composición de ácidos grasos le permite una diferente funcionalidad (inmunológica, de fagocitosis, etc...).

### 1.1.4.3. Segundos mensajeros.

El metabolismo del AA produce *eicosanoides* y otros compuestos lipídicos que pueden desempeñar una importante actividad en la transducción de señales (*vide infra*). Estos se sintetizan por diversos órganos y actúan localmente. Así, por ejemplo, los producidos en riñón como las prostaglandinas son capaces de regular la función renal.

### 1.1.5. Emulsificación, hidrólisis y absorción.

La mayor parte de la grasa que se ingiere se halla en forma de triglicéridos que contienen ácidos grasos saturados e insaturados. La presencia de grasa retrasa el vaciamiento gástrico por acción de la secretina, que se libera cuando la grasa entra en contacto con el duodeno. Antes de su digestión y absorción, las sales biliares y pequeñas cantidades de ácidos grasos y monoglicéridos liberados por la lipasa pancreática la emulsifican en el duodeno, formando pequeñas micelas menores a 0.5  $\mu$ . La lipasa pancreática escinde los triglicéridos en ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol para luego ser absorbidos, ingresando a las células de la mucosa intestinal. El jugo pancreático también contiene fosfolipasa y colesterol esterasa.

Dentro del enterocito puede haber más hidrólisis por medio de la lipasa de monoglicéridos intracelular y entonces los *ácidos grasos de cadena larga (LCFA)* se reesterifican para formar nuevos triglicéridos. De esta forma, los triglicéridos de los alimentos pierden su identidad y se forman nuevos triglicéridos que son más característicos de las especies animales. Después de este ensamblaje, los triglicéridos entran a los vasos quilíferos del intestino delgado formando (con la apo C-II) partículas de 0.1 a 0.6  $\mu$  de diámetro, conocidas como *quilomicrones*. Estos pasan a los vasos linfáticos *mesentéricos*, desde donde ingresan al *conducto torácico (circulación linfática)* y, de ahí, a la *circulación sistémica* a través de la vena subclavia derecha, llegando principalmente al músculo y tejido adiposo. Una vez ahí, la LPL del endotelio de los capilares de estos tejidos hidroliza los triglicéridos de los quilomicrones a ácidos grasos y glicerol para que puedan ingresar a estos tejidos. En el músculo, se utilizan para la producción de energía, y en el tejido adiposo se reesterifican para formar triglicéridos de reserva.

Los *ácidos grasos de cadena media*, en cambio, pasan inmediatamente del intestino a la *circulación portal* y llegan directamente al hígado.

El 95% de la grasa que ingiere un adulto en condiciones normales (hasta 100/día) se digieren y absorben; sin embargo, se pueden absorber hasta 250 g/día o incluso más si el organismo tiene una deficiencia energética.

### 1.1.6. Transporte.

El 95% de los ácidos grasos *tisulares* en el hombre se encuentran esterificados formando triacilglicéridos (más comunmente conocidos como "triglicéridos") o fosfolípidos, existiendo por tanto una mínima cantidad como ácidos grasos libres (no esterificados) (FFA) (7). De igual forma, la mayoría de los ácidos grasos en *plasma* están esterificados, por lo que en él existe también una

relativamente pequeña cantidad (5%) de FFA, sobre todo provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos del *tejido adiposo* o de la hidrólisis *intraplasmática* de los *quilomicrones* y las *VLDL*.

Aún cuando su vida media es de apenas unas horas, los FFA son una muy importante fuente de energía para los tejidos. Dada su insolubilidad en agua, se transportan unidos a albúmina cuando están en forma libre. En cada molécula de albúmina hay siete sitios de unión para los ácidos grasos. La concentración postprandial plasmática de FFA es de 0.5 mmol/l, pero en el ayuno prolongado puede llegar a 4 mmol/l.

Las *lipoproteínas plasmáticas* transportan lípidos plasmáticos (triglicéridos) y colesterol unidos a diversas *apoproteínas*. Su superficie (más hidrofílica) está formada por colesterol libre, fosfolípidos y apoproteínas, y su núcleo contiene los lípidos más hidrofóbicos (ésteres de colesterol y triglicéridos). Su función es transportar los lípidos (insolubles en el plasma) desde el intestino e hígado a los tejidos periféricos, y desde éstos, devolver el colesterol al hígado para su eliminación en forma de ácidos biliares. Las lipoproteínas se distinguen por la diferente proporción de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos que contienen, así como por las distintas apoproteínas integradas en su estructura (apo B, apo E, apo C, apo AII y apo AIV). Se clasifican de acuerdo a su densidad en:

- a) Quilomicrones: grandes partículas secretadas por los vasos linfáticos intestinales después de la ingestión de alimentos grasos. Están constituidos por un 90% de triglicéridos.
- b) Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL): grandes partículas secretadas por el hígado. Están constituidas por un 60% de triglicéridos y una mayor proporción de colesterol que los quilomicrones.
- c) Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL o LDL1): se derivan del catabolismo intraplasmático de las VLDL. Las IDL o LDL1 son retiradas del plasma por el hígado o bien transformadas por la LPL en LDL2. En el segundo caso, se remueven triglicéridos y se agrega colesterol.
- d) Lipoproteínas de baja densidad (LDL2 o simplemente LDL): son las únicas que contiene una sola apoproteína (apo B-100). Están constituidas por un 80% colesterol esterificado; de hecho, las LDL transportan el 75% del colesterol plasmático en la especie humana. Su función es proveer colesterol a los tejidos extrahepáticos que lo requieran y transportar el exceso de colesterol de estos tejidos hasta el hígado.
- e) Lipoproteínas de alta densidad (HDL): se forman a partir de apoproteínas, colesterol y fosfolípidos derivados de las VLDL y quilomicrones (remanentes) después de la lipólisis por un proceso complejo. Se secretan por el hígado e intestino.

El colesterol dietético es transportado del intestino delgado al hígado en el interior de los quilomicrones, la mayoría previamente reesterificado por acción de la acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT). El colesterol sintetizado en este órgano, así como el dietético que excede las necesidades del hígado, se exporta en las VLDL, que se transforman intravascularmente en IDL y LDL. El colesterol que regresa al hígado en las LDL se excreta en la bilis como

colesterol libre o como sales biliares tras su conversión, en el mismo hígado, a ácidos biliares.

### **1.1.7. Metabolismo.**

#### **1.1.7.1. Lipólisis, $\beta$ -oxidación y $\omega$ -oxidación.**

Los lípidos generalmente se encuentran en los alimentos y en el organismo como triglicéridos, estructuras complejas que deben sufrir dos procesos para producir energía: 1) *lipólisis* (hidrólisis) para poder *absorberse* (de los alimentos) o *liberarse* de los triglicéridos de *depósito* (adipocitos, hígado) o triglicéridos *transportados* (en las lipoproteínas) formando ácidos grasos y glicerol, y 2) posteriormente, ya en estas formas más sencillas, un proceso de *oxidación* (generalmente,  $\beta$ -oxidación), que es el que propiamente producirá energía.

#### **Lipólisis**

Es la degradación de triglicéridos para formar glicerol y ácidos grasos. En el período postprandial, las lipasas gástrica y pancreática actúan sobre los triglicéridos que componen los alimentos, mientras que en el organismo la LPL actúa sobre los triglicéridos de depósito en los adipocitos y sobre las lipoproteínas plasmáticas para, en ambos casos, liberar ácidos grasos.

El estado metabólico del organismo ejerce influencia sobre la velocidad de la oxidación de la grasa, y hormonas como la insulina y glucagon –de acción antagonica- intervienen de manera decisiva en esta homeostasis energética:

- El ayuno y ejercicio de larga duración favorecen un aumento de la lipólisis y de la oxidación de los ácidos grasos producidos. La actividad de la lipasa sensible a hormonas (HSL) del tejido adiposo es la principal determinante de la concentración de FFA en el plasma. La adrenalina y glucagon estimulan la HSL y, con ello, la liberación de los triglicéridos del tejido adiposo, para que sean transportados -unidos a albúmina- hasta los tejidos donde serán oxidados.
- La elevación de la glucemia e insulinemia, por el contrario, disminuyen la lipólisis y oxidación de ácidos grasos.

El tráfico intracelular de LCFA (insolubles en agua) está mediado por proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP). De las 9 isoformas, existe una específica para el hígado (L-FABP), cuya expresión aumenta en presencia de diferentes ácidos grasos (8). Unas vez libres, los ácidos grasos llegan a músculo, hígado, corazón, corteza renal y otros tejidos para ser oxidados. Los ácidos grasos son capturados muy eficientemente por el hígado y atraviesan la membrana plasmática por un proceso no saturable de difusión simple (9) y por uno saturable de transporte facilitado, identificándose una FABP de membrana (M-FABP), dependiente de un gradiente de protones (10). Se han aislado otras proteínas transportadoras similares en tejidos que capturan ácidos grasos con gran actividad como el tejido adiposo, la mucosa intestinal y el corazón. Estas

proteínas constituyen un primer punto de control de entrada de ácidos grasos a la célula y su función podría ser de transportadoras o simplementeceptoras de ácidos grasos que facilitasen su posterior difusión a través de la membrana (11).

Una vez en el citosol, los ácidos grasos deben ingresar a las mitocondrias, ya que las enzimas que los oxidan se encuentran en su interior. Los ácidos grasos de cadena corta o media pueden atravesar la membrana mitocondrial libremente, en tanto que los de cadena larga requieren un sistema de transporte que se realiza mediante tres reacciones en las que intervienen la acil-CoA sintetasa, la carnitin aciltransferasa I y carnitin aciltransferasa II (*vide infra*). Se ha descrito también la existencia de proteínas ligantes de acil-CoA, que podrían estar implicadas en la regulación de las enzimas que utilizan acil-CoA como sustrato o como modulador.

### **$\beta$ -oxidación**

La oxidación de los ácidos grasos comparte una ruta común final con los hidratos de carbono y las proteínas: el ciclo de Krebs (también llamado “ciclo de los ácidos tricarbónicos” o “ciclo del ácido cítrico”). Inicialmente, se forma *acetil coenzima A (acetil-CoA)* a partir de la glucosa (glucólisis), ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación) o aminoácidos (desaminación oxidativa).

En el caso específico de los ácidos grasos, experimentan una degradación cíclica en cuatro fases: deshidrogenación, hidratación, deshidrogenación y fraccionamiento. Estas fases se repiten hasta que el ácido graso está completamente degradado a acetil-CoA (se produce una acetil-CoA por cada dos carbonos de la molécula de ácido graso). Los ácidos grasos, por tanto, se oxidan por pérdida sucesiva de dos carbonos mediante el esquema de la  $\beta$ -oxidación en la que el átomo del carbono  $\beta$  del ácido graso se oxida y origina un  $\beta$ -cetoácido que se escinde y forma un fragmento de dos carbonos y un ácido graso cuya cadena se ha acortado en dos átomos de carbono. Estos fragmentos de dos carbonos activos (acetil-CoA) pueden incorporarse en el ciclo de Krebs y cadena respiratoria transportadora de electrones para ser completamente oxidados a CO<sub>2</sub> y agua obteniendo *energía*, o bien ser convertidos en *cuerpos cetónicos*.

La capacidad de oxidación de los ácidos grasos por el hígado u otros tejidos está condicionada por la disponibilidad de sustrato y la capacidad del tejido para oxidar estos ácidos grasos. En el hígado, su velocidad de oxidación aumenta en forma casi lineal con la concentración de ácidos grasos en el medio y por eso se considera que, en situaciones fisiológicas, el sistema no se satura (12).

La  $\beta$ -oxidación se produce en las *mitocondrias* y *peroxisomas*. Cuantitativamente, la  $\beta$ -oxidación *mitocondrial* es la vía más importante para obtener energía a partir de las grasas.

### $\beta$ -oxidación mitocondrial

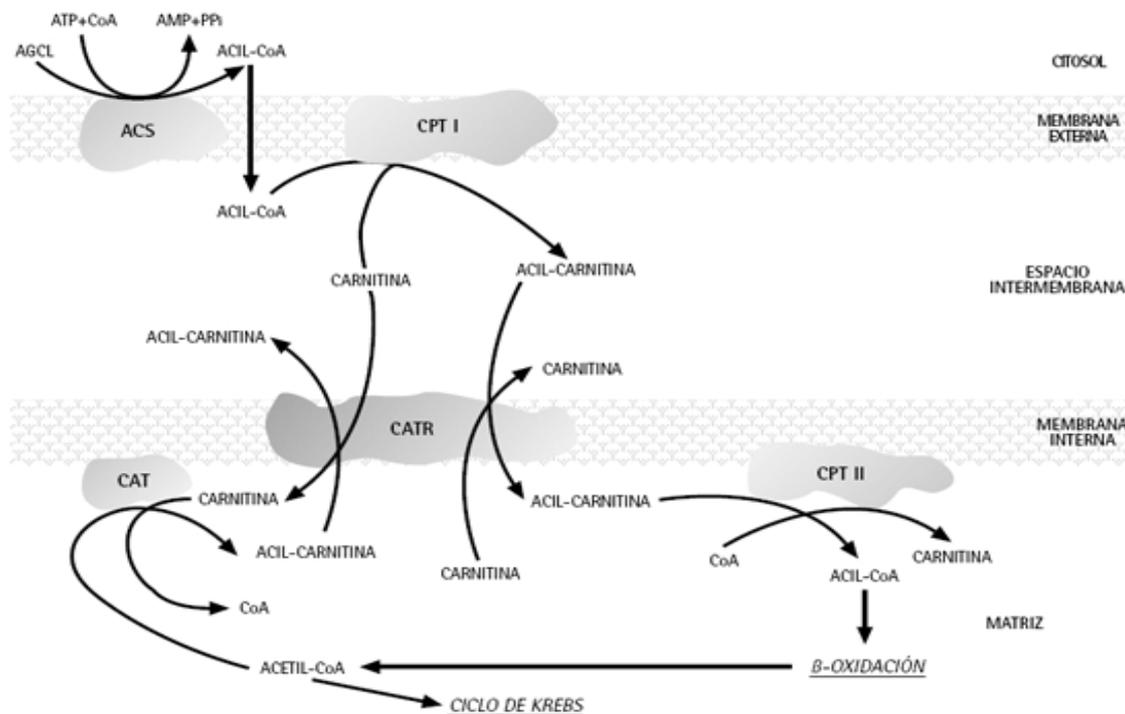
Los ácidos grasos de 18 o más átomos de carbono entran en la *mitocondria* por medio del transporte de carnitina. La carnitina es un aminoácido biosintetizado a partir de lisina o metionina -utilizando como cofactores el hierro, la vitamina C, la niacina y la piridoxina- principalmente en el hígado, cerebro y riñones (13). La metilación de la lisina y conversión de trimetil lisina a butirobetaína se produce en todos los tejidos, pero la hidroxilación de esta última para finalmente convertirse en carnitina se restringe al hígado, cerebro y riñón. En un adulto sano la mitad de sus requerimientos de carnitina (40 mg/día) provienen de la síntesis endógena, y el resto de la dieta (carne roja, huevos, lácteos). La carnitina se almacena en músculo esquelético y cardíaco, y el hígado apenas tiene el 1.6% de la carnitina total. La mayoría de la carnitina se encuentra en forma libre y el resto está esterificada, formando acil-carnitinas de cadena corta y larga.

Aunque se mencionó que los ácidos grasos de cadena media o corta no requieren carnitina para penetrar en la mitocondria para su oxidación, recientemente se han descrito una carnitín-acil transferasa para ácidos grasos de cadena corta (carnitín- acetil transferasa o CAT) y una para ácidos grasos de cadena media (carnitín- octanoil transferasa o COT). La CAT actúa de la misma forma que la acetil-CoA (como sustrato), mientras que la COT facilita el transporte de los ácidos grasos de cadena media (8-10 C) desde los *peroxisomas* hasta las *mitocondrias*, una vez que los ácidos grasos de cadena muy larga o larga se hayan acortado en los peroxisomas por medio de la  $\beta$ -oxidación *peroxisómica* y esterificado a la carnitina. La COT también oxida eicosanoides y xenobióticos.

La carnitín-palmitoil transferasa mitocondrial (EC 2.3.1.2.) es un sistema enzimático compuesto por dos enzimas: la carnitín-palmitoil transferasa I (CPT-1), unida a la membrana mitocondrial externa, y la carnitín-palmitoil transferasa II (CPT-2), localizada en la membrana interna (14). Este sistema, junto con la acil-CoA sintetasa de cadena larga (ACS) de la membrana externa y la carnitín-acilcarnitina translocasa (CATR) de la membrana interna transportan los LCFA del citoplasma a la matriz mitocondrial para ser oxidados hasta acetil-CoA por  $\beta$ -oxidación (15), y lo hacen catalizando de forma reversible la síntesis de complejos *acilcarnitina* a partir de una molécula de acil-CoA de longitud de cadena intermedia o larga y una molécula de carnitina (9).

La activación de ácidos grasos a sus tioésteres de CoA es un requisito previo a su utilización por la célula. Esta reacción está catalizada por una familia de ACS que difieren en su especificidad por la longitud de la cadena del ácido graso y en su localización subcelular. La ACS de cadena larga, regulada por la dieta, activa los LCFA que se encuentran en el citosol y próximos a la mitocondria, requiriendo ATP y CoA. Estos ésteres de CoA luego son convertidos en ésteres de carnitina (acilcarnitina) por la CPT-1 para poder atravesar la membrana mitocondrial. La CoA que se unió en la activación se libera en el espacio intermembranal y la acilcarnitina atraviesa entonces la membrana mitocondrial interna por acción de la CATR. En el interior de la mitocondria, la acilcarnitina se reconvierte a éster de CoA (acil-CoA) por acción

de la CPT-2 y se libera carnitina (figura 2). Se ha demostrado que la CPT-1 regula la mayor parte de la  $\beta$ -oxidación (16).



**Figura 2. Papel de la carnitín-palmitoil transferasa (CPT) en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga. ACS: acil-CoA sintetasa; CAT: carnitín aciltransferasa; CATR: carnitín-aciltransferasa translocasa.**

**Fuente: Arenas J, Martín MA. Intolerancias metabólicas al ejercicio. Neurología 2003; 18: 291-302.**

La CPT-1 se encuentra fuertemente unida a la membrana mitocondrial externa y se libera, inactiva, usando detergentes fuertes. La CPT-2, en cambio, está unida débilmente a la membrana mitocondrial interna y se libera en forma activa, también al usar detergentes. La CPT-1 puede inhibirse por el malonil-CoA, no así la CPT-2 (15). A nivel fisiológico, la CPT de mayor importancia reguladora es la CPT-1, y se considera una enzima clave en el proceso de oxidación de LCFA tanto en el hígado (17) como en los tejidos extrahepáticos.

El estudio de las propiedades cinéticas y reguladoras de la CPT-1 presenta tres grandes dificultades (9): a) La creencia errónea de que se encontraba en la membrana mitocondrial interna, b) La contaminación con peroxisomas en las preparaciones convencionales de mitocondrias, c) La solubilización de la proteína. La caracterización de la CPT-1 ha sido bastante más difícil que la de la CPT-2 por su estrecha asociación a la membrana mitocondrial externa y por la pérdida de su actividad catalítica cuando se separa de su entorno nativo.

La CPT-1 de hígado (L) y de músculo (M) son proteínas diferentes y presentan una sensibilidad al malonil-CoA muy diferente. La L-CPT-1 es la principal (o única) en hígado, riñón, pulmón, bazo, intestino, ovario y páncreas, mientras que la M-CPT-1 predomina en músculo esquelético y testículos. En la tabla 2 se presentan algunas características de las CPT mitocondriales.

**Tabla 2. Características de las CPT mitocondriales.**

Características	L-CPT-1	M-CPT-1	CPT-2
Peso molecular	88 KDa	88 KDa	70 KDa
IC <sub>50</sub> para malonil-CoA	2.5 μM	0.03 μM	
K <sub>m</sub> para carnitina	30 μM	500 μM	120 μM
Expresión en Tejidos			
Hígado	++++	-	+
Músculo esquelético	(+)	++++	+
Corazón	+	+++	+
Riñón	++++	(+)	+
Pulmón	++++	(+)	+
Bazo	++++	-	+
Intestino	++++	-	+
Páncreas	++++	-	+
Tejido adiposo pardo	(+)	++++	+
Tejido adiposo blanco	+	+++	+
Ovario	++++	(+)	+
Testículo	(+)	++++	+
Fibroblastos	++++	-	+
Deficiencia humana descrita	Sí	No	Sí

Fuente: Velasco Diez G. Regulación a corto plazo de la carnitina palmitoiltransferasa I del hígado de rata. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, 1997.

Se sabe que no sólo las *mitocondrias* sino el *retículo endoplásmico* y los *peroxisomas* contienen enzimas con actividad de CPT (acilación de proteínas para transportar estos grupos). En el hígado de rata, por ejemplo se han localizado dos proteínas con actividad de CPT: una asociada a la membrana celular y otra en el lumen del *retículo endoplásmico*, que es donde se produce el *ensamblaje* y posterior *secreción* de *VLDL* (9). En los *peroxisomas*, como se mencionó anteriormente, la COT está implicada en la exportación de acil-CoA de cadena intermedia hacia las mitocondrias.

El malonil-CoA es el primer eslabón en la síntesis de ácidos grasos, y se forma por carboxilación de una molécula de acetil-CoA por mediación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) en un proceso que requiere ATP (18) y es el producto de la reacción catalizada por esta enzima (el malonil-CoA) el que constituye la etapa limitante de la síntesis de ácidos grasos.

La ACC se expresa principalmente en tejidos lipogénicos como el tejido adiposo e hígado, paralelamente donde la CPT-1 predomina (19). De esta manera, se consigue un control coordinado de la síntesis (mediada por la ACC) y la oxidación (facilitada por la L-CPT-1) de los ácidos grasos en el hígado (20):

- El citrato es un inhibidor *alostérico* de la ACC.
- El malonil-CoA es un inhibidor *competitivo* o *alostérico* de la CPT-1.

Las concentraciones de *malonil-CoA* son notablemente dependientes de la actividad de la ACC y se afectan por cambios a corto plazo en la *actividad de la ACC* dados por el estado hormonal y nutricio del animal (20). Es especialmente determinante la *relación insulina/glucagon*. Cuando esta relación es alta, aumenta la concentración de malonil-CoA y, por tanto, se inhibe la actividad de la CPT-1 (12). De lo anterior se desprende que la *hiperinsulinemia* favorece la lipogénesis e inhibe la lipólisis y oxidación de grasas.

La *CPT* no sólo está regulada por el *malonil-CoA*, sino también por la concentración de *carnitina*, ya que es sustrato para la CPT-1 y necesaria para el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria (21). En reposo, la oxidación de ácidos grasos no está limitada por la carnitina.

Fisiológicamente, durante el período fetal el mRNA y la actividad de la CPT-1 son muy bajos, pero aumentan bruscamente durante el primer día de vida extrauterina y permanecen elevados durante la lactancia (22). En el destete, si la dieta es alta en grasa (sobre todo, en LCFA) la concentración de mRNA de CPT-1 se mantiene elevada. La concentración de la CPT-2, en cambio, no se modifica. Las situaciones que estimulan la cetogénesis en el hígado (ayuno, diabetes, hipertiroidismo o tratamiento con agentes proliferadores de peroxisomas) inducen la síntesis de CPT-1.

En tejidos como el hígado, donde la síntesis y degradación de ácidos grasos están controladas por la ingestión, el malonil-CoA es el principal regulador de estos procesos. En el ayuno y cetosis, la disminución de la relación *insulina/glucagon* incrementa la síntesis de citrato y, por tanto, disminuye la actividad de la ACC y consecuentemente la síntesis de malonil-CoA, desapareciendo la inhibición de la CPT-1, por lo que aumenta la oxidación mitocondrial de ácidos grasos. Por el contrario, en el período postprandial el aumento de insulina estimula la lipogénesis y la ACC sintetiza malonil-CoA, que es un sustrato lipogénico que, a su vez, inhibe la CPT-1, evitando que los acil-CoA sean oxidados y que, más bien, sean esterificados en triglicéridos para formar parte de las VLDL hepáticas para ser luego exportadas hasta el tejido adiposo para su almacenamiento (20).

La  $\beta$ -oxidación mitocondrial es la ruta metabólica principal para la oxidación de ácidos grasos bajo condiciones fisiológicas normales. Los LCFA, como se mencionó, son una fuente energética indispensable, especialmente en condiciones de estrés o ayuno prolongado (23). La oxidación de estos ácidos grasos vía la  $\beta$ -oxidación implica la generación de equivalentes reductores ( $FADH_2$  y NADH) que se reoxidan en la cadena respiratoria (fosforilación oxidativa). El defecto (error metabólico) en estas enzimas es más grave en ácidos grasos de cadena larga que media, y pueden afectarse corazón, músculo e hígado (24). En el caso de alguna deficiencia en el sistema mitocondrial de  $\beta$ -oxidación hay acumulación de intermediarios grasos de la acil-CoA (23,24) y otras sustancias nocivas. La  $\beta$ -oxidación, entonces, puede ser también la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) (25).

### $\beta$ -oxidación peroxisómica

La  $\beta$ -oxidación también se lleva a cabo en los *peroxisomas* por un proceso semejante al que se realiza en las mitocondrias (26). Los peroxisomas poseen un equipamiento enzimático particular para  $\beta$ -oxidar ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, prostaglandinas y diversos análogos de ácidos grasos (27).

En la  $\beta$ -oxidación *peroxisómica* la insaturación inicial se realiza por medio de una acil-CoA oxidasa, mientras que en la *mitocondrial* la primera enzima que actúa es acil-CoA dehidrogenasa. La  $\beta$ -oxidación *peroxisómica*, además, no está acoplada a la cadena respiratoria o de transferencia de electrones, por lo que no se produce ATP pero sí se genera calor. Los hidrogeniones (H) producidos durante la fase inicial de oxidación se transfieren directamente al FAD, formando FADH<sub>2</sub>; y al oxígeno molecular, formando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que posteriormente es degradado a agua por medio de catalasas.

La  $\beta$ -oxidación peroxisómica, bajo condiciones fisiológicas, no proporciona directamente energía pero es capaz de *acortar ácidos grasos de cadena muy larga*, preparándolos para la posterior  $\beta$ -oxidación mitocondrial (28). Se lleva a cabo en LCFA (de 18 átomos de carbono) y muy larga (más de 20 átomos de carbono). También puede actuar sobre los ácidos grasos dicarboxílicos y de cadena media, larga y ramificada, y sobre prostaglandinas y ácidos biliares (29). El EPA y el DHA se oxidan relativamente poco en las mitocondrias y, en cambio, inician su oxidación en los peroxisomas, acortando su cadena (30).

En resumen, la función de la ruta peroxisómica no es clara aún, pero es probable que comporte las fases iniciales de la oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga y otros lípidos. Más recientemente, se ha encontrado que la contribución de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica en la oxidación total de LCFA en hepatocitos depende tanto de la concentración como de la longitud de cadena de los ácidos grasos presentes (31). En ratas, esta contribución oscila entre 20 y 35% si se alimentan con palmitato u oleato. La  $\beta$ -oxidación peroxisómica puede ser fácilmente inducida por la dieta, así como por la administración a largo plazo de una serie de agentes hipolipemiantes y xenobióticos.

### **$\omega$ -oxidación**

Los ácidos grasos pueden también ser oxidados por  $\omega$ -oxidación en los *microsomas del retículo endoplásmico liso*, y particularmente los ácidos grasos de cadena muy larga pueden metabolizarse por  $\omega$ -oxidación por medio del citocromo P450 CYP4A hasta ácidos dicarboxílicos (32). Normalmente, esta vía de oxidación es de muy escasa actividad; sin embargo, puede ser altamente inducible por diversas circunstancias como el consumo excesivo de alcohol y la sobrecarga o el daño mitocondrial.

Al igual que la  $\beta$ -oxidación peroxisómica, la  $\omega$ -oxidación microsómica genera también H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y es una de las fuentes más importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los genes que codifican para las enzimas peroxisómicas, microsómicas y algunas mitocondriales que metabolizan ácidos grasos están regulados a nivel de transcripción por el receptor activado por el proliferador peroxisómico- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) (*vide infra*). La actividad sostenida del PPAR- $\alpha$  induce carcinoma hepatocelular en ratas y ratones, probablemente relacionado a la generación continua  $H_2O_2$ , altamente oxidante.

### 1.1.7.2. Lipogénesis: síntesis de triglicéridos.

La lipogénesis consiste en la *síntesis de ácidos grasos* y en su *esterificación* para formar *triglicéridos*. Está regulada por la disponibilidad de sustratos.

#### Síntesis de ácidos grasos

El proceso global de la síntesis de ácidos grasos es similar en todos los sistemas procariotas y eucariotas (1). La síntesis de PUFA ocupa tres sistemas enzimáticos distintos que catalizan, respectivamente:

- a) La biosíntesis del palmitato a partir de la acetil-CoA.
- b) La elongación de la cadena, a partir del palmitato.
- c) La insaturación.

En las células eucariotas, la primera ruta tiene lugar en el citosol, la elongación de la cadena se produce tanto en las mitocondrias como en el retículo endoplásmico y la insaturación tiene lugar en el retículo endoplásmico.

La síntesis *de novo* de ácidos grasos se lleva a cabo a partir de acetil-CoA en el espacio extramitocondrial por un grupo de sintetetas. Este proceso está gobernado por la ACC, que convierte el acetil-CoA en malonil-CoA (*vide supra*). Una serie de unidades de malonil-CoA se van añadiendo en una cadena de ácidos grasos para terminar en la formación de ácido palmítico (C16:0). A partir de este momento, por elongaciones e insaturaciones, se van creando ácidos grasos más complejos. La ácido graso sintetasa (FAS) también interviene en la síntesis de ácidos grasos. Existen dos ACC hepáticas, y una de ellas está más relacionada con la síntesis de malonil-CoA y el control de la actividad de la CPT-1 (33).

#### Síntesis de ácidos grasos saturados

Se lleva a cabo principalmente en el citoplasma de los hepatocitos y adipocitos, aunque también ocurre en el tejido adiposo pardo, intestino delgado y piel (34). El componente inicial es la acetil-CoA, que se deriva de la oxidación de hidratos de carbono u otros lípidos y es común para la síntesis de colesterol. La acetil-CoA, por acción de la ACC, se transforma en malonil-CoA. Este último sufre una serie de condensaciones (unión de dos moléculas), reducciones (conversión del grupo C=O a CH<sub>3</sub>-) y deshidrataciones catalizadas por el complejo enzimático ácido-graso sintetasa hasta formar una acil-CoA que continúa elongándose con acetilos provenientes del malonil-CoA hasta llegar a formar ácido palmítico. En el retículo endoplásmico es posible su adicional elongación a ácido esteárico (C18:0) a expensas de malonil-CoA. Esta

elongación también puede realizarse por un complejo enzimático mitocondrial que transfiere acetilos desde el acetil-CoA.

La dieta puede regular la síntesis de ácidos grasos saturados: la glucosa, induciéndola (35) mientras que los PUFA inhibiéndola (36).

### Síntesis de ácidos grasos insaturados

La mayoría de los ácidos grasos en el hombre se encuentran esterificados formando triglicéridos y fosfolípidos. De ellos, más de la mitad son insaturados. Como se comentó anteriormente, el proceso de insaturación endógena de ácidos grasos en el hombre se limita a ácidos grasos menores de 18 C, y es factible gracias a acil-CoA insaturasas que se encuentran en la bicapa de los microsomas del retículo endoplásmico liso acopladas a un flavoproteína y a un citocromo y que eliminan dos hidrógenos del ácido graso saturado a fin de crear el doble enlace.

Existen insaturasas específicas que introducen dobles enlaces en las posiciones 5, 6 y 9. La primera insaturación se introduce en la posición 9 cuando el ácido graso es saturado; cuando es insaturado, el doble enlace se introduce entre el grupo carboxilo y la insaturación más próxima a éste. Sólo en el caso del reino vegetal y en algunos seres unicelulares existen insaturasas que introducen dobles ligaduras partiendo del ácido oleico en la posición 12 (formando C18:2n6) y posteriormente en la 15 (formando C18:3n3).

Tanto el ácido palmitoleico (C16:1n7) como el oleico (C18:1n9) son los más abundantes en tejido adiposo e hígado, y pueden sintetizarse por insaturación en la posición 9 del ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0), respectivamente (37). La actividad de la enzima que regula este proceso ( $\Delta^9$ -insaturasa) disminuye durante el ayuno y en la diabetes mellitus y se recupera con la ingestión de proteínas y administración de insulina (38).

La formación de MUFA es relativamente sencilla. En cambio, la síntesis de PUFA es mucho menos conocida y más compleja ya que implica elongaciones de la cadena carbonada por medio de la adición de los grupos acetilo a las acil-CoA que provienen del malonil-CoA. Los complejos enzimáticos de insaturación y elongación son comunes para las cuatro familias de PUFA, aunque no es posible su interconversión (37).

La vía metabólica que tiene mayor importancia cuantitativa y cualitativa es la que convierte el LA (C18:2n6) a AA (C20:4n6). La vía metabólica a partir del ácido ALA (C18:3n3) es también de enorme importancia biológica, ya que se sintetizan el EPA (C20:5n3) y el DHA (C22:6n3), que participan en la fisiología nerviosa (39) y en muchas otras funciones.

El conocimiento sobre la regulación de la síntesis de PUFA es aún parcial, ya que el hecho de que los complejos enzimáticos se encuentren fuertemente unidos a la membrana celular limita su estudio. Entre todas las enzimas que participan en la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos, se cree que la más importante es la  $\Delta^6$ -insaturasa. Se sabe que la actividad de esta enzima puede modularse por el efecto de hormonas que participan en el metabolismo

energético (insulina, glucagon, glucocorticoides y hormonas tiroideas)(40), de nutrimentos como la glucosa, proteínas, Fe, Cu y Zn (41-43) y nucleótidos (44) e incluso de la temperatura. Por otra parte, los ácidos grasos de una serie pueden modular la síntesis de los ácidos grasos de las series restantes (45). Es destacable que la misma composición lipídica de la dieta modifica el perfil de ácidos grasos del organismo, hecho que se refleja en el contenido de ácidos grasos de los hepatocitos (46) y de los hematíes (47). Poco se sabe del papel de las elongasas en la regulación de la biosíntesis de PUFA, y únicamente se habla de la retroconversión como un proceso de acortamiento de ácidos grasos que ocurre, como se mencionó, en los *peroxisomas* y probablemente en las mitocondrias en donde los ácidos grasos de 22 carbonos se convierten en compuestos de 20 carbonos que no siguen una  $\beta$ -oxidación sino que se dirigen para formar parte de la membrana celular (48).

La composición de los ácidos grasos de las membranas de los diferentes tejidos es reflejo de una diferente actividad metabólica. Así, en las plaquetas y neutrófilos abunda el AA y en los cardiomiocitos el DHA. Existe actividad de insaturasas y elongasas en tejidos extrahepáticos que posibilita la biotransformación de los diferentes PUFA en derivados con importantes funciones metabólicas en esos tejidos específicos.

### **Síntesis de triglicéridos**

La mayoría de los ácidos grasos celulares se encuentran esterificados con el glicerol, formando triglicéridos o fosfogliceroles (fosfolípidos). Su formación está coordinada con la oxidación de ácidos grasos. Las variaciones en el estado nutricional y hormonal pueden estimular en el hígado la esterificación y disminuir la oxidación de los ácidos grasos (como en la realimentación e hipotiroidismo) o vice versa (como en el ayuno, diabetes o hipertiroidismo) (9).

La síntesis de triglicéridos requiere la activación de los ácidos grasos con CoA y que el glicerol se encuentre como glicerol-3-fosfato. Generalmente los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) se añaden en la posición 1, mientras que los PUFA lo hacen en la posición 2. Finalmente, una fosfatasa elimina el grupo fosfato y se añade cualquier otro ácido graso en la posición 3 (49).

Especial mención merece la biosíntesis de triglicéridos a partir de dos acilgliceroles activados (con CoA) en la mucosa intestinal, catalizada por el complejo multienzimático triglicérido sintetasa (49).

#### **1.1.7.3. Síntesis de eicosanoides.**

La familia de los ácidos grasos  $\omega$ -3 deriva del ALA, de los que a su vez derivan el EPA y DHA (50). La familia de los ácidos grasos  $\omega$ -6 deriva del LA, del que se sintetiza el AA. Todos emplean las mismas rutas metabólicas y compiten por las mismas enzimas elongasas e insaturasas. Además de ser fuentes de energía, ambas familias de ácidos grasos se incorporan a las membranas celulares, donde son precursores de eicosanoides. Los eicosanoides son productos derivados de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, que poseen 20 átomos de

carbono. Incluyen: prostaglandinas (PGs)/prostaciclina, tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs), hidroxiácidos y lipoxinas (LXs).

Los eicosanoides se sintetizan por diversos órganos y actúan localmente. Así, metabolitos del AA producidos en riñón como las prostaglandinas, son capaces de regular la función renal. Producen también una amplia serie de efectos biológicos sobre la respuesta inflamatoria en articulaciones, piel y ojos, sobre la intensidad y duración del dolor y de la fiebre, y sobre la función reproductora. Desempeñan, además, un importante papel en la inhibición de la secreción de ácidos en el estómago, regulan la presión arterial por medio de vasodilatación o vasoconstricción, e inhiben o activan la agregación de las plaquetas y la trombosis. En general, los eicosanoides sintetizados a partir de los ácidos grasos  $\omega$ -3 son menos activos que los  $\omega$ -6.

Existen tres vías de síntesis de eicosanoides que pueden, entre sí, tener efectos antagónicos y que tienen como precursor inicial el AA, cada una catalizada por un sistema enzimático diferente (49):

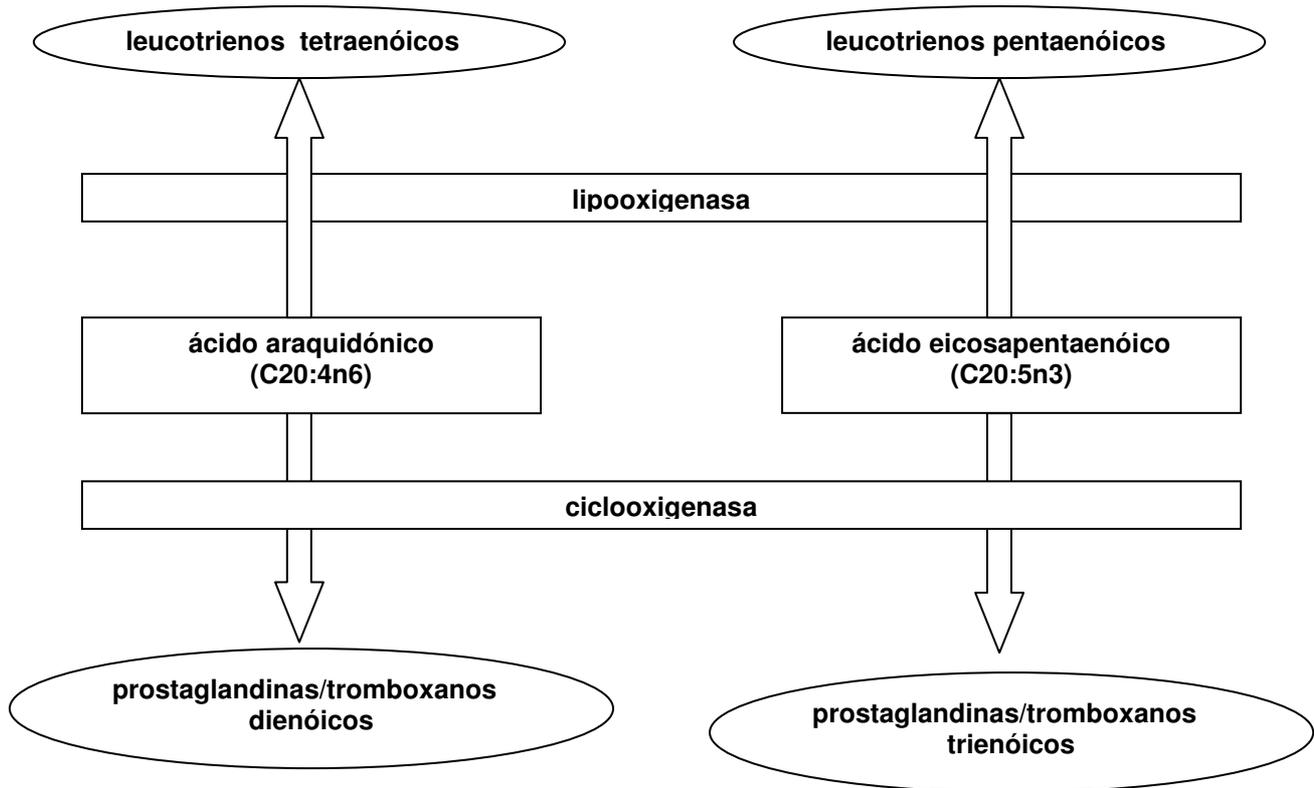
- a) La ciclooxigenasa (COX): se producen PGs, TXs y prostaciclina. Los endoperóxidos cíclicos inestables sufren diversas roturas de los enlaces entre oxígenos reestructurándose para formar prostanoides. La ciclooxigenasa-1 (COX-1) se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y está implicada en la producción de PGs. Las PGs intestinales actúan modulando la secreción de cloro y la absorción de cloruro de sodio, las renales contribuyen en el mantenimiento de la filtración glomerular y las secretadas por el estómago protegen la mucosa gástrica. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es un enzima inducible que está presente en las células expuestas a agentes proinflamatorios y se expresa durante el proceso inflamatorio. Dadas sus diferentes formas de actuación se puede entender la utilidad terapéutica de los inhibidores de COX-2 y la razón por la que la inhibición de COX-1 produzca efectos secundarios indeseables a nivel renal y gástrico.

Los derivados de esta vía intervienen en procesos relacionados con la carcinogénesis como la proliferación celular, participando en la apoptosis y mitosis; la inmunosupresión y la angiogénesis. Por otra parte, la síntesis de prostaglandinas genera malondialdehído (MDA), un compuesto mutagénico y carcinogénico.

- b) La lipooxigenasa: se producen LTs, LXs y ácidos grasos hidroxiados. Los LTs regulan los procesos inmunoinflamatorios e inducen la contractibilidad de músculo liso, lo que se traduce en acciones bronco y vasoconstrictoras.
- c) El citocromo P 450 (CYP 450): hidroxila el AA, formando epóxiderivados.

Los metabolitos de las dos primeras vías tienen una vida media corta y ejercen una actividad hormonal a nivel local. Los metabolitos del LA ( $\omega$ -6) pueden tener función vasoconstrictora/vasodilatadora y ser agregantes/antiagregantes

plaquetarios; por otra parte, los metabolitos del ALA ( $\omega$ -3), como el DHA y EPA, también producen eicosanoides con estas funciones (figura 3).



**Figura 3. Biosíntesis de eicosanoides.** La vía de la lipooxigenasa forma leucotrienos tetraenólicos a partir del ácido araquidónico y pentaenólicos a partir del ácido eicosapentaenólico, mientras que la vía de la ciclooxigenasa forma prostaglandinas y tromboxanos dienólicos a partir del ácido araquidónico y trienólicos a partir del ácido eicosapentaenólico.

### 1.1.8. Regulación metabólica.

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones de diversas hormonas y de la glucemia son suficientes para inducir la actividad de complejas maquinarias -reguladoras de la actividad de muchas enzimas relacionadas con las vías sintéticas y catabólicas.

#### 1.1.8.1. Factores de transcripción.

Recientemente ha cambiado radicalmente el concepto que se tenía del adipocito como un depósito pasivo de energía. Ahora se sabe que es una célula que regula activamente el balance de energía y que secreta citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  que son capaces de influir en la sensibilidad a la insulina y en procesos metabólicos en tejidos periféricos e hígado (51). Esto ocurre a través de dos grandes familias de factores de transcripción específicos (52):

1. Proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides-1 (SREBP-1) y proteínas de unión de elementos en respuesta a carbohidratos-1 (ChREBP-

1): son dos familias de factores de transcripción que regulan la síntesis de ácidos grasos y colesterol (53).

Existen tres isoformas de la SREBP, la -1a, la -1b y la -1c. La SREBP-1c es un regulador transcripcional clave para muchos genes involucrados en el metabolismo de lípidos y colesterol, incluyendo los que codifican para las hidroximetilglutaril-CoA (HMGCoA) sintetasa y reductasa, la ACC, la FAS, la esteroil-CoA insaturasa (SCD) y el receptor para LDL (53), que no sólo regula la velocidad de síntesis de triglicéridos sino la cantidad que se almacena en hígado. Se activa con las altas concentraciones de *insulina* y con la *AMP cinasa* (AMPK) (54), uno de los principales reguladores del metabolismo lipídico y de glucosa, y determina la resistencia a la insulina del hígado graso. Su elevación incrementa la expresión genética lipogénica y favorece la síntesis de ácidos grasos, acelerando la acumulación de triglicéridos (55). Se cree que el aumento de la SREBP-1c media la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo II (53).

La ChREBP controla la lipogénesis por regulación transcripcional de genes que codifican para enzimas lipogénicas, incluyendo –al igual que en el caso de las SREBPs- la ACC y la FAS (56) en respuesta a estímulos nutricionales y hormonales, y puede jugar un importante papel en la diabetes, obesidad e hipertensión (57). La ChREBP se activa con las altas concentraciones de *glucosa* y se inhibe con una dieta alta en *grasa*. De esta forma, una dieta alta en hidratos de carbono induce la transcripción de más de 15 genes involucrados en la conversión metabólica de glucosa a lípidos.

Así, tanto la insulina como la glucosa estimulan la *lipogénesis* al activar la SREBP-1c (58) y la ChREBP (59), respectivamente. Esto inicia la síntesis de ácidos grasos y su insaturación (requerida para su esterificación como triglicéridos), induciendo la expresión de ACC, FAS y SCD-1 (58, 60).

La síntesis de triglicéridos en el citoplasma del hígado también está regulada por el aumento en el flujo de ácidos grasos al hígado y en la expresión de la acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), una enzima que participa en el último paso de la síntesis de triglicéridos (61). Sin embargo, el hecho de que aumente el contenido de grasa en hígado no incrementa la producción de triglicéridos-VLDL o de la apo B. Por ello, deben existir otros factores que regulen la producción de VLDL (62).

2. Receptores activados por el proliferador peroxisómico (PPARs): son factores nucleares que se unen a ligandos derivados de ácidos grasos y activan la transcripción de genes que regulan el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, la respuesta inflamatoria, la homeostasis de la glucosa y la diferenciación celular (63). Se han descrito tres isoformas:  $\alpha$ ,  $\delta$  (o  $\beta$ ) y  $\gamma$ , cada uno codificado por un gen diferente:
  - a) PPAR- $\gamma$ : se encuentran en adipocitos, macrófagos y células musculares, donde regulan la diferenciación de adipocitos, captación y almacenamiento de ácidos grasos y metabolismo de la glucosa. Su expresión es baja en tejidos que expresan predominantemente PPAR- $\alpha$  (hígado, corazón, músculo y riñón). El PPAR- $\gamma$  contribuye en el desarrollo de esteatosis (64).

- b) PPAR- $\alpha$ : se expresan en el hígado, riñón, músculo, corazón, células de la pared vascular y tejido adiposo pardo (65). Activa un programa de expresión de genes diana involucrados en la captación de ácidos grasos,  $\beta$ -oxidación, transporte en los peroxisomas y  $\omega$ -oxidación de ácidos grasos insaturados. Los PPAR- $\alpha$  pueden incrementar el catabolismo de ácidos grasos y, en el contexto fisiopatológico del síndrome metabólico o una dieta rica en grasa, inducir el catabolismo de ácidos grasos para prevenir el depósito de grasa en hígado. Los PUFA  $\omega$ -3 actúan como agonistas del PPAR- $\alpha$  (36). Igualmente, están regulados por el TNF- $\alpha$  y la adiponectina (66,67). La endotoxemia puede regular *negativamente* la expresión de PPAR- $\alpha$  (68).
- c) PPAR- $\beta/\delta$ : se expresan en una amplia variedad de tejidos pero sus funciones aún se desconocen.

En el tejido hepático, los PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$  se expresan más en los hepatocitos que en las células endoteliales y de Kupffer, y su expresión aumenta tanto en la esteatosis inducida por ayuno como en la inducida por una dieta alta en grasa. La evidencia indica que los PPAR- $\alpha$  hepáticos son *antiesteatósicos*, mientras que los PPAR- $\gamma$  son *proesteatósicos* (figura 4) (69).

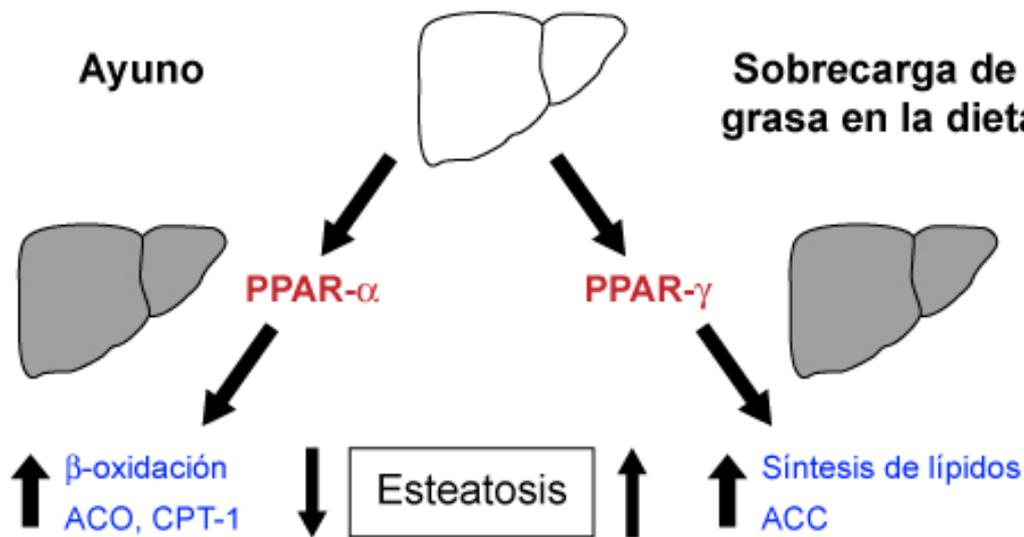


Figura 4. Participación del PPAR- $\alpha$  y del PPAR- $\gamma$  en el metabolismo hepático de los lípidos. El PPAR- $\alpha$  estimula la  $\beta$ -oxidación y la actividad de la ACO y CPT-1, disminuyendo la esteatosis hepática. El PPAR- $\gamma$  estimula la síntesis de lípidos a través de la inducción de la ACC, aumentando la esteatosis hepática.

Los ligandos del PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$  son los ácidos grasos en estado natural y sus derivados: el PPAR- $\alpha$  se activa por los derivados de eicosanoides de la vía de la lipooxigenasa, como el ácido 8s-hidroxitetraenóico (8-s-HETE) y el leucotrieno B4 (LTB4) y por los fosfolípidos de las lipoproteínas oxidadas, mientras que el PPAR- $\gamma$  se activa por los derivados de eicosanoides tanto de la vía de la ciclooxigenasa como de la lipooxigenasa, como las prostaglandinas PGJ2, PGH1 y PGH2 y el ácido 15-hidroxitetraenóico (15-HETE).

Las *tiazolidinedionas* (*glitazonas*), empleadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, son ligandos de alta afinidad para el *PPAR-γ*, mientras que los *fibratos* son ligandos del *PPAR-α* (70). Su actividad transcripcional está regulada por mecanismos post-transcripcionales que incluyen la fosforilación y ubiquitinación. La actividad del *PPAR-α* está modulada por una serie de señales extracelulares relacionadas con diferentes procesos fisiológicos (63). La actividad del *PPAR-γ*, en cambio, responde al tratamiento con insulina. Poco se sabe del control post-translacional de la actividad del *PPAR-β/δ*.

En general, los *PPARs* pueden interferir con las diferentes etapas de la respuesta inflamatoria modulando la expresión de quimiocinas y sus receptores, moléculas de adhesión en células endoteliales, células de músculo liso, monocitos/macrófagos y células T (71).

El papel de los *PPARs* en el control de la inflamación se demostró primeramente para el caso del *PPAR-α* (63). La administración de fibrato (*PPAR-α*) en pacientes con hiperlipidemia, por ejemplo, disminuye las concentraciones plasmáticas de IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y fibrinógeno y proteína C reactiva (CRP), mientras que la rosiglitazona (agonista *PPAR-γ*) disminuye la de metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9 o gelatinasa B) y también la CRP.

El *PPAR-α* reprime las vías del NF- $\kappa$ B (por homología de su subunidad p65 y por inducción de la expresión del I $\kappa$ B, el principal inhibidor del NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora-1 (AP-1). De esta forma, el *PPAR-α* reprime la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por estímulos inflamatorios extracelulares como las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) e intracelular (ICAM-1) en las células endoteliales, IL-2 y TNF- $\alpha$  (63).

El papel del *PPAR-γ* en la inflamación es más controvertido, pero puede intervenir *in vitro* con el NF- $\kappa$ B, interfiriendo con sus subunidades p50 y P65; y con la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS).

#### **1.1.8.2. Insulina: la gran reguladora metabólica.**

La absorción de 100 g de almidones se produce en 2-3 horas. En este tiempo, el hígado extrae unos 50 g de glucosa e inhibe completamente su producción de glucosa a partir de aminoácidos. La concentración de insulina aumenta en la vena porta en respuesta a la glucosa en sangre y secreción de hormonas intestinales.

El hígado almacena una considerable cantidad de glucosa como glucógeno, utiliza otra parte como combustible y el resto pasa a la circulación, donde llega al cerebro y músculos. Tiene un sistema específico de transporte de glucosa de gran capacidad y una cinasa de baja afinidad por la glucosa, que la fosforila. La velocidad de extracción de la glucosa responde a la concentración de glucosa en la sangre portal sin necesidad de insulina u otro control hormonal. En cambio, los tejidos muscular y adiposo están limitados en el transporte, que es sensible a insulina. La distribución periférica de glucosa, por tanto, está finamente regulada por la insulina en plasma. La insulina:

- a) Estimula la captación de glucosa por parte del músculo.
- b) Inhibe la producción hepática de glucosa.
- c) Inhibe la hidrólisis de grasas del tejido adiposo y estimula la captación de glucosa en el mismo tejido.

La insulina, además, tiene otras muchas funciones.

La hiperinsulinemia suprime la producción de glucosa hepática, aumenta la captación hepática de glucosa, estimula la lipogénesis *de novo* (72) y suprime la secreción de VLDL (73). Por el contrario, cuando la insulina es baja (ej: ayuno), se moviliza glucosa de las reservas de glucógeno hepático, se estimula la gluconeogénesis hepática y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos es la principal fuente de energía. Por otra parte, las alteraciones en la  $\beta$ -oxidación, tanto en el hombre como en roedores, de naturaleza tanto genética como inducida, se asocian a hipoglucemia y acumulación de triglicéridos hepáticos en ayuno (74).

### **1.1.9. Requerimientos.**

Es difícil establecer los requerimientos de lípidos en el hombre. Los lípidos pueden llegar a constituir el 35 a 45% del valor energético total de la dieta de la población de los países desarrollados, y en los habitantes de países pobres apenas llegar al 15%. Sin embargo, en todas las civilizaciones la adición de grasa a la dieta es una necesidad para la preparación de los alimentos. Dado el avance del conocimiento en la fisiopatología de las enfermedades crónico-degenerativas, se ha establecido una recomendación del consumo de lípidos de 25 a 30% del valor energético total (10% como mínimo de PUFA).

Aún no se ha establecido formalmente una recomendación del consumo de ácidos grasos indispensables, pero se ha sugerido una ingestión no menor del 2% del valor energético total de la dieta, o menor de 5 g de LA para un adulto (650 mg DHA y EPA). En 2002, la *Food and Nutrition Board* del Instituto de Medicina de los Estados Unidos estableció un "consumo adecuado" de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 (75). En forma simple, la Comisión Europea recomienda una ingestión de  $\omega$ -6 del 4 al 8% del aporte energético y una ingestión de  $\omega$ -3 de 2 g/día de ALA y de 200 mg/día de EPA y DHA (76). La Organización Mundial de la Salud recomienda un consumo de  $\omega$ -6 del 5 al 8% del valor energético total y un consumo de  $\omega$ -3 del 1 al 2%. Sin embargo, la Sociedad Japonesa para la Nutrición de Lípidos recomienda que se reduzca el consumo de LA a 3-4% en personas japonesas cuyo consumo de  $\omega$ -3 sea de 2.6 g/día, incluyendo 1 g/día de EPA y DHA.

## **1.2. Enfermedad por hígado graso no alcohólico.**

### **1.2.1. Definición.**

Actualmente, se reconoce que la *enfermedad por hígado graso no alcohólico* (non-alcoholic fatty liver disease o NAFLD) es una de las enfermedades hepáticas más comunes que no puede contemplarse como benigna, sino como un estado premórbido que puede causar enfermedad hepática avanzada e importantes problemas de salud pública (77,78). Es una entidad clínico-

patológica cuya historia natural aún no se ha logrado esclarecer completamente y que se caracteriza por un amplio espectro de daño hepático que va de la *esteatosis* simple a la *esteatohepatitis*, pudiendo llegar a estadios de *fibrosis avanzada* y *cirrosis* (79) y formas en las que todas éstas formas se superponen (80). Estas lesiones son similares a las que produce el alcohol, aunque se observa precisamente en personas que no consumen alcohol en exceso (81). La *esteatosis* no es progresiva, mientras que la *esteatohepatitis* sí lo es y progresa a fibrosis y cirrosis, y aún a carcinoma hepatocelular.

Las características histológicas de lo que ahora llamamos “esteatohepatitis no alcohólica” (non-alcoholic steatohepatitis o NASH) fueron mencionadas desde 1962 por Thaler, y se describieron apropiadamente por Ludwig en 1980 (82). La NASH se caracteriza por una infiltración grasa difusa, degeneración balonoide e inflamación con o sin cirrosis hepática. La *NASH* expresa sólo una fase o subtipo del espectro de la *NAFLD*.

Aún cuando se considera una enfermedad benigna, puede progresar a fibrosis, cirrosis o carcinoma hepatocelular (80,83). El trasplante de un hígado graso, además, es una causa de disfunción primaria del injerto post-trasplante hepático (84), y probablemente se relaciona con el hecho de que este hígado es más susceptible a daño por isquemia fría o caliente (85). Ello puede deberse a la ruptura de hepatocitos que liberan grandes gotas de grasa a la microcirculación hepática y presumiblemente producen obstrucción y distorsión, o bien a que los triglicéridos y ácidos grasos de los fosfolípidos se solidifican cuando el hígado es refrigerado, lo que altera los organelos y membrana celular. Por último, existe una controversia con respecto a que la NASH altere la capacidad de regeneración hepática. Algunos autores creen que no la afecta tanto como la esteatohepatitis alcohólica (86); en cambio, otros creen que sí, probablemente debido a un aumento en la lipoperoxidación hepatocelular en conjunto con una respuesta proinflamatoria mediada por las células de Kupffer, y por ello se explica que los pacientes con esteatosis tienen un mayor riesgo de complicaciones inflamatorias cuando son sometidos a resección hepática parcial (87).

#### **1.2.1.1. Esteatohepatitis alcohólica vs. esteatohepatitis no alcohólica.**

La *esteatosis hepática* se observa frecuentemente en consumidores excesivos de alcohol, aunque también en otras condiciones como la obesidad, diabetes o hiperlipidemia (88). En los alcohólicos, la inducción de la lipoperoxidación y el incremento de la actividad del citocromo P450 2E1 (CYP 2E1) por el alcohol son dos factores clave en esta evolución (89). Aún cuando se han implicado factores similares en la NASH, su papel respectivo en el proceso de la esteatosis, inflamación y depósito de colágeno que llevan finalmente a la cirrosis es aún objeto de debate (89,90).

El hígado graso alcohólico está predispuesto a mayor daño (hepatitis y fibrosis) a través de la *inducción* del CYP 2E1, la generación de radicales libres, la lipoperoxidación (stress oxidativo), la activación del NF- $\kappa$ B y la transcripción de mediadores proinflamatorios, incluyendo el TNF- $\alpha$  (91). El acetaldehído producido por oxidación del etanol puede promover la acumulación de grasa en

hígado al alterar la unión del PPAR- $\alpha$  al DNA y la síntesis de la SRBP-1 y, junto con la activación de las células de Kupffer por los lipopolisacáridos, empeora la lesión tisular. En este contexto, los ácidos grasos insaturados (maíz, pescado) exacerbaban el daño alcohólico al aumentar el stress oxidativo, mientras que los saturados actúan como protectores ante el mismo. De la misma forma, el fosfatidil inositol disminuye la actividad del CYP 2E1, por lo que atenúa el stress oxidativo y así disminuye el número de células estelares hepáticas activadas e incrementa la actividad de la colagenasa.

La NASH, en ocasiones indistinguible histológicamente de la de origen alcohólico, se desarrolla, al igual que la ASH, por stress oxidativo y disfunción mitocondrial, pero además existe resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de la metionina/S-adenosilmetionina/homocisteína, y de la regulación del metabolismo de citocinas. Ya que comparte muchos de los mecanismos de daño de la ASH, la progresión de la NAFLD a NASH puede facilitarse por el consumo crónico de alcohol.

### **1.2.2. Prevalencia.**

La NAFLD tiene una importante prevalencia en el mundo, y cada vez más se le reconoce como la principal causa de disfunción hepática y cirrosis en la población no alcohólica y sin infección por virus de hepatitis C (92). La prevalencia de NAFLD en la población general varía entre 15 y 39% (93,94), mientras que la de NASH en la población general es del 2% (95). Se encuentran en el 7 a 9% de los pacientes que se someten a biopsia hepática para la evaluación de pruebas de función hepática incidentalmente elevadas en los países occidentales (82), y hasta en un 21 a 63% en los pacientes con transaminasas elevadas persistentemente (94); en Japón esta prevalencia es de apenas 1.2% (96). Con respecto al material de autopsia, en diversos estudios se ha encontrado NAFLD en el 6.3 a 21% (95,97,98) y el 25.8% de los donadores de hígado la presentan (84).

La mayoría de los casos se diagnostican entre los 40 y 60 años, aunque se ha informado la presencia de esta enfermedad en niños de 10 años (99). La NAFLD afecta al 2.6% de los niños, y entre el 22.5 y 58.5% de éstos son obesos (100).

### **1.2.3. Factores de riesgo.**

Los principales factores de riesgo de la NAFLD son la *sobrealimentación* y las alteraciones que produce: obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y dislipidemia (101,102). La NAFLD, por tanto, está asociada con las características clínicas del *síndrome metabólico*: obesidad, diabetes mellitus tipo II y dislipidemia (100,103,104). En un estudio transversal que incluyó 551 obesos, se encontró que el riesgo de esteatosis hepática aumenta exponencialmente con la adición de los cuatro componentes de los síndromes de resistencia a la insulina (diabetes mellitus tipo II, hiperlipidemia, obesidad visceral e hipertensión) (105).

Del otro lado de la moneda se encuentra la *restricción dietética desequilibrada* o *acelerada* (después de cirugía bariátrica, resección intestinal extensa o ayuno prolongado)(90), que también puede producir alteraciones hepáticas y empeorar la NASH existente, ya que promueve la inflamación portal hepática, la fibrosis, la estasis biliar y la necrosis focal (101).

Sin embargo, ni la obesidad ni el síndrome metabólico son, estrictamente, prerequisites para el desarrollo de NASH (106,107) y existen otros factores que favorecen su desarrollo.

### 1.2.3.1. Obesidad.

Muchos de los pacientes obesos tienen evidencia de hígado graso e incluso NASH (104), de tal forma que puede afirmarse que la obesidad está fuertemente relacionada con la NAFLD (82,83,108,109).

La obesidad *visceral* es un mejor predictor de la resistencia a la insulina y alteración en la función hepática, aún en personas con peso normal (110), que la obesidad definida simplemente en términos de índice de masa corporal (111). El tejido adiposo visceral y el subcutáneo tiene diferentes funciones metabólicas y productos secretados (tabla 3), lo que puede explicar por qué la grasa visceral, y no la grasa subcutánea, está asociada con anomalías metabólicas. El tejido adiposo visceral puede generar radicales libres y aumentar la producción de TNF- $\alpha$ , induciendo resistencia a la insulina y produciendo agentes profibrogénicos como la angiotensina II, norepinefrina, neuropéptido Y y leptina.

**Tabla 3. Diferencias en la expresión de adipocitocinas entre el tejido adiposo visceral (V) y el tejido adiposo subcutáneo (S) en el hombre.**

Adipocitocina	Diferencias en expresión
Adiponectina	V < S
Leptina/ob-re	V < S
TNF- $\alpha$	V = S
Angiotensinógeno	V > S
IL-6	V > S
IL-8	V > S
PPAR- $\gamma$	V > S
Resistina	V > S

Fuente: Sebastián Muñoz D. Resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos en células de músculo esquelético L6E9: papel de la carnitina. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia. Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular, 2006.

La alta tasa de recambio (deposición y lipólisis) del tejido visceral lleva a un aumento en el flujo de FFA hacia el hígado por vía portal (112).

La prevalencia de obesidad en pacientes con NASH varía entre el 30 y 100% (100), y la prevalencia de NASH en obesos es 6 veces más alta que en personas con peso normal (108). La esteatosis se encuentra en el 70% de las personas obesas y 35% de las delgadas en autopsia, y la NASH en el 18.5% y

2.7%, respectivamente. En obesos mórbidos que requieren derivación gástrica, la prevalencia de NAFLD es del 95%, mientras que de NASH es del 25% (113).

### **1.2.3.2. Resistencia a la insulina y diabetes mellitus.**

#### **Resistencia a la insulina**

La resistencia a la insulina juega un papel fundamental en la diabetes mellitus tipo II, al igual que en la obesidad, y es el factor más predisponente y reproducible para el desarrollo de NAFLD (114). Algunos autores han considerado que la NAFLD es la manifestación *hepática* del síndrome metabólico (115). La relación de la NAFLD con la *resistencia a la insulina* es clara (83,116), así como con la *diabetes mellitus tipo II*.

#### **Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus tipo II está causada por:

- a) Resistencia a la insulina, que es la incapacidad de la insulina para suprimir la producción hepática de glucosa y promover la captación de glucosa por los tejidos periféricos.
- b) Una disminución en la función de las células  $\beta$  del páncreas.

De esta forma, la enfermedad inicia una disminución progresiva de la acción de la insulina, seguida de una incapacidad por parte de las células  $\beta$  del páncreas para compensar esta resistencia a las acciones de la hormona.

Aunque se han propuesto varios factores que relacionan la obesidad con la resistencia a la insulina como los FFA, el TNF- $\alpha$ , la leptina y la angiotensina - todos secretados por el tejido adiposo (*vide infra*)- puede haber obesidad sin resistencia a la insulina, o resistencia a la insulina en personas o animales con peso normal. Así, alrededor del 80% de los diabéticos tipo II presentan obesidad central; sin embargo, sólo el 10% de los obesos son diabéticos. Por tanto, la NAFLD también puede presentarse en un contexto de resistencia a la insulina o diabetes mellitus independiente de la obesidad.

Por otra parte, la diabetes tipo II está relacionada a largo plazo con la disminución de los depósitos de grasa (adipocitos), reflejado en un aumento de los triglicéridos y FFA circulantes, aunque con una deposición excesiva de grasa en los tejidos periféricos no adipocíticos incluidos el músculo (117).

Entre un 63 y un 75% de los diabéticos presenta alguna forma de hígado graso (118,119), y se calcula que la diabetes mellitus eleva el riesgo de NASH 2.6 veces (120).

### **1.2.3.3. Dislipidemias.**

La hiperlipidemia está presente en una importante proporción de pacientes con NASH. En algunas series publicadas, la hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o ambas se encuentran en el 20 a 80% de los pacientes

con NASH, aunque al parecer es más la hipertrigliceridemia que la hipercolesterolemia la que aumenta el riesgo de NASH (100). Muchos pacientes, sin embargo, presentan además obesidad y diabetes mellitus tipo II.

La hiperlipidemia se encuentra en el 21 a 61% de los pacientes con NAFLD (121-123).

#### **1.2.3.4. Otros factores de riesgo.**

Recientes investigaciones han demostrado que algunos polimorfismos genéticos pueden aumentar significativamente el riesgo de esteatohepatitis (124).

Los mecanismos exactos que inician la esteatosis hepática primaria y su progresión se desconocen. Se ha encontrado que los pacientes con NASH tienen una mayor expresión de unos genes hepáticos (HK1, UCP2, ME2 y ME3) y menor expresión de HMGCS2 y hnRNPK. Sin embargo, no se puede afirmar si estas diferencias en su perfil de expresión reflejan verdaderamente la progresión de anormalidades morfológicas o más bien son indicativos del estado metabólico u hormonal de los pacientes con diferentes grados de NAFLD (125). Por otra parte, se sabe que los pacientes con esteatosis tienen un patrón de expresión génica intermedio entre los pacientes con NASH y los controles (126) y que muchos de los genes asociados con la NASH contienen un elemento Sp1. Probablemente la fosforilación de este elemento está relacionada con la génesis de esteatosis y, posteriormente, otros factores como el stress oxidativo disparan la progresión a NASH.

En la tabla 4 se encuentran las principales condiciones asociadas a la NASH.

**Tabla 4. Condiciones asociadas a la esteatohepatitis no alcohólica.**

**Principales factores asociados**

Obesidad  
Diabetes mellitus  
Hiperlipidemia  
Género femenino, edad avanzada  
Pérdida de peso rápida  
Resistencia a la insulina  
Cambios en las reservas de hierro corporal

**Condiciones etiológicamente asociadas a la NASH**

*Técnicas quirúrgicas en el tratamiento de obesidad:*

Derivación yeyunoileal o yeyunocólica  
Gastroplastía  
Derivación biliopancreática  
Resección intestinal masiva.

*Alteraciones relacionadas con la alimentación*

Anorexia, ayuno, bulimia  
Nutrición parenteral total  
Enfermedad celiaca

*Diverticulosis yeyunal y otras condiciones asociadas a sobrecrecimiento bacteriano*

*Enfermedad hepática inducida por medicamentos*

Amiodarona  
Maleato de perhexilina  
Bloqueadores de canales de calcio  
Glucocorticoides (dosis elevadas)  
Estrógenos sintéticos, tamoxifeno  
Cloroquina  
Síndrome del aceite tóxico  
Toxicidad por dimetilformamida

*Enfermedades metabólicas*

Enfermedad de Wilson  
Enfermedades infantiles relacionadas con hierro  
Glucogenosis tipo 1  
Abetalipoproteinemia

*Síndromes de resistencia grave a la insulina*

Lipodistrofia (general o parcial)  
Mutaciones en receptores de insulina

Fuente: Pérez Aguilar F, Benlloch S, Berenguer M, Beltrán B, Berenguer J. Non-alcoholic steatohepatitis: physiopathological, clinical and therapeutic implications. Rev Esp Enferm Dig 2003; 96: 628-648.

#### 1.2.4. Fisiopatología.

La hipótesis más aceptada con respecto a la patogénesis de la NAFLD es la hipótesis de los dos “hits” o impactos propuesta por Day y James (127), en la que se reconocen dos “etapas” de la NAFLD.

1. *Esteatosis*: la acumulación de grasa en hígado producida básicamente por *resistencia a la insulina*.
2. *Esteatohepatitis*: la progresión de la esteatosis previa cuya causa es aún desconocida pero que se atribuye a *lipotoxicidad*, *stress oxidativo*, *desbalance de citocinas pro y antiinflamatorias* (116,128) y *fibrosis*. Los FFA que se acumulan en los hepatocitos se oxidan, produciendo ROS en la mitocondria, microsomas y peroxisomas (129). Las ROS producen peroxidación de lípidos de las membranas celulares y el daño resultante hace que se recluten células inflamatorias (107) que, a su vez, secretan citocinas proinflamatorias (130).

Para facilitar la explicación de la fisiopatología de esta enfermedad, se suelen separar el *desequilibrio de hormonas* relacionadas con el metabolismo de la glucosa, del *stress oxidativo*; sin embargo, lo propio es considerarlos como eventos interdependientes y secuenciales, aunque en algunas ocasiones no lo sean. En términos generales, la NASH está asociada a dos defectos (131):

1. *Resistencia periférica a la insulina*, que aumenta la lipólisis, la llegada de FFA al hígado y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el hígado, lo que incrementa el stress oxidativo.
2. Una anomalía en los hepatocitos—concretamente, el daño ultraestructural en las mitocondrias (pérdida de crestas mitocondriales, inclusiones paracristalinas, disminución de la actividad de la cadena respiratoria) (132)—que los hace más susceptibles al daño por *stress oxidativo*. Dichas alteraciones se han detectado en pacientes con NASH (133).

Existen, asimismo, otras muchas alteraciones interrelacionadas que, en conjunto, intervienen en el desarrollo de esta enfermedad. Ejemplo de ellas son:

- El desequilibrio de citocinas *pro* y *antifibrogénicas*.
- El aumento de la leptina, asociada con la obesidad, que es profibrogénica.
- La alteración en la regulación del recambio de la proteína de matriz hepática (metaloproteinasas –matrix metalloproteinases o MMP- y sus inhibidores –tissue inhibitor metalloproteinases o TIMP)(134).

##### 1.2.4.1. Resistencia a la insulina e implicación de las adipocitocinas: esteatosis.

#### Resistencia a la insulina

La *resistencia a la insulina* es la incapacidad del organismo de responder normalmente a las acciones de la insulina. Está relacionada con la obesidad,

diabetes mellitus y otras condiciones. Aunque la definición de *resistencia a la insulina* había versado siempre en términos de metabolismo de *glucosa*, ahora se habla más de anomalías en el metabolismo de *ácidos grasos*. En términos generales, se acompaña de un incremento de los FFA plasmáticos que, junto con la hiperglucemia, promueven la síntesis hepática de ácidos grasos y alteran la  $\beta$ -oxidación (135).

La resistencia a la insulina aumenta la lipólisis del tejido adiposo y, por tanto, el flujo de FFA desde los adipocitos hacia el músculo, hepatocitos y células  $\beta$ , favoreciendo su depósito y estimulando la lipogénesis hepática (136,137). Los FFA son esterificados a triglicéridos en estos tejidos y en hígado, además, se incorporan a las VLDL. El exceso en la secreción hepática de VLDL produce hipertrigliceridemia. Sin embargo, la misma resistencia a la insulina inhibe la acción de la LPL y por ello disminuye la depuración intravascular de VLDL (la LPL no actúa sobre ellas y, por ello, no escinde triglicéridos para distribuirlos en los tejidos, que también son resistentes a la insulina) y aumenta consecuentemente la trigliceridemia. A su vez, esta acumulación *periférica* de lípidos (en hígado y músculos, fundamentalmente) y también el aumento de lípidos circulantes provoca la aparición de resistencia a la insulina (21) (138). Cuando aumenta la carga de triglicéridos al hígado y/o su síntesis hepática *de novo* se produce la NAFLD.

En la NAFLD, la resistencia a la insulina altera la capacidad de regulación del hígado sobre metabolismo de lípidos (139) ya que hay un aumento de la lipogénesis *de novo* y una acumulación de triglicéridos. Existen una serie de alteraciones moleculares en la resistencia a la insulina durante su señalización que producen finalmente acumulación de triglicéridos en hígado (52). La sobrecarga crónica de grasa al hígado produce resistencia a la insulina, y la hipersecreción compensatoria de insulina por el páncreas y la disminución de la aclaración de insulina por el hígado producen hiperinsulinemia (106). A pesar de la resistencia a la insulina, la insulina y glucosa activan los factores de transcripción lipogénicos SREBP-1c y ChREBP-1c, respectivamente, y ambos a su vez estimulan la síntesis de malonil-CoA, inhibidor de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y primera molécula en la biosíntesis de ácidos grasos (*vide supra*). La DGAT2, también juega un importante papel en la síntesis de triglicéridos hepáticos, y por tanto en la esteatosis hepática (61).

### Resistencia periférica a la insulina

El *músculo* metaboliza la mayoría de la glucosa en situaciones de estimulación, confiriéndosele por ello mucha importancia en el desarrollo de resistencia a la insulina (21). La acumulación de derivados de ácidos grasos en músculo (por aporte excesivo de lípidos o alteraciones en su oxidación), y no en adipocitos, conducen a una resistencia a la insulina. Los ratones lipodistróficos (tejido adiposo ausente pero doble cantidad de grasa acumulada en hígado y músculos) son muy resistentes a la insulina, pero cuando se les transplantan adipocitos se produce un efecto similar al de las tiazolidinedionas: disminuyen los lípidos intracelulares, se normaliza la sensibilidad a la insulina y se produce un aumento de tejido adiposo. Las tiazolidinedionas son activadores de los PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo e incrementan la diferenciación de los adipocitos y

producen una redistribución de lípidos desde el músculo e hígado al tejido adiposo, mejorando la sensibilidad a la insulina.

Es poco probable que los *triglicéridos* intervengan en la sensibilidad muscular a la insulina, no así los *LCFA*. Los ácidos grasos:

- a) Disminuyen la captación y transporte de glucosa por el GLUT4 en músculo.
- b) Compiten con la glucosa como sustrato energético en el músculo y tejido adiposo: el aumento en la oxidación de ácidos grasos causa un incremento de acetil-CoA/CoA y NADH/NAD<sup>+</sup>, con la consecuente inactivación de las enzimas glucolíticas (140).

### Resistencia hepática a la insulina

La resistencia *periférica* a la insulina (presente en la mayoría de los pacientes con NASH)(102) y la sobreexpresión experimental de LPL aumentan el flujo de FFA al hígado, lo que produce *esteatosis hepática* e induce una resistencia del hígado a que la insulina suprima la producción hepática de glucosa. El *hígado* se vuelve, entonces, *resistente a la insulina* y se desarrolla *hiperglucemia* (5), agravando la *resistencia periférica a la insulina*. Así, con sólo aumentar el flujo de ácidos grasos hacia el hígado aumenta la *resistencia hepática a la insulina*. La hiperglucemia favorece la lipogénesis hepática (139). Existe una correlación positiva entre la resistencia *hepática* a la insulina y el contenido de grasa en hígado (106), aunque la *sensibilidad hepática a la insulina* puede estar conservada en el hígado graso que contiene más MUFAs (141).

Por otra parte, la insulina también inhibe la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria por elevación del malonil-CoA (que a su vez inhibe la CPT-1) y en los peroxisomas (29).

La sobreexpresión experimental de la CPT-1 con C75 aumenta la oxidación de ácidos grasos, reduce la acumulación de grasa en hígado y tejido adiposo e impide el desarrollo de resistencia a la insulina en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en lípidos que disminuye la sensibilidad a la insulina (21,142); en tanto que su inhibición con etomoxir aumenta los lípidos intramusculares y se induce resistencia a la insulina (143). Debido a esto, se considera a la CPT-1 como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II y, por extensión, de la NAFLD asociada a resistencia a la insulina.

### **Implicación de las adipocitocinas**

El tejido adiposo produce una serie de adipocitocinas, que incluyen la leptina, la adiponectina y el TNF- $\alpha$  (144), entre otras muchas. Existe una compleja interacción entre las adipocitocinas y la patogénesis de la NAFLD (145). La obesidad, que se asocia con las altas concentraciones plasmáticas de leptina y TNF- $\alpha$  y bajas de adiponectina, es un factor de riesgo independiente para la NAFLD; la alteración funcional de la insulina y leptina, por otra parte, están también implicadas en el desarrollo de esta enfermedad (146).

## Leptina

La leptina es una adipocitocina producida por el tejido adiposo blanco y actúa en el núcleo hipotalámico ventral medio produciendo anorexia. Fisiológicamente, la leptina media una respuesta adaptativa neuroendócrina innata a la inanición, en la que el tejido adiposo se depleta y la concentración de leptina cae. Esto provoca el deseo de buscar alimento y suprime el tiroides, la hormona de crecimiento y los ejes adrenal y reproductivo (147). Su concentración correlaciona con el porcentaje de grasa corporal pero su influencia en la distribución de la grasa no se ha esclarecido completamente, ya que existen datos contradictorios con respecto a la asociación de la leptina y la distribución abdominal de la grasa (148). Se ha sugerido que la leptina mejora la sensibilidad a la insulina haciendo que los ácidos grasos acumulados en tejidos periféricos se redistribuyan y acumulen en el tejido adiposo en ratones con lipodistrofia (149); sin embargo, recientemente se ha descrito que, por lo contrario, puede contribuir a la resistencia a la insulina, sobre todo en tejido adiposo blanco (150).

La leptina interviene en numerosos procesos fisiológicos, puede afectar directamente la respuesta inflamatoria (regula la función de macrófagos y aumenta su producción de TNF inducida por endotoxinas) y promueve la fibrogénesis hepática por inducción del TGF- $\beta$ 1 (el principal activador de la síntesis de proteína de matriz extracelular) en las células de Kupffer y en las células endoteliales sinusoidales (151) y porque es indispensable para la regulación transcripcional del colágeno I durante el daño hepático necroinflamatorio crónico (152). Además, la leptina facilita la proliferación y previene la apoptosis de las células estelares hepáticas (que, a su vez, secretan más leptina)(104) y estimula la producción de  $\alpha$ -actina de músculo liso, colágeno y del TIMP-1 (153), todos ellos, factores que contribuyen en la fibrogénesis.

La deficiencia de leptina juega un papel causal en diversos modelos animales de resistencia a la insulina y NAFLD. Existe, sin embargo, evidencia de que esta deficiencia pueda, en contraste, proteger a los roedores de desarrollar cirrosis después de la exposición a algunos hepatotóxicos (152). Este hallazgo debe confirmarse, ya que la deficiencia de leptina promueve la patogénesis de *esteatosis* a *esteatohepatitis* pero al mismo tiempo podría limitar la progresión de la NAFLD a una etapa cirrótica (154). Esto podría explicar por qué muchos modelos animales con resistencia a la insulina e hígado graso (y sin leptina) no son francamente cirróticos y por qué la resistencia a la insulina y la NAFLD son tan comunes en el hombre (la deficiencia de leptina –como en la lipodistrofia– es excepcionalmente rara), mientras que la cirrosis en estos pacientes es relativamente poco frecuente (108). Dado que las células estelares hepáticas, las principales reguladoras de la fibrosis hepática, expresan el gen receptor de la leptina (Ob-Rb), es esperable que la leptina pueda ser necesaria para obtener una respuesta fibrótica óptima (154). Los modelos animales deficientes en leptina (como el ratón *ob/ob*) están relativamente protegidos de desarrollar cirrosis aún cuando presenten NASH (150)(*vide infra*).

La alteración en la secreción de leptina puede producir resistencia a la insulina (155) y, de hecho, *clínicamente*, la leptinemia correlaciona bien con el porcentaje de grasa corporal y resistencia a la insulina (104), pero muy pobremente con el desarrollo de NASH (156). Existe *hiperleptinemia* en los pacientes con NASH y correlaciona con el grado de esteatosis hepática pero la leptina no predice la severidad de la inflamación o de la fibrosis hepáticas (155). Es probable que esta hiperleptinemia (inefectiva) en los pacientes con NAFLD sea provocada por compensación, ya que hay una resistencia periférica a los efectos antiesteatósicos de la leptina. Este estado refractario (también a los efectos profibrogénicos de la leptina) podría explicar la razón por la que no es frecuente hallar fibrosis y cirrosis hepáticas en estos pacientes. Por otra parte, el hecho de que el tratamiento crónico con leptina mejora la resistencia a la insulina en pacientes con lipodistrofia (deficientes en leptina) al mejorar el metabolismo hepático y periférico de la glucosa (157) obliga a pensar que el papel de la leptina en la NAFLD es controversial. Es por ello que se requieren más estudios para detallar el efecto de la administración de leptina en pacientes con aumento en la resistencia a la insulina (158).

Teóricamente la administración de leptina disminuye la acumulación hepática de triglicéridos y, por tanto, mejora la resistencia a la insulina. Sin embargo, este efecto no se observa en ratas viejas que presentan resistencia a la leptina. Al estudiar ratas Zucker, resistentes a la leptina, mejoró la resistencia a la insulina eliminando tejido adiposo visceral pero aún así no disminuyó el contenido de triglicéridos hepáticos. Este hallazgo conduce a la conclusión de que la alteración en la *acción* de la leptina es el principal mecanismo fisiológico de la esteatosis hepática.

### Adiponectina

La adiponectina es una proteína secretada exclusivamente por el tejido adiposo que incrementa la sensibilidad a la insulina y la oxidación de FFA en el hígado, inhibe la captación de ácidos grasos y ejerce efectos antiinflamatorios (139). Es la única proteína específica del tejido adiposo que disminuye en los pacientes obesos, sobre todo cuando se produce un aumento en el tejido adiposo visceral (159). Aún cuando su estructura es muy similar a la del TNF- $\alpha$ , sus efectos son completamente opuestos y antagónicos tanto *in vivo* como *in vitro* y, de hecho, se inhiben mutuamente (síntesis y actividad) (5). La adiponectina puede tener un papel crítico en el mantenimiento del fenotipo quiescente de las células *estelares hepáticas* o en la *regresión* de la *fibrosis hepática* por inducción de la apoptosis de las células estelares activadas (160).

La adiponectinemia correlaciona negativamente con la concentración en sangre de glucosa, insulina, triglicéridos y LDL, y positivamente con la HDL (5,161); por tanto, se encuentra disminuida en pacientes y modelos animales de obesidad, diabetes mellitus II y enfermedad coronaria (162).

La *hipoadiponectinemia* es causada por el consumo crónico de alcohol (163) y también es una característica de la NASH (5) y puede tener un papel patogénico en la disfunción de las células  $\beta$  y en la necroinflamación hepática y la fibrosis, independientemente de la resistencia a la insulina, acumulación de

grasa visceral, actividad de TNF- $\alpha$  y hábitos alimentarios (128,164). Puede estar presente antes del diagnóstico de diabetes y obesidad y correlaciona con la severidad de la necroinflamación hepática (128,165,166). La *hipoadiponectinemia* puede predecir la esteatosis hepática y elevación de ALT y GGT y la baja concentración de adiponectina en ratones *knockout* para ésta contribuye a la progresión de la esteatosis hepática, fibrosis y formación de tumores hepáticos (167). En ratones KK-A (y) (obesos y diabéticos), la falta de regulación fisiológica de la adiponectina produce NAFLD más severo (inducido por dieta DCM) que en los ratones C57BL/6; por tanto, el papel de la *hipoadiponectinemia* es clave en la regulación de la progresión de la fibrosis hepática (151,168).

Actualmente, se considera que la adiponectina es un factor protector tanto contra la inflamación (169) como contra la fibrosis (144) que puede prevenir la progresión del hígado esteatótico al fibrótico (104) y por tanto se plantea actualmente el uso de adiponectina recombinante, análogos de adiponectina o agonista de receptores de adiponectina como terapias innovadoras para la NAFLD (104,163). Su administración en animales obesos disminuye la hiperglucemia y se considera protectora del daño hepático mediado o no por alcohol (163) ya que reduce la concentración de FFA (probablemente por aumento en la actividad de la CPT-1 (160), mejora la sensibilidad a la insulina (161), estimula la  $\beta$ -oxidación mitocondrial (por activación directa de los receptores *PPAR- $\alpha$* )-incluso en cultivos de hepatocitos (You)- y disminuye la SREBP-1c (170). La adiponectina, además, inhibe la proliferación y migración de las células estelares hepáticas y la expresión del TGF- $\beta$ 1 (167) y reduce la secreción de TNF- $\alpha$  de los macrófagos activados.

Por otra parte, la expresión de la adiponectina puede inducirse con agonistas de los *PPAR- $\gamma$*  como la pioglitazona, lo que aumenta *el tejido adiposo* pero previene la acumulación de triglicéridos en hígado, aunque no sea necesariamente porque cause una modificación en la actividad de enzimas hepáticas que regulan la  $\beta$ -oxidación (acil-CoA oxidasa y acil-CoA carboxilasa) (171).

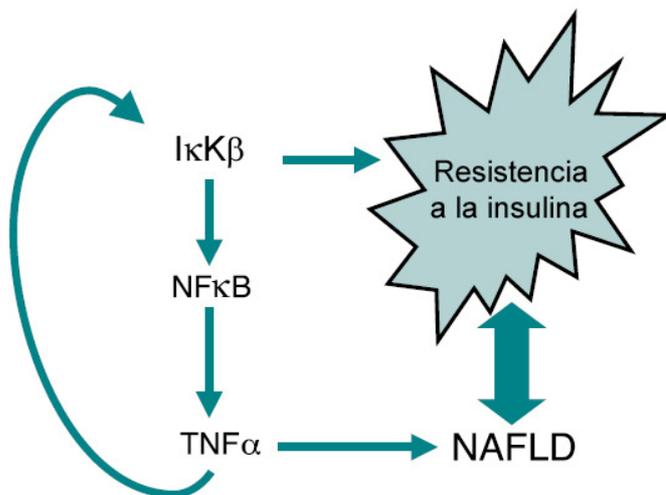
La *hiperadiponectinemia* no necesariamente refleja que el hígado está protegido del desarrollo de inflamación, ya que el mismo hígado es el principal órgano donde se metaboliza la adiponectina y, consecuentemente, la afectación hepática podría explicar que se encuentre elevada en la cirrosis (172).

### TNF- $\alpha$

La importancia del TNF- $\alpha$  en la resistencia a la insulina se demostró en ratones con ausencia de TNF- $\alpha$  o de la subunidad de su receptor (173,174). Durante las etapas tempranas de la NAFLD, el inhibidor  $\kappa$  cinasa  $\beta$  ( $I\kappa K\beta$ ), una cinasa que induce al TNF- $\alpha$  y otras citocinas proinflamatorias, se activa y causa resistencia a la insulina. Además del  $I\kappa K\beta$ , otra cinasa regulada por el TNF- $\alpha$  también promueve la resistencia a la insulina: la cinasa Jun N-terminal (JNK) (175, 176).

Los mecanismos que explican la resistencia a la insulina son múltiples, y entre ellos se mencionan:

- a) Una disminución en la expresión del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 causada por el TNF- $\alpha$  (el GLUT-4 favorece la entrada de glucosa a las células).
- b) Una disminución en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1).
- c) Una inhibición periférica de la captación de glucosa por el efecto inhibitorio de los triglicéridos sobre el IRS-1 (177).
- d) Un aumento en la actividad del I $\kappa$ K $\beta$  debido a la exposición al TNF- $\alpha$ . El I $\kappa$ K $\beta$ , a su vez, activa el NF- $\kappa$ B, mismo que induce la síntesis de TNF- $\alpha$ . De esta forma, la activación del I $\kappa$ K $\beta$  es tanto causa como consecuencia del aumento de TNF- $\alpha$  y, por tanto, este ciclo perpetúa la resistencia a la insulina y un estado inflamatorio crónico (figura 5)(154).



**Figura 5. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina asociada a la NAFLD.** La activación del I $\kappa$ K $\beta$  activa el NF- $\kappa$ B, que induce la transcripción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . Debido a que el TNF- $\alpha$  también activa el I $\kappa$ K $\beta$ , se produce una retroalimentación positiva que perpetúa la resistencia a la insulina y producción de TNF- $\alpha$ .

La inhibición del I $\kappa$ K $\beta$  o TNF- $\alpha$  mejora la sensibilidad a la insulina, la esteatosis y la esteatohepatitis en animales, sugiriendo que existen estrategias novedosas para prevenir y tratar tempranamente la NAFLD en el hombre. De hecho, los agentes que mejoran la sensibilidad a la insulina (metformina) que, se sabe, bloquean la señalización del TNF- $\alpha$  en los hepatocitos (178,179), también pueden revertir la enfermedad hepática grasa en ratones *ob/ob*. Por otra parte, la inducción de TNF- $\alpha$  es común a varios factores agresores y promueve la progresión de esteatosis a esteatohepatitis.

## Esteatosis

La *esteatosis hepática* se refiere a la acumulación de lípidos en el hígado ("hígado graso"). Es una característica preponderante en la NAFLD y un promotor potencial de inflamación (134), convirtiéndose en un cofactor que

puede determinar la progresión a fibrosis (64,82,127), la cual se acelera con la interacción de otros factores etiológicos como el consumo de alcohol o el virus de hepatitis C. La esteatosis de la NAFLD generalmente es *macrovesicular*, y es más prominente en la zona acinar 3, extendiéndose a la zona panacinar aunque preservando la zona periportal (180).

Por otra parte, el hígado juega un papel central en el metabolismo de las grasas e hidratos de carbono (64), y la síntesis de triglicéridos aumenta en el hígado graso asociado a la obesidad y diabetes mellitus tipo II en el hombre y en ratones (101). No obstante, aún no se ha logrado dilucidar si esta resistencia a la insulina se produce por la misma acumulación de triglicéridos en hígado o por un exceso de intermediarios en la síntesis de estos mismos (181). Al parecer, la disminución en la síntesis de glucógeno en músculo esquelético, indicativa de resistencia a la insulina periférica, produce una mayor acumulación de triglicéridos musculares. Estos posteriormente se liberan como FFA y llegan al hígado, en donde participan en la síntesis hepática de triglicéridos *de novo*, lo que al final se refleja como una resistencia hepática y sistémica a la insulina aún en ausencia de obesidad o de una dieta lipogénica.

Se ha mencionado que existe una “comunicación” disfuncional entre el tejido adiposo y el tejido hepático en las enfermedades metabólicas e inflamatorias (182), y que existen diversos factores liberados del tejido adiposo hipertrófico que pueden contribuir en la resistencia intrahepática a la insulina (52), entre ellos el TNF- $\alpha$ .

La alteración de los mecanismos normales de la síntesis, transporte y eliminación de los LCFA y triglicéridos es la base del desarrollo de NAFLD y proporcionan un esquema para revisar los modelos animales disponibles. La esteatosis se produce cuando la importación o síntesis de ácidos grasos por los hepatocitos excede su exportación o catabolismo (78). La acumulación intrahepática de lípidos se produce cuando se rompe este balance fisiológico normal de alguna de las cuatro formas siguientes:

*1. Aumento en la llegada y captación por los hepatocitos de LCFA debido a un exceso en el consumo dietético o liberación desde los depósitos del tejido adiposo:*

El tejido adiposo es metabólicamente activo y libera muchos mediadores del metabolismo de hidratos de carbono (leptina, adiponectina, resistina) y del de lípidos (apolipoproteína E, LPL), además de adipocitocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 y TGF- $\beta$ 1). Al desarrollarse la obesidad, aumenta progresivamente el TNF- $\alpha$ , que activa el I $\kappa$ K $\beta$  e inhibe la fosforilación de los sustratos de los receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2). Esto produce un defecto en la supresión mediada por insulina de la HSL y un aumento en la liberación de LCFA a la circulación (183). La obesidad central se relaciona con la esteatosis, ya que se liberan grandes cantidades de LCFA directamente a la circulación portal. Esto, unido a la estimulación de la translocasa de ácidos grasos del hígado lleva a un aumento de su captación hepática.

## 2. Aumento en la síntesis de novo de LCFA y triglicéridos

En la esteatosis, se produce una acumulación de ácido oleico en exceso (producto de la síntesis de ácidos grasos *de novo*) (184). La SREBP-1c es un factor de transcripción clave unido a la membrana por el que la insulina promueve la síntesis hepática de lípidos, y de igual manera, la hiperglucemia activa la síntesis hepática *de novo* a través de la ChREBP (185) (*vide supra*). Las altas concentraciones postprandiales de glucosa e insulina normalmente disparan rápidamente la síntesis de LCFA en los hepatocitos. La hiperinsulinemia, además, promueve en los adipocitos la captación de la glucosa plasmática mediada por el GLUT4, la síntesis de depósitos de lípidos y la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo.

En los individuos obesos, sin embargo, hay una menor actividad de GLUT4, lo que produce una mayor hiperglucemia postprandial y liberación de insulina pancreática que, junto con el aumento de TNF- $\alpha$  y su consecuente resistencia a la insulina, favorecen la síntesis de LCFA hepáticos a partir de acetil-CoA. La conversión de estos LCFA a triglicéridos por la glicerol fosfato aciltransferasa en los hepatocitos es ilimitada, por lo que el aumento en la disponibilidad de LCFA lleva al aumento en la síntesis y acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (186).

## 3. Inhibición en la síntesis de VLDL y exportación de triglicéridos.

Existen otros muchos mecanismos que explican la *esteatosis hepática* en el contexto de la resistencia a la insulina (puede haber esteatosis sin resistencia a la insulina), entre ellos la disminución en la producción de VLDL.

El aclaramiento de LCFA sólo puede lograrse a través de su esterificación a triglicéridos y su exportación como VLDL o bien por oxidación. La transferencia de lípidos a la apolipoproteína B100, la principal apolipoproteína de la VLDL, por la proteína microsómica de transferencia de triglicéridos (MTT) en el retículo endoplásmico es el paso limitante en el ensamblaje de VLDL. La abetalipoproteinemia es una enfermedad autosómica recesiva en la que hay un defecto en esta proteína y se produce esteatosis hepática severa que puede llevar a cirrosis. Algunos medicamentos como la amiodarona, doxiciclina y tetraciclina pueden también inhibir la actividad de la MTT y, además, alterar la  $\beta$ -oxidación (186). En los escenarios dominados por la resistencia a la insulina se produce esteatosis probablemente porque la insulina estimula la degradación intracelular de la apoB (187).

## 4. Inhibición en la eliminación de LCFA debido a una alteración en la $\beta$ -oxidación mitocondrial en el hígado.

La oxidación de ácidos grasos se produce en las mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplásmico (microsomas) (188). La  $\beta$ -oxidación mitocondrial es la principal ruta metabólica para los ácidos grasos de cadena corta, mediana y larga bajo condiciones fisiológicas normales (25). Este proceso puede alterarse en diferentes etapas catalizadas por enzimas clave.

La transesterificación e importación de ácidos grasos hacia dentro de la matriz mitocondrial por la CPT-1 es un paso limitante y regulatorio en este proceso. La CPT-1 se inhibe por la malonil-CoA, el primer intermediario en la síntesis de ácidos grasos (*vide supra*) y, por lo tanto, es sensible cuando se estimula la síntesis de ácidos grasos (18). Si la CPT-1 y, por tanto, la capacidad oxidativa de la *mitocondria* se saturan, existen rutas oxidativas alternativas en los *peroxisomas* y retículo endoplásmico liso (*microsomas*) para procesar la esta sobrecarga de LCFA. Es probable que los pacientes con NASH muestren una *menor* actividad de CPT-1 y, asimismo, tengan menores concentraciones de carnitina y acilcarnitina que los pacientes con esteatosis simple (189).

Una vez dentro de la matriz mitocondrial las acil-CoA se degradan a través de cuatro reacciones enzimáticas secuenciales para liberar NADH, FADH<sub>2</sub> y acetil-CoA (que después entra en el ciclo de los ácidos tricarbónicos). La proteína mitocondrial trifuncional (MTP), asociada a la membrana mitocondrial interna, cataliza las tres reacciones finales de esta serie (190). Las mutaciones en esta enzima son responsables de un síndrome similar al del Reye y el feto con esta mutación puede ser causante del síndrome de HELLP e hígado graso del embarazo.

La NAFLD humana está asociada con la obesidad y se caracteriza por una depleción de PUFA  $\omega$ -3 (191) y sus precursores y con una mayor concentración de ácido eláidico (el isómero *trans* del ácido oleico) en tejido adiposo. La expresión de factores de transcripción lipolíticos como el PPAR- $\alpha$  en el hígado esteatótico está suprimida (81). El PPAR- $\alpha$  controla la captación de ácidos grasos y transporte a las células, su unión intracelular, su almacenaje y su catabolismo (192, 193)(*vide supra*), y la reducción en su expresión altera la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos que, a su vez, puede desequilibrar el metabolismo de lípidos disminuyendo la exportación de triglicéridos y aumentando su síntesis, finalmente produciendo la acumulación de lípidos característica de la esteatosis hepática (25).

#### **1.2.4.2. Esteatohepatitis: stress oxidativo, lipoperoxidación, inflamación y fibrogénesis.**

##### **Esteatohepatitis**

La *esteatohepatitis* se refiere a la inflamación grasa del hígado (esteatosis macrovesicular, necroinflamación, degeneración balonoide de hepatocitos y fibrosis)(114). La progresión de la esteatosis a esteatohepatitis no es una constante, y se postula que se requieren factores diferentes a los que causan la esteatosis (88). La *esteatosis* es considerada inocua y reversible, mientras que la balonización de los hepatocitos y la inflamación determinan el que un paciente progrese a daño hepático irreversible y fibrosis. La imposibilidad de distinguir histológicamente la *esteatohepatitis alcohólica* de la *no alcohólica* sugiere que ambas comparten mecanismos patogénicos comunes. Una vez desarrollada la *esteatosis*, el hígado está "sensibilizado" y la respuesta inflamatoria, factor clave en la progresión a *esteatohepatitis* (194) puede precipitarse por una serie de estímulos. Al igual que en la esteatohepatitis alcohólica, el daño en la NAFLD se produce por dos mecanismos:

- a) Estrés oxidativo, lipoperoxidación y muerte celular.
- b) Inflamación mediada por citocinas.

Cuando este daño se prolonga por un tiempo suficiente bajo ciertas condiciones se propicia la *fibrogénesis*.

### **Estrés oxidativo y lipoperoxidación**

Una dieta aterogénica (alta en colesterol y AGS) produce un aumento en la expresión hepática de genes que regulan la síntesis de ácidos grasos, el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrogénesis; cuando esta dieta, además, tiene también un alto contenido de grasa, aumenta la resistencia a la insulina y disminuye la expresión génica de enzimas antioxidantes. Los lípidos, por tanto, tienen una importante participación en el stress oxidativo y resistencia a la insulina que conducen a la NAFLD (195).

La oxidación de ácidos grasos en los hepatocitos es la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS), y al parecer su formación es la principal causa por la que la simple esteatosis progresa a esteatohepatitis, ya que forman lipoperóxidos proinflamatorios a partir de los ácidos grasos acumulados en el hígado (196).

En condiciones normales, los FFA se  $\beta$ -oxidan preferencialmente en las *mitocondrias* (formando ATP, CO<sub>2</sub> y agua), y en mucho menor grado en los *peroxisomas* y *microsomos*, y las enzimas que regulan la  *$\beta$ -oxidación mitocondrial* están reguladas por el PPAR- $\alpha$ , aunque éste preferentemente induce la  *$\beta$ -oxidación extramitocondrial (peroxisómica)* y la  *$\omega$ -oxidación* (197). Cuando hay una sobrecarga de FFA y se satura la capacidad oxidativa de las mitocondrias o éstas han sufrido alteraciones ultraestructurales, se afecta la cadena respiratoria y así se generan más ROS y menos energía se conserva como ATP. Es entonces cuando se activa la  *$\beta$ -oxidación peroxisómica* y la  *$\omega$ -oxidación microsómica*, que generan una gran cantidad de ROS, y la energía producida se disipa como calor (*vide supra*), y no se conserva como ATP. Este hecho se ha confirmado en una cohorte de pacientes con NASH (198).

Existe también evidencia de un aumento de lipoperoxidación en pacientes con NASH (131,199). La *lipoperoxidación* sucede cuando los ROS reaccionan con PUFA acumulados, generándose más ROS -por lo que el daño se propaga- y malondialdehído (MDA) como producto final. La producción de ROS en el hígado graso, dada su abundancia de sustrato, es especialmente importante. Estos se originan en tres sitios intracelulares (200):

1. Retículo endoplásmico liso (microsomos): participan especialmente los complejos enzimáticos CYP 2E1 y CYP 4A .
2. Peroxisomas: la  $\beta$ -oxidación en estos organelos libera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, altamente oxidante.
3. Mitocondrias: cuando la cadena respiratoria se daña por las ROS, la  $\beta$ -oxidación cesa, no hay una oxidación completa y eficaz de los FFA a ATP, CO<sub>2</sub> y agua y, en cambio, la cadena respiratoria disipa la mayoría

de los electrones liberados: unos forman aniones *superóxido* y otros, ROS.

Recientemente se ha concluido que la disfunción mitocondrial (particularmente, la deficiencia en la cadena respiratoria) juega un papel clave en la fisiopatología de la NASH, independientemente de su causa. La  $\beta$ -oxidación mitocondrial de ácidos grasos puede tanto *aumentar* (como en la NASH relacionada con la resistencia a la insulina) como *disminuir* (como en la NASH inducida por medicamentos como la amiodarona, tamoxifeno, estavudina y zidovudina). Sin embargo, en ambas circunstancias hay un aumento en la generación de ROS por una cadena respiratoria dañada (124).

### Inducción del CYP 2E1

Aún cuando muchos estudios han concluido que el hígado graso es vulnerable al stress oxidativo, pocos estudios han hecho una descripción cuantitativa de los diferentes sistemas antioxidantes involucrados en la NASH (201). El CYP 2E1 ha demostrado tener un papel clave en la patogénesis tanto de la ASH (202) como de la NASH, sea en el hombre o en modelos animales (180, 203).

La progresión de la esteatosis hepática simple a esteatohepatitis, ambas de origen no alcohólico, sólo se ha podido explicar por el aumento del stress oxidativo. Como se comentó, al igual que durante el consumo crónico de alcohol, hay una inducción del sistema microsómico de oxidación de etanol (MEOS), y específicamente del CYP 2E1 (204). De esta manera, el CYP 2E1 no sólo es inducible por alcohol, sino también por situaciones que se asocian a la NAFLD, como la *obesidad* (205) y la *diabetes mellitus* (206) por lo que su papel patogénico en la NASH también se ha reconocido (207). La *resistencia a la insulina* aumenta aún más la  $\omega$ -oxidación mediada por el CYP 2E1 cuando hay una sobrecarga de ácidos grasos y *disfunción mitocondrial* (ej: diabetes mellitus y obesidad). Esta vía fisiológica secundaria, junto con la  $\beta$ -oxidación peroxisómica, son las que producen los ROS que contribuyen en el daño celular oxidativo del hepatocito (25). Sin embargo, se ha hipotetizado que en ausencia de *disfunción mitocondrial*, la resistencia periférica a la insulina no produce NASH, sino sólo esteatosis (87).

La concentración de CYP 2E1 no sólo aumenta en animales (205,208), sino en personas con NASH (209). Las concentraciones del CYP 2E1 están invariablemente elevadas en pacientes con NASH (198) porque los ácidos grasos (que se incrementan en la obesidad) y las cetonas (que aumentan en la diabetes) son también sustratos para el CYP 2E1 (202). No obstante la inducción de este citocromo, no se observa en todos los modelos animales (180) y, de hecho, puede disminuir la expresión de la proteína y actividad de otros citocromos (210).

### Estrés oxidativo y lipoperoxidación

La generación de ROS en un ambiente enriquecido de lípidos, a su vez, induce la lipoperoxidación, que libera derivados aldehídicos altamente reactivos como el MDA y 4-hidroxinonal, que tienen diversos efectos deletéreos en los

hepatocitos y otras células hepáticas (211). En los hepatocitos, las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y los productos de la lipoperoxidación son citotóxicos, por lo que dañan los fosfolípidos de la membrana celular y los demás organelos celulares (212).

Recientemente, se ha descrito que la serotonina, cuando se degrada por la monoamino oxidasa, es también una fuente importante de ROS en esta enfermedad, por lo que su inhibición con clorgilina disminuye el daño hepatocelular y la inflamación, aún cuando no disminuye la esteatosis (213). Asimismo, el papel de la serotonina en esta enfermedad se ha corroborado en ratones *knockout* para triptofano hidroxilasa-1 [*Tph1* (-/-)].

Cuando la producción de ROS excede la capacidad antioxidante de la célula se produce daño al DNA nuclear y mitocondrial y se deteriora aún más la cadena respiratoria, tanto directa como indirectamente, a través del daño oxidativo al genoma mitocondrial. El *estrés oxidativo* se amplifica por el *daño mitocondrial* que induce pérdida del citocromo c, que incapacita a la cadena de transporte de electrones (214) y, por ello, la mitocondria no produce ATP y se convierte, al igual que los peroxisomas y microsomas, en una generadora de ROS. Esto lleva, como consecuencia, a la generación de más ROS y se produce, entonces, un círculo vicioso. La disfunción mitocondrial puede también conducir a la apoptosis o necrosis, dependiendo del estado energético de la célula. Los ROS y los productos de lipoperoxidación también aumentan la generación de diversas citocinas (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) e inducen la expresión del ligando Fas en los hepatocitos, por lo que juegan un papel clave en la inflamación, necrosis, apoptosis paracrina (214), fibrosis e incluso en la regeneración hepática, ya que la inhiben (154).

El *estrés oxidativo* aumenta de acuerdo con el grado de esteatosis (215) y su importancia es tal en la NASH que los títulos de anticuerpos relacionados con la lipoperoxidación aumentan tres veces el riesgo de desarrollar fibrosis/cirrosis (216).

La importancia del estrés oxidativo no sólo estriba en la *generación* de daño inducido por las ROS (a su vez, relacionado con el daño mitocondrial) -por la insuficiente producción de energía en la mitocondria que no permite la recuperación de los hepatocitos- sino también porque el estado de oxidación permite una activación crónica de la I $\kappa$ K $\beta$  y el aumento del TNF- $\alpha$ , que a su vez (como se mencionó anteriormente) aumenta aún más la activación del I $\kappa$ K $\beta$ , perpetuando la *resistencia crónica a la insulina*.

El MDA es un indicador del estrés oxidativo en NASH (217). Se une a proteínas formando complejos como las proteínas haptenadas de malondialdehído-acetaldehído y es un indicador de stress oxidativo prolongado, como ocurre en la AFLD, NAFLD y aterosclerosis (218). Los efectos proinflamatorios del MDA, en teoría, podrían explicar las características histológicas de los pacientes con NASH (219). Sin embargo, parece que su concentración (prooxidante) y la de la glutatión peroxidasa (GSH Px)(antioxidante) no difiere en personas con y sin NASH, aunque también hay una *disminución* en estos pacientes en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)(antioxidante) y catalasa (antioxidante) y un

*aumento* en el estado antioxidante total y del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (201). En otros estudios, por lo contrario, se ha observado que los pacientes con NASH tienen mayores concentraciones de MDA (129,220), y también de óxido nítrico (NO)(oxidante) y glutatión (GSH)(antioxidante) aunque nuevamente una disminución de SOD (220). Todas estas discrepancias indican que deben existir otros mecanismos, además de la lipoperoxidación, que sean importantes en la patogénesis de la NASH.

El estrés oxidativo resultante y el daño hepático se exacerban con una dieta baja en hidratos de carbono y alta en grasas, incluyendo ácidos grasos insaturados, que promueven la inducción del CYP 2E1 (221). No obstante, el análisis de ácidos grasos hepáticos en obesos mórbidos indica una significativa acumulación tanto de ácidos grasos saturados como insaturados (222).

El papel de los distintos tipos de lípidos tiene cada vez mayor relevancia en la fisiopatología de muchas enfermedades. En la NAFLD, particularmente, dada la importancia del grado de acumulación de grasa y de su lipoperoxidación, el análisis del tipo de lípidos puede proporcionar hallazgos claves en su fisiopatología y tratamiento. Hay un aumento secuencial de la proporción triglicéridos/diglicéridos, en el colesterol libre y en la proporción colesterol libre/fosfatidilcolina en hígados normales, esteatosis y esteatohepatitis pero no una diferencia en el contenido de FFA (223). La fosfatidilcolina también disminuye en la esteatosis y esteatohepatitis. El LA (C18:2n-6) y ALA (C18:3n-3) no varían en los hígados con NASH, a diferencia del AA (C20:4n-6), que disminuye en las fracciones de los FFA, triglicéridos y fosfatidilcolina. Asimismo, la concentración de EPA (20:5n-3) y DHA (22:6n-3) en NASH también es menor. Por tanto, la relación  $\omega$ -6: $\omega$ -3 aumenta en la NASH.

## **Inflamación**

Durante el desarrollo de la NAFLD, hay un aumento de la actividad fagocitaria de los macrófagos en los hepatocitos. Los macrófagos liberan ROS, nitrorradicales, citocinas y prostanoïdes vasoactivos, todos ellos causantes del daño al parénquima y la respuesta vascular inflamatoria (224). En particular, las ROS y otros subproductos de la lipoperoxidación son potentes quimioatrayentes para las células inflamatorias (225) y moléculas de señalización (226) que las activan directamente a través de factores de transcripción sensibles al stress (227) (*vide infra*) como el NF- $\kappa$ B, iniciando así varias cascadas de respuestas celulares y titulares. El NF- $\kappa$ B, en especial, interviene en la inducción de citocinas proinflamatorias implicadas también en la resistencia a la insulina, como la IL-1, IL6 y TNF- $\alpha$  (139). Estas citocinas, a su vez, actúan en forma paracrina disminuyendo la sensibilidad hepática a la insulina (52). Esto, aunado a que la desintoxicación intracelular está alterada y a la inefectividad en los sistemas antioxidantes que secuestran radicales libres, favorece el daño hepático. Es por ello que el uso de antioxidantes es efectivo en este tipo de inflamación (228).

La liberación de citocinas proinflamatorias causa más disfunción mitocondrial y stress oxidativo, lo que contribuye al fallo hepático y promueve la inflamación, fibrosis y necrosis asociada a la NASH (106). La obesidad, en sí, es un estado

inflamatorio de bajo grado y, al igual que la diabetes mellitus, son causa de un aumento crónico en la producción de TNF- $\alpha$  hepático que provoca acumulación de células inflamatorias en el parénquima hepático.

La patogénesis de la NASH es compleja y aún no se ha terminado de dilucidar. En el hombre, el MDA y la IL-8 pueden estar relacionados directamente con la NAFLD, mientras que el papel del TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 y NO parece no ser importante (217), pese al papel que tiene el TNF- $\alpha$  en la inducción y perpetuación de la resistencia a la insulina y en la activación inflamatoria y de células estelares en el hígado (229). Sin embargo, se sabe que la NASH se acompaña de un aumento en el TNF sérico y mRNA del TNF hepático (230,231). La obesidad, esteatosis y diabetes asociadas a NAFLD, en cambio, sólo aumentan su señalización (228).

La participación del TNF- $\alpha$  como mediador del daño hepático por NAFLD es motivo de controversia, aunque hay estudios tanto en el hombre (230) como en modelos animales que demuestran su *elevación* (81). Esta citocina es clave en el desarrollo del síndrome metabólico y se asocia a la resistencia a la insulina, obesidad, hipertrigliceridemia e intolerancia a la glucosa (232). El TNF- $\alpha$ , además, es una citocina proinflamatoria especialmente importante en el desarrollo de diferentes formas de daño hepático, incluyendo la esteatohepatitis (233, 234). De hecho, hay una *mayor* expresión de TNF- $\alpha$  y del receptor tipo 1 del TNF- $\alpha$  en pacientes con esteatohepatitis que con esteatosis únicamente (230). Otra evidencia a favor de la participación del TNF- $\alpha$  en la patogénesis de la NAFLD es que el uso de agentes que aumentan la sensibilidad a la insulina y que bloquean la señalización del TNF- $\alpha$  en los hepatocitos revierten la NAFLD (en ratones *ob/ob*), mientras que su inducción promueve la progresión de esteatosis a esteatohepatitis. El TNF- $\alpha$  puede ejercer efectos fibrogénicos porque induce la activación de las células estelares hepáticas en forma paracrina (235).

En otros estudios se menciona que el TNF- $\alpha$  no es necesario para el desarrollo de esteatohepatitis (5), como se comprobó en un modelo de ratones C57BL/6 con dieta deficiente en colina y metionina (*vide infra*) e inducción con lipopolisacárido, ya que no se encontró diferencia en el daño histológico y los marcadores de lipoperoxidación entre estos ratones y los *knockout* para esta citocina (236). De esta forma, es posible inducir NAFLD por mecanismos que no dependen del TNF- $\alpha$ , aunque muchas veces el TNF- $\alpha$  se eleva (5).

Por último, y para rebatir el papel del TNF- $\alpha$  en esta enfermedad, un estudio que involucró ratones *knockout* para ambos receptores del TNF- $\alpha$  (TNFR1 y TNFR2) alimentados con dieta deficiente en colina y metionina demostró, en los ratones sanos, incluso, una *disminución* de TNF- $\alpha$ , VCAM-1, ICAM-1 y *aumento* del mRNA de la TIMP-1 (factor antifibrogénico) tanto en hígado como en células estelares hepáticas (237); se observó, además, que en cultivos celulares el TNF- $\alpha$  aumentó la expresión del mRNA de la TIMP-1 en las células estelares activadas y suprimió la inducción de apoptosis en dichas células. Todos estos hallazgos no apoyan la participación del TNF- $\alpha$  como inductor del daño hepático en la NAFLD.

Existen actualmente, por tanto, más datos que apoyan un papel del TNF- $\alpha$  y de la activación del I $\kappa$ K $\beta$  en la patogénesis de la NAFLD (154).

La IL-6 también es una citocina proinflamatoria secretada por el tejido adiposo subcutáneo que puede intervenir en la patogénesis de la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad (238), y puede también reducir la actividad de la LPL del tejido adiposo, lo que conlleva a una menor hidrólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y, con ello, contribuye a la resistencia a la insulina.

La inflamación de la esteatohepatitis alcohólica, en cambio, está mediada (además de por el TNF- $\alpha$  y la IL-6) también por la IL-1; la IL-10 tiene un papel protector en este daño (163).

### **Fibrogénesis**

La fibrogénesis es el resultado final de la interacción de una serie de complejos mecanismos mediados por hormonas y citocinas cuyo resultado final es la sustitución del parénquima hepático por tejido fibroso. Las células estelares hepáticas que almacenan vitamina A, pierden su contenido en esta vitamina al ser estimuladas por *adipocitocinas* como la leptina y varias citocinas *proinflamatorias* como el TNF- $\alpha$  y la IL-6 (88) y *fibrogénicas* como el TGF- $\beta$  (152,239), por lo que sufren cambios fenotípicos que las convierten en células *miofibroblásticas* que, finalmente, conducirán a la fibrosis hepática (239).

La formación de ROS y de productos de lipoperoxidación produce *apoptosis* o *necrosis* de los adipocitos y activación de las células estelares hepáticas, un prerrequisito para el desarrollo de fibrosis (104). Así, por ejemplo, el 4-hidroxinonenal incrementa la expresión del TGF- $\beta$ 1, promoviendo así la fibrogénesis hepática (238).

#### **1.2.5. Cuadro clínico y diagnóstico.**

Muchos pacientes (45-50%) son asintomáticos, pero sólo un 10%, especialmente los niños (240), pueden presentar dolor en el hipocondrio derecho, dolor abdominal, astenia y malestar (241). Lo típico es que el paciente con NAFLD padezca otra enfermedad y se detecten incidentemente la hepatomegalia o alteraciones en la función hepática (242). Debe recordarse que muchas veces la cirrosis criptogénica es la etapa final de la NAFLD en algunos pacientes y puede presentarse con las múltiples complicaciones de la cirrosis avanzada de cualquier otra etiología (114).

La NAFLD es una enfermedad crónica muy frecuentemente detectada en pacientes con alteraciones en la función hepática. Muchos pacientes son mujeres, obesas con diabetes mellitus tipo 2 y/o hiperlipidemia con resistencia a la insulina (114). Sin embargo, puede presentarse también en hombres y mujeres de peso normal sin otra patología asociada que la relacionada con cirugía derivativa (no bariátrica), tratamiento con ciertos medicamentos (*vide supra*), etc...

La NASH se define como la presencia de hallazgos histológicos característicos con una elevación persistente de transaminasas, sin historia previa de consumo de alcohol significativo (menos de 30 g/semana) o de enfermedad hepática previa (83).

Debe sospecharse esta enfermedad en pacientes con sobrepeso y elevación leve de lípidos séricos y en diabéticos bajo tratamiento médico, o bien en pacientes que presenten uno o más de los componentes del síndrome metabólico (243):

- Obesidad central (circunferencia de cintura  $\geq$  100 cm en hombres y  $\geq$  85 cm en mujeres).
- Hipertrigliceridemia (triglicéridos en ayuno  $>$  150 mg/dl).
- HDL disminuido ( $<$  40 mg/dl en hombres y  $<$  50 mg/dl en mujeres)
- Elevada presión sanguínea ( $>$ 130/85 mm Hg).
- Resistencia a la insulina (glucemia en ayuno  $\geq$  100 mg/dl).

La resistencia a la insulina es un predictor importante de NAFLD, aún en ausencia de intolerancia a la glucosa (118, 244). Idealmente, debería medirse mediante un *clamp* euglucémico de insulina, aunque la aplicación de la fórmula del HOMA (Homeostasis Model Assessment) es una medida subrogada confiable:

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulina sérica en ayuno} \times \text{glucosa sérica en ayuno}}{22.5}$$

en donde la insulina sérica se expresa en  $\mu\text{U/ml}$  y la glucosa sérica en ayuno en  $\text{mmol/L}$ .

Los pacientes se clasifican como “resistentes a la insulina” con un valor de HOMA por encima de 1.64 (245).

Este diagnóstico debe descartar otras enfermedades hepáticas. Sin embargo, algunas hepatopatías pueden estar asociadas con la NAFLD y esto influir en su pronóstico. Por esta razón, la positividad para el virus de hepatitis C y la hemocromatosis no excluyen el diagnóstico de NAFLD. La esteatosis también se presenta en la enfermedad de Wilson, hepatitis autoinmune, galactosemia y enfermedad hepática por alcohol. Por ello, deben descartarse enfermedades hepáticas crónicas por virus de hepatitis B o C, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hemocromatosis, porfiria y aquéllas de origen tóxico (114).

El hallazgo *bioquímico* más frecuente es la elevación de transaminasas de 2 a 5 veces su valor normal, y ocasionalmente, de 10 a 15 veces, aunque su valor puede ser normal. A diferencia de la ASH, la relación AST/ALT es menor a 1 en el 65-90% de los pacientes con NASH, y una relación mayor a 1 sugiere NASH avanzada (242). La *ultrasonografía (ecografía)* aporta la imagen de un hígado brillante pero no puede establecer la presencia de fibrosis. La *tomografía computada* y la *resonancia magnética nuclear* dan información de la

acumulación de grasa en el hígado, pero tampoco diferencia entre la NASH y la NAFLD que no progresa. El estándar de oro para el diagnóstico y estadiaje de la NAFLD es la *biopsia hepática*. La poca correlación entre los hallazgos clínicos, bioquímicos y de pruebas de imagen con los histopatológicos impide que se pueda prescindir de la biopsia para diagnosticar con certeza la NAFLD. Es siempre indispensable descartar el consumo excesivo de alcohol.

Algunas asociaciones diagnósticas interesantes desde el punto de vista patogénico son las elevaciones de:

- TNF- $\alpha$  plasmático (231) y hepático (230) (en NASH).
- Glucemia, insulinemia e IL-6 y factor de crecimiento insulínico (IGF-1) en sangre (factores pronósticos independientes de esteatosis hepática y NASH en obesos mórbidos) (246). A pesar de ello, el TNF- $\alpha$  no se relaciona con ellos.
- Productos de la lipoperoxidación (en NASH) (247). Sin embargo, el MDA, la vitamina A y el  $\alpha$ -tocoferol no se asocian con la severidad histopatológica (129), aunque hay hallazgos discrepantes sobre esto. La vitamina A en suero es un indicador de progresión de la enfermedad hepática en la NASH. Los pacientes con esteatosis y NASH presentan un aumento en la vitamina A sérica y una disminución de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (129, 248), mientras que en la hepatitis viral C y cirrosis la vitamina A se encuentra disminuida (248). El aumento en la vitamina A puede ser, entonces, un indicador del aumento en la carga lipídica de los hepatocitos y activación de las células estelares hepáticas, mientras que la disminución de  $\alpha$ -tocoferol puede estar relacionado con un aumento en el stress oxidativo.

#### **1.2.6. Historia natural: indicadores de progresión, complicaciones y pronóstico. Implicaciones clínicas.**

Algunos autores sostienen que la NASH progresa a cirrosis menos frecuentemente que la hepatitis alcohólica (249); sin embargo, falta evidencia que permita afirmarlo. La información sobre la historia natural de la NAFLD es escasa, pero puede progresar consecutivamente de esteatosis a esteatohepatitis con fibrosis y posteriormente a cirrosis. Aproximadamente el 25% de los pacientes con NAFLD progresan a NASH en 10 años, y 12% de ellos fallecen a causa de la enfermedad hepática (242). Existen, sin embargo, otros estudios que indican una escasa progresión.

Mientras que la elevación de enzimas hepáticas no es sensible ni fiable para confirmar el diagnóstico o el grado de fibrosis, una edad mayor a 40 años, un índice de masa corporal mayor a 40 Kg/m<sup>2</sup>, una relación AST/ALT > 1 y la presencia de, al menos, dos causas de NAFLD (ej: diabetes o hiperlipidemia) implican un mayor riesgo de progresión (109, 250). No existen pruebas específicas o sensibles no invasivas y confiables y por eso la detección de NASH (251) es limitada. Así, los criterios de selección para biopsiar (200) son:

- Aminotransferasas elevadas.
- Hígado graso en ultrasonografía.
- Exclusión de otras causas de hepatopatía.
- Edad mayor de 40 años.

La progresión de esteatosis a esteatohepatitis depende de muchos factores, entre ellos la resistencia a la insulina (252), la activación de la señalización proinflamatoria (inducida por citocinas producidas sistémica o localmente), el desarrollo de resistencia a la insulina (253), el consumo crónico de alcohol y otros factores.

Las causas de muerte incluyen la falla hepática, complicaciones de la cirrosis (hemorragia por varices esofagogástricas) y hepatocarcinoma (116). Existe una estrecha relación entre la diabetes, obesidad y resistencia a la insulina en la patogénesis del hepatocarcinoma (200). De hecho, el riesgo de desarrollar NASH y HCC es el doble en diabéticos que en población general (254). Por otra parte, el hepatocarcinoma no es poco común en pacientes con cirrosis criptogénica probablemente relacionada a NASH (255).

Una de las implicaciones más importantes ahora que el transplante hepático es un procedimiento habitual en muchos centros hospitalarios es que la NASH recurre frecuentemente en los pacientes transplantados (256). Por otra parte, el hecho de transplantar un hígado con más del 60% de esteatosis, produce disfunción primaria del injerto (114).

### **1.2.7. Tratamiento.**

Debido a heterogeneidad de la fisiopatología de la NAFLD, existen varias alternativas de tratamiento dirigidas a las enfermedades que predisponen a esta enfermedad (obesidad, diabetes mellitus, dislipidemia) y a contrarrestar los mecanismos que operan (200). Muy resumidamente, se exponen algunas alternativas de tratamiento cuya eficacia se ha comprobado en el hombre y constituyen, por ello, la base del tratamiento actual de la NAFLD:

a) *Dieta y ejercicio*: tratamientos bien establecidos para el control de la obesidad y diabetes mellitus tipo II, son también una opción terapéutica para la NAFLD (257). La dieta razonable para perder peso debe aportar 25 Kcal/Kg al día. No obstante, el grado de evidencia sobre su eficacia es aún bajo (116, 258). Un estudio reciente no controlado sugiere que este tratamiento podría mejorar la histología hepática en un número sustancial de pacientes con NASH (259). La efectividad de este enfoque también se ha comprobado en ratas alimentadas con una dieta hiperlipidémica (260), y aunque disminuye el grado de obesidad y esteatosis hepática, no afecta las alteraciones de lípidos en suero ni los cambios inflamatorios en hígado.

La pérdida rápida y extrema de peso acelera la progresión de la NAFLD. En un estudio, cuatro de cinco pacientes obesos que perdieron entre 14 y 30 Kg en un mes desarrollaron fibrosis (261), y en otro estudio con una dieta muy baja en aporte energético (388 Kcal/día), el 20% de los pacientes presentó inflamación portal o fibrosis (262). Esto puede deberse al gran aumento de FFA, la falta de aminoácidos indispensables (260) y la depleción de antioxidantes.

- b) *Hipoglucemiantes*: mejoran la resistencia a la insulina e inhiben la actividad del TNF- $\alpha$ , normalizando las enzimas hepáticas y la histología hepática. Los más habituales son:  
*Metformina*: disminuye la producción hepática de glucosa y su absorción intestinal e incrementa su utilización. Revierte la hepatomegalia, esteatosis y hace que se redistribuyan los lípidos del hígado a los depósitos de tejido adiposo (179). Activa la AMPK en los hepatocitos, por lo que la actividad de la ACC disminuye y, entonces, se induce la oxidación de ácidos grasos y, por lo tanto, la expresión de enzimas lipogénicas mediada por la SREBP-1c se suprime.  
*Agonistas del PPAR- $\gamma$* : como la pioglitazona y, recientemente, la rosiglitazona.  
 Los diferentes tipos de hipoglucemiantes, además de mejorar obviamente la resistencia a la insulina, inhiben la actividad del TNF- $\alpha$  (178), normalizando las enzimas hepáticas y mejorando la histología en estos pacientes.
- c) *Antilipemiantes*: los más empleados son los fibratos como el bezafibrato y el gemfibrozil (agonistas del *PPAR- $\alpha$* )(*vide infra*). Teóricamente, la inhibición de la *SREBP1-c* podría también ser efectiva.
- d) *Antioxidantes*: los más investigados son la betaína y la S-adenosil metionina, y escasamente la vitamina E (263, 264).
- e) *Citoprotectores*: principalmente ácido ursodesoxicólico y la N-acetil-cisteína.
- f) *Antibióticos*: en pacientes postderivación yeyuno-ileal, para disminuir el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (265).

### 1.2.7.1. Agonistas de los PPARs e inhibidores de la SREBP-1c.

El uso clínico de los PPARs es un tema que ha generado mucho interés ya que regulan el metabolismo de lípidos, por lo que son una terapia potencial para la hiperlipidemia, hígado graso, resistencia a la insulina, obesidad y síndrome metabólico. Los agonistas PPAR- $\alpha$  y  $\gamma$  reducen los lípidos en sangre y mejoran la sensibilidad a la insulina; sin embargo, los agonistas *PPAR- $\alpha$*  disminuyen el consumo de alimentos y el contenido de grasa corporal, mientras que los agonistas *PPAR- $\gamma$*  promueven el consumo de alimentos, la captación de lípidos por parte del tejido adiposo y la adiposidad (266).

Existen teóricamente algunas discrepancias en cuanto al beneficio real de los agonistas del PPAR- $\alpha$ , ya que este factor de transcripción regula también la transcripción de algunos genes que codifican para enzimas involucradas en la  *$\omega$ -oxidación microsómica* (en especial, del CYP 4A) y en la  *$\beta$ -oxidación peroxisómica* (200)(debe recordarse que es un proliferador peroxisómico), y esta *activación* se da cuando la  $\beta$ -oxidación mitocondrial está alterada o saturada (*vide supra*). La proliferación peroxisómica producida aumenta la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que activa la peroxidación de lípidos y hace que la esteatosis evolucione a NASH (267). El PPAR- $\alpha$ , sin embargo, reprime también las vías del NF- $\kappa$ B (por homología de su subunidad p65 y por inducción de la

expresión del I $\kappa$ B, el principal inhibidor del NF- $\kappa$ B) y AP-1. De esta forma, el *PPAR- $\alpha$*  reprime la expresión de *mediadores inflamatorios* inducidos por estímulos inflamatorios extracelulares como el VCAM-1, ICAM-1 en las células endoteliales y la IL-2 y TNF- $\alpha$  (63).

Existen diversos enfoques farmacológicos de eficacia no probada o actualmente en desarrollo, entre los que se incluyen el *orlistat* (un inhibidor de la lipasa pancreática) y los inhibidores de la SREBP-1c (53), ya que éste controla la síntesis y depósito de triglicéridos en hígado y representa un blanco de acción terapéutica prometedor para la esteatosis hepática.

Las *estatinas*, como la simvastatina, disminuyen la actividad de la HMGCoA y, por tanto, la síntesis de colesterol. Tanto los *fibratos* como las *estatinas* disminuyen la hipertrigliceridemia, pero sólo las *estatinas* disminuyen la hipercolesterolemia significativamente. Fisiológicamente, cuando la concentración de colesterol intracelular baja, se activa la SREBP-1c, y es probable que la SREBP controle la expresión de la LPL. Más que disminuir la producción de VLDL hepática (que podría ser más bien contraproducente para el tratamiento de la NAFLD), la simvastatina aumenta la lipólisis de los triglicéridos hepáticos, lo que contrasta con la acción de los agonistas del *PPAR- $\alpha$*  como los fibratos, que disminuyen la secreción hepática de VLDL. La simvastatina, por tanto, parece tener más un efecto de agonista *PPAR- $\gamma$*  (tiazolidinedionas) que de *PPAR- $\alpha$*  (fibratos)(268).

Recientemente se ha enfatizado la importancia del daño mitocondrial en la NAFLD y por ello ahora existe el reto de encontrar tratamientos que mejoren directa o indirectamente la disfunción mitocondrial (124).

Quizá el aspecto más importante en el tratamiento de la NAFLD es que éste debe confeccionarse dependiendo de los factores predisponentes, y como ejemplos se podrían mencionar la prescripción de dieta e hipoglucemiantes en diabéticos, la administración de leptina exógena en pacientes con lipodistrofia generalizada congénita, el desarrollar un suplemento de antioxidantes en pacientes desnutridos, etc.(154).

### **1.3. Modelos animales de enfermedad por hígado graso no alcohólico.**

#### **1.3.1. Importancia de los modelos animales.**

La investigación médica frecuentemente está limitada por la falta de modelos muestras biológicas sanas y patológicas, por lo que los modelos animales son una herramienta esencial para los estudios de fisiopatología (269). En el caso de la NAFLD, los modelos animales han ayudado a comprender los mecanismos subyacentes en el incremento de la susceptibilidad del hígado esteatótico al daño hepático (87). Sin embargo, la gran variedad de modelos experimentales de estatois es confusa y complica la comparación e interpretación de los resultados. Un modelo animal debe, idealmente, no sólo reproducir la expresión patológica de la enfermedad humana, sino también remedar el contexto dentro del cual la enfermedad se desarrolla y progresa.

Existen muchos modelos animales de NAFLD. La mayoría desarrollan sólo *esteatosis*, y muy pocos progresan a *esteatohepatitis* (154).

Debido a que el desarrollo de la NAFLD está determinado por la interacción de factores genéticos y ambientales (183), es difícil estudiarla en humanos dada la heterogeneidad genética en la población, la epistasia y las interacciones genético-ambientales. No obstante, también la esteatohepatitis experimental ofrece su complejidad, ya es una enfermedad poligénica dada por genes que determinan la producción de ALT, peso hepático y fibrosis hepática (270) e incluso involucra el estudio de aspectos básicos muy detallados. Como ejemplo se pueden mencionar las proteínas mitocondriales que regulan la *apoptosis* (Bax la promueve y Bcl-2 Bcl-xL la inhiben) y *necrosis* en estos modelos (271).

El ratón de laboratorio *Mus musculus* se ha adoptado universalmente como el principal modelo en la investigación de este campo debido a que comparte muchas similitudes fisiológicas, anatómicas y metabólicas con el hombre (64). Las muy estandarizadas y bien caracterizadas cepas procreadas en consanguinidad permiten eliminar variables confundentes como la heterogeneidad genética, género, variación dietética o ambiental y edad (272).

Aún con los recientes avances en la contribución genética y patogénesis de las enfermedades asociadas a la NAFLD como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo II, el conocimiento de la patogénesis de la esteatosis y esteatohepatitis continúa siendo incompleto (154). El valor del uso de modelos animales es incuestionable y, de hecho, el trabajo realizado en un modelo animal llevó a Day y James a proponer la teoría de los dos “hits”, que continúa fundamentando la investigación en el campo de la NAFLD.

### **1.3.2. Características de los modelos y aplicaciones.**

#### **1.3.2.1. Clasificación de los modelos murinos.**

Existen numerosos modelos diferentes de roedores que exhiben las características de la esteatosis hepática (64). Las características de la *esteatohepatitis* verdadera que deben incluir la *degeneración balonoide* además del simple cambio de lípidos y un *infiltrado inflamatorio* son menos frecuentes (273). No existe un modelo que exhiba el fenotipo completo de la NAFLD como se muestra en la práctica clínica, y una gran mayoría de ellos dista mucho de asemejarse a la enfermedad humana excepto en la apariencia histológica general. Estas inconsistencias y la falta de un modelo de esteatohepatitis progresivamente fibrosante han limitado la investigación en este campo.

Los modelos de investigación de NAFLD pueden dividirse en dos grandes categorías:

- a) Los causados *espontáneamente* o por una *mutación genética inducida*. Generalmente son modelos de obesidad por mutaciones *null* de genes que codifican para la leptina, receptor de leptina o *agouti*; o con alteraciones en el metabolismo de lípidos por ablación del PPAR- $\alpha$ , acil-CoA oxidasa o por

sobreexpresión de la SREBP-1 y PPAR- $\gamma$  (274). También pueden producirse ratones *knockout* (KO) para apolipoproteínas, como la apolipoproteína E, que es un ligando de los receptores que depuran los quilomicrones y los remanentes de VLDL. Así, los ratones KO para Apo E (E-KO) desarrollan NASH al ser alimentados con una dieta con alto contenido de grasa (sobre todo, aceite de palma, rico en AGS) y colesterol (275). Todos estos modelos, sin embargo, no reflejan el escenario etiológico que se encuentra en forma natural en los pacientes con NAFLD.

- b) Los que adquieren el fenotipo de NAFLD por dieta o manipulación farmacológica. Los que emplean una dieta deficiente en colina y metionina (DCM), por ejemplo, son modelos muy reproducibles que reflejan una patología progresiva; sin embargo, la deficiencia de factores lipotrópicos y fosfatidilcolina producida por esta maniobra no semeja la patología humana.

La mayoría de la investigación publicada ha empleado los ratones *deficientes* (*ob/ob*) o *resistentes* (*db/db*) a la *leptina* y el modelo inducido por dieta DCM (78). Todos ellos, y los ratones lipoatróficos, desarrollan *esteatosis* espontáneamente pero su progresión a *esteatohepatitis* y *cirrosis* es variable y, de hecho, mucho más difícil de lograr (275), por lo que en ocasiones se requiere un estímulo extra (alcohol, endotoxinas) que estimule el CYP 2E1 (276) y, por ésta u otras vías, desencadenar una respuesta inflamatoria, excepción hecha del ratón E-KO, que desarrolla espontáneamente esteatohepatitis en 10 semanas. Asimismo, tampoco existe ningún modelo animal satisfactorio de esteatohepatitis con fibrosis atribuido a la resistencia a la insulina que no requiera la combinación de otro factor para el desarrollo de stress oxidativo y daño hepatocelular (224). Por todo ello, estos modelos difieren significativamente del fenotipo humano en una serie de maneras patogénicamente importantes que ha llevado a cuestionar si las observaciones realizadas usando muchos de estos modelos son realmente aplicables al hombre.

Los principales modelos animales para el estudio de la NAFLD son:

1. Modelo de deficiencia de leptina determinada genéticamente (ratón *ob/ob*):

La deficiencia o resistencia a la *leptina* produce *obesidad*, *resistencia a la insulina*, *dislipidemia* y *NAFLD*.

Los ratones deficientes en leptina *ob/ob* son un modelo de obesidad con lipogénesis hepática incrementada (56). El ratón *ob/ob* es deficiente en leptina porque una mutación en el gen *ob*, que codifica para la síntesis de leptina, previene su síntesis (277); es, por tanto, hiperfágico, inactivo, obeso, resistente a la insulina e *hiperinsulinémico* (gravemente diabético), con la consecuente *hiperglucemia* e *hiperlipidemia* (278).

El tejido adiposo secreta leptina y, de hecho, es su principal fuente. En los ratones con *lipoatrofia* (también deficientes en leptina), los adipocitos se destruyen o son inexistentes, por lo que los ratones exhiben muchas de las características de los ratones *ob/ob* excepto, por supuesto, la obesidad: son ratones fenotípicamente delgados): se produce una importante *resistencia a la*

*insulina, hiperinsulinemia y esteatosis hepática*, e incluso NASH. Este modelo, en particular, es valioso porque permite afirmar que la obesidad no es una condición necesaria para el desarrollo de NAFLD o resistencia a la insulina, sino que la patogénesis de ambas está relacionada con la deficiencia de *leptina* (154).

La mutación del gen *ob* no es común en el hombre obeso con NASH y, como se mencionó anteriormente, la leptinemia correlaciona muy pobremente con el desarrollo de NASH (156). El acúmulo de tejido adiposo y el aumento en la expresión del TNF- $\alpha$  promueven la lipólisis del tejido adiposo, liberándose LCFA. Estos ácidos grasos llegan al hígado. Paralelamente, se activa la SREBP-1c, por lo que se promueve la actividad de la ACC y FAS y, por tanto, la síntesis de lípidos *de novo* (274). De esta forma se produce obesidad y esteatosis. La evidencia con respecto a la oxidación de ácidos grasos en este ratón es motivo de debate, aunque en general se cree que hay muy poco –o ningún- incremento en la  $\beta$ -oxidación, nunca suficiente para manejar la gran carga de ácidos grasos, por lo que se activa la  $\omega$ -oxidación microsómica alternativamente. A diferencia del hombre, el ratón *ob/ob* no progresa espontáneamente de esteatosis a esteatohepatitis y requiere un segundo “hit” o impacto, que puede ser alcohol, lipopolisacárido o isquemia-reperfusión (64,154). Existe, sin embargo, evidencia de que los ratones *ob/ob*, con la edad, pueden desarrollar esteatohepatitis leve, que se potencia si se alimentan con una dieta alta en PUFA (154). El aporte más importante de este modelo al estudio de la NAFLD es que un hígado graso es más susceptible o vulnerable al estrés oxidativo.

La expresión de ChREBP está elevada en los ratones *ob/ob* y su inhibición disminuye importantemente la esteatosis hepática y, consecuentemente, mejora la señalización hepática de la insulina, con lo que se comprueba su importancia en esta alteración. Igualmente, en estos ratones la expresión de la SREBP-1c es mayor, por lo que cualquier maniobra que la disminuya mejora notablemente la esteatosis hepática (53).

El aumento crónico en la producción de TNF- $\alpha$  hepático provoca acumulación de células inflamatorias en el parénquima hepático, lo que es especialmente nocivo para los ratones *ob/ob* que tienen *deficiencia de leptina*, ya que ésta se requiere para la maduración y función del sistema inmunológico (154).

La *deficiencia de leptina suprime la respuesta inmunitaria* innata (mediada por monocitos y macrófagos) y adquirida (mediada por linfocitos T). La depleción hepática de linfocitos T NK, entonces, favorece una polarización linfocitaria *antifibrótica*: si se considera que el TGF- $\beta$  es el estimulante más potente de la *fibrogénesis*, y que la *leptina* es necesaria para la liberación de TNF- $\alpha$  y la activación de TNF- $\alpha$ , estos ratones no exhibirán, por tanto, fibrosis. La deficiencia de leptina, entonces, podría teóricamente proteger del desarrollo de cirrosis después de la exposición a hepatotóxicos (212,214). Si esto se comprueba, al menos un factor (deficiencia de leptina) podría limitar la progresión de NAFLD “temprana” a cirrosis. Este hecho podría, entonces, explicar por qué muchos modelos animales con resistencia a la insulina y NAFLD no desarrollan cirrosis franca, y también por qué la resistencia a la

insulina y la NAFLD son extremadamente comunes, mientras que la cirrosis es relativamente poco común en personas con estas condiciones (230).

2. Modelo de resistencia a la leptina determinada genéticamente (ratones *db/db*).

Fenotípicamente, son ratones *diabéticos y obesos* como los ratones *ob/ob* (279). Los ratones *db/db* y las ratas *fa/fa* *presentan concentraciones normales o elevadas de leptina* pero son *resistentes* a sus efectos.

Los ratones *db/db* (*resistencia a la insulina* genética y *tendencia a obesidad*) constituyen un modelo para la progresión de la NAFLD a NASH relacionada con la obesidad (280). Desarrollan espontáneamente *obesidad, diabetes tipo II* grave e *hígado graso* como resultado de un defecto funcional en el receptor largo de la leptina, que juega un papel clave en la regulación del consumo de alimentos, sensibilidad a la insulina y control de peso corporal.

3. Modelo de aumento de LCFA circulantes determinado genéticamente.

La entrada de ácidos grasos al hígado por encima de los requerimientos oxidativos puede inducir esteatosis, independientemente de la masa de tejido adiposo. La proteína transmembrana CD36 (translocasa de ácidos grasos) es un transportador de ácidos grasos importante que se expresa en tejidos periféricos, incluyendo el músculo y tejido adiposo. Los ratones CD36 *null* exhiben, por este deficiente almacenamiento de ácidos grasos, elevadas concentraciones de LCFA y un aumento de triglicéridos hepáticos y resistencia hepática a la insulina

4. Modelos de aumento en la captación de LCFA hepáticos y en la lipogénesis *de novo* adquiridos (sobrealimentación).

El aumento en el aporte dietético de grasa e hidratos de carbono al hígado puede promover la esteatosis a través del incremento en la captación de lípidos por el hígado o síntesis *de novo*. Las diferencias entre las características estudiadas de la obesidad y NAFLD dependen tanto de las cepas estudiadas como de la formulación de la dieta; sin embargo, la mayoría de los estudios se centran más en los efectos sobre la sensibilidad a la insulina, tolerancia a la glucosa y obesidad que en el hígado graso; no por ello se puede olvidar que existe una serie de alteraciones moleculares y fisiológicas en la resistencia a la insulina que dan como resultado la acumulación de triglicéridos en hígado. La SREBP-1c, elevada en la hiperinsulinemia, determina la resistencia a la insulina del hígado graso. Su elevación incrementa la expresión genética *lipogénica* y favorece la síntesis de ácidos grasos, acelerando la acumulación de triglicéridos (55).

Los ratones *C57BL/6* son útiles en el estudio del síndrome metabólico (281). Con la edad, estos ratones están genéticamente predispuestos a la *obesidad, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa*, independientemente de su dieta. Este fenotipo se exacerba:

- Cuando la dieta contiene 55% de *grasa* y se administra por 6 meses: hay un aumento en los genes de los reguladores lipogénicos SREBP-1c, SREBP-2 y de la SCD-1. Cuando se sobrealimenta por sonda esta misma dieta también aumenta el PPAR- $\gamma$  y se reduce la expresión del PPAR- $\alpha$  (81,274).
- Cuando la dieta contiene 65% de hidratos de carbono (como *sacarosa*) por 8 semanas: provoca *obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis macrovesicular* (282).

Debe recordarse que, al igual que en la obesidad y diabetes mellitus tipo II humana, los ratones *ob/ob*, *db/db* y aquéllos en los que se induce obesidad por alimentación desarrollan esteatosis hepática, pero raramente progresión a fibrosis, esto debido a que requieren un segundo “hit” o impacto que induzca stress oxidativo suficiente para incitar la infiltración de células inflamatorias en hígado y la activación de células estelares (199).

#### *Efectos de la sobrealimentación y composición de la dieta*

Muchos estudios han demostrado que las ratas normales se vuelven obesas y desarrollan esteatosis hepática cuando se les administra una dieta rica en grasa *ad libitum* (283, 284). El aumento de lípidos en hígado produce *resistencia hepática y sistémica a la insulina*. La *resistencia a la insulina* causa *esteatosis*, y a su vez la *esteatosis* provoca *resistencia a la insulina* (5).

La obesidad inducida por una *dieta rica en grasa* incrementa la *síntesis hepática de lípidos* debido a que se acumula *malonil-CoA*, intermediario metabólico que inhibe la  $\beta$ -oxidación (5). Al utilizar malonil-CoA descarboxilasa (enzima antagónica de la lipogénesis) disminuye la síntesis de ácidos grasos en hígado y aumenta la oxidación de éstos en el hígado. Con ello, desaparece la esteatosis y mejora la sensibilidad del músculo a la insulina.

La alimentación rica en grasa también *induce el CYP 2E1 e inhibe el PPAR- $\alpha$*  (81). Lieber y cols. administraron una dieta de estas características (71% de la energía como lípidos, 11% como hidratos de carbono y 18% como proteínas) a ratas *Sprague Dawley* (285), y es interesante señalar que no se requirió ningún estímulo tipo “segundo impacto” ya que, a las tres semanas, estas ratas presentaron *estrés oxidativo, inflamación, aumento de TNF- $\alpha$  y procolágeno* y fibrosis. Esta emulsión rica en grasa, como era de esperar, también produjo obesidad, hipertransaminasemia, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina (periférica e intrahepática); aumento del TNF- $\alpha$ , colesterol, triglicéridos, MDA, SOD; disminución de colesterol-HDL, adiponectina y expresión de PPAR- $\alpha$  en el tejido adiposo visceral (52,81). De esta forma, se consiguió un modelo que se asemeja *morfológica, biológica y clínicamente* a la NAFLD humana.

Otros estudios, en cambio, mencionan la dificultad de inducir obesidad en ratas y ratones con una dieta rica en grasa (286). Debido a la naturaleza autolimitada de la alimentación *ad libitum*, las ratas que consumen una dieta rica en grasa comen menos que las ratas con alimentación normal, por lo que entonces debe utilizarse una técnica de infusión intragástrica (81), aunque ello requiere

entrenamiento (cirugía), equipo especializado (bombas de infusión) y la habilidad de colocar una sonda de alimentación.

En cualquier caso, todos los ratones sobrealimentados desarrollan síndrome metabólico y esteatosis, pero sólo unos cuantos desarrollan esteatohepatitis, reproduciendo el escenario que recuerda a la NAFLD humana (107). Un modelo prometedor es el ratón *foz/foz*, que desarrolla obesidad, síndrome metabólico y esteatosis con dieta normal pero que progresa a esteatohepatitis cuando ingiere una dieta alta en grasas saturadas (287). Este modelo refleja también el NAFLD humano ya que hay una disminución en la adiponectina sérica en ratones con esteatosis, y una disminución aún mayor en ratones que ya desarrollaron esteatohepatitis. No obstante, el estrés oxidativo no parece estar relacionado con el desarrollo o progresión de la esteatohepatitis ni en este modelo ni en el de sobrealimentación por sonda gástrica (274).

#### 5. Modelos de lipogénesis hepática genéticamente determinada.

Como se mencionó anteriormente, tanto la hiperglucemia como la hiperinsulinemia promueven la esteatosis hepática a través de la regulación de factores de transcripción. La sobreexpresión dirigida del factor de transcripción *SREBP-1* (controlado por insulina) promueve la lipogénesis hepática y, por tanto, la esteatosis. Se han descrito dos de estos modelos de ratones no obesos transgénicos (55,288). En cambio, la alteración del factor de transcripción *ChREBP* disminuye la lipogénesis en un 50% (289). Por otra parte, la delección del *PPAR-γ* reduce la esteatosis.

#### 6. Modelos de reducción en la $\beta$ -oxidación genéticamente determinada.

Se han descrito mutaciones genéticas que producen una  $\beta$ -oxidación defectuosa y que se asocian con esteatosis (64). Estas mutaciones afectan factores de transcripción claves en la regulación del metabolismo lipídico, la importación de LCFA a la mitocondria y la actividad enzimática. A pesar de que todas estas mutaciones provocan esteatosis, muy pocas exhiben esteatohepatitis.

#### 7. Modelos de reducción en la $\beta$ -oxidación adquirida (deficiencia de colina y metionina).

Inicialmente se estableció este modelo para estudiar el efecto del hígado graso en el trasplante hepático; sin embargo, su aplicación en el estudio de la patogénesis de la NASH ha proporcionado una importante información, sobre todo en lo que respecta al aumento en la actividad del CYP 2E1 en los hepatocitos (80). La *inflamación y fibrosis* en este modelo es *leptina-dependiente* (152).

Sin lugar a dudas, el modelo inducido por dieta DCM subraya la importancia del stress oxidativo (independientemente de la obesidad) en la patogénesis de la esteatosis y NASH (154). No obstante, este modelo es, discutiblemente, el mejor modelo establecido para estudiar los elementos *inflamatorios* y *fibróticos* del espectro de la NAFLD y para ello requiere el uso de especies animales que

tengan *leptina* o *receptores de leptina funcionantes* (160). A pesar de ello, existe poca evidencia que apoye la suposición de que este modelo replica el fenotipo o los mecanismos patogénicos de la NAFLD relacionada con el síndrome metabólico.

La alteración en la  $\beta$ -oxidación puede inducirse por diferentes medicamentos como el tamoxifeno (antagonista estrogénico) y el etomoxir (inhibidor de la CPT1) (64). Sin embargo, el principal modelo de investigación en el que se emplea un *defecto adquirido en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial* para producir esteatosis se basa en la alimentación de una *dieta deficiente en colina y metionina* (DCM), ambas precursoras de la *fosfatidilcolina*, el principal fosfolípido de la capa externa de las partículas de VLDL (290). Esta dieta lipogénica no sólo induce *esteatosis hepática* sino también *inflamación y fibrosis hepáticas*.

La *colina* es un nutrimento clasificado por la Food and Drug Administration (FDA) como indispensable y que interviene en la integridad de la membrana celular, la defensa antioxidante, la señalización transmembrana, la síntesis de fosfatidilcolina, la neurotransmisión y la metilación. Los roedores alimentados con una dieta deficiente en colina y/o metionina agotan sus reservas de antioxidantes hepáticos como el GSH y S-adenosil metionina (SAME) (291).

La dieta DCM disminuye la disponibilidad de sustratos para la síntesis de *fosfatidilcolina*, por lo que se inhibe la síntesis (“ensamblaje”) de VLDL, se bloquea su secreción hepática (292) y, por tanto, se produce una menor *secreción* (63) y *depuración* de triglicéridos hepáticos (293). La síntesis de *fosfatidilcolina* se produce por dos vías: por la incorporación directa de la *colina* preformada a compuestos fosfatidilo o a través de la metilación de la adenosil metionina (294). La fosfatidilcolina es un componente indispensable de las VLDL y no puede ser sustituida por otros fosfolípidos (85). Conforme pasa el tiempo de administración de esta dieta, hay una tendencia a disminuir el contenido hepático de fosfolípidos y de FFA, y de aumentar la concentración de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos totales. El aumento de triglicéridos y colesterol se da en forma espectacular en la primera semana apenas. Los ácidos grasos que más aumentan son el palmítico (C16:0), oleico (C18:1n9), linoleico (C18:2n6) y, en menor grado, el araquidónico (C20:4n6) y esteárico (C18:0).

Recientemente, se ha descrito que la dieta DCM duplica o triplica el mRNA y la expresión de la proteína aumentadora de unión a CCAAT  $\beta$  (C/EBP- $\beta$ ) a las 4 semanas de administrarse en ratones C57BL/6, por lo que aumenta también:

- La *síntesis de lípidos* al incrementar la expresión del PPAR- $\gamma$  y la FAS (295)
- Los marcadores lipoperoxidativos (CYP 2E1 y acetil-CoA oxidasa)
- Los marcadores inflamatorios fosforilados, como el NF $\kappa$ B y la JNK.

Su *delección* [en ratones *knockout* (C/EBP- $\beta$  -/-)], en cambio, reduce en un 60% la acumulación de triglicéridos hepáticos, el estrés oxidativo, la lipogénesis y el daño tisular.

La dieta únicamente deficiente en *colina* (DC) produce *esteatosis, ganancia de peso y alteración en la sensibilidad a la insulina* (296), mientras que la dieta DCM produce *esteatohepatitis asociada a la pérdida de peso* (296, 297) y *estrés oxidativo*. La *colina* puede biosintetizarse a través de la *metionina*, y entonces la deficiencia de *colina* aisladamente no parece disminuir la secreción de VLDL (298). La dieta DC, entonces, provoca una deficiente incorporación de la *colina* preformada a los compuestos fosfatidilo, lo que causa una activación compensatoria de la metilación para mantener la síntesis de fosfatidilcolina y excreción de VLDL, y esto explica el aumento en los lípidos plasmáticos (299). La esteatosis hepática que la dieta DC produce, sin embargo, queda sin explicación.

Debe aclararse que en este modelo (dieta DCM) la lipogénesis se produce exclusivamente por alteración en la síntesis de la *VLDL*. En otros modelos de lipogénesis, como el de la dieta alta en grasa, ésta se produce por estimulación de la *SREBP-1c* (53). La secreción de triglicéridos hepáticos (por la *VLDL*) también puede bloquearse inhibiendo la *MTTP* (*vide supra*), un péptido que facilita la incorporación de los triglicéridos a las *VLDL* (300) y su tráfico. En los ratones carentes de esta enzima hay disminución de la *SCD-1* (301), que cataliza la conversión del palmitato (C16:0) y estearato (C18:0) a sus derivados monoinsaturados, insaturación crítica para la incorporación de ácidos grasos recién sintetizados a los triglicéridos (302). Además, la ausencia de *SCD-1* promueve un aumento en el gasto energético y una constitución corporal magra pese al consumo de alimentos (303).

No se sabe si la dieta DCM altera la síntesis de *carnitina*, ya que ésta se sintetiza a partir de *metionina* (o lisina). Sin embargo (tal vez paradójicamente), la dieta DCM aumenta la actividad tanto de la *CPT-1* como de la *CPT-2*, aunque la diferencia sólo es estadísticamente significativa para la segunda enzima (304). De cualquier manera, si se produjera de esta manera un aumento en la  $\beta$ -oxidación, ésta no sería suficiente como para prevenir la esteatosis producida por la misma deficiencia de *colina* y *metionina*. Por otra parte, aunque se sabe que este modelo produce pérdida de peso y desnutrición, los cambios producidos en este modelo no son compatibles con estas alteraciones, ya que no se eleva el  $\beta$ -hidroxibutirato.

La dieta DCM altera la  *$\beta$ -oxidación mitocondrial* e induce la expresión del *CYP 2E1* (a su vez, inducible por el alcohol) (180), al igual que el alcohol y el pirazol. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la *esteatohepatitis alcohólica* y *no alcohólica* pueden compartir mecanismos patogénicos (*vide infra*). Además, la NASH en el hombre muchas veces llega a confundirse con la ASH, tanto en el comportamiento bioquímico como en la histología; sin embargo, en los modelos experimentales se han encontrado diferencias sustanciales al comparar la NAFLD inducida por una dieta DCM con la AFLD (305), y cuando el efecto de la primera se potencia con la administración de alcohol. La dieta DCM produce (al igual que el alcohol), esteatosis macrovesicular, pero cuando se administra alcohol conjuntamente con la dieta DCM, se produce esteatosis masiva, necrosis e inflamación. La dieta DCM eleva la ALT 1.6 veces su valor y disminuye la L-FABP; en cambio, si se da en conjunto con etanol, la ALT puede elevarse hasta 10 veces su valor normal y la L-FABP, por lo contrario, elevarse.

La dieta DCM, además, eleva la FA, los FFA hepáticos y los lipoperóxidos y disminuye el FAS y la relación SAME/GSH.

La producción de ROS a partir de la  $\omega$ -oxidación del CYP 2E1 y lipoperóxidos, junto con la depleción de antioxidantes hepáticos (GSH y SAME) promueven el estrés oxidativo, daño al DNA mitocondrial y apoptosis e inducen *esteatohepatitis*. La dieta DCM induce más *estrés oxidativo* que muchos otros modelos de NASH (208, 306), además de esteatosis.

Las fuentes de estrés oxidativo son los ácidos grasos intracelulares, vía *inducción* del CYP 2E1 y  *$\beta$ -oxidación peroxisómica* (307) o bien por toxicidad directa. Es probable que el CYP 2E1 sea el principal generador de productos de lipoperoxidación responsables del daño hepático, pero pueden existir otras vías bioquímicas inducibles (incluso, por la dieta DCM) como el CYP 4A que medien la actividad de la peroxidasa de lípidos NADPH-dependiente (208, 308) y por lo que se produzca aún así lipoperoxidación en ratones CYP 2E1 *-/-* y, consecuentemente, NASH, aunque se haya demostrado que la NADPH oxidasa no contribuye importantemente en el estrés oxidativo en ratones alimentados con DCM (309). Por esta razón, se concluye que no se conocen aún todas las fuentes de prooxidantes que participan en la fisiopatogénesis de la NAFLD.

El CYP 2E1 ( *$\omega$ -oxidación*) y la  *$\beta$ -oxidación* (la *mitocondrial defectuosa* y la *peroxisómica*) generan ROS, que promueve el daño a la membrana celular vía la formación de malondialdehído (MDA), el producto final de la lipoperoxidación (296). El MDA causa más cambios estructurales en la matriz mitocondrial, causando disfunción mitocondrial (310). Esto activa la liberación de *citocinas proinflamatorias* por las células de Kupffer y asimismo activa las células estelares, estimulando la *producción de colágeno* y la *fibrogénesis* (79), lo que lleva al desarrollo de cambios necroinflamatorios en el parénquima hepático (214):

- La dieta DCM induce también la expresión de varios genes que codifican para *mediadores proinflamatorios* (277). Hay autores, sin embargo, que informan que esta dieta no aumenta el *TNF- $\alpha$*  y, de cualquier forma, se desarrolla NASH (de la Pena y Farrell, comunicación personal, 228), aún incluso cuando el IL-6 hepático aparentemente disminuye. Esta esteatosis hepática e inflamación intralobular se asocia con una activación temprana del NF- $\kappa$ B (unión al DNA de las fracciones nucleares hepáticas) que, a su vez, induce simultáneamente los genes de ICAM-1, COX-2, MCP-1 y CINC, proteínas inflamatorias, incluso en ratones *TNF- $\alpha$  -/-* y *TNFR-1 -/-* (311). Debe recordarse, no obstante, que es el *TNF- $\alpha$*  el que muchas veces estimula en forma potente el *NF- $\kappa$ B* y éste, a su vez, induce la expresión de *TNF- $\alpha$*  (227). En resumen, el NF- $\kappa$ B es un importante mediador proinflamatorio y aparentemente explica la causa de la esteatohepatitis experimental, que se produce, independientemente de la síntesis de *TNF- $\alpha$*  y activación de TNFR-1.

- El incremento del estrés oxidativo y la disminución en la respuesta antioxidante en este modelo estimula la secreción de citocinas *proinflamatorias* (TNF- $\alpha$  y IL-6, entre otras) y *profibrogénicas* (TGF- $\beta$ ), activación de células estelares hepáticas y deposición de colágeno, favorecido por la sobreexpresión de la actina de músculo liso- $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) y TIMPs, procolágeno  $\alpha$ -1 e inhibidor-1 del activador de plasminógeno, entre otros factores. La dieta DCM produce *fibrosis* cuando se administra por un tiempo prolongado (252,298,308).

En muchos modelos lipogénicos se desconoce por qué la acumulación de grasa progresa a inflamación hepática y fibrosis (277). Al manipular la MTTP, se produce *esteatosis* pero no *hepatitis* o *fibrosis*. Algunos datos experimentales indican que la *esteatosis hepática* es crítica en la patogénesis del daño hepático inducido por la dieta DCM, de tal forma que si se previene la acumulación de lípidos no se desarrolla daño hepático (196,308). Este hecho da margen a pensar que la composición de lípidos del hígado de los ratones alimentados con esta dieta podría influir en el desarrollo de NASH.

A diferencia de la NAFLD humana, los animales de este modelo presentan *caquexia* (50% de pérdida de peso con respecto a los ratones control a las 10 semanas de estudio), probablemente porque la inflamación hepática inducida causa un estado catabólico mediado por el TNF- $\alpha$ , *hipotrigliceridemia* y *menor peso hepático relativo al peso corporal*. La *distribución* histológica de la *esteatosis hepática* difiere del patrón visto en el hombre, donde hay una deposición *periportal* más que *pericentral* (78,180). Estos ratones también presentan una mucho mayor elevación de ALT que los pacientes con NASH, consistente con el proceso necroinflamatorio. Además, *no* desarrollan claramente *resistencia periférica* (312) pero sí *resistencia intrahepática a la insulina*, asociada a una menor fosforilación del receptor de insulina hepático y de Akt (171). No obstante, recientemente se ha publicado que la expresión del CYP 2E1 y el consecuente stress oxidativo -característica de este modelo- puede alterar la *señalización de la insulina*, reduciendo la fosforilación de la tirosina y aumentando la fosforilación de la serina del IRS-1 (313), por lo que podría presentarse resistencia a la insulina (*vide supra*).

En resumen, la dieta DCM produce los siguientes efectos (tabla 5):

**Tabla 5: Efectos metabólicos, inflamatorios y fibrogénicos de la dieta deficiente en colina y metionina.**

<b>Aumento</b>	<b>Disminución/inhibición</b>
$\omega$ -oxidación (CYP 2E1)	Peso
$\beta$ -oxidación peroxisómica	$\beta$ -oxidación mitocondrial
Resistencia hepática a la insulina	Resistencia sistémica a la insulina.
mRNA TNF- $\alpha$ (ratones <i>db/db</i> )	Colesterol y triglicéridos séricos.
TGF- $\beta$ 1	
$\alpha$ -SMA	
Colágeno	
TIMP-1	

Fuentes:

Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996; 111:1645-1653.

Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 1-16.

La magnitud de la *esteatosis, inflamación y fibrosis hepáticas* producidas en este modelo depende de la *especie, cepa y género* (macho-hembra) de los animales estudiados (80). Se han estudiado ratas macho *Wistar* (180), ACI (85) y *Sprague-Dawley* (314), ratones macho *C57BL/6* (315) y ratones genéticamente obesos *ob/ob* (152). En el hombre, se sabe que los factores genéticos (316) y los debidos al género (317) pueden influir en la susceptibilidad a NASH, además de que el género femenino es un predictor independiente de severidad de fibrosis en NASH, opuesto a lo que ocurre en los roedores.

Los ratones *C57BL/6* macho alimentados con una dieta DCM durante cuatro semanas presentan una mucho mayor cantidad de focos necroinflamatorios que los ratones hembra (80) y que las ratas *Wistar* de ambos sexos, tratadas de la misma forma. Los ratones no presentan balonización de hepatocitos y cuerpos de Mallory pero puede haber *fibrosis pericelular focal*. En ambos géneros, los ratones presentan *menos esteatosis* que las ratas *Wistar*. *Ultraestructuralmente, hay más daño morfológico* en los ratones *C57BL/6* que en las ratas *Wistar* (mayor "hinchazón" mitocondrial, proliferación del retículo endoplásmico liso, pérdida de la relación normal entre el retículo endoplásmico rugoso y la mitocondria y "blebbing" de la membrana mitocondrial (aparición de una vesícula o ampolla). La concentración de *triglicéridos séricos* es *mucho menor* que en las ratas *Wistar*, pero los ratones tienen un *mucho mayor* contenido de *TBARS*. En general, en las ratas hay una mayor *esteatosis* y, en cambio, en los ratones hay *mucho más inflamación y fibrosis*. Ello quiere decir que el aumento en la *necroinflamación* no está en función de la *esteatosis*, sino de la *lipoperoxidación*, misma que daña directa e indirectamente los hepatocitos a través de sus derivados proinflamatorios y profibrogénicos: MDA y 4-hidroxi-nonenal (180). En conclusión los ratones *C57BL/6* desarrollan las características *histológicas* que más se asemejan a las del NASH humano (80).

En los ratones genéticamente obesos *ob/ob* y diabéticos y lipoatróficos la *esteatosis* se debe a una *disfunción* secundaria de *leptina* (318) pero no se

produce *esteatohepatitis*. En cambio, en este modelo la producción de *leptina* es normal y ello facilita la fibrogénesis. En la tabla 6 se muestra comparativamente la expresión de los factores de riesgo de la NAFLD en diferentes modelos murinos.

**Tabla 6. Comparación de los factores de riesgo para la NAFLD humana en diferentes modelos murinos.**

<b>Factor de riesgo en el hombre</b>	<b>Ratones <i>ob/ob</i></b>	<b>Ratas <i>fa/fa</i></b>	<b>Ratones lipoatróficos</b>	<b>Ratas con dieta DCM</b>
Obesidad	Sí	Sí	No	No
Deficiencia de Leptina	Sí	No	Sí	¿?
Resistencia a la Leptina	No	Sí	No	¿?
Aumento de insulina/ resistencia a la insulina	Sí	Sí	Sí	¿?
Dislipidemia	Sí	Sí	Sí	No
Aumento del TNF- $\alpha$	Sí	Sí	Sí	Sí

Fuente: Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatohepatitis. Best Prac Res Clin Gastroenterol 2002; 16: 679-690.

Los ratones *KK-A (y)* desarrollan, al igual que los ratones *C57BL/6*, esteatosis hepática, aunque una mucho mayor infiltración inflamatoria y fibrogénesis [procolágeno- $\alpha$ 1 (tipo I) y TGF- $\beta$ 1] con una dieta DCM sin cambios en la adiponectina. Los ratones *KK-A (y)*, por tanto, son probablemente un mejor modelo que los ratones *C57BL/6* debido a su *deficiencia* característica de *adiponectina*, que a su vez juega un papel clave en la exacerbación de la respuesta proinflamatoria y profibrogénica (168).

La dieta DCM es una maniobra muy común que, *per se*, produce NASH en algunos modelos animales, aunque también puede utilizarse para potenciar la enfermedad en otros modelos animales que expresen las características que acompañan a la NAFLD.

#### 8. Modelos combinados de NAFLD determinado genética y ambientalmente.

Algunos grupos de investigación han intentado unir la brecha entre el fenotipo que existe entre los modelos disponibles y la enfermedad humana. Esta labor combina una *manipulación genética y dietética* para producir esteatohepatitis más severa y que se presenta en forma más acelerada, o esteatohepatitis fibrosante. Estas combinaciones incluyen ratones mutantes *Abcb11* con dieta DCM (319), ratones mutantes de apolipoproteína E con dieta alta en grasa (320), ratones PPAR- $\alpha$  *null* con dieta DCM (321) o ratones con delección de la metionina adenosiltransferasa tipo 1A con dieta DCM (322). Los ratones *knockout (null)* para PPAR- $\alpha$  desarrollan daño hepático grave (196).

Estos modelos se caracterizan por desarrollar *esteatohepatitis* histológica. Así, por ejemplo, la dieta DCM en los ratones *db/db* acelera el desarrollo de esteatohepatitis fibrosante (323) (el mRNA del colágeno tipo I aumenta 10 veces más, mientras que en los ratones *db/m* aumenta 4 veces y en los ratones *ob/ob* no hay incremento en la fibrogénesis). Otro ejemplo son los ratones A/J, en los que se expresa notablemente desde el primer día de haber iniciado la alimentación con dieta DCM la *osteopontina*, una citocina Th1 que juega un papel importante en las enfermedades fibroinflamatorias (324). La expresión de su mRNA se inicia a la semana 4, manteniéndose durante 8 semanas, y coincide con el desarrollo secuencial de elevación de ALT, esteatosis, inflamación, expresión del mRNA del colágeno y fibrosis. Cuando se bloquea su señalización se evita el incremento de ALT pero no se altera la esteatosis (325). Finalmente, en los ratones CAR +/+ hay una mayor expresión del mRNA para colágeno- $\alpha$  1 tipo I y para TIMP-1 cuando son alimentados con dieta DCM. El receptor constitutivo para androstano (CAR) es un receptor nuclear clave para la regulación de enzimas que metabolizan medicamentos (326).

La inducción de resistencia a la insulina con una dieta alta en grasa en ratas obesas y diabéticas Long Evans alimentadas con dieta DCM produce paralelamente un aumento de TGF- $\beta$ , procolágeno  $\alpha$ -1 e inhibidor-1 del activador de plasminógeno, por lo que desarrollan rápidamente un *pool* de triglicéridos hepáticos, activación de células estelares, inducción en la expresión genética de la SREBP-1c y FAS, todo lo cual conlleva a un estado precirrótico (252).

Otro ejemplo de modelo de manipulación *genética y ambiental* para producir NASH consiste en emplear especies con una mutación genética y manipular el *estado inflamatorio*. Tal es el caso de los ratones *jnk1 null*. Como se mencionó anteriormente, la JNK-1 induce a la resistencia a la insulina; además, regula el daño celular. Esta cinasa se activa por oxidantes y citocinas (327). Los ratones *jnk1 null* presentan menos acumulación de triglicéridos hepáticos, inflamación, lipoperoxidación, daño hepático y apoptosis.

### **Cronología del daño hepático inducido**

El tipo de alteración o daño y el momento en el que se presenta depende de la especie y cepa animal, así como de la maniobra efectuada. Se cuenta con los siguientes datos:

- Aumento de ALT desde el día 3, esteatosis a partir de la semana 1, inflamación en la semana 2, expresión del mRNA del colágeno I hepático entre las semanas 1 y 4, y fibrosis en la semana 8 (en ratones A/J alimentados con dieta DCM) (324).
- Marcado aumento de triglicéridos y colesterol desde la primera semana, alcanzándose el contenido máximo de triglicéridos hepáticos a los 14 días (en ratas ACI alimentadas con dieta DCM)(85).
- Esteatosis en una semana, y esteatosis grave (con inflamación) en 5 semanas (en ratas Wistar con dieta DCM) (87).

- Esteatosis hepática leve a los 10 días con escasas células inflamatorias diseminadas, asociadas con un aumento de la ALT en suero (en ratones C57BL/6 con dieta DCM) (228).
- Activación del CYP 2E1 a partir de la semana 2 (en ratas alimentadas con DCM)(180).
- Esteatosis en la semana 2, cambios necroinflamatorios locales y expresión génica del colágeno- $\alpha$  (1) tipo I en la semana 5, aumento en la síntesis de TIMP-1 y -2 en la semana 12 y fibrosis pericelular entre las semanas 12 y 17 (en ratas con dieta DCM)(298).
- Brusco aumento de la actividad fagocitaria de los macrófagos en los hepatocitos entre las semanas 3 y 5 (en ratones con dieta DCM)(224).
- Aumento significativo de lipoperóxidos (expresados en TBARS) entre las semanas 3 y 5 (en ratas alimentadas con una dieta DCM y con alto contenido de grasa) (224).
- Macroesteatosis vesicular, inflamación y focos intralobulares, asociados con un gran aumento (el triple) en el contenido de lípidos totales y elevación de la ALT a las 4 semanas (en ratones C57BL/6 con dieta DCM) (228).
- Evidencia de necrosis a partir de la semana 4, y necrosis focal con inflamación intralobular aguda en la semana 6 (en ratas ACI con dieta DCM) (85).
- Activación de células estelares adyacentes (pérdida de lípidos, inicio de producción de colágeno) en la semana 8. Numerosos focos de inflamación dispersos, necrosis de hepatocitos ocasional y un ligero aumento en la fibrosis pericentral en la semana 13 (198).

De esta manera, puede concluirse que la esteatosis es el primer cambio importante que se produce, y es base (ya que sirve como sustrato) para el desarrollo del daño hepático ulterior: activación del CYP 2E1, estrés oxidativo, inflamación y fibrosis.

### **1.3.2.2. Aplicaciones de los modelos murinos.**

No todos los modelos son adecuados para estudiar todo el espectro de afecciones hepáticas de la NAFLD. Así, por ejemplo, el uso de modelos deficientes en leptina para investigar el efecto de la acumulación de lípidos hepáticos en la regeneración es inadecuado ya que la misma leptina también interviene en esta regeneración (152). De la misma manera, el uso de un modelo inducido con DCM para estudiar el mismo problema también es inapropiado ya que esta dieta, además, produce también stress oxidativo, por lo que podría confundirse con el daño por isquemia-reperfusión (328). El modelo inducido por dieta DCM es un modelo muy empleado para el estudio del reclutamiento inflamatorio, daño celular y fibrosis en la esteatohepatitis, pero tampoco es un modelo para estudiar la influencia de los componentes del

síndrome metabólico en la NAFLD (312). De ahí la importancia de conocer los mecanismos responsables de la esteatosis y esteatohepatitis en estos modelos para así aplicarlos adecuadamente en la investigación fisiopatológica o terapéutica.

El modelo animal ideal debe abarcar el espectro completo de la enfermedad por hígado graso en el contexto en el que se desarrolla la NAFLD en el hombre: obesidad, síndrome metabólico e hipoadiponectinemia (166). Quizá el hecho de que no exista un modelo animal “perfecto” para replicar la NAFLD humana en el que se manifieste tanto la *resistencia a la insulina* como la *lipoperoxidación* favorece el estudio de estos dos componentes por separado tanto desde el punto de vista fisiopatológico como terapéutico.

En resumen, la utilidad de los modelos animales en la NAFLD permite:

- a) Conocer el amplio espectro de la fisiopatología de esta enfermedad.
- b) Ensayar modalidades profilácticas y terapéuticas dirigidas a los factores que perpetúan el daño hepático (154). Ej:  $\text{I}\kappa\text{K}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , leptina, oxidantes, composición de la dieta.
- c) Proponer variables a estudiar que permitan el diagnóstico precoz de la enfermedad (154). La NAFLD, por ejemplo, se puede sospechar en personas con condiciones que promuevan la deficiencia de leptina (lipodistrofia congénita o adquirida, obesidad), con un aumento en el estrés oxidativo y/o producción de citocinas proinflamatorias (desnutrición, edad avanzada, sobrecarga hepática de hierro, consumo de alcohol, exposición a tóxicos o drogas que inducen enzimas oxidativas, sobrecrecimiento bacteriano intestinal, errores innatos del metabolismo de lípidos).

### **1.3.3. Tratamiento de la enfermedad por hígado graso no alcohólico en modelos murinos.**

Es difícil agrupar los tratamientos según su mecanismo de acción, ya que en muchas ocasiones éste no es único y actúan sobre diferentes vías que, además, se interrelacionan. Se mencionan, sin embargo, según su orden de importancia o de experiencia en su uso como tratamiento para la NAFLD:

1. Agonistas PPAR: los PPARs juegan un importante papel en la NASH ya que están estrechamente relacionados con el metabolismo de lípidos (65). Múltiples estudios con agonistas de PPARs (pan-agonistas como el bezafibrato,  $\alpha$ -agonistas como el fenofibrato y  $\delta$ -agonistas) disminuyen los triglicéridos hepáticos, aumentan el mRNA de las enzimas asociadas con la  $\beta$ -oxidación (acil-CoA oxidasa, CPT-1, L-FABP y cetotilasa peroxisómica) y disminuyen la formación de TBARS, inflamación hepática, síntesis de citocinas y quimiocinas inflamatorias [ $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ,  $\text{TGF-}\beta 1$ , IL-6, IL-1  $\beta$  y proteína quimioatrayente monocitaria (MCP-1)] y número de células estelares hepáticas activadas (329)(Harano Y) por la supresión del  $\text{TGF-}\beta$ . El bezafibrato aumenta el mRNA de la CPT-1 y aumenta la adiponectina y sus receptores 1 y 2 (Nagasawa Effects). Particularmente, el fenofibrato puede emplearse en NAFLD cuando *no* está asociado a obesidad o

diabetes mellitus, como se comprobó en un modelo de ratón Shionogi (330). Ej: NASH relacionada a tamoxifeno (331).

La activación del *PPAR- $\alpha$*  puede mejorar el metabolismo lipídico en ratones, mientras que la activación del *PPAR- $\gamma$*  puede empeorarlo (69). Los agonistas *PPAR- $\delta$*  tienen una intensa actividad antiobesigénica, antidiabética y antiarteriosclerótica en modelos animales (65)(332), aunque poco se sabe de su efecto en la NAFLD. A continuación se describen los efectos de los agonistas-PPAR:

- a) *PPAR- $\alpha$*  (ej: Wy-14,643): su regulación positiva con potentes ligandos como el Wy14,643 disminuye la concentración de triglicéridos y el daño hepático (308). Además, no sólo previene el desarrollo de esteatohepatitis, sino que disminuye la esteatohepatitis disminuyendo el contenido de triglicéridos hepáticos, la expresión de VCAM-1, el número de macrófagos, el colágeno  $\alpha$ -1 hepático y el mRNA del TIMP-1 y TIMP-2 y de la MMP-13 (308), además de aumentar la adiponectina.

Los CYP 4A y 2E1 son fuentes hepáticas potenciales de ROS que pueden inducirse por el *PPAR- $\alpha$* . Teóricamente, entonces, la activación del *PPAR- $\alpha$*  mediante agonistas (Wy-14,643) podría agravar la esteatohepatitis en un modelo de ratones alimentados con dieta DCM (308). Sin embargo, ocurre lo contrario, ya que aumenta el mRNA de la FABP en hígado y las enzimas peroxisómicas de  $\beta$ -oxidación, lo que reduce el contenido de triglicéridos hepáticos y previene la esteatosis sin acumulación de lipoperóxidos hepáticos, aún cuando aumenta 18 veces el mRNA de ambos citocromos. Esto se debe a que el *PPAR- $\alpha$*  inhibe la vía de la COX-2 (333). Además, el hecho de que los ratones *PPAR- $\alpha$*  (-/-) desarrollen esteatohepatitis más marcada implica a la activación del *PPAR- $\alpha$*  como protector del daño hepático en NASH, ya que mejora el recambio de lípidos hepáticos, eliminando a los ácidos grasos como sustratos de lipoperoxidación. Su inhibición, en cambio, podría constituir una anomalía en el tejido adiposo visceral y en el hígado de pacientes con NAFLD (52).

- b) *PPAR- $\gamma$* : (ej: pioglitazona) disminuye el contenido de triglicéridos hepáticos, el TNF- $\alpha$  sérico y la fibrosis hepática (334, 335). Mejora la resistencia a la insulina, lo que atenúa el desarrollo y progresión de la esteatohepatitis parcialmente por inhibición de genes lipogénicos, de inflamación y fibrogénesis (disminución en la expresión del mRNA de TIMP-1 y TIMP-2 y menor expresión de procolágeno,  $\alpha$ -actina de músculo liso y TGF- $\beta$ 1)(334, 335). La pioglitazona previene, además, la activación de células estelares hepáticas *in vitro* y las lesiones preneoplásicas. La emodina, antraquinona del ruibarbo que se asocia a un aumento en la expresión del mRNA hepático del *PPAR- $\gamma$* , podría ser una alternativa de tratamiento (206).

La rosiglitazona, otro agonista *PPAR- $\gamma$* , mejora la resistencia a la insulina, pero aumenta la masa adiposa y el peso en ratones y en el hombre (182). El ácido linoleico conjugado (CLA), por otra parte, disminuye la masa adiposa y peso corporal pero induce microesteatosis hepática en ratones,

aunque también aumento en la producción de VLDL sin inducir la inflamación mediada por TNF- $\alpha$  o la infiltración por macrófagos. Su combinación evita la lipodistrofia hepática (efecto de la rosiglitazona) y previene la ganancia de peso (efecto del CLA), de tal forma que se suman sus efectos benéficos y se contrarrestan sus efectos secundarios (182).

- c) PPAR- $\delta$ : (ej: GW501516) mejora la NASH al disminuir la resistencia a la insulina y, por tanto, la esteatosis (65).
2. Acarbosa: es un inhibidor de la  $\alpha$ -glucosidasa, útil para la prevención de la diabetes mellitus tipo II (276). En ratas Sprague Dawley con dieta líquida alta en grasa (71% grasa), la acarbosa disminuye también la expresión del CYP 2E1 y el mRNA de procolágeno.
3. Adiponectina: mejora la resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa, disminuye la expresión de TNF- $\alpha$ , restituye la expresión de CPT-1 suprimida previamente por alcohol, aumenta la oxidación de ácidos grasos en el hígado, disminuye la actividad de las enzimas lipogénicas ACC y FAS (163) y disminuye la hiperlipidemia. No produce cambios en la ingestión de alimentos, glucosa e insulina plasmáticas pero sí disminuye los triglicéridos y FFA plasmáticos. Su efecto en la disminución de peso, sin embargo, es motivo de controversia (163, 336). El efecto que tiene en la disminución de grasa en hígado no es por su efecto antagónico al TNF- $\alpha$  sino por su acción sobre las dos enzimas limitantes en la síntesis de ácidos grasos (FAS y ACC). La inactivación de la ACC puede disminuir la síntesis de su producto, el malonil-CoA (potente inhibidor de la CPT-1, como se ha mencionado) y, entonces, inducir la oxidación de ácidos grasos en este tejido. La adiponectina disminuye la hepatomegalia, esteatosis y elevación de ALT en un modelo de ASH y NASH inducido por obesidad (163).
4. Inhibidores de la COX-2: el hecho de que la inducción de COX-2 se asocie a la activación de NF- $\kappa$ B y estimulación del TNF- $\alpha$ , IL-6 e ICAM1 en un modelo de esteatohepatitis inducido por dieta MDC hizo pensar que su inhibición es útil, y de hecho mejora la gravedad de la esteatohepatitis experimental (333).
5. Carnitina y coenzima A: cofactores en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria, pueden incrementar teóricamente la oxidación de éstos. No se conocen hasta el momento, sin embargo, estudios que las incluyan como alternativas terapéuticas. Sólo se sabe que su dosis parenteral sobrepasa por mucho la de uso clínico (200).
6. Exendina: es un péptido agonista del GLP-1 que promueve la secreción de insulina (337). Como consecuencia, disminuye la esteatosis hepática en ratones *ob/ob* (por reducción en la expresión del mRNA de la SCD-1 y otros genes que sintetizan ácidos grasos). Además, disminuye la concentración de TBARS.
7. Curcumina: disminuye la expresión de NF- $\kappa$ B y, por tanto, la inflamación, e inhibe la esteatosis, probablemente al estimular el PPAR- $\alpha$  (228). De hecho,

los agonistas PPR- $\alpha$  previenen y revierten la NAFLD en ratones (*vide supra*).

8. Oligonucleótidos antisentido: la utilización de oligonucleotidos antisentido de porciones peptídicas de enzimas que codifican para la síntesis de triglicéridos en ratones C57BL/6J obesos por inducción con dieta rica en grasa y en ratones *ob/ob* reduce la expresión del mRNA de enzimas lipogénicas como la DGAT2 hasta en un 75% en hígado y tejido adiposo, pero no de la DGAT1, cuya actividad sólo disminuye en hígado (338). No producen cambios significativos en peso, adiposidad, tasa metabólica o sensibilidad a insulina, pero sí una importante disminución del contenido de triglicéridos hepáticos y de la esteatosis hepática, reflejo de una marcada disminución en la síntesis de triglicéridos y aumento en la oxidación de ácidos grasos. No obstante, cuando se utilizan en ratones *db/db* alimentados con dieta DCM, aún cuando se previene la esteatosis hepática y resistencia a la insulina, disminuye la expresión de TNF- $\alpha$  y aumenta la síntesis de adiponectina, empeora el daño hepático y fibrosis, pues hay un incremento en el contenido hepático de FFA, en la inducción del CYP 2E1, hay mayor estrés oxidativo (acumulación de 4-hidroxinonal), lipoperoxidación (339), muerte celular, inflamación y fibrosis (aumento en el contenido de hidroxiprolina). De alguna forma, entonces, la síntesis de triglicéridos *protege* al hígado de la lipotoxicidad ya que amortigua el efecto de la acumulación de FFA.

Por otra parte, la manipulación de esta enzima no es suficiente como tratamiento de la NAFLD, ya que en ratones que sobreexpresan DGAT2 sólo se acumulan triglicéridos, diacilgliceroles y acil-CoA de cadena larga en el hígado pero no hay resistencia a la insulina. Esto una vez más demuestra que la esteatosis hepática puede ocurrir independientemente a la resistencia a la insulina (340).

Las reservas de éster de retinil disminuyen durante la activación de las células estrelladas hepáticas y la fibrogénesis hepática, y aunque la mayoría de la esterificación del retinol es catalizada por la lecitina-retinol aciltransferasa, también se lleva a cabo por la DGAT1. El tratamiento con el oligonucleótido antisentido para la DGAT1 no disminuye el contenido de triglicéridos o necroinflamación pero sí disminuye la activación de las células estelares y, por lo tanto, la fibrogénesis (341).

Otro oligonucleótido antisentido que, además, disminuye la resistencia a la insulina en ratones obesos deficientes en leptina es el dirigido hacia la proteína relacionada a la diferenciación de adipocitos (ADPR), aumentado en NASH (342).

El malonil-CoA, generado por las carboxilasas 1 y 2 del acetil-CoA (ACc1 y Acc 2), es clave en la regulación de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y la síntesis de lípidos. El empleo de oligonucleótidos antisentido para estas enzimas aumenta la oxidación de grasas y mejora la resistencia a la insulina (343).

9. CLA: disminuye los triglicéridos hepáticos, las enzimas hepáticas elevadas por daño hepático, la expresión de mRNA del TNF- $\alpha$  y la actividad de la CPT hepática y la MTP en ratas Zucker *fa/fa* (344). Asimismo, el CLA también aumenta la concentración de adiponectina.
10. SAME: previene el aumento de apoptosis de hepatocitos, actividad de caspasa 3, el incremento de TNF- $\alpha$  sérico y la lipoperoxidación en ratones obesos (345). El SAME puede revertir o corregir el daño inducido por el CYP 2E1.
11. Pentoxifilina: es un inhibidor no selectivo de la fosfodiesterasa empleado en enfermedades periféricas vasculares. Tiene actividad *antioxidante* (disminuye la producción de ROS y los secuestra)(346) e inhibitoria de las citocinas proinflamatorias (318). Su acción anti-TNF- $\alpha$  bloquea la activación de NF- $\kappa$ B en células de Kupffer estimuladas. Además, atenúa la fibrosis hepática *in vitro*, aunque hay controversia con respecto a este efecto *in vivo*. Clínicamente, disminuye la mortalidad de la esteatohepatitis alcohólica. Aunque no reduce el contenido de triglicéridos hepáticos, sí disminuye la inflamación (346), AST, ALT, MDA plasmático y hepático y TNF- $\alpha$  plasmático (318).
12. Infliximab: la inhibición a corto plazo del TNF- $\alpha$  reduce la inflamación y esteatosis/fibrosis y mejora la transducción de la señal de insulina en ratas Wistar con NAFLD inducido por dieta alta en grasa (253).
13. Taurina: inhibe el metabolismo de glucosa y lípidos y la lipoperoxidación y disminuye la síntesis de TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Promueve la síntesis de adiponectina en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (347). Por todo ello, teóricamente podría ensayarse como tratamiento de la NAFLD.
14. Inhibidores de MMPs: el *marimastat* es, además de un inhibidor de MMP (antifibrogénico), un inhibidor de la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (134) que interrumpe las vías inflamatorias. Asimismo, también activa (por fosforilación) el PPAR- $\alpha$  y disminuye, consecuentemente, el contenido de triglicéridos hepáticos y en suero.
15. N-acetilcisteína: aumenta el GSH pero no altera la formación de MDA. Disminuye también la deposición de grasa en hígado y necroinflamación (348), pero su efecto en ratas alimentadas con una dieta que contenga 100% de grasa no es diferente a cuando vuelven a consumir una dieta normal (349).
16. Antioxidantes lipofílicos: los pacientes con NAFLD presentan una disminución de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (129)(248), mientras que en la hepatitis viral C y cirrosis la vitamina A se encuentra disminuida (248). El *aumento* en la vitamina A puede ser indicador del aumento en la carga lipídica de los hepatocitos y activación de las células estelares hepáticas, mientras que la *disminución* de  $\alpha$ -tocoferol puede estar relacionado con un aumento en el stress oxidativo. En combinación con el ácido

ursodesoxicólico y su derivado (NCX-1000), la vitamina E mejora la efectividad del tratamiento de la NAFLD (350).

17. Isoflavonas: derivadas de la soya, disminuyen la lipoperoxidación en modelos experimentales de NASH al aumentar la actividad de paraoxanasa, una enzima antioxidante que disminuye la lipoperoxidación, inflamación, necrosis y fibrosis. Adicionalmente, reduce las concentraciones de colesterol y triglicéridos (351).
18. Quelación de hierro: la deferoxamina, un quelante de hierro, previene la lipoperoxidación en ratones alimentados con una dieta deficiente en colina (352). Hay una menor acumulación de MDA y previene la expresión de células estelares activadas.
19. Probióticos: los ratones *ob/ob* tienden a desarrollar estasis intestinal con el consecuente sobrecrecimiento bacteriano en intestino que fermenta los hidratos de carbono dietéticos a alcohol. Estas bacterias aumentan la permeabilidad intestinal, atravesando por ello libremente el etanol, las endotoxinas y otras sustancias que pueden generar daño en un hígado ya esteatótico (154). En modelos experimentales, la descontaminación intestinal o la inhibición del TNF- $\alpha$  mejora la enfermedad hepática por alcohol. De la misma manera, el empleo de ambas estrategias para el tratamiento de la NAFLD en ratones *ob/ob* mejoran la histología, reducen el contenido de grasa en hígado, decrece la ALT y la actividad de las dos cinasas –reguladas por el TNF- $\alpha$  que promueven mayoritariamente la resistencia a la insulina: la JNK y la I $\kappa$ K $\beta$ . Esta última, como se mencionó, promueve la activación del NF- $\kappa$ B y, por tanto, la síntesis de TNF- $\alpha$ ; y el TNF- $\alpha$ , a su vez, causa más activación del I $\kappa$ K $\beta$ . En ambos casos, se induce más resistencia a la insulina (175,176). Al disminuir la resistencia a la insulina, disminuye la  $\beta$ -oxidación.
20. Aminosterol: originalmente un antibiótico, mejora la resistencia a la insulina y esteatosis hepática en ratones *Lep ob/ob* al reducir la síntesis de lípidos hepáticos y estimular la lipólisis (353).
21. Herbolaria: el *Yo iyo hen shi ko* impide la esteatosis macrovesicular en ratones *ob/ob* alimentados con dieta alta en grasa o DCM porque promueve el incremento en la actividad del PPAR- $\alpha$  y la expresión del mRNA de la MTTP (354). Adicionalmente, disminuye la concentración de ROS (355).
22. Bromocriptina: mejora el comportamiento obesigénico, aumenta la sensibilidad a la insulina y la lipólisis y tiene propiedades antioxidantes tanto en ratas genéticamente obesas (Zucker) como en ratas obesas por inducción con dieta (356), por lo que es potencialmente benéfico para el tratamiento de la NAFLD.

### 1.3.3.1. Ácidos grasos: una nueva alternativa en el tratamiento de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.

Diversos estudios han empleado los ácidos grasos como terapéutica de la NAFLD. La lipemia y contenido de triglicéridos en hígado pueden ser controlados por el tipo de lípidos alimentarios, ya que ejercen cambios en la actividad de enzimas hepáticas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos, lipogénesis y oxidación de ácidos grasos (357).

Los efectos benéficos del aceite de pescado en la dieta se han atribuido a su alto contenido de PUFA  $\omega$ -3 y sus derivados: el EPA y el DHA (358). El ALA (aceite de linaza) y el EPA y DHA (aceite de sardina), por ejemplo, aumentan la actividad hepática de ACS, CPT-1 y la  $\beta$ -oxidación peroxisómica.

La administración de PUFA  $\omega$ -3 se ha recomendado sobre la base de su papel en la prevención de eventos cardiovasculares relacionados con las dislipidemias. Hay evidencias de que tanto el EPA como el DHA disminuyen los triglicéridos en sangre (359) ya que:

- Activan el *PPAR- $\alpha$* , por lo que aumenta la  $\beta$ -oxidación *mitocondrial* y *peroxisómica* y, por tanto, se reduce la cantidad de ácidos grasos en hígado que serían esterificados para ser convertidos en triglicéridos (30).
- Retardan la secreción de VLDL (360).

Los PUFA  $\omega$ -3 son ligandos de los *PPAR- $\alpha$*  que facilitan la unión de estos últimos con el DNA induciendo genes que codifican para proteínas de transporte y oxidación de lípidos, así como de termogénesis. De esta forma, suprimen la lipogénesis hepática y aumentan la oxidación de ácidos grasos en el hígado y músculo esquelético (361). En este sentido, los PUFA  $\omega$ -3 son más potentes que los  $\omega$ -6.

El aceite de pescado reduce el tamaño de los adipocitos y del panículo adiposo (358) e incrementa la respuesta celular a la insulina y a la lipólisis estimulada por los  $\beta$ -agonistas.

El papel del *DHA* en los hepatocitos es aún debatible, y parece no tener un efecto hipolipidémico *per se*. En cambio, el *EPA* aumenta la expresión y actividad de la CPT-1 en los hepatocitos, lo que incrementa el flujo de ácidos grasos a la *mitocondria* para ser  $\beta$ -oxidados y así reduce los sustratos para la síntesis de lípidos (30). El *EPA*, además, disminuye la síntesis de triglicéridos en los hepatocitos por inhibición directa de la actividad de la DGAT, inhibe la secreción de apolipoproteínas en enterocitos y hepatocitos - por ello, sólo el *EPA* disminuye también el colesterol en sangre (362)- y también inhibe la síntesis *de novo* de los ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos en adipocitos, lo que implica que los mecanismos por los que el EPA modula el metabolismo de lípidos en los hepatocitos no pueden ser extrapolados a los adipocitos, aunque ambos tipos de células comparten muchas de sus vías metabólicas para los lípidos (187)(363).

Las mitocondrias son, cuantitativamente, los organelos predominantes para la oxidación en los hepatocitos, comparados con los peroxisomas, por lo que una inducción en la *β-oxidación mitocondrial* 1.5 veces tiene mucho más impacto en la *β-oxidación total* de ácidos grasos que una inducción *peroxisómica* de la misma magnitud. Por ello, no es suficiente la inducción *peroxisómica* del DHA y EPA para disminuir la trigliceridemia. En cambio, como el EPA también estimula la *β-oxidación mitocondrial*, sí logra tener un efecto hipotrigliceridémico mucho más potente.

La modificación de los ácidos grasos de la dieta es un enfoque terapéutico escasamente explorado en los pacientes con NAFLD. Los PUFA ejercen diferentes acciones que podrían resultar beneficiosas también en el contexto específico de esta enfermedad. Los PUFA  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de la dieta son reguladores negativos del metabolismo lipídico hepático a través de modificaciones en la transcripción génica de genes lipogénicos y glucolíticos (53,361,364,365) ejerciendo su acción a través de:

1. La *represión* de la SREBP-1c, presumiblemente, por escisión del precursor de esta proteína y por reducción de la tasa de su transcripción y estabilidad de su mRNA (365,367). De esta forma, se suprime la expresión de los genes de enzimas lipogénicas como la FAS y la SCD1, disminuyendo la lipogénesis. Aún cuando el EPA se convierte en DHA por medio de una elongasa y la  $\Delta$ -6 insaturasa y se consideran igualmente efectivos para suprimir la SREBP-1c, sus mecanismos divergen (368).
2. La activación del PPAR- $\alpha$ . Al disminuir la lipogénesis e incrementar la *β-oxidación* de ácidos grasos, se altera el balance energético de un *almacenaje* hacia un *consumo* (369). Particularmente, los PUFA  $\omega$ -3 son ligandos del PPAR- $\alpha$  (370) y: a) evitan que los demás ácidos grasos se almacenen como triglicéridos porque favorecen la oxidación de los mismos, y b) evitan que la glucosa se transforme en ácidos grasos, favoreciendo en su lugar la glucogenogénesis (361).

De esta forma, los PUFA  $\omega$ -3 inhiben la SREBP-1c, disminuyendo la lipogénesis, e inducen el PPAR- $\alpha$ , estimulando la oxidación de lípidos. Esto se ha comprobado tanto en el hombre como en animales (371).

La acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos (esteatosis) es reversible. Si continúa el estímulo (consumo de alcohol, obesidad, diabetes no controlada, etc...) progresa a hepatitis y fibrosis, y eventualmente a cirrosis. Se considera que el hígado graso es benigno, aunque últimamente se considera una condición patológica. El evitar la acumulación de grasa en el hígado puede bloquear o retrasar la progresión del hígado graso a hepatitis o fibrosis (91), y en este sentido, los PUFA  $\omega$ -3 serían beneficiosos.

Los PUFA  $\omega$ -3, además, pueden disminuir el *estado inflamatorio* (372) ya que reducen la respuesta al TNF- $\alpha$ , el cual inicia la señalización intracelular que lleva a la activación de la caspasa y apoptosis, liberación de ROS y aumento en la permeabilidad mitocondrial (371,373). La adición de PUFA a la dieta,

además, reemplaza una parte del AA en las membranas celulares por EPA y DHA, lo que lleva a una menor producción de mediadores derivados del AA (371). Además, ácidos grasos PUFA  $\omega$ -3 pueden suprimir la producción de citocinas proinflamatorias y modular la expresión de moléculas de adhesión a nivel de expresión génica (374).

En ratones, la administración de estos ácidos grasos disminuye el TNF- $\alpha$  hepático y restaura la expresión del PPAR- $\alpha$  hepático, mejora el hígado graso y el grado de daño hepático (52); y en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, los PUFA  $\omega$ -3 previenen la resistencia a la insulina tanto en hígado como en músculo (375).

Se ha observado que en la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico la depleción de PUFA  $\omega$ -3 contribuye al desarrollo de NAFLD (371). Por otra parte, se ha descrito deficiencia de ácidos grasos  $\omega$ -3 en pacientes con cirrosis hepática, no sólo por la alteración funcional del hígado, sino por la misma desnutrición (376,377); y depleción de PUFA  $\omega$ -3 en el tejido hepático de los pacientes con NASH (378), por lo que esperarían tres eventos:

- a) Aumento en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos con respecto a la oxidación de ácidos grasos.
- b) Disminución en la exportación de triglicéridos del hígado, ya que no se estimula el PPAR- $\alpha$  (por la misma deficiencia de PUFA) para que secrete apolipoproteína B-100, que es proteína limitante en la síntesis de VLDL en el hígado.
- c) Aumento de la relación PUFA  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 en suero por depleción de PUFA  $\omega$ -3, lo que también altera la actividad del PPAR- $\alpha$  hepático y se asocia a un mayor aumento de FFA circulantes, disminución de la  *$\omega$ -oxidación microsómica* y de la  *$\beta$ -oxidación peroxisómica y mitocondrial*, menor síntesis de VLDL y aumento en los factores de transcripción lipogénicos (SREBP-1c) (184,185).

En un estudio se administró a 42 pacientes con NAFLD una cápsula con 1 g PUFA  $\omega$ -3/día durante 12 meses que mejoró la glucemia en ayunas, los triglicéridos séricos y redujo la relación PUFA  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 y el AA circulantes, acompañado de una disminución en la ALT y GGT (185). Desafortunadamente, como en muchos estudios terapéuticos de NAFLD en humanos, no se comprobó histológicamente la regresión de la lesión, aún cuando ecográficamente se observó menos esteatosis. En otro estudio, 20 pacientes recibieron 2 g PUFA $\omega$ -3/día durante 6 meses y se pudo observar un menor contenido de lípidos en hígado (por ultrasonografía también), además de una disminución de ALT, TNF- $\alpha$  sérico, un mejoramiento en la resistencia a la insulina, un aumento en la adiponectina sérica y en su síntesis en adipocitos y una normalización en la expresión nuclear de PPAR- $\alpha$ , todo ello llevando a una disminución en la síntesis de colesterol y acumulación de triglicéridos (371).

La activación *farmacológica* del PPAR- $\alpha$  contrarresta la esteatosis al *incrementar* la *oxidación de ácidos grasos*; sin embargo, no ataca la causa de la acumulación anormal de lípidos hepáticos. En cambio, los *ligandos* que se encuentran *normalmente* en organismo, como los PUFA  $\omega$ -3, *activan* simultáneamente la *oxidación de ácidos grasos* e *inhiben* la *síntesis de ácidos grasos* por inhibición de la expresión y translocación nuclear de la SREBP-1c y de la ChREBP (379,380).

Los PUFA  $\omega$ -3 *mejoran* la *sensibilidad a la insulina* en ratas (381), y además *reducen* el contenido de *triglicéridos intrahepáticos* y mejoran la esteatohepatitis en ratones (53) y ratas (382). Los PUFA  $\omega$ -3 disminuyen la síntesis de los ácidos grasos que pueden ser sintetizados *de novo* por enzimas lipogénicas, como el ácido palmítico (C16:0), el palmitoléico (C16:1n7) y el oléico (C18:1n9). Debido a que éstos son los ácidos grasos predominantes en el hígado, hay una reducción general en el contenido total de ácidos grasos (53).

El tratamiento de la NAFLD en un modelo inducido por dieta alta en grasa con PUFA  $\omega$ -3 (52) aumenta la síntesis de adiponectina en tejido adiposo y las concentraciones plasmáticas (52,383) y mejora la expresión nuclear de PPAR- $\alpha$  hepático, por lo que se acumulan menos triglicéridos; asimismo, se reduce el mRNA del TNF- $\alpha$  hepático, la necroinflamación y los cuerpos apoptóticos.

Los PUFA  $\omega$ -3 tienen, por tanto, un doble papel protector en la NASH: aumentan la expresión de PPAR- $\alpha$  en el hígado y mejoran la relación adiponectina/TNF- $\alpha$  hacia un perfil antiesteatogénico y antiinflamatorio similar al que se observa en pacientes con NAFLD a los que se les trata con aceite de pescado y que mejoran el grado de esteatosis y los valores de ALT (384).

No obstante, existe la controversia de que, al activar el PPAR- $\alpha$  hepático, los PUFA  $\omega$ -3 no sólo disminuyan la expresión de genes lipogénicos, sino que también induzcan la L-FABP (responde al PPAR- $\alpha$  y favorece la captación hepática de ácidos grasos, exponiéndolos a la oxidación de ácidos grasos de los hepatocitos), la acil-CoA oxidasa, el CYP y la proteína desacopladora -2 (UCP-2), lo que favorece la lipoperoxidación (385), causante del daño hepatocelular lipotóxico y el reclutamiento inflamatorio, hecho que demerita la protección que podría haber conferido la activación del PPAR- $\alpha$ . Por otra parte, los lipoperóxidos de los PUFA generan derivados aldehídicos (MDA y 4-hidroxinonenal) que son más persistentes que los ROS mismos y dañan organelos más distantes, causando muerte celular. Estos activan las células estelares fibrogénicas en el hígado y son quimiotácticos para los neutrófilos, reclutando células inmunológicamente activas para iniciar la respuesta inflamatoria.

Por último, recientemente, se ha identificado una nueva familia de mediadores de lípidos bioactivos generados a partir del DHA que ejercen potentes efectos antiinflamatorios (386). Estos disminuyen la necroinflamación en un modelo por tetracloruro de carbono, disminuye el stress oxidativo, la liberación de TNF- $\alpha$  y la expresión de COX-2 y PGE2. La intervención dietética con DHA y/o EPA

controla la inflamación (inhibe la infiltración por polimorfonucleares, la migración de células T, y reduce la formación de citocinas y quimiocinas y la activación de NFκB inducida por IL-1) sin efectos secundarios y pueden emplearse como profilaxis en artritis reumatoide, fibrosis quística, colitis ulcerosa, asma, aterosclerosis, cáncer y enfermedad cardiovascular.

Los triglicéridos de cadena media (MCT) también tienen características metabólicas que los hacen atractivos en los pacientes con acúmulo hepático de grasa. A diferencia de los LCFA habituales en la dieta, no requieren la formación de micelas para solubilizarse y se absorben directamente por vía portal, alcanzando el hígado e incorporándose a las mitocondrias sin necesidad del concurso de la carnitina. Son, por tanto, un sustrato energético de rápida utilización con nula (o muy escasa) posibilidad de ser almacenados (387). Estas propiedades parecen particularmente relevantes en pacientes con NASH avanzada (con fibrosis e hipertensión portal) si se tiene en cuenta que recientemente se ha demostrado que los pacientes cirróticos absorben una parte de los LCFA de la dieta directamente por vía *portal*, acumulándose en el hígado de donde no pueden ser exportados (388). Teóricamente, el que las grasas se absorban por vía portal y no por vía linfática en la cirrosis hepática puede deberse a:

- a) Esteatorrea: por:
  - Insuficiencia pancreática exócrina (sólo en alcohólicos).
  - Déficit de ácidos biliares.
- b) Hipertensión en el territorio linfático esplácnico (congestión para intentar corregir la disminución de la volemia efectiva secundaria a la vasodilatación arteriolar esplácnica causada por la cirrosis).

Esta absorción portal ya había sido demostrada en animales de experimentación así como en humanos en situación de déficit de función micelar, y no se podría descartar que tuviera también lugar en sujetos sanos. El consumo de MCT, por otro lado, incrementa el gasto energético, disminuye el apetito y contribuye así en la prevención y tratamiento de la obesidad (387). Por último, y no por ello menos importante, el uso de triglicéridos de cadena media en sustitución de los LCFA para disminuir la inducción del CYP 2E1 por alcohol es un enfoque terapéutico debidamente comprobado en la enfermedad hepática alcohólica y, por ello, su uso se ha generalizado (389).

La administración rápida de PUFA ω-3 puede estar indicada en algunas situaciones agudas dado que estos ácidos grasos disminuyen la respuesta inflamatoria y la sensibilidad celular a varios estímulos y además mejoran la disfunción endotelial (390). Para lograr estos objetivos, se requiere que la concentración de PUFA ω-3 aumente rápidamente en las membranas celulares de los órganos *clave*. Las emulsiones intravenosas de aceite de pescado constituyen una fuente excelente de éstos; sin embargo, su hidrólisis limita su velocidad de infusión. Las mezclas que contienen triglicéridos provenientes de aceite de pescado y MCT se depuran rápidamente del plasma y hacen llegar eficientemente PUFA ω-3 a diferentes tejidos (391). Se ha observado también que otro efecto benéfico de la mezcla MCT-PUFA ω-3 es que favorece la oxidación de ácidos grasos y su movilización del tejido adiposo sin efectos

adversos aparentes, tal y como se demostró en un estudio reciente en voluntarios sanos a corto plazo en quienes la administración de una fórmula que aportó 1500 Kcal/día (72% de MCT y 22% de PUFA  $\omega$ -3)(392).

## 2. Planteamiento del problema.

La NAFLD se desarrolla por resistencia a la insulina, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y alteraciones en el metabolismo de lípidos y regulación de citocinas, entre otros factores. Aún cuando el modelo inducido por la dieta DCM subraya la importancia del estrés oxidativo en la patogénesis de esta enfermedad (independientemente de la obesidad) y probablemente no replica el fenotipo o los mecanismos patogénicos de la NAFLD relacionada con el síndrome metabólico, se requiere descartar la participación de hormonas como la leptina y adiponectina en este modelo.

La deficiencia de *leptina* causa resistencia a la insulina en diversos modelos de NAFLD y puede tanto promover la progresión de *esteatosis* a *esteatohepatitis* como proteger contra la cirrosis por hepatotóxicos (es necesaria para una adecuada respuesta fibrótica). La administración de leptina disminuye la esteatosis y mejora la resistencia a la insulina. Es probable que en el modelo de NAFLD inducida por dieta DCM la producción de leptina y la funcionalidad de sus receptores sean normales, ya que se observa histológicamente un aumento en la fibrosis; no obstante, es necesario constatar la interrelación entre la leptina, la resistencia a la insulina y el desarrollo de NASH en este modelo.

La *adiponectina* es un factor antiinflamatorio y antifibrogénico en el hígado esteatótico. La *hipoadiponectinemia* es característica del consumo crónico de alcohol y de la NASH, y al corregirla mejora la histología; por otra parte, la *hiperadiponectinemia* no indica necesariamente que el hígado esté protegido de la inflamación y puede, en cambio, ser reflejo de la afección hepática. A pesar de su importante papel, pocos son los estudios que se han realizado sobre esta adipocitocina en un modelo de NAFLD inducido por DCM.

La participación del *TNF- $\alpha$*  en el síndrome metabólico es inequívoca; sin embargo, su importancia en la NAFLD es motivo de debate, y aunque la mayoría de los estudios en humanos y modelos animales demuestran su *elevación* y se reconoce como mediador de distintas formas de daño hepático (esteatohepatitis, inclusive), en otros estudios se menciona que no es necesario para el desarrollo de la enfermedad. Es probable que en este modelo el *TNF- $\alpha$*  ejerza un papel importante pero éste debe confirmarse.

Existe también evidencia de un aumento de lipoperoxidación en la NASH, y aunque la mayoría de los estudios (muchos, experimentales) lo demuestra por la elevación de la concentración de MDA, otros estudios no han encontrado diferencias entre las personas con y sin NASH.

El papel de la carnitina y sus aciltransferasas, fundamentales en el catabolismo de ácidos grasos, no se ha estudiado prácticamente en la NAFLD. Hasta la fecha la mayor parte de la literatura se refiere a la CPT-1 y generalmente no se mencionan la CPT-2 o las concentraciones de la carnitina libre o esterificada (acilcarnitina) y su relación con el contenido total de carnitina. El análisis del contenido de carnitina puede reflejar su síntesis endógena a partir de sus precursores, y el de las acilcarnitinas en forma subrogada reflejar directamente

la actividad de la CPT-1 (a mayor actividad de la CPT-1, más acilcarnitina) o bien guardar una relación inversa con la CPT-2 (a menor actividad de la CPT-2, más acilcarnitina). Cabe la posibilidad que la dieta DCM aumente, paradójicamente, la actividad tanto de la CPT-1 como de la CPT-2 y con ello se modifique el curso de la NASH inducida, pero esto debe analizarse.

El estudio de la participación de los lípidos en la fisiopatología de muchas enfermedades reviste cada vez más importancia, sobre todo actualmente que se ha reconocido que, más que la cantidad de grasa, su composición es la que puede influir definitivamente en su papel fisiopatogénico, profiláctico y/o terapéutico.

Los PPARs son un blanco terapéutico potencial para el síndrome metabólico y sus componentes individuales. La activación del PPAR- $\alpha$  por medio de PUFA  $\omega$ -3 puede reducir la concentración de triglicéridos hepáticos y reprimir las vías del NF- $\kappa$ B y, por tanto, la expresión de *mediadores inflamatorios*, disminuyendo el mRNA del TNF- $\alpha$  hepático, la necroinflamación y los cuerpos apoptóticos; los PUFA  $\omega$ -3 aumentan también la síntesis de adiponectina en tejido adiposo y su concentración plasmática. Por todo lo anterior, los PUFA- $\alpha$  mejoran potencialmente la esteatohepatitis. En teoría, sin embargo, los PUFA  $\omega$ -3 también inducen enzimáticamente la  $\omega$  y  $\beta$ -oxidación, por lo que se favorecería la evolución de la esteatosis a NASH.

Hasta la fecha, no se ha investigado el papel específico del *DHA* en la NAFLD, pero la posibilidad de que sus mediadores de lípidos bioactivos disminuyan la necroinflamación y stress oxidativo abre una posibilidad terapéutica en la NAFLD. El *EPA*, asimismo, incrementa la expresión y actividad de la CPT-1 en los hepatocitos, por lo que aumenta el ingreso de ácidos grasos a la *mitocondria* y así disminuyen los sustratos para la lipogénesis. Es posible, por tanto, que su uso conjunto prevenga el desarrollo de NASH. Existe evidencia clínica de que la administración de PUFA  $\omega$ -3 durante un año mejora los parámetros metabólicos, enzimáticos y ecográficos, pero esto no se ha comprobado debidamente en muestras histológicas.

Recientemente, se ha demostrado que en la cirrosis hepática una parte de los LCFA llega por vía portal al hígado, y al estar este órgano afectado, no pueden ser exportados, por lo que se convierten en sustratos importantes para la lipoperoxidación. En estas condiciones los MCT podrían ser beneficiosos, ya que se oxidan rápidamente sin necesidad del concurso de la carnitina y tienen muy escasa posibilidad de ser almacenados. Además, cuando los MCT sustituyen a los LCFA disminuye la inducción del CYP 2E1.

### 3. Justificación.

La NAFLD es una afección hepática asociada con la obesidad y diabetes mellitus. Debido a la alta prevalencia de estas dos enfermedades a nivel mundial y a la toma de conciencia relativamente reciente de su asociación con esta enfermedad hepática, su detección ha aumentado considerablemente, hasta el punto de que cada vez más se le reconoce como la principal causa de disfunción hepática y cirrosis en población no alcohólica y sin infección por virus de hepatitis C (92). La NASH es una importante causa de cirrosis hepática y está relacionada con el carcinoma hepatocelular (52), alteraciones en la regeneración hepática después de una resección parcial y la recidiva de enfermedad hepática en pacientes postransplantados. Aún cuando su diagnóstico debe confirmarse a través de biopsia hepática, se calcula que del 15 al 39% de la población general puede presentar NAFLD (93,94) y NASH el 2% de la misma (95). Existen hallazgos histológicos de NAFLD hasta en una de cada cinco autopsias, y una cuarta parte de los donadores de hígado presentan algún grado de esta enfermedad.

La NAFLD afecta principalmente a la población que se encuentra en sus mejores años de vida productiva y, con el alarmante incremento de la obesidad infantil, empieza a detectarse en niños desde los 10 años de edad. Los costos generados por la atención médica de esta enfermedad, así como la pérdida de calidad de vida y de productividad hacen que la NAFLD sea un preocupante problema en términos de salud pública.

Existen diversos tratamientos para la NASH que básicamente intentan mejorar la resistencia a la insulina o prevenir el daño oxidativo. La modificación de composición del tipo de grasa de la dieta constituye un enfoque fundamentado teóricamente y experimentalmente que, por ser también accesible e innovador, conviene investigar. De ser efectivo, constituiría una opción de muy bajo costo y que podría implementarse en forma muy sencilla modificando la composición de la dieta o sugiriendo suplementos de ácidos grasos.

Los pacientes con NAFLD tienen un menor contenido de PUFA  $\omega$ -3 en hígado que las personas sanas (184). Los PUFA  $\omega$ -3, agonistas de los PPAR- $\alpha$ , son reguladores negativos de la lipogénesis hepática que disminuyen la esteatosis hepática y atenúan la respuesta inflamatoria mediada por TNF- $\alpha$  en ratones; y la ALT, trigliceridemia, TNF- $\alpha$  plasmático y la esteatosis en el hombre, aunque esto último sólo se demostró por ultrasonografía (371). Por otra parte, el uso de ácidos grasos saturados (aceite de palma y MCT) en un modelo de AFLD mejora la histología, disminuye la concentración de endotoxinas y la lipoperoxidación, no se detecta activación de NF- $\kappa$ B y disminuye la expresión de TNF- $\alpha$  y COX-2; por tanto, revierte la necrosis, inflamación y fibrosis producida por el alcohol (393).

Con el objeto de conocer más acerca de la fisiopatología de la enfermedad y comprobar histológicamente el efecto de esta intervención, se desarrolló un modelo murino en el que se pudieran cumplir estos objetivos de forma más inmediata y controlada que en pacientes con esta enfermedad.

#### 4. Hipótesis.

- Si los *PUFA*  $\omega$ -3 activan los PPAR- $\alpha$ , podrían prevenir o mejorar la NASH al:
  - ❖ Aumentar la  $\beta$ -oxidación y, por tanto, reducir la cantidad de ácidos grasos en hígado que serían esterificados para ser convertidos en triglicéridos, disminuyendo el contenido de triglicéridos hepáticos.
  - ❖ Suprimir la producción de citocinas proinflamatorias.
  - ❖ Aumentar la síntesis de adiponectina y, por ello, disminuir la expresión del TNF- $\alpha$ , posiblemente restituir la expresión de CPT-1 y aumentar (también por esta vía) la oxidación de ácidos grasos en el hígado.
- Si los *PUFA*  $\omega$ -3 inhiben los SREBP-1c, podrían prevenir o mejorar la NASH al disminuir la lipogénesis.
- Si los *MCT* no requieren carnitina para ser oxidados, podrían ser rápidamente oxidados, disminuyendo su acumulación en hígado y así podrían prevenir o mejorar la NASH.
- Si los *MCT* están compuestos por ácidos grasos con bajo grado de insaturación, podrían sustituir a los *PUFA* en hígado, por lo que disminuiría el stress oxidativo y así podrían prevenir o mejorar la NASH.

## 5. Objetivos.

### 5.1. Objetivo general.

Observar el efecto de los triglicéridos de cadena media (MCT) y ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 (PUFA  $\omega$ -3) en la prevención y tratamiento de la fibrosis hepática en un modelo murino (ratones C57BL/6 de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) inducido por dieta deficiente en colina y metionina (DCM).

### 5.2. Objetivos específicos.

1. En el *modelo* estudiado:

a) Comprobar su validez, principalmente a través de la histología hepática, y adicionalmente por la alteración de las pruebas de función hepática y pérdida de peso de los ratones.

b) Estudiar el comportamiento de diferentes parámetros involucrados en la NAFLD:

- El peso corporal, el peso hepático y el peso hepático relativo.
- Las pruebas de función hepática [concentración de bilirrubina total, bilirrubina directa, alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) y albúmina].
- La química sanguínea (concentración plasmática de glucosa, triglicéridos y colesterol).
- La concentración plasmática de insulina, leptina y adiponectina.
- La concentración plasmática de carnitina libre, acilcarnitinas y la actividad hepática de la CPT-2.
- La concentración hepática de malondialdehído.
- La concentración plasmática de citocinas proinflamatorias (IL-1  $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ).
- La acumulación hepática de lípidos (cuantitativa e histológica).
- La necroinflamación y fibrosis hepáticas.

c) El tipo de alteraciones que se han desarrollado a las 6 y 10 semanas.

2. En los *grupos experimentales*:

a) Conocer el efecto diferencial de los MCT y PUFA  $\omega$ -3 en las anteriores variables.

b) Verificar la utilidad profiláctica y terapéutica de los MCT y PUFA  $\omega$ -3.

3. En la membrana celular:

a) Constatar que la variación de los parámetros estudiados se debe al efecto de la manipulación de los ácidos grasos en las dietas experimentales a

través de la medición de su incorporación en la membrana eritrocitaria (*vide infra*).

- b) Comprobar que los MCT son capaces de incorporarse a la membrana celular.

## **6. Material y métodos.**

### **6.1. Diseño experimental.**

Estudio experimental en dos fases a medio plazo en 92 ratones CB57/BL6 en los que se indujo NASH por medio de la administración de una dieta deficiente en colina y metionina, con o sin alteración en la composición de ácidos grasos, y que fueron seguidos durante 6 semanas (“fase de prevención”) o 10 semanas (“fase de tratamiento”). De esta forma, se obtuvieron 5 grupos experimentales por cada tiempo de observación:

Grupo 1 o STD: dieta estándar [la formulación original contenía aceite de maíz, (PUFA  $\omega$ -6)].

Grupo 2 o DCM: dieta deficiente en colina y metionina sin modificación de la grasa.

Grupo 3 o MCT: dieta deficiente en colina y metionina sustituyendo parcialmente el aceite de maíz por MCT.

Grupo 4 o PUFA: dieta deficiente en colina y metionina sustituyendo parcialmente el aceite de maíz por PUFA  $\omega$ -3.

Grupo 5 o MP: dieta deficiente en colina y metionina sustituyendo parcialmente el aceite de maíz por una mezcla 50:50 MCT/PUFA  $\omega$ -3.

### **6.2. Metodología.**

#### **6.2.1. Experimentación con ratones.**

##### *Condiciones pre-experimentales*

Se obtuvieron 92 ratones C57/BL6 (anexo 1) de los laboratorios Harlan Ibérica (edad: 4 semanas; peso: entre 18 y 20 g). Se permitió que se aclimataran a las condiciones de estabulación (humedad del 50-60%, ciclo luz-oscuridad de 16-8 horas) durante tres semanas en jaulas de alambre. Se proporcionó agua y una dieta de composición normal para roedor *ad libitum* durante este período. Se pesó a los ratones semanalmente en balanza granataria con una precisión en décimas de gramos.

##### **6.2.1.1. Inducción de la hepatopatía.**

Se indujo NASH por medio de la administración de una dieta deficiente en colina y metionina (DCM) y con el doble del requerimiento mínimo de grasa (10% en lugar de 5%) (anexo 2).

##### **6.2.1.2. Maniobra preventiva.**

La duración de esta fase fue de 6 semanas.

Grupo control: 6 ratones alimentados con dieta estándar (5% grasa como aceite de maíz).

Grupo DCM: 10 ratones alimentados con dieta DCM (10% grasa como aceite de maíz).

Grupo MCT: 10 ratones alimentados con dieta DCM modificada con MCT (10% grasa, sustituyendo el 75% del aceite de maíz por MCT).

Grupo PUFA: 10 ratones alimentados con dieta DCM modificada con PUFA (10% grasa, sustituyendo el 75% del aceite de maíz por PUFA).

Grupo MP: 10 ratones alimentados con dieta DCM modificada con MCT y PUFA (10% grasa, sustituyendo el 75% del aceite de maíz por una mezcla 50:50 de MCT y PUFA, es decir, 37.5% de cada tipo de grasa).

Se permitió el acceso libre a la alimentación y agua y se pesaron semanalmente los ratones a lo largo de esta fase en balanza granataria con una precisión en décimas de gramos.

### **6.2.1.3. Maniobra terapéutica.**

La duración de esta fase fue de 10 semanas.

Se administró durante 6 semanas a 6 ratones una dieta estándar, con 5% grasa como aceite de maíz y a 40 ratones la dieta DCM, con 10% grasa como aceite de maíz.

Grupo control: los 6 ratones continuaron 4 semanas más con la dieta estándar.

Grupo DCM: los 10 ratones continuaron 4 semanas más con dieta DCM (10% grasa como aceite de maíz).

Grupo MCT: los 10 ratones continuaron 4 semanas más con dieta DCM modificada con MCT (10% grasa, sustituyendo el 75% del aceite de maíz por MCT).

Grupo PUFA: los 10 ratones continuaron 4 semanas más con dieta DCM modificada con PUFA (10% grasa, sustituyendo el 75% del aceite de maíz por PUFA).

Grupo MP: los 10 ratones continuaron 4 semanas más con dieta DCM modificada con MCT y PUFA (10% grasa, sustituyendo el 75% del aceite de maíz por una mezcla 50:50 de MCT y PUFA, es decir, 37.5% de cada tipo de grasa).

Al igual que en la fase de prevención, se permitió el acceso libre a la alimentación y agua y se pesaron semanalmente los ratones a lo largo de esta fase.

### **6.2.2. Sacrificio.**

Al final de ambas fases del estudio se anestesiaron los ratones y se sacrificaron por sobredosis de fluotano. Se realizó punción cardiaca para la obtención del máximo volumen de sangre y se agregó anticoagulante a la misma, centrifugándola para obtener el plasma. Este fue repartido en dos tubos Eppendorf previamente etiquetados y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Se extrajo el hígado, pesándolo y dividiéndolo en cinco porciones: cuatro de ellas (una para medición de triglicéridos, otra para medición de MDA, otra para medición de la actividad de la CPT-2 y otra para histología) fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$  e introducidas por separado en tres tubos Eppendorf previamente etiquetados para ser conservadas a  $-80^{\circ}$

C. La última porción fue fijada en una solución de formaldehído al 4% tamponado para el análisis posterior de los lípidos hepáticos.

### **6.2.3. Análisis de parámetros.**

#### **6.2.3.1. Pruebas de función hepática.**

Se analizaron las concentraciones de bilirrubina total, bilirrubina directa, alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) y albúmina por medio de un analizador automático Modular DP (Roche Diagnostics). La bilirrubina total y la directa fueron medidas por diazorreacción; la ALT, AST y FA por optimización de la IFCC y la albúmina por el método del verde bromocresol. Las bilirrubinas total y directa se midieron en  $\mu\text{M/l}$ ; la ALT, AST y FA en U/l y la albúmina en g/l.

#### **6.2.3.2. Química sanguínea.**

Se analizaron las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma por medio de un analizador automático Modular DP (Roche Diagnostics). La glucosa fue medida por la técnica de la hexoquinasa y tanto los triglicéridos como el colesterol por el método enzimático Trinder. Tanto la glucosa como los triglicéridos y colesterol se midieron en mM/l.

#### **6.2.3.3. Hormonas en plasma: insulina, leptina y adiponectina.**

##### Fundamento

Los *kits* de ELISA para la cuantificación no radioactiva de hormonas en suero se basan en la cuantificación de la actividad enzimática de la peroxidasa que se une a anticuerpos policlonales biotinilados previamente unidos a la hormona a analizar en la muestra. Los ensayos están basados en la formación de un ELISA tipo *sandwich* que se produce de acuerdo a la siguiente secuencia:

1. Captura de las moléculas de la hormona de la muestra en los pocillos de una placa de microtitulación cubierta por un cantidad pretitulada (conocida) de anticuerpos monoclonales ratón anti-rata (para la insulina), antisuero (para la leptina) o anticuerpos monoclonales anti-ratón Acrp30 (para la adiponectina).
2. Unión de unos segundos anticuerpos policlonales biotinilados a la hormona capturada (inmovilizada en la placa)
3. Eliminación por lavado del material no unido.
4. Conjugación de los anticuerpos biotinilados inmovilizados con la peroxidasa de raíz fuerte (*horseradish*).
5. Eliminación por lavado de los conjugados de enzima libres.
6. Cuantificación de los conjugados anticuerpo-enzima inmovilizados por medio de la medición de la actividad de la peroxidasa de *horseradish* en presencia del sustrato 3,3',5,5' tetrametil bencidina. La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente como el aumento en la absorbancia a
7. 450 nm, corregido de la absorbancia a 590 nm, después de la acidificación de los productos formados. Debido a que el aumento en la absorbancia es

directamente proporcional a la cantidad de insulina, leptina y adiponectina capturadas en la muestra desconocida, la concentración de éstas se puede calcular a partir de la interpolación de este valor a una curva de referencia generada en el mismo ensayo para cada hormona a partir de estándares de referencia de concentraciones conocidas de insulina de rata, leptina de ratón y adiponectina de ratón, respectivamente.

A continuación se describirá el procedimiento y los cálculos para cuantificar cada una de las hormonas. En el anexo 3 se mencionan el material necesario, la interpretación de los cálculos y las características de la prueba para cada una de las hormonas.

### Medición de insulina de rata/ratón por técnica de ELISA

#### Procedimiento

1. Precalentar todos los reactivos antes de iniciar el ensayo.
2. Diluir el buffer de lavado concentrado TBS 10X diez veces con agua desionizada.
3. Retirar la envoltura de plástico aluminizado de la placa de ensayo de microtitulación y lavar cada pocillo 3 veces con 300 µl solución TBS diluida por lavado. Decantar el buffer de lavado y eliminar el residuo de los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre toallas absorbentes varias veces. No dejar que los pocillos se sequen antes de proceder a las siguientes fases.
4. Transferir la solución de anticuerpo de detección (biotinilado) a un reservorio para reactivos y agregar 80 µl de esta solución a cada pocillo por medio de una pipeta multi-canal.
5. Esquematizar en una hoja aparte la distribución de los pocillos de la placa (designar los pocillos “blanco”, los “estándar X”, los controles y los de las muestras).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco	0.2 ng/ml	0.2 ng/ml	0.5 ng/ml	0.5 ng/ml	1 ng/ml	1 ng/ml	2 ng/ml	2 ng/ml	5 ng/ml	5 ng/ml
B	10 ng/ml	10 ng/ml	QC1	QC1	QC2	QC2	M1	M2	M3	etc...		
C												
D												
E												
F												
G												
H												

QC = control de calidad.

M = muestra

6. Agregar 10 µl solución matriz a los pocillos designados para los blancos, estándares y controles.
7. Agregar 10 µl buffer de prueba a los pocillos designados para los blancos.

8. Agregar por duplicado 10  $\mu\text{l}$  de cada uno de los distintos estándares de insulina de rata de acuerdo de acuerdo al esquema anterior a los pocillos designados para los estándares correspondientes a estas concentraciones ascendentes.
9. Agregar 10  $\mu\text{l}$  solución QC1 y 10  $\mu\text{l}$  solución QC2 a los pocillos designados "QC1" y "QC2", respectivamente.
10. Agregar secuencialmente alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de las muestras a analizar por duplicado a los pocillos restantes. Para optimizar resultados, este procedimiento debe completarse en no más de una hora. Cubrir la placa con el sellador de placas e incubar a temperatura ambiente por 2 horas en un agitador orbital de placas de microtitulación programado para rotar a velocidad moderada, a 400-500 rpm.
11. Retirar el sellador de la placa y decantar las soluciones de la placa. Golpear ligeramente como se hizo con anterioridad para eliminar las soluciones residuales en los pocillos.
12. Lavar los pocillos tres veces con buffer de lavado diluido TBC, 300  $\mu\text{l}$  por pocillo por lavado. Decantar y golpear ligeramente después de cada lavado para eliminar el buffer residual.
13. Agregar 100  $\mu\text{l}$  solución enzimática a cada pocillo. Cubrir la placa con el sellador e incubar con agitación moderada a temperatura ambiente por 30 minutos en el agitador de placas de microtitulación.
14. Retirar el sellador, decantar las soluciones de la placa y golpear ligeramente la placa para eliminar el líquido residual.
15. Lavar los pocillos 6 veces con buffer TBS diluido, 300  $\mu\text{l}$  por pocillo por lavado. Decantar y golpear ligeramente después de cada lavado para eliminar el buffer residual.
16. Agregar 100  $\mu\text{l}$  solución de sustrato a cada pocillo, cubrir la placa con el sellador y agitar en el agitador de placas por 15 minutos. En estos momentos se desarrolla un color azul en los pocillos de los estándares de insulina cuya intensidad es proporcional a las concentraciones crecientes de insulina. Retirar el sellador y agregar 100  $\mu\text{l}$  de solución de terminación con precaución, ya que es una solución corrosiva. Agitar la placa a mano para asegurar la mezcla completa de la solución en todos los pocillos. El color azul se volverá amarillo por la acidificación. Leer la absorbancia a 450 nm y a 590 nm en un lector de placas dentro de los siguientes 5 minutos y asegurarse de que no existan burbujas de aire en ningún pocillo. Registrar la diferencia de absorbancia. Alternativamente, el incremento en el color azul puede registrarse a 630 nm y agregar la solución de terminación cuando la absorbancia de los estándares mayores llegue a 0.8-0.9.

### Cálculos

La curva dosis-respuesta de este ensayo se ajusta mejor a una ecuación logística de 4 o 5 parámetros. Las concentraciones desconocidas de las muestras se calcularon con Excel. Se graficó la curva de referencia para la interpretación de muestras considerando las unidades de absorbancia de 450 nm (excepto la de 590 nm) en el eje de las Y contra la concentración de los estándares de insulina de rata/ratón en el eje de las X. Se obtuvo la recta de regresión, y para calcular la concentración de insulina se despejó el valor de x,

sustituyendo el valor de y (el promedio del duplicado) por la diferencia entre la absorbancia de la muestra y del blanco. La insulina se midió en ng/ml.

### Medición de leptina de ratón por técnica de ELISA

#### Procedimiento

1. Precalentar todos los reactivos antes de iniciar el ensayo.
2. Diluir el buffer de lavado concentrado 10X diez veces mezclando el contenido de las dos botellas del buffer con 900 ml agua desionizada.
3. Retirar la envoltura de plástico aluminizado de la placa de ensayo de microtitulación y lavar cada pocillo 3 veces con 300 µl solución TBS diluida por lavado. Decantar el buffer de lavado y eliminar el residuo de los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre toallas absorbentes varias veces. No dejar que los pocillos se sequen antes de proceder a las siguientes fases.
4. Esquematizar en una hoja aparte la distribución de los pocillos de la placa (designar los pocillos “blanco”, los “estándar X”, los controles y los de las muestras).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco	0.2 ng/ml	0.2 ng/ml	0.5 ng/ml	0.5 ng/ml	1 ng/ml	1 ng/ml	2 ng/ml	2 ng/ml	5 ng/ml	5 ng/ml
B	10 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml	30 ng/ml	30 ng/ml	QC1	QC1	QC2	QC2	M1	M2
C	M3	etc..										
D												
E												
F												
G												
H												

QC = control de calidad.

M = muestra

5. Agregar 30 µl buffer de prueba a los pocillos designados para los blancos, estándares y controles. Agregar 40 µl buffer de prueba a los pocillos designados para las muestras.
6. Agregar 10 µl solución matriz a los pocillos designados para los blancos, estándares y controles.
7. Agregar 10 µl buffer de prueba a los pocillos designados para los blancos y agregar por duplicado 10 µl de cada estándar de leptina de ratón en orden ascendente de acuerdo a su concentración.
8. Agregar 10 µl QC1 y 10 µl QC2 a los pocillos designados “QC1” y “QC2”, respectivamente.
9. Agregar secuencialmente alícuotas de 10 µl de las muestras por duplicado al resto de los pocillos.
10. Transferir la solución de anticuerpo de detección (biotinilado) a un reservorio para reactivos y agregar 50 µl de esta solución a cada pocillo por medio de una pipeta multi-canal. Cubrir la placa con el sellador de placas e

incubar a temperatura ambiente por 2 horas en un agitador orbital de placas de microtitulación programado para rotar a velocidad moderada, a 400-500 rpm.

11. Retirar el sellador de la placa y decantar las soluciones de la placa. Golpear ligeramente como se hizo con anterioridad para eliminar las soluciones residuales en los pocillos.
12. Lavar los pocillos tres veces con buffer de lavado diluido TBC, 300  $\mu$ l por pocillo por lavado. Decantar y golpear ligeramente después de cada lavado para eliminar el buffer residual.
13. Agregar por duplicado 100  $\mu$ l anticuerpo de detección a cada pocillo. Cubrir la placa con el sellador de placas e incubar a temperatura ambiente por 1 hora en un agitador orbital de placas de microtitulación programado para rotar a velocidad moderada, a 400-500 rpm.
14. Retirar el sellador de la placa y decantar las soluciones de la placa. Golpear ligeramente como se hizo con anterioridad para eliminar las soluciones residuales en los pocillos.
15. Lavar los pocillos tres veces con buffer de lavado diluido TBC, 300  $\mu$ l por pocillo por lavado. Decantar y golpear ligeramente después de cada lavado para eliminar el buffer residual.
16. Agregar 100  $\mu$ l solución enzimática a cada pocillo. Cubrir la placa con el sellador de placas e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en el agitador orbital de placas de microtitulación.
17. Retirar el sellador de la placa y decantar las soluciones de la placa. Golpear ligeramente como se hizo con anterioridad para eliminar las soluciones residuales en los pocillos.
18. Lavar los pocillos 6 veces con buffer TBS diluido, 300  $\mu$ l por pocillo por lavado. Decantar y golpear ligeramente después de cada lavado para eliminar el buffer residual.
19. Agregar 100  $\mu$ l solución de sustrato a cada pocillo, cubrir la placa con el sellador y agitar en el agitador de placas por 15 minutos. En estos momentos se desarrolla un color azul en los pocillos de los estándares de leptina cuya intensidad es proporcional a las concentraciones crecientes de leptina. Retirar el sellador y agregar 100  $\mu$ l de solución de terminación con precaución, ya que es una solución corrosiva. Agitar la placa a mano para asegurar la mezcla completa de la solución en todos los pocillos. El color azul se volverá amarillo por la acidificación. Leer la absorbancia a 450 nm y a 590 nm en un lector de placas dentro de los siguientes 5 minutos y asegurarse de que no existan burbujas de aire en ningún pocillo. Registrar la diferencia de absorbancia.

### Cálculos

La curva dosis-respuesta de este ensayo se ajusta mejor a una ecuación logística de 4 o 5 parámetros. Las concentraciones desconocidas de las muestras se calcularon con Excel. Se graficó la curva de referencia para la interpretación de muestras considerando las unidades de absorbancia de 450 nm (excepto la de 590 nm) en el eje de las Y contra la concentración de los estándares de leptina de ratón en el eje de las X. Se obtuvo la recta de regresión, y para calcular la concentración de leptina se despejó el valor de x,

sustituyendo el valor de  $y$  (el promedio del duplicado) por la diferencia entre la absorbancia de la muestra y del blanco. La leptina se midió en ng/ml.

## **Medición de adiponectina de ratón por técnica de ELISA**

### Procedimiento

1. Precalentar todos los reactivos antes de iniciar el ensayo.
2. Diluir las muestras de plasma 1:1000 con buffer de prueba 1X (diluyente):
  - Preparar la dilución A para cada muestra, diluyendo 10  $\mu$ l muestra en 990  $\mu$ l diluyente de muestra y mezclar bien.
  - Preparar la dilución B agregando 100  $\mu$ l dilución A a 900  $\mu$ l diluyente de muestra y mezclar bien. Usar esta dilución B (1:1000) para el procedimiento de prueba.
3. Preparar los estándares y controles de calidad:
  - Abrir cuidadosamente el vial "Standard" de estándar liofilizado.
  - Reconstituir el estándar de adiponectina de ratón agregando en el vial 1 ml agua destilada o desionizada (concentración final: 100 ng/ml). Tapar el vial e invertir, mezclando suavemente la solución. Dejar asentar 5 minutos y después mezclar bien.
  - Etiquetar 7 tubos: "50", "25", "12.5", "6.25", "3.125", "1.56" y "0.78 ng/ml".
  - Agregar 0.5 ml buffer de prueba a cada uno de los 7 viales.
  - Preparar las diluciones en serie agregando 0.5 ml del estándar reconstituido al tubo "50 ng/ml", mezclar bien y transferir 0.5 ml del tubo "50 ng/ml" al tubo "25 ng/ml", mezclar bien y transferir 0.5 ml del tubo "25 ng/ml" al tubo "12.5 ng/ml", mezclar bien y transferir 0.5 ml del tubo "12.5 ng/ml" al tubo "6.25 ng/ml", mezclar bien y transferir 0.5 ml del tubo "6.25 ng/ml" al tubo "3.125 ng/ml", mezclar bien y transferir 0.5 ml del tubo "3.125 ng/ml" al tubo "1.56 ng/ml", mezclar bien y transferir 0.5 ml del tubo "1.56 ng/ml" al tubo "0.78 ng/ml" y mezclar bien. Debe cambiarse la punta de la pipeta para cada dilución.
3. Reconstituir los viales de liofilizado de control de calidad (CQ1 y CQ2) en tubos con 1 ml agua destilada o desionizada. Invertir y mezclar suavemente, dejar asentar y mezclar bien.
4. Precalentar todos los reactivos antes de iniciar el ensayo.
5. Diluir el concentrado HRP de buffer de lavado 10X diez veces mezclando el contenido total de la botella con 450 ml agua desionizada o destilada.
6. Retirar la envoltura de plástico aluminizado de la placa de ensayo de microtitulación y lavar cada pocillo 3 veces con 300  $\mu$ l solución TBS diluida por lavado. Decantar el buffer de lavado y eliminar el residuo de los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre toallas absorbentes varias veces. No dejar que los pocillos se sequen antes de proceder a las siguientes fases.
7. Esquematizar en una hoja aparte la distribución de los pocillos de la placa (designar los pocillos "blanco", los "estándar X", los controles y los de las muestras).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanco	Blanco	0.78 ng/ml	0.78 ng/ml	1.56 ng/ml	1.56 ng/ml	3.125 ng/ml	3.125 ng/ml	6.25 ng/ml	6.25 ng/ml	12.5 ng/ml	12.5 ng/ml
<b>B</b>	25 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml	QC1	QC1	QC2	QC2	M1	M2	M3	etc...
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

QC = control de calidad.

M = muestra

8. Agregar 60 µl buffer de prueba a todos los pocillos.
9. Agregar 20 µl buffer de prueba por duplicado a los pocillos designados para los blancos.
10. Agregar 20 µl estándares de adiponectina de ratón en orden ascendente de acuerdo a su concentración.
11. Agregar 20 µl QC1 y 20 µl QC2 por duplicado a los pocillos designados "QC1" y "QC2", respectivamente.
12. Agregar secuencialmente alícuotas de 20 µl de las muestras por duplicado al resto de los pocillos.
13. Agregar 20 µl de anticuerpo de detección (biotinilado). Para optimizar resultados, este procedimiento debe completarse en no más de una hora. Cubrir la placa con el sellador de placas e incubar a temperatura ambiente por 2 horas en un agitador orbital de placas de microtitulación programado para rotar a velocidad moderada, a 400-500 rpm.
14. Retirar el sellador de la placa y decantar las soluciones de la placa. Golpear ligeramente como se hizo con anterioridad para eliminar las soluciones residuales en los pocillos.
15. Lavar los pocillos cinco veces con buffer de lavado diluido HRP, 300 µl por pocillo por lavado. Decantar y golpear ligeramente después de cada lavado para eliminar el buffer residual.
16. Agregar 100 µl solución enzimática a cada pocillo. Cubrir la placa con el sellador e incubar con agitación moderada a temperatura ambiente por 30 minutos en el agitador de placas de microtitulación.
17. Retirar el sellador, decantar las soluciones de la placa y golpear ligeramente la placa para eliminar el líquido residual.
18. Lavar los pocillos 5 veces con buffer HRP diluido, 300 µl por pocillo por lavado. Decantar y golpear ligeramente después de cada lavado para eliminar el buffer residual.
19. Agregar 100 µl solución de sustrato a cada pocillo, cubrir la placa con el sellador y agitar en el agitador de placas por 12 a 18 minutos. En estos momentos se desarrolla un color azul en los pocillos de los estándares de adiponectina cuya intensidad es proporcional a las concentraciones crecientes de adiponectina. Retirar el sellador y agregar 100 µl de solución de terminación con precaución, ya que es una solución corrosiva. Agitar la

placa a mano para asegurar la mezcla completa de la solución en todos los pocillos. El color azul se volverá amarillo por la acidificación. Leer la absorbancia a 450 nm y a 590 nm en un lector de placas dentro de los siguientes 5 minutos y asegurarse de que no existan burbujas de aire en ningún pocillo. Registrar la diferencia de absorbancia. La absorbancia del estándar más elevado de adiponectina debe ser de aproximadamente 2.2 a 2.8, o no exceder la capacidad del lector de placas que se utilice.

#### Cálculos:

La curva dosis-respuesta de este ensayo se ajusta mejor a una ecuación logística de 4 o 5 parámetros. Las concentraciones desconocidas de las muestras se calcularon con Excel. Se graficó la curva de referencia para la interpretación de muestras considerando las unidades de absorbancia de 450 nm (excepto la de 590 nm) en el eje de las Y contra la concentración de los estándares de adiponectina de ratón en el eje de las X. Se obtuvo la recta de regresión, y para calcular la concentración de adiponectina se despejó el valor de x, sustituyendo el valor de y (el promedio del duplicado) por la diferencia entre la absorbancia de la muestra y del blanco. Los resultados finales se multiplicaron por un factor de dilución de 1000. La adiponectina se midió en ng/ml.

#### **6.2.3.4. Carnitina y acilcarnitina en suero.**

##### Fundamento

La técnica para medir carnitina libre y total (la suma de la carnitina libre y acilcarnitina o carnitina esterificada) en suero se basa en la transferencia estequiométrica del grupo acilo desde el acetil-CoA marcado con  $^{14}\text{C}$  a la carnitina, en una reacción catalizada por la carnitín acetiltransferasa. La mezcla de reacción se trata con una resina de intercambio aniónico que se une a al acetil-CoA $^{14}$  que está cargado negativamente. Debido a la carga positiva de la molécula de carnitina, la acetil-CoA $^{14}$  permanece en solución, y después de ser centrifugada, puede medirse la radioactividad en un contador de centelleo líquido. El contenido de carnitina de la muestra se obtiene al comparar cada muestra con un estándar de L-carnitina. En la reacción se incluye un agente tiol capaz de reaccionar con el CoASH liberado en la reacción principal. De esta forma se evita que la reacción principal se desplace hacia la izquierda y así todo el acil-CoA se transforme en acilcarnitina.

En el ensayo sólo la carnitina libre reacciona. Para cuantificar sólo la forma esterificada de la carnitina (acilcarnitina) presente en la muestra es preciso el tratamiento mediante hidrólisis alcalina (ej: KOH 0.1 N) e incubación a temperatura entre 50 y 60 ° C. Posteriormente, se mide la carnitina tanto en la muestra hidrolizada (carnitina libre) como de la no hidrolizada (carnitina total). La diferencia de ambas es el contenido de carnitina esterificada.

## Procedimiento

- Preparación de solución A (N-etilenmaleimida 5 mM, EDTA 25 mM, HEPES 62.5 mM pH 7.8):
  - Mezclar 15.6 mg N-etilenmaleimida, 232.6 mg EDTA y 1.56 ml HEPES 1 M.
  - Llevar hasta 15 ml con agua destilada.
  - Ajustar el pH a 7.8 con NaOH 1 N (al tener 14 ml, aproximadamente).
  - Congelar alícuotas de 3.5 ml.
- Reconstituir el vial de 10 mg acetil-CoA (10 mg) con 7.905 ml agua destilada.
- Preparación de solución B (acetil-CoA  $^{14}\text{C}$ , 62.5  $\mu\text{M}$ : mezcla de acetil-CoA no marcado y marcado).
  - Agregar al vial con la solución de acetil-CoA 0.2 ml de la solución madre de acetil-CoA marcado con  $^{14}\text{C}$ .
  - Congelar alícuotas de 0.22 ml a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Preparación de la mezcla de reacción: mezclar en un vial de centelleo 3 ml solución A, 0.2 ml solución B y 1.8 ml agua.
- Seguir el siguiente esquema (por duplicado):

	<b>Carnitina total</b>	<b>Carnitina total</b>	<b>Carnitina libre</b>	<b>Carnitina libre</b>
	<i>Muestra</i>	<i>Estándar</i>	<i>Muestra</i>	<i>Estándar</i>
Suero	50 $\mu\text{l}$	-	50 $\mu\text{l}$	-
Standard L- carnitina	-	50 $\mu\text{l}$	-	50 $\mu\text{l}$
KOH 0.2 N	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	-	-

- Incubar a  $56^\circ\text{C} \pm 1.2^\circ\text{C}$  por una hora.

	<b>Carnitina total</b>	<b>Carnitina total</b>	<b>Carnitina libre</b>	<b>Carnitina libre</b>
	<i>Muestra</i>	<i>Estándar</i>	<i>Muestra</i>	<i>Estándar</i>
HEPES 0.5 M pH 7.4	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	-	-
KOH 0.2 N HEPES 0.5 M (1:1)			100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
Mezcla de reacción	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
Carnitín-aciltransferasa	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$

- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Agregar 150  $\mu\text{l}$  Dowex a todos los viales.
- Mantener 10-15 minutos a  $5^\circ\text{C}$ .
- Centrifugar 10 minutos (centrífuga refrigerada) a 4500-5000 rpm.
- Transferir 10  $\mu\text{l}$  sobrenadante de cada tubo (con punta de pipeta para radioactividad) a un vial de centelleo con 900  $\mu\text{l}$  de líquido de centelleo.

12. Registrar las cuentas por minuto (CPM) en el contador de centelleo Tri-Carb 2300 TR (Hewlett Packard PETES-315) para cada vial por separado durante 10 minutos.

### Cálculos

1. Calcular la media de las CPM de los duplicados de los estándares, blancos y muestras.
2. Establecer una relación de proporcionalidad (regla de 3) entre la CPM promedio del estándar (concentración conocida) y la CPM promedio de la muestra.
3. Calcular, por diferencia (carnitina no hidrolizada o total – carnitina hidrolizada o libre), la cantidad de acilcarnitinas. La carnitina libre y las acilcarnitinas se miden en  $\mu\text{M/l}$ .

### **6.2.3.5. Actividad de carnitín-palmitoil-transferasa 2 en hígado.**

#### Fundamento

Medición de la actividad de la carnitín-palmitoil transferasa-2 después de la inactivación de la actividad de la carnitina transferasa-1. Las muestras de hígado deben haber estado almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Procedimiento

1. Preparación de la solución saturada de sulfato de amonio:
  - Calentar el baño María a  $140^{\circ}\text{C}$  y encender el agitador magnético a temperatura máxima.
  - Colocar dentro del baño un vaso de precipitados con 25 ml agua y un imán dentro.
  - Retirar el vaso cuando llegue a  $90^{\circ}\text{C}$  y transferirlo al agitador.
  - Agregar sulfato de amonio hasta saturar la solución (cuando ya no se pueda disolver más sal, aproximadamente 7-9 cucharadas).
  - Retirar el vaso del agitador térmico para que se enfríe y vaya cristalizando.
2. Preparación de la solución detergente:
  - Disolver 1.865 g KCl en agua destilada.
  - Agregar 0.5 g Tween 20 1% (aproximadamente 500  $\mu\text{l}$ ) y completar hasta 50 ml con agua destilada.
  - Ajustar a un pH de 7.2 con aproximadamente 275  $\mu\text{l}$  NaOH 0,01 N (gota a gota). El pH debe ajustarse justo antes de ser utilizada la solución, ya que ésta es una solución no amortiguada.
3. Preparación de la solución Tris-HCl (hidroximetil aminometano-hidróxido clorhidrato-trometamol) 1 M pH 7.8.
  - Disolver 10.1 g Tris en 83.3 ml agua destilada.
  - Ajustar la solución Tris-HCl a un pH de 7.8 con HCl.
  - Congelar alícuotas de 5 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
4. Preparación de la solución de glutatión reducido 25 mM:
  - Disolver 7.8 mg glutatión reducido en 1 ml agua destilada (preparar el mismo día).

5. Preparación de la solución de palmitoil-CoA:
  - Disolver 2 mg palmitoil-CoA en 2 ml agua.
  - Congelar alícuotas de 175  $\mu$ l . A  $-20^{\circ}$  C.
6. Preparación de la solución de carnitina  $^{14}\text{C}$  12,5 mM 1.5 mCi/mmol.
  - Disolver 76 mg L-carnitina "fría" (reactivo muy higroscópico) en 2 ml agua destilada.
  - Tomar alícuotas de 100  $\mu$ l .
  - Diluir 275  $\mu$ l L-[metil- $^{14}\text{C}$ ] carnitina hidrociorada en 825  $\mu$ l agua (dilución 1:4).
  - Mezclar 74  $\mu$ l solución de carnitina "fría" y 1100  $\mu$ l solución de L-[metil- $^{14}\text{C}$ ] carnitina (esta cantidad es suficiente para 9-10 muestras por serie. Si se analizan menos muestras, puede congelarse el sobrante a  $-20^{\circ}$  C).
7. Preparación del estándar de carnitina  $^{14}\text{C}$ : diluir 12.5  $\mu$ l de L-[metil- $^{14}\text{C}$ ] carnitina con 10 ml líquido de centelleo emulsificador.
8. Solubilización de la CPT e inactivación de la CPT-1:
  - Pesar con exactitud una muestra de unos 20 mg hígado congelado.
  - Homogeneizar rápidamente y sobre hielo en el Potter la muestra de hígado con 700  $\mu$ l solución detergente.
  - Transferir a un tubo Eppendorf y mantenerlo en hielo durante 15 minutos, agitando suavemente de vez en cuando.
  - Incubar 45 minutos.
9. Reacción: durante la etapa de solubilización, preparar: dos tubos por muestra, dos tubos para los blancos (blanco de reactivo -un duplicado de blancos para un duplicado de muestras) y dos tubos para uso posterior para la muestra y blanco, una vez que se hayan centrifugado los cuatro anteriores y se haya tomado el sobrenadante, pero se recomienda dejarlos preparados), de la siguiente manera:

Cantidad	Reactivos	Concentración final
25 $\mu$ L	Tris-HCl 1 M pH 7,8	100 mM
25 $\mu$ L	glutación	2,5 mM
25 $\mu$ L	palmitoil Co A	100 mM
50 $\mu$ L	L-[metil- $^{14}\text{C}$ ] carnitina 12,5 mM	2,5 mM
50 $\mu$ L	agua	

10. Después de 45 minutos, incubar los tubos a  $37^{\circ}$  C por dos minutos.
11. Agregar a cada tubo designado para la muestra (aún en el baño María de  $37^{\circ}$  C) 75  $\mu$ L homogenado (para los tubos designados para las muestras) cada 30 segundos o 75  $\mu$ L agua para los tubos designados para los blancos.
12. Incubar cada tubo exactamente 5 minutos.
13. Detener la reacción agregando 0.5 ml isobutanol en el mismo orden y cada 30 segundos a cada tubo, para respetar los 5 minutos exactos de incubación.
14. Agitar fuertemente cada tubo, agregar rápidamente 0.5 ml sulfato de amonio saturado a todos los tubos y agitar en el vórtex.
15. Extracción:
  - Tapar los tubos y agitarlos con cuidado.
  - Agitar fuertemente durante 5 minutos en vórtex.
  - Centrifugar 10 minutos a  $22^{\circ}$  C y 3000 rpm.

- Tomar 350 µL de la fase orgánica (la superior) de cada tubo y transferirla al tubo sobrante asignado para la muestra, ya preparado en el paso 9; o la misma cantidad de agua, y transferirla al tubo sobrante correspondiente.
  - Agregar 0.5 ml solución de sulfato de amonio saturado.
  - Agitar fuertemente durante 5 minutos en vórtex.
  - Centrifugar 10 minutos a 22 ° C y 3000 rpm.
  - Preparar los viales de conteo con 10 ml líquido de centelleo emulsificador.
  - Transferir 200 ml fase orgánica dentro de los viales de conteo (los niveles entre las dos fases son difícilmente visibles en este momento de la extracción), o bien el mismo volumen de agua
16. Conteo: mover los viales y colocarlos en un contador Packard Tri-Carb 2300 TR, protocolo 3 (5 minutos por vial).
17. Medición de proteínas no colagénicas:
- Diluir el homogeneizado 1:10 con NaOH 0.05 N.
  - Dejar reposar una noche a temperatura ambiente.
  - Centrifugar por 5 minutos a 10,800 rpm.
  - Proceder a la medición de las proteínas por el método de Lowry o un método similar.

### Cálculos

- Calcular la media de CPM de los estándares, blancos y muestras.
- Multiplicar la media por 2.5 para los blancos y las muestras (factor de dilución de la fase orgánica).
- Restar las CPM del blanco de las CPM de su muestra correspondiente.
- Calcular la actividad específica (nM sustrato/min. mg proteína):

$$\text{Unidades} = \frac{(\text{CPM muestra} - \text{CPM blanco}) \times 625}{\text{CPM estándar} \times 5 \times \text{proteínas} \times 0,075}$$

en donde:

625: nmol <sup>14</sup>C carnitina en 50 ml L-[metil-<sup>14</sup>C] carnitina 12,5 mM.

5: tiempo de incubación (min)

Proteínas: contenido de proteínas (g/l)

0,075: cantidad de muestra (ml)

### **6.2.3.6. Malondialdehído en hígado.**

La lipoperoxidación es un mecanismo de daño celular bien establecido en plantas y animales y es indicador del stress oxidativo en células y tejidos. Los peróxidos de lípidos derivados de los PUFA son inestables y se descomponen para formar una serie compleja de compuestos que incluyen compuestos carbonilo reactivos. El más abundante de ellos es el malondialdehído (MDA). La medición del MDA es ampliamente utilizada como indicador de la peroxidación lipídica (394). La alta concentración de productos de lipoperoxidación se asocia con una variedad de enfermedades crónicas tanto

en el hombre (395,396) como en modelos animales (397,398). El MDA reacciona fácilmente con los grupos amino de las proteínas y con otras biomoléculas para formar una variedad de aductos (394), incluyendo productos con enlaces cruzados (399). El MDA también forma aductos con las bases del DNA, que son mutagénicos (400) y posiblemente carcinogénicos (401). Los enlaces cruzados de las proteínas del DNA son también otro ejemplo de reacción entre el DNA y el MDA.

### Fundamento

La cuantificación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (ThioBarbituric Reacting Substances) o TBARS se usa comúnmente para medir MDA en muestras biológicas (402). Sin embargo, esta reacción es relativamente inespecífica: tanto el MDA libre como el unido a proteínas puede reaccionar. Habitualmente, se usa el método colorimétrico para cuantificar MDA como una simplificación de la medición de lipoperoxidación. Sin embargo, su análisis no descarta la presencia de otros compuestos que participan en este proceso, por lo que se requiere un método más específico para detectar sólo el MDA después de la reacción del ácido tiobarbitúrico, como la cromatografía de gases de líquidos de alta resolución (HPLC) y, en específico, la cromatografía de fase reversa (una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada). Debe considerarse que el MDA puede producirse *in vitro*, por lo que se requiere la adición de hidroxitolueno butilado (BHT) (403). Al final, se mide la concentración de proteína para referir el contenido de MDA al tejido hepático.

### Procedimiento:

1. Preparación de la solución de fosfato potásico 50 mM pH 6.8:
  - Diluir 6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 800 ml agua destilada.
  - Ajustar a un pH de 6.8 con KOH 5 N (28.06 g en 100 ml agua destilada).
2. Preparación de la solución de hidroxitolueno butilado 2% en etanol:
  - Diluir 0.5 g BHT en 25 ml etanol.
3. Preparación de la solución de ácido ortofosfórico 0.44 M:
  - ❖ Llevar 29.7 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a un litro de agua destilada.
4. Preparación de la solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) 42 mM:
  - 0.308 g TBA en 50 ml agua destilada.
5. Preparación de la solución de ácido nítrico 1%:
  - Llevar 30.8 ml a dos litros de agua destilada.
6. Preparación de la solución de etanol 400 ml/l:
  - Llevar 400 ml etanol a un litro de agua destilada.
7. Preparación de la solución A:
  - ❖ 1 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  + 100  $\mu\text{l}$  BHT.
8. Preparación de los estándares:
  - ❖ Dilución 1 (1/500).  
Llevar 50  $\mu\text{l}$  solución madre de TEP hasta 25 ml etanol.
  - ❖ Dilución 2 (1/200):  
Llevar 500  $\mu\text{l}$  de la dilución 1 hasta 100 ml etanol.
  - ❖ Dilución 3:

STD $\mu$ l	ml $H_3PO_4$ 0.44 M	Concentración final $\mu$ M
1 ml dilución 2	9	4
2 ml solución 4 $\mu$ M	2	2
1 ml solución 4 $\mu$ M	3	1
0.5ml solución 1 $\mu$ M	0.5	0.5
0.25 ml solución 1 $\mu$ M	0.75	0.25
0.5 ml solución 0.25 $\mu$ M	0.5	0.125

8. Agregar 1.5 ml solución ácido ortofosfórico 0.44 M y 150 ml BHT 2% en hielo a cada tubo donde se homogeneizará la muestra.
9. Pesar 20-40 mg tejido (debe mantenerse a  $-80^\circ C$  hasta el momento de la medición de MDA) y agregar al tubo anterior.
10. Homogeneizar en frío por medio del Politrón.
11. Transferir el homogeneizado a un tubo Eppendorf y centrifugar durante 5 minutos a  $4^\circ C$  a 2000 rpm.
12. Extraer 1 ml sobrenadante y transferir 500  $\mu$ l a un tubo Eppendorf para la medición de MDA (250  $\mu$ l, por duplicado) y el resto a otro tubo Eppendorf para la medición de proteínas (congelar a  $-80^\circ C$  hasta el momento de su medición).
13. Rotular dos tubos de 10 ml por cada muestra a procesar, y 7 tubos para los estándares y uno para el control (plasma).
14. Preparación de tubos de reacción:

	Muestras	Control	Estándar
Homogeneizado	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l
$H_3PO_4$	-	250 $\mu$ l	
BHT	-	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Solución A	25 $\mu$ l		
TBA	85 $\mu$ l	85 $\mu$ l	85 $\mu$ l
Agua	390 $\mu$ l	140 $\mu$ l	390 $\mu$ l
Total	750 $\mu$ l	750 $\mu$ l	750 $\mu$ l

15. Agitar bien con el vórtex.
16. Incubar por una hora a  $95^\circ C$ , tapando los tubos con una canica para evitar la evaporación.
17. Acondicionar el cromatógrafo.
18. Enfriar los tubos con las muestras rápidamente en hielo.
19. Agregar 50  $\mu$ l de ácido perclórico para detener la reacción.
20. Centrifugar durante 10 minutos a  $4^\circ C$  a 5000 rpm.
21. Colocar 200  $\mu$ l sobrenadante en un vial para cromatografía y taparlo.
22. Eliminar la burbuja de cada vial.
23. Colocar en el cromatógrafo HPLC.
24. Condiciones del cromatógrafo HPLC:
  - Fase móvil: 60% fosfato de potasio 50 mM, pH 6.8 y 40% metanol (no es muy polar).
  - Columna: Guard Symmetry C18 15 cm x 4.6 mm (5  $\mu$ m)(muy apolar).
  - Velocidad de flujo: 0.8 ml/min.
  - Detección fluorométrica

- Volumen de inyección: 15 µl sobrenadante.
  - La fase reversa (de apolar a polar) del HPLC se realiza isocráticamente (la concentración de la fase móvil es la misma durante todo el tiempo de análisis).
25. Medir el contenido de proteína en el homogeneizado (Coomassie Plus Protein Assay Reagent):
- Colocar en un tubo 0.05 ml homogeneizado o estándar y 1.5 ml reactivo Coomassie Plus®.
  - Mezclar bien.
  - Leer a 595 nm.

#### Cálculos:

La curva dosis-respuesta de este ensayo se ajusta mejor a una ecuación lineal de 4 o 5 parámetros. Las concentraciones desconocidas de las muestras se calcularon con Excel. Se graficó la curva de referencia para la interpretación de muestras considerando el área bajo la curva del MDA en el eje de las Y contra la concentración de los estándares de MDA en el eje de las X. Se obtuvo la recta de regresión, y para calcular la concentración de MDA se despejó el valor de x, sustituyendo el valor de y (el promedio del duplicado) por el área bajo la curva del pico identificado como MDA de cada muestra. Los resultados (µM) se expresaron en función de la cantidad de proteínas en el tejido, de tal forma que el contenido de MDA se midió en µM/g proteínas.

#### **6.2.3.7. Citocinas en plasma.**

##### Fundamento

La citometría de flujo es una técnica para medir cantidades mínimas de compuestos (ej: citocinas) a través de su reconocimiento por medio de una reacción inmunológica que se verifica por la emisión de fluorescencia. Existen cuentas de dos tamaños que en su interior contienen material fluorescente en diferentes cantidades, de tal forma que las señales se agrupan en dos tipos de cuentas (las grandes y las pequeñas). El exterior de estas cuentas, a su vez, está recubierto por un anticuerpo marcado con biotina. La combinación “tamaño de la cuenta” y grado de fluorescencia” es característico para cada citocina, y de esta forma se identifican y cuantifican las citocinas en una muestra.

Una vez que se realiza un ensayo tipo ELISA en el que, en placas o tubos, se hace reaccionar la citocina cuya concentración quiere medirse en la muestra con el anticuerpo marcado con biotina para esa citocina, se le agrega estreptavidina para reconocer la cantidad de biotina incorporada y se procede a la lectura (“adquisición”) de las muestras.

Cuando se detecta un “evento” se refiere a que se encontró una cuenta que se marcó al identificar la citocina. La citometría cuenta el “número de eventos” para cada citocina, que se equipara a la cantidad de citocinas por separado presentes en la muestra. Estos eventos se reflejan en un “mapa” (dot plot)

como nubes de puntos que, idealmente, deben formar conjuntos compactos de los mismos.

### Procedimiento

1. Agitar en vórtex los reactivos a temperatura ambiente.
2. Mezclar y diluir 50 ml de buffer de prueba concentrado a 450 ml agua destilada o desionizada y agitar suavemente.
3. Preparación de estándares:
  - Centrifugarlos pocos segundos.
  - Reconstituirlos con agua destilada según la etiqueta de cada vial.
  - Agitar y esperar 10 minutos antes de pipetear.
  - Agregar 10 µl de cada estándar reconstituido (agitando inmediatamente antes cada estándar en el vortex) al vial "Standard 1" (total: 30 µl).
  - Agregar 170 µl buffer de prueba. (total: 200 µl).
4. Dilución en serie de la mezcla de estándares:
  - Agregar 100 µl buffer de prueba a 6 tubos etiquetados "Standard 2", "3", "4", "5" y "6".
  - Transferir 50 µl del tubo "Standard 1" al tubo "Standard 2". Mezclar.
  - Repetir el procedimiento hasta llegar al tubo "Standard 7".
5. Preparar en un vial la mezcla de cuentas (25 µl/pocillo; considerar 8 pocillos para la curva estándar):
  - 850 µl buffer de prueba
  - 50 µl cuentas IL-1α (vortex)
  - 50 µl cuentas IL-6 (vortex)
  - 50 µl cuentas TNF-α (vortex)
6. Preparar en un vial la mezcla del conjugado de biotina (50 µl/pocillo):
  - 1700 µl buffer de prueba
  - 100 µl conjugado de biotina IL-1 (vortex)
  - 100 µl conjugado de biotina IL-6 (vortex)
  - 100 µl conjugado de biotina TNF-α (vortex)
7. Preparar la solución estreptavidina-PE: mezclar 58 µl de estreptavidina-PE con 1772 µl buffer de prueba.

Esquema de distribución de la placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 1	Std1 setup										
B	Standard 2											
C	Standard 3											
D	Standard 4											
E	Standard 5											
F	Standard 6											
G	Standard 7											
H	Blanco											

8. Agregar 25 µl de cada estándar a su pocillo correspondiente.
9. Agregar 25 µl buffer de prueba al pocillo designado para el blanco.

10. Agregar 25 µl “Standard 1” al pocillo A2.
11. Agregar 25 µl muestra al resto de los pocillos.
13. Agregar 25 µl mezcla de cuentas a todos los pocillos.
14. Agregar 50 µl mezcla biotina conjugada a todos los pocillos.
15. Cubrir la placa con sellador adhesivo de placas y papel aluminio.
16. Incubar a temperatura ambiente 2 horas en agitador de placas a 500 rpm.
17. Retirar el sellador de la placa y papel aluminio y vaciar los pocillos con el aspirador.
18. Agregar 100 µl buffer de prueba y aspirar. Repetir la operación.
19. Retirar el líquido excedente de la base de la placa con toalla absorbente.
20. Agregar 100 µl buffer de prueba a todos los pocillos.
21. Agregar 50 µl estreptavidina-PE a todos los pocillos.
22. Cubrir los pocillos con el sellador adhesivo de placas y papel aluminio.
23. Incubar a temperatura ambiente 1 hora en agitador de placas a 500 rpm.
24. Retirar el sellador de la placa y papel aluminio y vaciar los pocillos con el aspirador.
25. Agregar 100 µl buffer de prueba y aspirar.
26. Agregar 100 µl buffer de prueba y aspirar, nuevamente.
27. Retirar el líquido excedente de la base de la placa con toalla absorbente.
28. Agregar 200 µl buffer de prueba a todos los pocillos.
29. Mezclar el contenido de cada pocillo alternando aspiraciones y eyecciones y transferirlo a un tubo de adquisición para citómetro de flujo, agregando 200 µl buffer de prueba a cada uno.
30. Programación del citómetro de flujo:
  - Agitar con vórtex las cuentas de inicio.
  - Pipetear 500 µl cuentas de inicio y colocar en un tubo SB.
  - Encender el equipo.
  - Revisar el flujo (alineación y estabilidad de flujo del sistema).
  - Abrir un nuevo protocolo.
  - Crear una ventana de mapa de puntos (*dot plot*) con FS (*Forward Scatter*) para el eje X y SSC (*Side Scatter*) para el eje Y.
  - Fijar FS y SSC a modo lineal.
  - Crear una segunda y una tercera ventana de *dot plots* con FL-2 para el eje X y FL-3(-4) para el eje Y.
  - Fijar FL-2 y FL-3 (-4) a modo logarítmico.
  - Fijar la compensación a cero.
  - Guardar el protocolo frecuentemente durante el inicio.
  - En el modo “Setup Mode” correr el tubo SB (con las cuentas de inicio).
  - Ajustar los parámetros de FS y SSC para que ambas poblaciones de cuentas en el control sean visibles en la ventana abierta.
  - Crear la región “R1” para las cuentas grandes y la región “R2” para las cuentas pequeñas. Definir el número de eventos para que los 300 eventos por analito se midan dentro de la puerta R2 (cuentas pequeñas).
  - Seleccionar la puerta R1 en el primer *dot plot* FL-2/FL-3 (-4). Seleccionar la puerta R2 en el segundo *dot plot* FL-2/FL-3(-4).
  - Ajustar los parámetros de FL-2 y FL-3 (-4) para que las poblaciones de cuentas sean visibles en la ventana abierta. Con las cuentas de inicio del tubo SB el voltaje de FL-2 debe ajustarse para que las poblaciones de cuentas se posicionen en la parte izquierda del *dot plot*.

- Guardar el protocolo frecuentemente durante el inicio.
  - Antes de iniciar la adquisición de estándares y muestras, colocarse en SETUP MODE y ajustar los parámetros usando “Standard 1”. Ajustar posteriormente los parámetros de FL-2 para que la población de cuentas con la señal más alta de PE (FL-2) se pegue al eje derecho mientras que toda la población sea visible.
  - Reiniciar la adquisición de “Standard 1” para el inicio.
  - Si las poblaciones de cuentas no están en posición horizontal, aumentar o disminuir la compensación para FL-3 (-4) - % FL-2.
31. Adquisición: cambiar del modo SETUP MODE a ACQUISITION MODE.
32. Empezar a analizar las muestras iniciando con la curva estándar y el blanco, seguido de las muestras.

#### Cálculos:

El equipo funciona con un software que realiza los cálculos automáticamente contando el “número de eventos” por cada citosina. La IL-1 $\alpha$ , la IL-6 y el TNF- $\alpha$  se midieron en pg/ml.

#### **6.2.3.8. Triglicéridos hepáticos.**

##### Fundamento:

El *kit* para medir triglicéridos en tejido adiposo (Triglyceride Assay Kit-Bulk 5 Plate Kit TG-5-RB. Zen-Bio, Inc. ®) se basa en la medición de la concentración de glicerol liberado después de la lisis celular y la hidrólisis de las moléculas de triglicéridos. La concentración de triglicéridos es equivalente estequiométricamente a la cantidad de glicerol:



##### Procedimiento:

1. Calentar los buffers de lavado y lisis en baño María a 37 ° C.
2. Diluir el reactivo B con 2.5 ml agua desionizada e invertir la botella suavemente (no agitar en vórtex). Asegurarse que el polvo se haya disuelto completamente. Mantener a temperatura ambiente y en una botella protegida de la luz.
3. Pesar entre 50 y 150 mg hígado y registrar el peso exacto.
4. Colocar en un tubo de ensayo y agregar el doble de lo que pesa la muestra de hígado, de buffer de lisis (por cada mg hígado, 2  $\mu$ l de buffer de lisis). De esta forma, se obtiene una concentración de 0.5 mg/ $\mu$ l.
5. Sonicar cada muestra durante 20 segundos.
6. Transferir 3  $\mu$ l lisado a cada pocillo de la placa.
7. Agregar 20  $\mu$ l reactivo B a cada pocillo. No es necesario mezclar, pero sí golpear suavemente la placa para mezclar los reactivos.
8. Incubar la placa a 37 ° C por 2 horas.
9. Una hora antes de terminar de incubar la placa, llevar el estándar de glicerol y el reactivo B a temperatura ambiente.
10. Calentar el diluyente de estándares a 37 ° C.

#### 11. Preparar la curva estándar:

- Pipetear 200  $\mu\text{l}$  diluyente de estándares en el tubo “estándar de glicerol 1 mM” y mezclar bien en vórtex (estándar de glicerol madre 200  $\mu\text{M}$ ).
- Pipetear 125  $\mu\text{l}$  diluyente de estándar a 6 tubos.
- Preparar la curva estándar: hacer diluciones en serie partiendo del estándar de glicerol madre: pipetear 125  $\mu\text{l}$  estándar de glicerol madre 200  $\mu\text{M}$  que, al mezclarlo con 125  $\mu\text{l}$  diluyente, tendrá una concentración de la mitad del estándar de glicerol madre: 100  $\mu\text{M}$ . Mezclar vigorosamente esta dilución y repetir la operación con el tubo de 100  $\mu\text{M}$ , mezclando vigorosamente cada nueva dilución antes de realizar la siguiente (estándar superior: estándar glicerol madre 200  $\mu\text{M}$ , y estándar inferior: diluyente de estándar), y así sucesivamente con los demás pocillos. Las concentraciones finales de los estándares son 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125  $\mu\text{M}$  glicerol.
- Diluir el reactivo A con 11 ml agua desionizada e invertir la botella suavemente (no agitar en vórtex). Asegurarse que el polvo se haya disuelto completamente. Mantener a temperatura ambiente y en una botella protegida de la luz.
- Agregar 80  $\mu\text{l}$  buffer de lavado a cada pocillo de una nueva placa. NO usar buffer de lavado en los pocillos para la curva estándar.
- Mezclar los lisados (en la primera placa) muy bien usando una pipeta multicanal para cada hilera o para cada columna.
- Transferir inmediatamente 20  $\mu\text{l}$  lisado a cada pocillo de la nueva placa (factor de dilución: 5).
- Pipetear cada estándar de la curva en su pocillo correspondiente.
- Agregar 100  $\mu\text{l}$  reactivo A a las muestras y estándares. Mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo una sola vez.
- Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
- Leer a 540 nm usando un lector de placas de microtitulación.

#### Cálculos:

La curva dosis-respuesta de este ensayo se ajusta mejor a una ecuación lineal de 4 o 5 parámetros. Las concentraciones desconocidas de las muestras se calcularon con Excel. Se graficó la curva de referencia para la interpretación de muestras considerando las unidades de absorbancia de 540 nm en el eje de las Y contra la concentración de los estándares de glicerol en el eje de las X. Se obtuvo la recta de regresión, y para calcular la concentración glicerol se despejó el valor de x, sustituyendo el valor de y por la diferencia entre la absorbancia de la muestra (promedio del duplicado) y del blanco. Los resultados finales se multiplicaron por un factor de dilución de 5 (de acuerdo al *kit*). Considerando que se emplearon 3  $\mu\text{l}$  de un homogeneizado 0.5 mg/ $\mu\text{l}$  se dividieron los resultados finales ( $\mu\text{M}$  glicerol o triglicéridos) entre 50 y se expresaron en  $\mu\text{M}/\text{g}$  hígado.

#### **6.2.3.9. Ácidos grasos en membrana eritrocitaria.**

El análisis del perfil de ácidos grasos en membrana eritrocitaria constituye, hasta cierto punto, un reflejo de la incorporación de los distintos ácidos grasos dietéticos en la membrana celular del eritrocito, extrapolable a las células de

los demás tejidos. Los ácidos grasos de la membrana tienen la capacidad de influir y modular el metabolismo celular a diferentes niveles (inflamatorio, inmunológico, etc...) a diferentes niveles. Basta recordar la importancia del metabolismo del AA, EPA y DHA (404,405) y la influencia de las distintas familias de ácidos grasos de la membrana sobre los receptores de membrana (406). La medición de estos mismos ácidos grasos en plasma, sin embargo, no tiene la mencionada relevancia, ya que a este nivel éstos no se pueden relacionar exclusivamente con el metabolismo celular.

En el presente estudio, en particular, su valor radicó en constatar que el efecto de la manipulación de los ácidos grasos en las dietas experimentales sobre los parámetros estudiados fuera debido a ellos mismos (al comprobarse que éstos, efectivamente, se hubieran incorporado a las membranas) y no a otros factores. Además, se intentó comprobar que los MCT –ácidos grasos considerados tradicionalmente energéticos- fueran capaces de incorporarse a la membrana celular.

Se descongelaron muestras de sangre de cinco ratones STD, cinco ratones MCT y cinco ratones PUFA de 10 semanas de seguimiento. Se colocó aproximadamente 1 ml de sangre de cada muestra en tubos con EDTA. Las muestras fueron centrifugadas y se retiró el plasma. Después de realizar dos lavados con suero fisiológico, se añadió buffer de lisis (para romper los eritrocitos) y se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó PBS y se centrifugó cada tubo a 16,000 g por dos ocasiones. Se descartó el sobrenadante y se obtuvo aproximadamente 150 µl de lisado. Este pellet se disolvió con 400 µl de suero fisiológico y se homogeneizó antes de la medición del contenido de proteínas totales. Una vez cuantificadas, se agregó una cantidad de estándar interno (C17:0). La cantidad de este estándar se ajustó de acuerdo al contenido de proteínas de cada muestra (variabilidad biológica).

Posteriormente, se llevó a cabo la transesterificación directa de ácidos grasos por el procedimiento de Lepage y Roy (Lepage G, Roy CC. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. J Lipid Res 1984; 25: 1391-1396).. Se extrajo la fase de benceno, que se evaporó bajo una corriente de nitrógeno a 40° C hasta estar completamente seco. Se reconstituyó el residuo con 100 µl hexano y se inyectó una alícuota de 1 a 5 µl a un cromatógrafo de gas-líquido Perkin Elmer Autosystem usando una columna capilar de 30 m con un diámetro interno de 0,25 mm impregnado con BPX90 como fase estacionaria. Las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes:

- Temperatura inicial: 100 °C durante 2 minutos, con una rampa de 19 °C/min hasta 176 °C durante 6.60 minutos, hasta 195 °C durante 10.6 minutos con una rampa de 45 minutos hasta alcanzar 290 °C.
- Purga: 10 minutos.
- Temperatura del inyector: 250 °C.
- Temperatura del detector: 250 °C.
- Gas acarreador: nitrógeno (P=15 pSI)
- Atenuación: 4
- Split 1/20.

Los metilésteres de ácidos grasos se identificaron y cuantificaron mediante el método del estándar interno, comparando los valores de las muestras con los de una curva de calibración elaborada con los siguientes estándares externos (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA).

- C10
- C12
- C14
- C16:0 y C16:1 $\omega$ -7
- C18:0, C18:1 $\omega$ -9, C18:2  $\omega$ -6, C18:3  $\omega$ -3 y C18:3 $\omega$ -6
- C20:3  $\omega$ -6, C20:3  $\omega$ -9, C20:4  $\omega$ -6 y C20:5  $\omega$ -3
- C22:4  $\omega$ -6 y C22:6  $\omega$ -3
- C24:0
- C17:0 (estándar interno)

El contenido de los diferentes ácidos grasos en membrana eritrocitaria se expresó en mg/g proteína.

#### **6.2.3.10.Histología.**

Las muestras conservadas en formol se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 5  $\mu$  que se tiñeron con hematoxilina-eosina y con Masson tricrómico y se colocaron entre un porta y un cubreobjetos. Un patólogo experto (cegado a la identificación de las muestras) realizó un análisis histológico en el que intencionalmente se buscaron datos compatibles con NASH:

##### 1. Esteatosis:

###### a) Grado:

- 0: sin esteatosis.
- 1: 0-33%
- 2: 33-66%
- 3: > 66%.

###### b) Tipo: macroesteatosis o microesteatosis.

###### c) Localización: se señaló su predominancia, de mayor a menor, en las tres zonas acinares según Rappaport.

##### 2. Inflamación lobulillar:

###### a) Grado:

- 0: sin focos.
- 1: 1-2 focos/campo 40 x.
- 2: 2-4 focos/campo 40 x.
- 3: > 4 focos/campo 40 x.

###### b) Tipo celular: se describió el tipo de células inflamatorias encontradas (linfocitos, histiocitos, polimorfonucleares).

3. Inflamación portal:
  - a) Grado:
    - 0: sin focos.
    - 1: 1-2 focos/campo 40 x.
    - 2: 2-4 focos/campo 40 x.
    - 3: > 4 focos/campo 40 x.
  - b) Tipo celular: se describió el tipo de células inflamatorias encontradas (linfocitos, histiocitos, polimorfonucleares).
4. Hialina: presente o ausente.
5. Balonización: presente o ausente.
6. Núcleos con glucógeno: presentes o ausentes.
7. Lipogranulomas: 0, +, ++ y +++.
8. Grado de fibrosis central/perisinusoidal: 0, 1, 2 y 3.
9. Grado de fibrosis portal: 0, 1, 2 y 3.

Con el objeto de tener un índice global del estado hepático, se creó arbitrariamente un índice compuesto ("*índice hepático*") en el que se asignaron valores según la presencia y grado de las diferentes alteraciones observadas en la histología de la siguiente manera:

Esteatosis (máximo: 3 puntos).

- 0: sin esteatosis.
- 1: 0-33%
- 2: 33-66%
- 3: > 66%.

Inflamación lobulillar (máximo: 3 puntos).

- 0: sin focos.
- 1: 1-2 focos/campo 40 x.
- 2: 2-4 focos/campo 40 x.
- 3: > 4 focos/campo 40 x.

Inflamación portal (máximo: 3 puntos).

- 0: sin focos.
- 1: 1-2 focos/campo 40 x.
- 2: 2-4 focos/campo 40 x.
- 3: > 4 focos/campo 40 x.

Hialina (presente: 1 punto).

Balonización (presente: 1 punto).

Núcleos con glucógeno (presentes: 1 punto).

Lipogranulomas (máximo: 3 puntos).

- 0: ausentes.
- 1: +.
- 2: ++.
- 3: +++.

Grado de fibrosis central/perisinusoidal (máximo: 3 puntos).

- 0: ausente.
- 1: 1.
- 2: 2.
- 3: 3.

Grado de fibrosis portal (máximo: 3 puntos).

- 0: ausente.
- 1: 1.
- 2: 2.
- 3: 3.

El valor máximo para este “índice hepático” es de 21.

En la figura 6 se esquematiza el diseño del estudio realizado.

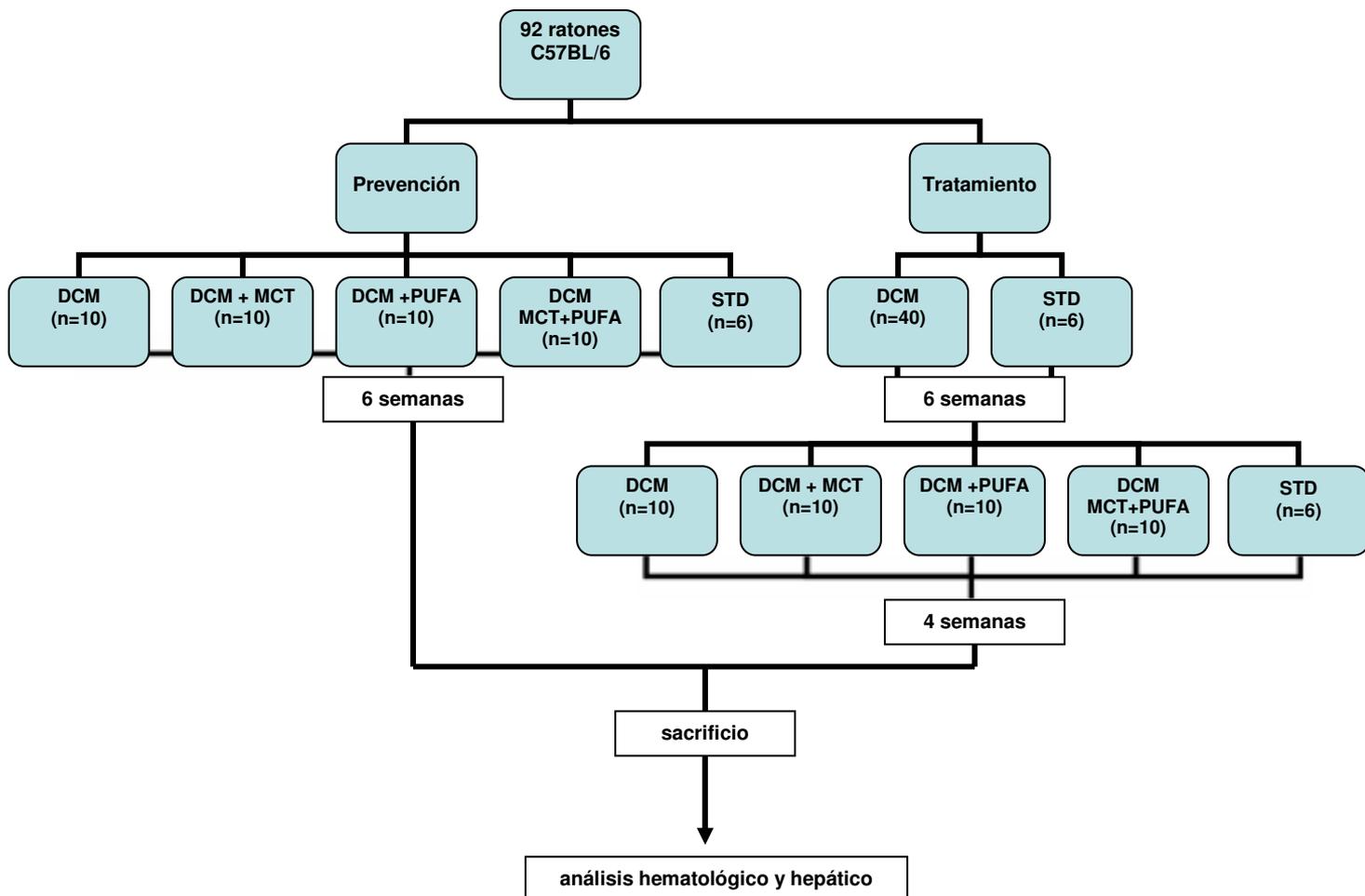


Figura 6. Diseño experimental.

### 6.3. Material.

1. Ratones C57 BL/6JO1aHsd (C57 BL/6) Harlan Interfauna Ibérica, S.I., de 19-21 g (36-45 días): se eligió este modelo por ser el más adecuado para los objetivos del estudio y, además, por ser el más susceptible de desarrollar la lesión en menor tiempo y con mayor eficiencia.
2. Dieta estándar y dietas deficientes en metionina y colina MP Biomedicals/Biolink 2000, S.I.: se eligió esta maniobra para inducir NASH igualmente por ser la más adecuada para los objetivos del estudio. Se modificó la composición del tipo de grasa de acuerdo a los objetivos del estudio, formulándose tres dietas experimentales además de la que indujo la patología (anexo 2).
3. Jaulas de alambre con serrín y botellas de agua.
4. Bioterio para estabular a los ratones.
5. Balanza granataria para pesar a los ratones.
6. Reactivos para análisis de las muestras de plasma (ver anexos):
  - a) Glucosa, triglicéridos, colesterol, albúmina, alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina total y bilirrubina directa para autoanalizador.
  - b) *Kits* para la medición de hormonas:
    - Rat/mouse insulin ELISA EZRMI-13K, LINCO Research ®
    - Mouse leptin ELISA EZML-82K, LINCO Research ®
    - Mouse adiponectin ELISA EZMADP-60K, LINCO Research ®
  - c) Carnitina libre y acilcarnitina.
  - d) *Kit* básico y *kits* con cuentas para las tres interleucinas a analizar:
    - Flow Cytomix mouse IL-1 $\alpha$  Simplex BMS8611FF, Bender MedSystems, GmbH ®
    - Flow Cytomix mouse IL-6 Simplex BMS8603FF, Bender MedSystems, GmbH ®
    - Flow Cytomix mouse TNF- $\alpha$  Simplex BMS8607FF, Bender MedSystems, GmbH ®
7. Reactivos para análisis de las muestras de hígado (ver anexos):
  - a) Medición de la actividad de la carnitín-palmitoil transferasa 2 en hígado.
  - b) Medición de la concentración hepática de malondialdehído.
  - c) *Kit* para la medición de la concentración de triglicéridos en hígado (Triglyceride Assay Kit-Bulk 5 Plate Kit TG-5-RB. Zen-Bio, Inc. ®).
  - d) Tinciones especiales para tejidos (hematoxilina-eosina), porta y cubreobjetos.
8. Material y equipos correspondientes para el trabajo de laboratorio descrito para cada análisis (ver anexos).
9. Ordenador con software para recolección de datos y su procesamiento estadístico (Microsoft Office y SPSS v.14).

### 6.4. Análisis estadístico

De acuerdo al objetivo general del estudio, se consideraron como variables *independientes* los grupos de comparación (tipo de dieta), dentro de la misma fase del estudio (prevención o tratamiento) y como variables *dependientes* los parámetros bioquímicos e histológicos estudiados.

## Grupos de comparación

- Ratones alimentados con dieta estándar vs. dieta DCM (sin modificación de lípidos) para comprobar la efectividad de la maniobra para producir NAFLD tanto bioquímica como histológicamente (validación del modelo experimental) (objetivo específico).
- Ratones alimentados con dieta DCM (sin modificación de lípidos) durante 6 o 10 semanas para establecer en forma grosera el tiempo de desarrollo de las alteraciones producidas (objetivo específico).
- Ratones alimentados con dieta DCM y sus variantes (MCT, PUFA y MP) tanto en fase de *prevención* como de *tratamiento* para definir el papel preventivo y/o terapéutico de los distintos tipos de grasa en los parámetros bioquímicos e histológicos estudiados (objetivo general).

## Parámetros de comparación

Los siguientes parámetros (variables continuas) se resumieron en términos de mediana y límites (mínimos y máximos). Por ser grupos de comparación relativamente pequeños y no presentar una distribución normal (no hubo homogeneidad de varianzas), todas estas variables fueron comparadas por medio de las pruebas de U de Mann Whitney (comparación de dos tiempos: 6 y 10 semanas; o de dos grupos: STD y DCM) o de Kruskal Wallis (comparación de cuatro grupos: DCM, MCT, PUFA y MP). Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos cuatro grupos ( $p < 0.05$ ), se aplicó “post-hoc” la prueba de U de Mann Whitney por pares de grupos para destacar el grupo diferente.

1. Peso corporal: se registró el cambio de peso semanal de cada ratón y se obtuvo su curva de crecimiento individual. Se obtuvo el valor mediano por grupo de experimentación y por semana (por fase del estudio, dieta y semana).
2. Pesos del hígado y del ratón al sacrificio y peso proporcional del hígado al sacrificio: se pesó el ratón y el hígado del ratón después del sacrificio y se calculó el peso proporcional del hígado al sacrificio [(peso del hígado/peso del ratón al sacrificio) x 100].
3. Mediciones en plasma: se compararon:
  - a) Glucosa, triglicéridos y colesterol.
  - b) Pruebas de función hepática: bilirrubina total, bilirrubina directa, ALT, AST, FA y albúmina.
  - c) Insulina, leptina y adiponectina.
  - d) Carnitina libre (CL), acilcarnitinas (AC), carnitina total (CT), AC/CT y CL/CT.
  - e) IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .
4. Mediciones en hígado: se compararon:

- f) Actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 (CPT-2).
- g) Contenido de malondialdehído.
- h) Contenido de triglicéridos

Los parámetros histológicos (variables categóricas) se expresaron como frecuencias y se compararon en los ratones con dieta normal y dieta DCM y en los ratones con dieta DCM y sus variantes por medio de la prueba de  $\chi^2$ . Se describió el número de casos por grupo con:

- Esteatosis: grado, tipo y localización.
- Grado de inflamación lobulillar (focos/campo).
- Grado de inflamación portal.
- Presencia de hialina.
- Balonización.
- Núcleos con glucógeno
- Lipogranulomas.
- Grado de fibrosis central/perisinusoidal.
- Grado de fibrosis portal.

Debido a que los grupos de comparación eran relativamente pequeños (n=10 para las dietas DCM, MCT, PUFA y MP y n=6 para la dieta STD) se redujeron las categorías para cada rubro (recategorización de variables, dicotomizándolas) para aumentar la potencia de la prueba de  $\chi^2$  (2 x 2) de la siguiente forma:

- *Esteatosis*: grado <3 vs. grado= 3.
- *Inflamación lobulillar*: grado <2 vs. grado  $\geq$  2.
- *Inflamación portal*: grado <2 vs. grado  $\geq$  2
- *Hialina*: ausente vs. presente
- *Lipogranulomas*: ausente o + vs. ++ o +++
- *Fibrosis central/perisinusoidal*: ausente vs. presente
- *Fibrosis portal*: grado <2 vs. grado  $\geq$  2

Además de estas variables, se analizó también la balonización (ausente=0; presente=1), y se excluyeron de este análisis el tipo de esteatosis (macrovesicular, microvesicular o mixta) y la localización de la esteatosis (zonas 1, 2 o 3) por falta de relevancia clínica y ser meramente descriptivos.

Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos cuatro grupos ( $p < 0.05$ ), se aplicó “post-hoc” nuevamente la prueba de  $\chi^2$  comparando los grupos por pares para destacar el grupo diferente.

Se comparó el “índice hepático” de los ratones con dieta normal y dieta DCM por medio de la prueba de U de Mann Whitney, y de los ratones con dieta DCM y sus variantes por medio de la prueba de Kruskal Wallis, aplicando la prueba de U de Mann Whitney para destacar el grupo diferente.

*Correlación de las variables indicadoras de esteatosis y esteatohepatitis en el modelo estudiado*

Según la información expuesta en el planteamiento de este estudio, se justificó correlacionar (correlación de Spearman):

- Las concentraciones de ALT y AST con los parámetros referentes a la inflamación.
- La concentración de leptina con el grado de esteatosis y de fibrosis y los parámetros referentes a la inflamación.
- La concentración de adiponectina con los parámetros referentes a la inflamación y a la mejoría histológica.
- La concentración de MDA con los parámetros referentes a la inflamación y al empeoramiento histológico.
- Carnitina (total, libre y acilada) y CPT-2 con esteatosis y triglicéridos hepáticos.

Así, se realizaron las siguientes correlaciones (Spearman) en el modelo (ratón alimentado con dieta DCM) a las 6 y 10 semanas:

- **“Esteatosis”** con leptina.
- **“Triglicéridos hepáticos”** con carnitina (total, libre y acilada), CPT-2, esteatosis, leptina, insulina y adiponectina.
- **“Inflamación”\*** con AST, ALT, leptina, adiponectina y MDA.
- **“Fibrosis”** (fibrosis central/perisinusoidal) con leptina.
- **“MDA”** con AST, ALT, IL-1 $\alpha$ , IL-6, triglicéridos hepáticos.

Entendiendo como los parámetros de “inflamación” los siguientes:

- IL-1.
- IL-6.
- Inflamación centrolobulillar
- Hialina
- Balonización
- Lipogranulomas

## 7. Resultados.

Los resultados se agrupan en seis apartados según los objetivos del estudio:

1. La efectividad de la dieta DCM para producir NAFLD tanto bioquímica como histológicamente.
2. Las diferencias bioquímicas e histológicas entre los dos tiempos de estudio en el modelo.
3. El efecto de los diferentes ácidos grasos en la prevención de la enfermedad.
4. El efecto de los diferentes ácidos grasos en el tratamiento de la enfermedad.
5. La correlación de las variables indicadoras de esteatosis y esteatohepatitis en el modelo estudiado.
6. La forma como se incorporan cuantitativamente los ácidos grasos administrados a la membrana eritrocitaria.

### 7.1. Efectividad de la dieta DCM para producir NAFLD.

Se compararon los ratones que consumieron dieta normal (ratones STD) con los que consumieron dieta DCM (ratones DCM) tanto a las 6 como a las 10 semanas con el objeto de definir el tiempo de desarrollo de las diferentes alteraciones bioquímicas e histológicas.

#### Efecto de la dieta DCM a las 6 semanas

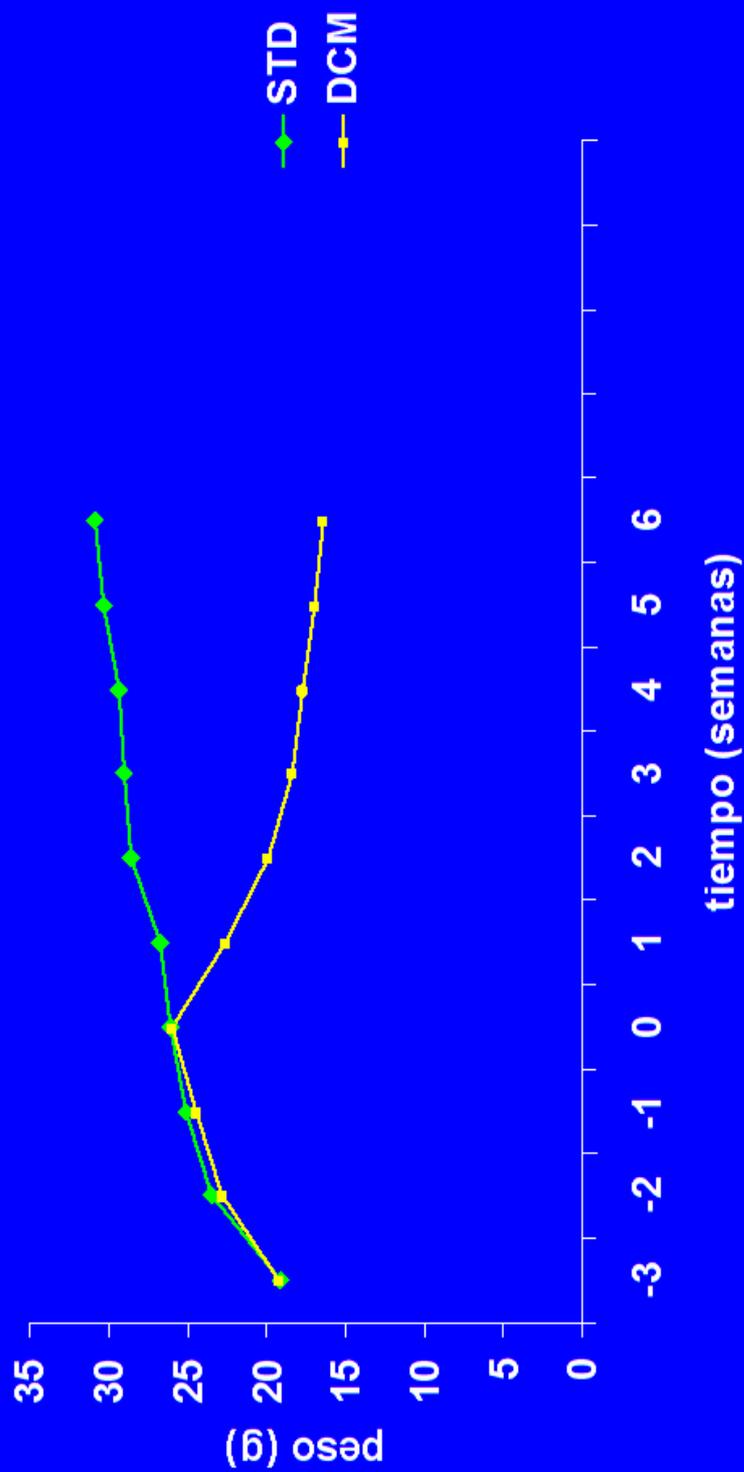
##### ***Evolución ponderal***

Los ratones alimentados con dieta DCM experimentaron una importante desaceleración en el crecimiento ponderal desde la primera semana de inicio de la maniobra de inducción de enfermedad hepática en comparación con los ratones STD, que continuaron creciendo como era de esperar. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (tabla 7) y se puede apreciar en la figura 7.

**Tabla 7. Peso semanal (g) de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM durante 6 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Semana -3	19.15 (18.5-19.8)	19.35 (18.4-20.1)	0.870
Semana -2	23.65 (21.7-24.4)	22.6 (21.6-24.8)	0.212
Semana 0	26.65 (23.9-27.4)	25.9 (24-28.1)	0.871
Semana 1	27.25 (24.7-28.2)	22.85 (19.7-25.7)	0.003
Semana 2	28.75 (26.1-30.6)	19.95 (18.6-21)	0.001
Semana 3	28.85 (26.7-31.4)	18.55 (16.2-19.8)	0.001
Semana 4	29.35 (26.9-31.6)	17.9 (16.1-19.1)	0.001
Semana 5	31.2 (27.2-32.6)	17.05 (14.8-18.4)	0.001
Semana 6	31.5 (27.9-33.4)	16.45 (14.4-17.6)	0.001

\* U de Mann Whitney



**Figura 7. Crecimiento ponderal de los ratones STD y DCM (seguimiento: 6 semanas).**  
 (no se muestran medidas de dispersión para lograr una clara apreciación)

### ***Peso del hígado y del ratón al sacrificio***

El peso hepático y de los ratones al sacrificio que fueron alimentados con la dieta DCM fue drásticamente menor que en los ratones STD. La disminución de peso hepático fue proporcional a la del peso corporal de tal manera que no se registraron diferencias en la relación entre el peso hepático y el peso del ratón en el momento del sacrificio (tabla 8).

**Tabla 8. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD Mediana (min-max)</b>	<b>DCM Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Peso hígado (g)	1.4 (1.2-1.5)	0.75 (0.6-0.9)	0.001
Peso del ratón al sacrificio (g)	31.25 (28-33.7)	16.45 (14-17.6)	0.001
Peso hígado/ Peso ratón al sacrificio (%)	4.45 (4.24-4.86)	4.58 (4.19-5.39)	0.416

\* U de Mann Whitney

### ***Pruebas de función hepática***

Los ratones DCM mostraron marcadas elevaciones en las enzimas hepáticas y bilirrubina, en comparación con los ratones STD. No hubo diferencias en la concentración de albúmina en plasma (tabla 9).

**Tabla 9. Pruebas de función hepática de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD Mediana (min-max)</b>	<b>DCM Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Bilirrubina total ( $\mu\text{M/l}$ )	1.25 (0.8-2.6)	7.5 (3.6-18.3)	0.001
Bilirrubina directa ( $\mu\text{M/l}$ )	0.75 (0.2-1.9)	5.8 (2.5-16.2)	0.001
ALT (U/l)	35.5 (22-50)	620 (339-810)	0.001
AST (U/L)	70 (44-167)	514 (420-660)	0.001
FA (U/l)	3 (1-25)	22.5 (6-46)	0.033
Albúmina (g/l)	31.2 (29.5-33.6)	31.6 (28.8-37.2)	0.860

\* U de Mann Whitney

### ***Glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma***

Los ratones DCM mostraron una significativa reducción en la concentración plasmática de glucosa, triglicéridos y colesterol al compararlos con los ratones STD (tabla 10).

**Tabla 10. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Glucosa (mM/l)	13.4 (11.7-15)	6.3 (4.4-7.6)	0.001
Triglicéridos (mM/l)	1.26 (0.64-1.79)	0.61 (0.26-0.92)	0.007
Colesterol (mM/l)	3.25 (3-3.7)	0.6 (0.2-0.8)	0.001

\* U de Mann Whitney

### ***Insulina, leptina y adiponectina en plasma***

Se observó una significativa disminución en la concentración plasmática de insulina y leptina en los ratones DCM y, por lo contrario, un aumento (también significativo) en la adiponectinemia (tabla 11) con respecto a los ratones STD.

**Tabla 11. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Insulina (ng/ml)	0.72 (0.39-0.98)	0.29 (0.26-0.55)	0.008
Leptina (ng/ml)	8.06 (4.89-9.56)	1.02 (0.67-1.3)	0.003
Adiponectina (ng/ml)	8.78 (6.08-11.49)	14.1 (11.45-21.29)	0.007

\* U de Mann Whitney

### ***Carnitina libre, acilcarnitinas, carnitina total, acilcarnitinas/carnitina total y carnitina libre/carnitina total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 en hígado***

Los ratones alimentados con dieta DCM mostraron una disminución en la concentración de acilcarnitinas y carnitina total, así como en su interrelación (AC/CT) y en la de su complemento (carnitina libre), todo ello en forma significativa (tabla 12).

**Tabla 12. Concentración de carnitina libre (CL), acilcarnitinas (AC), carnitina total (CT), AC/CT y CL/CT en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 (CPT-2) en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Carnitina libre (μM/l)	60.71 (42.21-82.13)	42.45 (25.73-100)	0.167
Acilcarnitinas (μM/l)	24.66 (11.98-34.41)	2.52 (0.49-8.29)	0.004
Carnitina total (μM/l)	85.37 (57.6-116.54)	44.49 (28.25-108.29)	0.028
AC/CT	0.29 (0.21-0.3)	0.06 (0.01-0.14)	0.004
CL/CT	0.71 (0.7-0.79)	0.94 (0.86-0.99)	0.004
Actividad CPT-2 (nM sustrato/min/ mg proteína)	4.39 (4.19-4.9)	-	-

\* U de Mann Whitney

## Citocinas

Los ratones DCM mostraron únicamente elevación de la IL-1 $\alpha$  en comparación con los ratones STD (tabla 13).

**Tabla 13. Concentración de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD Mediana (min-max)</b>	<b>DCM Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
IL-1 $\alpha$ (pg/ml)	20.48 (0-70.23)	82.95 (0-1523.53)	0.042
IL-6 (pg/ml)	0	0 (0-21.57)	0.317
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0	0 (0-78.44)	0.317

\* U de Mann Whitney

## Malondialdehído y triglicéridos en hígado

Los ratones DCM acumularon una cantidad significativamente superior de triglicéridos en hígado que los ratones alimentados con dieta estándar. En cambio, la concentración hepática de MDA fue diferente en ambos grupos (tabla 14).

**Tabla 14. Contenido de malondialdehído y triglicéridos en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD Mediana (min-max)</b>	<b>DCM Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Malondialdehído ( $\mu$ M/g proteína)	0.23 (0.13-0.81)	0.62 (0.31-1.07)	0.142
Triglicéridos ( $\mu$ M/g hígado)	0.2 (0.13-0.88)	0.62 (0.38-2.65)	0.009

\* U de Mann Whitney

## Histología

En la tabla 15 se describen las lesiones histológicas halladas en los ratones STD y DCM. Se observa (y era esperable) una mucho más elevada frecuencia de estas lesiones (y en mayor grado) en los ratones DCM que en los ratones STD. Es de destacar que la esteatosis moderada-intensa es un fenómeno generalizado, mientras que los fenómenos inflamatorios y los cambios fibróticos (cuando los hay) se circunscriben al lobulillo y la zona pericentral, dejando indemnes los espacios porta.

**Tabla 15. Lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	STD (n)	DCM (n)
Grado de esteatosis		
0	6	0
1 (0-33%)	0	1
2 (33-66%)	0	3
3 (> 66%)	0	6
Tipo de esteatosis		
Microvesicular	0	0
Macrovesicular	0	10
Localización de esteatosis (zona de Rappaport)		
1	0	4
2	0	4
3	0	2
Grado de inflamación lobulillar		
0 (sin focos)	6	0
1 (1-2 focos/campo 40x)	0	5
2 (2-4 focos/campo 40x)	0	3
3 (> 4 focos/campo 40x)	0	2
Grado de inflamación portal		
Sin inflamación	6	10
Leve	0	0
Moderada	0	0
Grave	0	0
Presencia de hialina		
No	6	7
+	0	3
Balonización		
No	6	8
Sí	0	2
Núcleos con glucógeno		
No	6	10
Sí	0	0
Lipogranulomas		
No	6	3
+	0	3
++	0	2
+++	0	2
Grado de fibrosis central/ perisinusoidal		
0	6	6
1	0	4
2	0	0
3	0	0
Grado de fibrosis portal		
0	6	10
1	0	0
2	0	0
3	0	0

Al recategorizar el grado de las lesiones con el fin de aumentar el poder de la prueba estadística se siguió conservando la tendencia de un mayor grado de lesiones. De esta forma, los ratones DCM presentaron mayor grado de esteatosis y de inflamación lobulillar y una tendencia a presentar más

lipogranulomas y fibrosis central/perisinusoidal (que seguramente hubiera alcanzado significación estadística de haber aumentado el tamaño de la muestra) (tabla 16).

**Tabla 16. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 6 semanas.**

	<b>STD (n)</b>	<b>DCM (n)</b>	<b>p*</b>
Grado de esteatosis (0-2/3)	6/0	4/6	0.016
Grado de inflamación lobulillar (0-1/2-3)	6/0	5/5	0.037
Presencia de hialina (0/+)	6/0	7/3	0.137
Balonización (ausente/presente)	6/0	8/2	0.242
Lipogranulomas (0 - + / ++ - +++)	6/0	6/4	0.074
Grado de fibrosis central/perisinusoidal 0/1-3	6/0	6/4	0.074

\*  $\chi^2$

El índice hepático fue de 0 en todos los ratones STD y alcanzo un valor mediano de 6 (límites: 3-10) para los ratones DCM ( $p < 0.001$ ).

#### Efecto de la dieta DCM a las 10 semanas

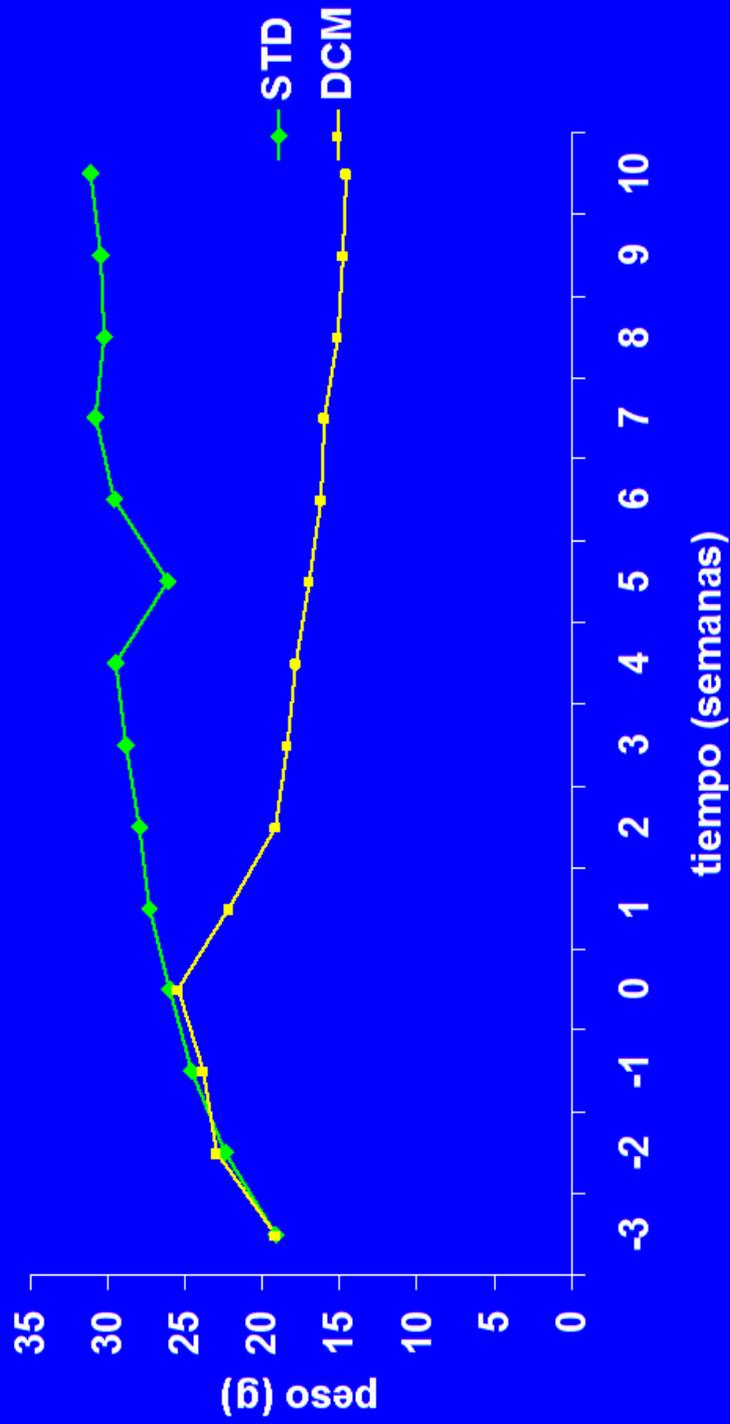
##### ***Evolución ponderal***

Los ratones alimentados con dieta DCM durante 10 semanas también experimentaron la misma y muy marcada desaceleración en el crecimiento ponderal en comparación con los ratones STD. También en este caso la diferencia fue estadísticamente significativa desde la primera semana (tabla 17) y se puede apreciar en la figura 8.

**Tabla 17. Peso semanal (g) de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM durante 10 semanas.**

	<b>STD Mediana (min-max)</b>	<b>DCM Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Semana -3	18.95 (18.4-20.6)	19 (17.4-20.9)	0.827
Semana -2	22.7 (20.7-23.4)	22.8 (21.2-24.6)	0.353
Semana 0	26.25 (23-27.5)	24.6 (22.7-28.6)	0.515
Semana 1	27.6 (24.2-29)	22.85 (19.7-23.3)	0.001
Semana 2	28.25 (24.8-29.8)	19.45 (17.5-20.2)	0.001
Semana 3	29.05 (25.7-30.9)	17.95 (16.8-20.3)	0.001
Semana 4	29.8 (25.9-31.6)	17.4 (16.5-19.5)	0.001
Semana 5	26.3 (23.2-28.6)	16.65 (15.5-18.4)	0.001
Semana 6	29.85 (26.2-31.9)	15.9 (14.8-18)	0.001
Semana 7	30.8 (27.1-32.8)	15.75 (14.7-17.1)	0.001
Semana 8	30.45 (27.4-33.2)	14.95 (13.9-16.5)	0.001
Semana 9	30.1 (28.2-33)	14.55 (13.2-16.2)	0.001
Semana 10	31.4 (27.8-33.8)	14.4 (13.4-15.6)	0.001

\* U de Mann Whitney



**Figura 8. Crecimiento ponderal de los ratones STD y DCM (seguimiento: 10 semanas).**  
 (no se muestran medidas de dispersión para lograr una clara apreciación)

### ***Peso del hígado y del ratón al sacrificio***

Después de 10 semanas de seguimiento, tanto el peso hepático como el del ratón en el momento del sacrificio y su relación (peso hepático relativo) fue estadísticamente menor en los ratones alimentados con dieta DCM que en los ratones STD. En esta ocasión, sin embargo, la disminución de peso hepático fue proporcionalmente mayor a la de peso corporal por lo que la relación peso hepático/peso corporal disminuyó significativamente en los ratones DCM (tabla 18).

**Tabla 18. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD Mediana (min-max)</b>	<b>DCM Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Peso hígado (g)	1.75 (1.3-1.9)	0.7 (0.6-0.8)	0.001
Peso del ratón al sacrificio (g)	31.4 (27.8-33.8)	14.4 (13.4-15.6)	0.001
Peso hígado /peso ratón al sacrificio (%)	5.57 (4.68-6.27)	4.76 (4.23-5.23)	0.009

\* U de Mann Whitney

### ***Pruebas de función hepática***

Los ratones con dieta DCM mostraron una elevación significativa en la ALT, la AST y bilirrubinas (total y directa) con respecto a los ratones STD (tabla 19).

**Tabla 19. Pruebas de función hepática de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD Mediana (min-max)</b>	<b>DCM Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Bilirrubina total ( $\mu$ M/l)	0.6 (0.2-0.9)	4 (1.4-9)	0.005
Bilirrubina directa ( $\mu$ M/l)	0.65 (0.1-1.2)	3.3 (1.5-8.1)	0.005
ALT (U/l)	37 (23-42)	341 (105-642)	0.001
AST (U/l)	85 (40-137)	268 (121-564)	0.006
FA (U/l)	6 (2-6)	19 (1-52)	0.076
Albúmina (g/l)	30.6 (18.8-39)	28.1 (15.9-35.2)	0.345

\* U de Mann Whitney

### ***Glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma***

Después de 10 semanas de seguimiento, los ratones DCM mostraron también una significativa disminución en la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol con respecto a los ratones STD (tabla 20).

**Tabla 20. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Glucosa (mM/l)	13.6 (9.5-15.3)	5.3 (2.9-8.3)	0.001
Triglicéridos (mM/l)	1.47 (0.55-2.02)	0.56 (0.27-1.20)	0.013
Colesterol (mM/l)	3.15 (1.9-3.7)	0.6 (0.2-1.4)	0.001

\* U de Mann Whitney

***Insulina, leptina y adiponectina en plasma***

Los ratones DCM presentaron una significativa disminución en las cifras de insulinemia y leptinemia y, en cambio, un drástico aumento en la concentración plasmática de adiponectina, con respecto a los ratones control (tabla 21).

**Tabla 21. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Insulina (ng/ml)	1.98 (0.96-6.3)	0.36 (0.27-1)	0.003
Leptina (ng/ml)	2.63 (2.15-6.5)	0.81 (0.66-0.97)	0.005
Adiponectina (ng/ml)	6.04 (3.13-8.38)	14.55 (12.38-20.86)	0.002

\* U de Mann Whitney

***Carnitina libre, acilcarnitinas, carnitina total, acilcarnitinas/carnitina total y carnitina libre/carnitina total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 en hígado***

Los ratones alimentados con dieta DCM mostraron una disminución en la concentración de acilcarnitinas y carnitina total, así como en su interrelación (AC/CT) y en la de su complemento (carnitina libre), todo ello en forma significativa. En cambio, experimentaron un aumento significativo en la actividad de la CPT-2 con respecto a los ratones control (tabla 22).

**Tabla 22. Concentración de carnitina libre (CL), acilcarnitinas (AC), carnitina total (CT), AC/CT y CL/CT en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 (CPT-2) en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Carnitina libre (μM/l)	59.36 (27.52-79.77)	32.23 (25.46-63.51)	0.078
Acilcarnitinas (μM/l)	26.56 (10.59-29.9)	2.98 (0-8.31)	0.004
Carnitina total (μM/l)	82.23 (38.11-107.88)	34.5 (26.56-71.82)	0.010
AC/CT	0.29 (0.2-0.35)	0.1 (0.1-0.13)	0.006
CL/CT	0.71 (0.65-0.8)	0.91 (0.87-1.01)	0.004
Actividad CPT-2 (nM sustrato/min/ mg proteína)	4.25 (3.8-4.48)	5.87 (4.63-8.65)	0.001

\* U de Mann Whitney

### **Citocinas**

Al cabo de 10 semanas, los ratones alimentados con dieta estándar presentaron un aumento significativo en la IL-6 con respecto a los ratones DCM (tabla 23).

**Tabla 23. Concentración de IL-1α, IL-6 y TNF-α en plasma de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
IL-1α (pg/ml)	125.33 (63.79-186.87)	78.76 (0-143.55)	0.389
IL-6 (pg/ml)	50.55 (0-101.1)	0	0.025
TNF-α (pg/ml)	0	0	1.000

\* U de Mann Whitney

### **Malondialdehído y triglicéridos en hígado**

No se encontraron diferencias estadísticas en la concentración hepática de malondialdehído o triglicéridos en los ratones STD o DCM en este lapso de observación (tabla 24).

**Tabla 24. Contenido de malondialdehído y triglicéridos en hígado de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>DCM</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>p*</b>
Malondialdehído (μM/g proteína)	0.79 (0.23-2.39)	0.61 (0.25-1.12)	0.745
Triglicéridos (μM/g hígado)	1.14 (0.15-3.32)	0.48 (0.26-2.34)	1.000

\* U de Mann Whitney

La tabla 25 resume las lesiones histológicas encontradas en los ratones STD y DCM. Se destaca igualmente una mucho más elevada frecuencia de estas lesiones (y en mayor grado) en los ratones DCM que en los ratones STD. De nuevo, la esteatosis estuvo siempre presente, mientras que la inflamación y fibrosis se concentró en el lobulillo y zona pericentral. Algún ratón, sin embargo, experimentó cambios de esta índole en los espacios porta.

**Tabla 25. Lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD (n)</b>	<b>DCM (n)</b>
Grado de esteatosis		
0	6	0
1 (0-33%)	0	2
2 (33-66%)	0	6
3 (> 66%)	0	2
Tipo de esteatosis		
Microvesicular	0	0
Macrovesicular	0	10
Localización de esteatosis (zona de Rappaport)		
1	0	1
2	0	6
3	0	3
Grado de inflamación lobulillar		
0 (sin focos)	6	0
1 (1-2 focos/campo 40x)	0	7
2 (2-4 focos/campo 40x)	0	2
3 (> 4 focos/campo 40x)	0	1
Grado de inflamación portal		
Sin inflamación	6	9
Leve	0	1
Moderada	0	0
Grave	0	0
Presencia de hialina		
No	6	8
+	0	2
Balonización		
No	6	7
Sí	0	3
Núcleos con glucógeno		
No	6	10
Sí	0	0
Lipogranulomas		
No	6	0
+	0	5
++	0	3
+++	0	2
Grado de fibrosis central/perisinusoidal		
0	6	6
1	0	3
2	0	0
3	0	1
Grado de fibrosis portal		
0	6	9
1	0	0
2	0	0
3	0	1

Al recategorizar también a las 10 semanas el grado de las lesiones se observó también la tendencia de un mayor grado de lesiones, aunque sólo se alcanzó significancia estadística en la presencia y cantidad de lipogranulomas, mayor en el caso de los ratones DCM (tabla 26).

**Tabla 26. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones alimentados con la dieta estándar y la dieta DCM a las 10 semanas.**

	<b>STD (n)</b>	<b>DCM (n)</b>	<b>p*</b>
Grado de esteatosis (0-2/3)	6/0	8/2	0.242
Grado de inflamación lobulillar (0-1/2-3)	6/0	7/3	0.137
Presencia de hialina (0/+)	6/0	8/2	0.242
Balonización (ausente/presente)	6/0	7/3	0.137
Lipogranulomas (0 - + / ++ - +++)	6/0	5/5	0.037
Grado de fibrosis central/perisinusoidal 0/1-3	6/0	6/4	0.074

\*  $\chi^2$

El índice hepático fue de 0 en todos los ratones STD y alcanzó una mediana de 6 (límites: 3-17) para los ratones DCM ( $p < 0.001$ ).

La tabla 27 resume el incremento, disminución o mantenimiento de los parámetros medidos en los ratones DCM con respecto a los ratones STD tanto a las 6 como a las 10 semanas y se constató, en términos generales, que en *ambos* tiempos de observación hubo en los ratones DCM un aumento en las bilirrubinas total y directa, ALT, AST, adiponectinemia, CL/CT e índice hepático; y una disminución del peso hepático, peso del ratón al sacrificio; concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina, leptina, carnitina total y AC/CT. No se detectaron diferencias en estos tiempos en la albúmina, TNF-a, carnitina libre, MDA, hialina, balonización y grado de fibrosis central.

Sólo en los ratones seguidos durante 6 semanas se observó un aumento de la IL-1, triglicéridos hepáticos, grado de esteatosis y grado de inflamación lobulillar con respecto a los ratones STD.

Sólo en los ratones seguidos durante 10 semanas se observó una disminución en el peso hepático relativo, acilcarnitinas e IL-6; y un aumento en la actividad de la CPT-2 y en los lipogranulomas con respecto a los ratones STD.

**Tabla 27. Peso corporal y hepático, y parámetros bioquímicos e histológicos de los ratones alimentados con dieta estándar y dieta DCM a las 6 y a las 10 semanas (con respecto a la dieta DCM).**

	<b>6 semanas</b>	<b>10 semanas</b>
Peso semanal	A partir de S1. DCM disminuyó y STD aumentó	A partir de S1. DCM disminuyó y STD aumentó
Peso del hígado	<	<
Peso del ratón al sacrificio	<	<
Peso del hígado/peso del ratón al sacrificio (%)	=	<
Bilirrubina total (BT)	>	>
Bilirrubina directa (BD)	>	>
Alanino aminotransferasa (ALT)	>	>
Aspartato aminotransferasa (AST)	>	>
Fosfatasa alcalina (FA)	>	> (tendencia)
Albúmina	=	=
Glucosa	<	<
Triglicéridos	<	<
Colesterol	<	<
Insulina	<	<
Leptina	<	<
Adiponectina	>	>
Carnitina libre (CL)	=	< (tendencia)
Acilcarnitinas (AC)	=	<
Carnitina total (CT)	<	<
AC/CT	<	<
CL/CT	>	>
Actividad de la CPT-2	-	>
IL-1 $\alpha$	>	=
IL-6	=	<
TNF- $\alpha$	=	=
Malondialdehído	=	=
Triglicéridos hepáticos	>	=
Grado de esteatosis	>	=
Grado de inflamación lobulillar	>	=
Hialina	=	=
Balonización	=	=
Lipogranulomas	> (tendencia)	>
Grado de fibrosis central/perisinusoidal	> (tendencia)	> (tendencia)
Índice hepático	>	>

## **7.2. Diferencias bioquímicas e histológicas entre los dos tiempos de estudio en el modelo.**

Se compararon todas variables estudiadas en los ratones DCM a las 6 y a las 10 semanas y se observó únicamente que el seguimiento a 10 semanas hizo que disminuyera aún más el peso hepático –aunque aumentara el peso

hepático relativo-, que disminuyera la bilirrubina total y leptina y que aumentara la insulina. El peso a las 5 y 6 semanas en los ratones que se siguieron durante 10 semanas curiosamente fue menor -y en forma significativa- que para los ratones que se siguieron durante 6 semanas (tabla 28).

**Tabla 28. Comparación del peso y de los parámetros bioquímicos e histológicos de los ratones alimentados con dieta DCM a las 6 y 10 semanas.**

	<b>6 semanas</b>	<b>10 semanas</b>	<b>p*/**</b>
Peso semana -3 (g)	19.35 (18.4-20.1)	19 (17.4-20.9)	0.818
Peso semana -2 (g)	22.6 (21.6-24.8)	22.8 (21.2-24.6)	0.093
Peso semana 0 (g)	25.9 (24-28.1)	24.6 (22.7-28.6)	0.818
Peso semana 1 (g)	22.85 (19.7-25.7)	22.85 (19.7-23.3)	1
Peso semana 2 (g)	19.95 (18.6-21)	19.45 (17.5-20.2)	0.394
Peso semana 3 (g)	18.55 (16.2-19.8)	17.95 (16.8-20.3)	0.937
Peso semana 4 (g)	17.9 (16.1-19.1)	17.4 (16.5-19.5)	0.699
Peso semana 5 (g)	17.05 (14.8-18.4)	16.65 (15.5-18.4)	0.009
Peso semana 6 (g)	16.45 (14.4-17.6)	15.9 (14.8-18)	0.041
Peso semana 7 (g)	-	15.75 (14.7-17.1)	-
Peso semana 8 (g)	-	14.95 (13.9-16.5)	-
Peso semana 9 (g)	-	14.55 (13.2-16.2)	-
Peso semana 10(g)	-	14.4 (13.4-15.6)	-
Peso del hígado (g)	0.75 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.8)	0.041
Peso del ratón al sacrificio (g)	16.45 (14-17.6)	14.4 (13.4-15.6)	1
Peso del hígado/peso del ratón al sacrificio (%)	4.58 (4.19-5.39)	4.76 (4.23-5.23)	0.004
Bilirrubina total (BT) (µM/l)	7.5 (3.6-18.3)	4 (1.4-9)	0.019
Bilirrubina directa (BD) (µM/l)	5.8 (2.5-16.2)	3.3 (1.5-8.1)	0.610
Alanino aminotransferasa (ALT) (U/l)	620 (339-810)	341 (105-642)	0.937
Aspartato aminotransferasa (AST) (U/l)	514 (420-660)	268 (121-564)	0.429
Fosfatasa alcalina (FA) (U/l)	22.5 (6-46)	19 (1-52)	1

Albúmina (g/l)	31.6 (28.8-37.2)	28.1 (15.9-35.2)	0.589
Glucosa (μM/l)	6.3 (4.4-7.6)	5.3 (2.9-8.3)	0.818
Triglicéridos (μM/l)	0.61 (0.26-0.92)	0.56 (0.27-1.2)	0.485
Colesterol (μM/l)	0.6 (0.2-0.8)	0.6 (0.2-1.4)	0.699
Insulina (ng/ml)	0.29 (0.26-0.55)	0.36 (0.27-1)	0.016
Leptina (ng/ml)	1.02 (0.67-1.3)	0.81 (0.66-0.97)	0.019
Adiponectina (ng/ml)	14.1 (11.45-21.29)	14.55 (12.38-20.86)	0.095
Carnitina libre (CL) (μM/l)	42.45 (25.73-100)	32.23 (25.46-63-51)	0.931
Acilcarnitinas (AC) (μM/l)	2.52 (0.49-8.29)	2.98 (0-8.31)	0.931
Carnitina total (CT) (μM/l)	44.49 (28.25-08.29)	34.5 (26.56-71.82)	0.792
AC/CT	0.58 (0.01-0.14)	0.1 (0.1-0.13)	0.792
CL/CT	0.94 (0.86-0.99)	0.91 (0.87-1.01)	0.792
Actividad de la CPT-2 (nM sustrato/min/mg proteína)	-	5.87 (4.63-8.65)	0.548
IL-1α (pg/ml)	82.95 (0-1523.53)	78.76 (0-143.55)	0.143
IL-6 (pg/ml)	0 (0-21.57)	0	0.429
TNF-α (pg/ml)	0 (0-78.44)	0	1
Malondialdehído (μM/g proteína)	0.62 (0.31-1.07)	0.61 (0.25-1.12)	0.177
Triglicéridos hepáticos (μM/g hígado)	0.62 (0.38-2.65)	0.48 (0.26-2.34)	0.240
Grado de esteatosis (0-2/3)	4/6	8/2	0.170
Grado de inflamación lobulillar (0-1/2-3)	5/5	7/3	0.650
Hialina (0/+)	7/3	8/2	1
Balonización (ausente/presente)	8/2	7/3	1
Lipogranulomas (0 - + / ++ - +++)	6/4	5/5	1
Grado de fibrosis central/perisinusoidal (0/1-3)	6/4	6/4	1
Índice hepático	6 (3-10)	6 (3-17)	0.394

\* U de Mann Whitney [datos expresados en medianas (min-max)]

\*\*  $\chi^2$  (datos expresados en frecuencias)

En las figuras 9 a 12 se pueden apreciar las diferencias en el grado de esteatosis, grado de inflamación lobulillar, cantidad de lipogranulomas y grado de fibrosis central/perisinusoidal entre los ratones alimentados con dieta

estándar y los alimentados con la dieta DCM, tanto a las 6 como a las 10 semanas.

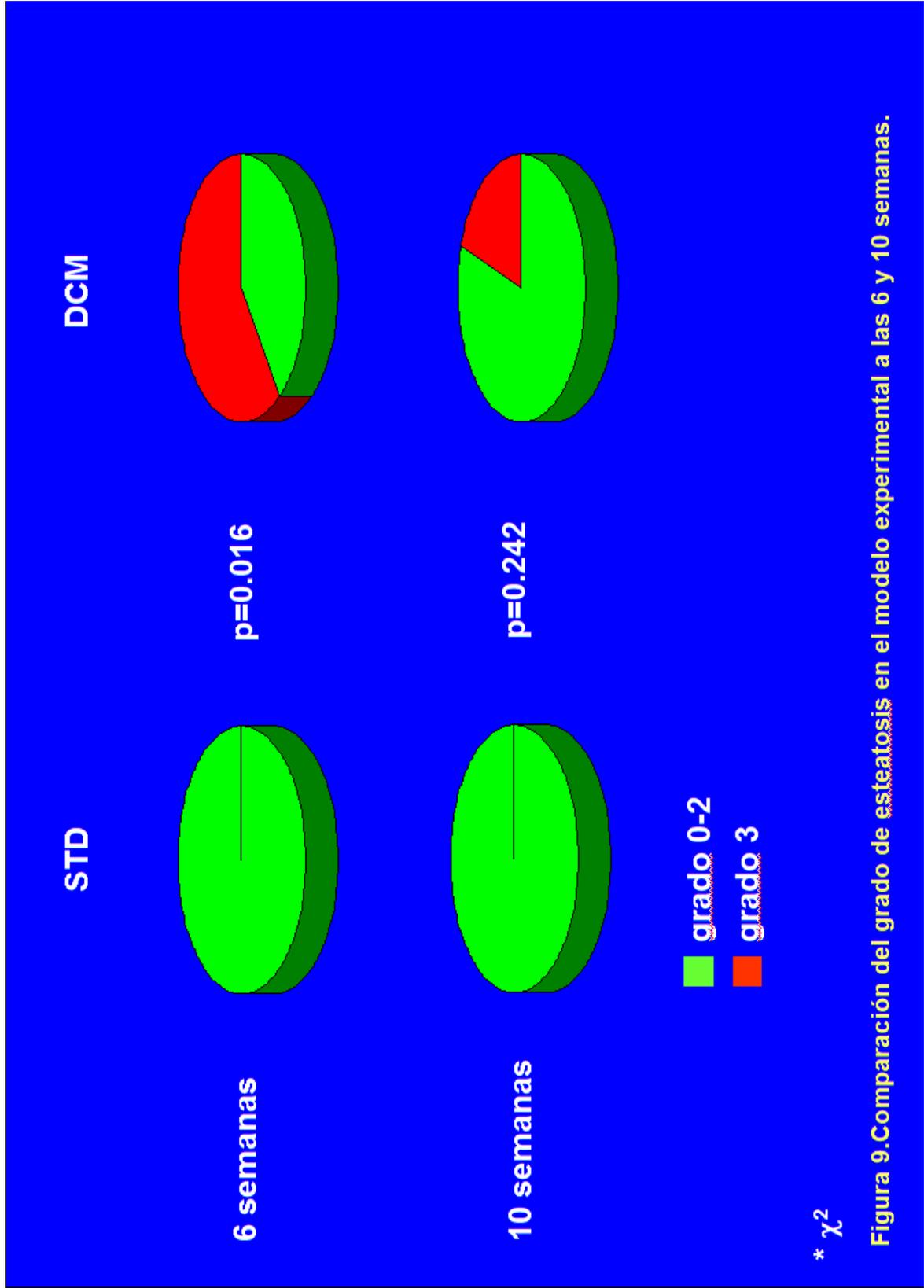


Figura 9. Comparación del grado de esteatosis en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.

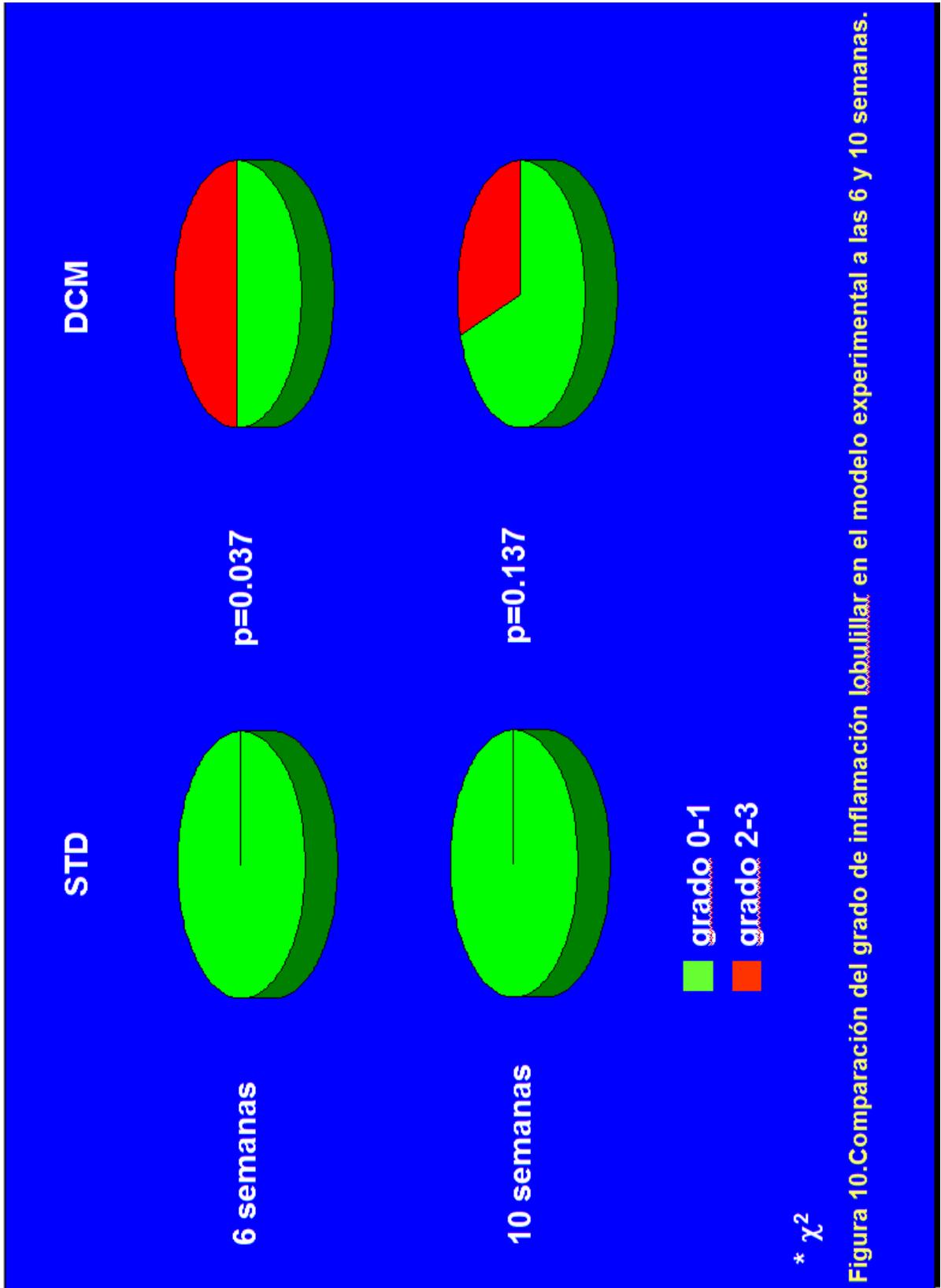


Figura 10. Comparación del grado de inflamación lobulillar en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.

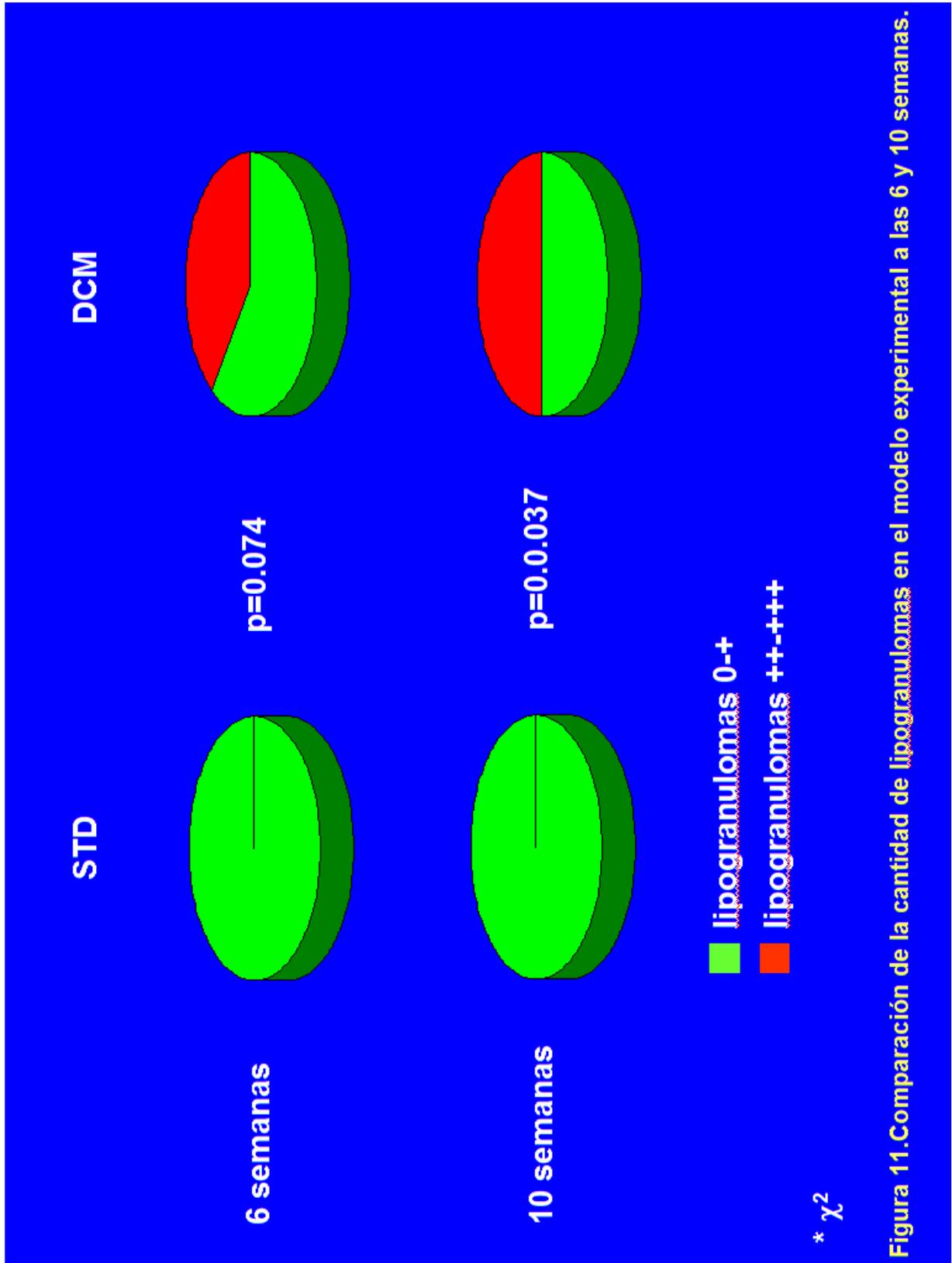


Figura 11. Comparación de la cantidad de lipogranulomas en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.

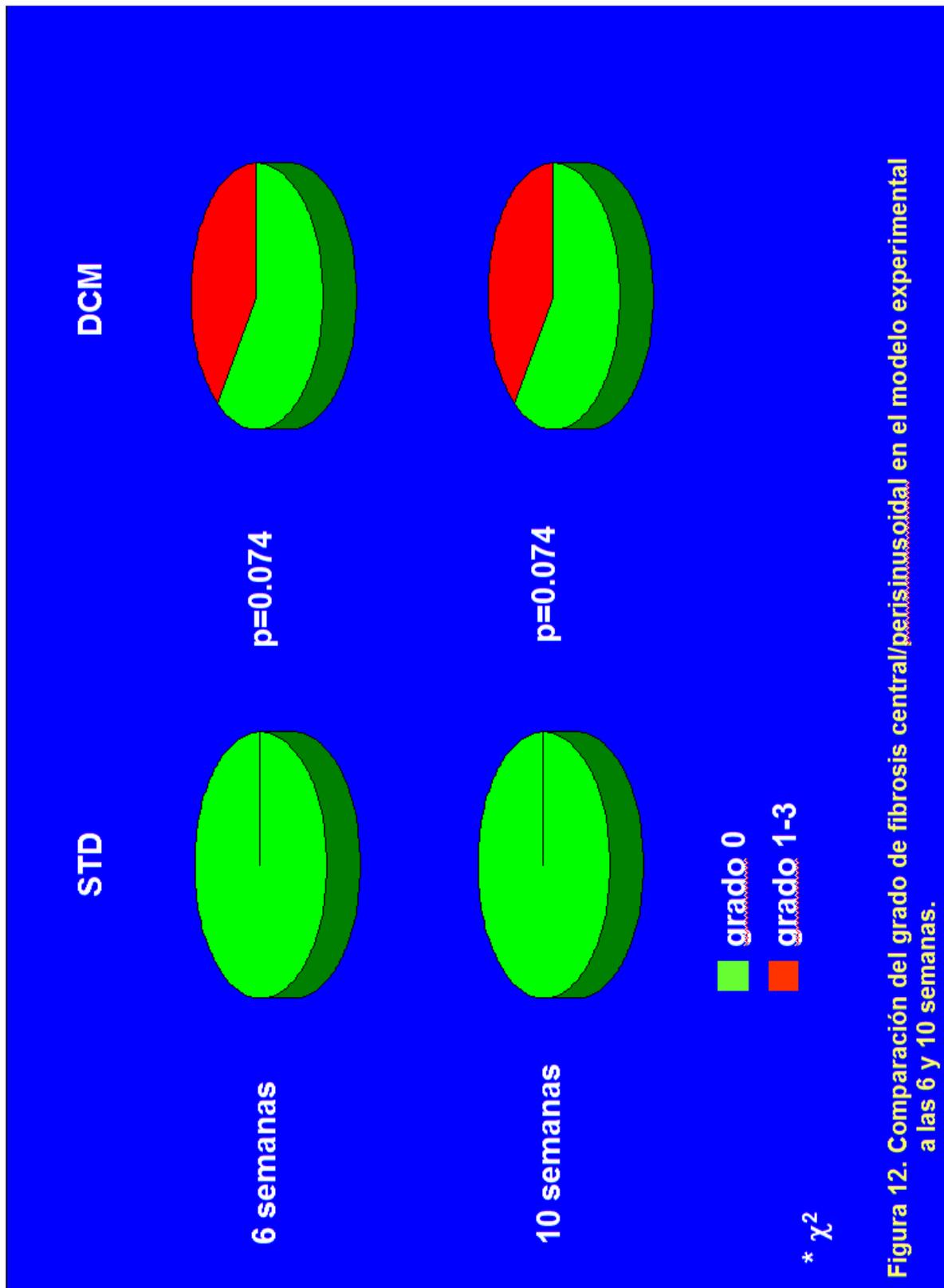


Figura 12. Comparación del grado de fibrosis central/perinusoidal en el modelo experimental a las 6 y 10 semanas.

### 7.3. Efecto de los diferentes ácidos grasos en la prevención de la enfermedad.

Se compararon todas las variables estudiadas en todos los grupos de ratones que consumieron dieta deficiente en colina y metionina (dieta DCM “control” y dietas MCT, PUFA y MP) para observar si la modificación de grasas podría aminorar el efecto de la inducción de la lesión hepática por la dieta DCM.

#### *Evolución ponderal*

En la tabla 29 se demuestra que el peso de los ratones de todos los grupos experimentales fue similar a lo largo del seguimiento, a excepción del registrado en la semana 1 –en donde los ratones MP presentaron el mayor peso- y en la semana 2, cuando en los ratones PUFA se registró el menor peso en comparación con los otros grupos de ratones.

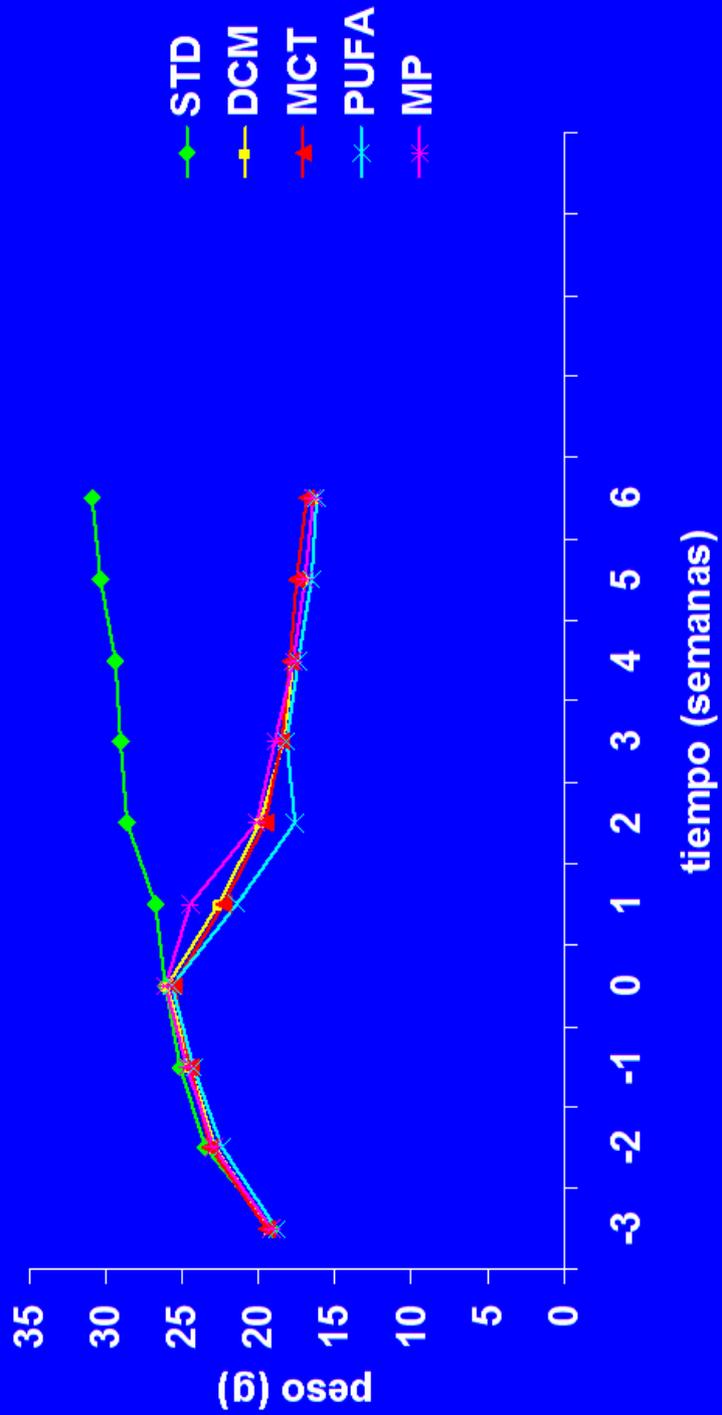
**Tabla 29. Peso semanal (g) de los ratones durante la fase de prevención.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>	<b>Observaciones**</b>
Semana -3	19.35 (18.4-20.1)	19.25 (18.2-21.3)	18.55 (17.4-20.7)	18.85 (17.8-22.2)	0.483	
Semana -2	22.6 (21.6-24.8)	23.25 (20.9-24.7)	22.15 (21-25.5)	22.45 (21.3-25.4)	0.338	
Semana 0	25.9 (24-28.1)	25.45 (23.1-28)	25.75 (23.9-28.8)	25.8 (24.1-28.5)	0.773	
Semana 1	22.85 (19.7-25.7)	22.1 (19.8-25.7)	22.1 (17.2-25)	24.4 (21.7-27)	0.045	4 vs 1. 2 y 3
Semana 2	19.95 (18.6-21)	19.2 (17.8-21.7)	17.9 (14.9-20)	20.1 (18.3-22.7)	0.020	3 vs 1. 2 y 4
Semana 3	18.55 (16.2-19.8)	18.55 (17.4- 19.8)	17.9 (16.6-19.8)	18.65 (17-20.6)	0.412	
Semana 4	17.9 (16.1-19.1)	17.95 (16.8-19.2)	17.25 (16-19.1)	17.55 (15.9-18.5)	0.602	
Semana 5	17.05 (14.8-18.4)	17.5 (16.4-18.5)	16.5 (14.4-18.4)	16.75 (15.7-18.5)	0.183	
Semana 6	16.45 (14.4-17.6)	17 (15.6-17.7)	15.9 (15.2-17.8)	16.24 (14.9-17.6)	0.296	

\* Kruskal Wallis

\*\* U de Mann Whitney

Estas ligeras diferencias pueden apreciarse en la figura 13, en la que, además, se comparan las curvas de crecimiento de estos ratones con la de los ratones que fueron alimentados con dieta estándar. La diferencia es drástica, ya que estos últimos continuaron creciendo a lo largo de las 6 semanas de seguimiento –como era natural- en contraste con los ratones alimentados con dieta DCM y modificada en su composición de ácidos grasos, cuyo peso fue disminuyendo en forma acusada.



**Figura 13. Crecimiento ponderal de todos los ratones (seguimiento: 6 semanas).**  
 (no se muestran medidas de dispersión para lograr una clara apreciación)

### ***Peso del hígado y del ratón al sacrificio***

El peso hepático y peso hepático relativo fue menor en el grupo control de ratones DCM, en comparación con los grupos con dieta DCM y modificación del tipo de grasa (tabla 30).

**Tabla 30. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones en la fase de prevención.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>	<b>Observaciones **</b>
Peso hígado (g)	0.75 (0.6-0.9)	0.85 (0.7-1)	0.95 (0.8-1)	0.95 (0.7-1.1)	0.002	1 vs 2, 3 y 4
Peso del ratón al sacrificio (g)	16.45 (14.-17.6)	17.25 (15.5-18)	16 (15.1-17.5)	16.1 (15.3-17.6)	0.208	
Peso hígado/peso ratón al sacrificio (%)	4.58 (4.19-5.39)	5.12 (4.44-5.68)	5.81 (5.13-6.37)	5.67 (4.58-6.47)	0.000	1 vs 2, 3 y 4; 2 vs 3 y 4

\* Kruskal Wallis

\*\* U de Mann Whitney

### ***Pruebas de función hepática***

En la tabla 31 se observa que los ratones MP, después de 6 semanas, mostraron el menor aumento de transaminasas y FA.

**Tabla 31. Pruebas de función hepática de los ratones en la fase de prevención.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>	<b>Observaciones**</b>
Bilirrubina total (µM/l)	7.5 (3.6-18.3)	9.35 (3.4-57.9)	18.5 (4.2-37.8)	12.3 (4.8-24.3)	0.078	
Bilirrubina directa (µM/l)	5.8 (2.5-16.2)	7.3 (3.3-53.2)	14.6 (1.8-34.6)	9.1 (3-21.1)	0.120	
ALT (U/L)	620 (339-810)	781 (186-1825)	887 (327-1508)	267 (130-780)	0.005	4 vs 1, 2 y 3
AST (U/L)	514 (420-660)	595.5 (181-1374)	498 (225-940)	221 (172-604)	0.018	4 vs 1, 2 y 3
FA (U/L)	22.5 (6-46)	22 (14-46)	45.5 (6-60)	17.5 (9-45)	0.049	3 vs 4
Albúmina (g/l)	31.6 (28.8-37.2)	34.45 (24.6-40.5)	34.55 (31.8-38)	32.5 (15.8-38.6)	0.156	

\* Kruskal Wallis

\*\* U de Mann Whitney

### ***Glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma***

Los ratones de los grupos MCT y PUFA mostraron un incremento en la concentración plasmática de triglicéridos que los ratones del grupo control. Esto no sucedió cuando se administró la combinación de MCT y PFA ω-3 (MP). No se registraron diferencias en las concentraciones plasmáticas de colesterol y glucosa entre los cuatro grupos estudiados. (tabla 32).

**Tabla 32. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones en la fase de prevención.**

	DCM (1) Mediana (min-max)	MCT (2) Mediana (min-max)	PUFA (3) Mediana (min-max)	MP (4) Mediana (min-max)	p*	Observaciones**
Glucosa (mM/l)	6.3 (4.4-7.6)	6 (4-7.2)	6.05 (4.8-9.9)	5.3 (2.7-8.9)	0.273	
Triglicéridos (mM/l)	0.61 (0.26-0.92)	0.7 (0.36-1)	0.54 (0.42-0.89)	0.42 (0.24-0.73)	0.021	4 vs 2 y 3
Colesterol (mM/l)	0.6 (0.2-0.8)	0.8 (0.4-1.2)	0.6 (0.4-1.2)	0.5 (0.2-0.7)	0.071	

\* Kruskal Wallis

\*\* U de Mann Whitney

### ***Insulina, leptina y adiponectina***

No se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de hormonas en los grupos estudiados (tabla 33).

**Tabla 33. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones en la fase de prevención.**

	DCM (1) Mediana (min-max)	MCT (2) Mediana (min-max)	PUFA (3) Mediana (min-max)	MP (4) Mediana (min-max)	p*
Insulina (ng/ml)	0.29 (0.26-0.55)	0.31 (0.26-0.47)	0.3 (0.25-0.53)	0.31 (0.26-0.62)	0.950
Leptina (ng/ml)	1.02 (0.67-1.3)	1.17 (0.67-1.94)	1.1 (0.76-1.41)	1.34 (1.09-1.87)	0.085
Adiponectina (ng/ml)	14.1 (11.45-21.29)	15.81 (6.03-63.38)	17.01 (11.57-28.64)	17.47 (15.07-7.95)	0.151

\* Kruskal Wallis

### ***Carnitina libre, acilcarnitinas, carnitina total, acilcarnitinas/carnitina total y carnitina libre/carnitina total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 en hígado***

No existieron, tampoco, diferencias en los parámetros referentes a las carnitinas y la CPT-2 en estos grupos experimentales (tabla 34).

**Tabla 34. Concentración de carnitina libre (CL), acilcarnitinas (AC), carnitina total (CT), AC/CT y CL/CT en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 (CPT-2) en hígado de los ratones en fase de prevención.**

	DCM (1) Mediana (min-max)	MCT (2) Mediana (min-max)	PUFA (3) Mediana (min-max)	MP (4) Mediana (min-max)	p*
Carnitina libre ( $\mu$ M/l)	42.45 (25.73-100)	37.35 (24.57-106)	35.7 (23.92-116)	48.5 (32.51-69.19)	0.578
Acilcarnitinas ( $\mu$ M/l)	2.52 (0.49-9.29)	4.83 (0-23.08)	2.96 (0-11.7)	4.47 (0.7.27)	0.959
Carnitina total ( $\mu$ M/l)	44.49 (28.25-108.29)	47.47 (24.57-106.94)	39.49 (24.04-116.62)	52.14 (39.68-70.96)	0.553
AC/CT	0.006 (0.01-0.14)	0.11 (0.01-0.39)	0.09 (0.01-0.32)	0.14 (0.02-0.18)	0.590
CL/CT	0.94 (0.86-0.99)	0.89 (0.61-1)	0.91 (0.68-0.99)	0.86 (0.82-0.98)	0.733
Actividad CPT-2 (nM sustrato/min/ mg proteína)	-	-	-	4.38 (4.13-44.63)	-

\* Kruskal Wallis

## Citocinas

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las citocinas entre los grupos experimentales (tabla 35).

**Tabla 35. Concentración de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en plasma de los ratones en la fase de prevención.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
IL-1 $\alpha$ (pg/ml)	82.95 (0-1523.53)	24.71 (0-116.62)	92.47 (0-188.41)	92.47 (0-195.21)	0.437
IL-6 (pg/ml)	0 (0-21.57)	0 (0-52.05)	0 (0-2.93)	0 (0-62.14)	0.845
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0 (0-78.44)	0	0	0	0.212

\* Kruskal Wallis

## Malondialdehido y triglicéridos en hígado

El malondialdehido fue significativamente mayor en los ratones MP en la fase de prevención (tabla 36).

**Tabla 36. Contenido de malondialdehido y triglicéridos en hígado de los ratones en la fase de prevención.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>	<b>Observaciones**</b>
Malondialdehido ( $\mu$ M/g proteína)	0.62 (0.31-1.07)	0.74 (0.42-2.57)	0.80 (0.59-1.7)	1.9 (0.73-5.22)	0.002	4 vs 1, 2 y 3
Triglicéridos ( $\mu$ M/g hígado)	0.62 (0.38-2.65)	0.54 (0.15-1.02)	0.69 (0.41-1.14)	0.64 (0.56-0.75)	0.721	

\* Kruskal Wallis

\*\* U de Mann Whitney

En la tabla 37 se resumen las lesiones histológicas halladas en los ratones DCM, MCT, PUFA y MP. A grandes rasgos, se observa gran desarrollo de esteatosis macrovesicular en todos los ratones, y mucha inflamación lobulillar y lipogranulomas en los ratones PUFA y MP. En esta fase (6 semanas) no se observó prácticamente desarrollo de fibrosis.

**Tabla 37. Lesiones histológicas de los ratones en la fase de prevención.**

	DCM (n)	MCT (n)	PUFA (n)	MP (n)
Grado de esteatosis				
0	0	0	0	0
1 (0-33%)	1	0	0	0
2 (33-66%)	3	2	3	1
3 (> 66%)	6	8	7	9
Tipo de esteatosis				
Microvesicular	0	0	0	0
Macrovesicular	10	10	10	10
Localización de esteatosis (zona de Rappaport)				
1	4	5	0	1
2	4	4	10	8
3	2	1	0	1
Grado de inflamación lobulillar				
0 (sin focos)	0	0	0	0
1 (1-2 focos/campo 40x)	5	5	0	1
2 (2-4 focos/campo 40x)	3	4	10	8
3 (> 4 focos/campo 40x)	2	1	0	1
Grado de inflamación portal				
Sin inflamación	10	10	10	10
Leve	0	0	0	0
Moderada	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0
Presencia de hialina				
No	7	9	10	10
+	3	1	0	0
Balonización				
No	8	9	10	8
Sí	2	1	0	2
Núcleos con glucógeno				
No	10	10	10	10
Sí	0	0	0	0
Lipogranulomas				
No	3	0	0	0
+	3	4	0	0
++	2	3	2	3
+++	2	3	8	7
Grado de fibrosis central/ perisinusoidal				
0	6	8	10	10
1	4	2	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
Grado de fibrosis portal				
0	10	10	10	10
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0

Al recategorizar el grado de las lesiones, también con el fin de aumentar el poder de la prueba estadística, se observó un incremento significativo de la incidencia de lipogranulomas en los ratones PUFA y MP y, en cambio, una mayor frecuencia de fibrosis central/perisinusoidal en los ratones DCM y MCT, aunque leveausencia de fibrosis en estos mismos grupos. Ninguno de los ratones estudiados bajo este esquema presentó fibrosis portal (tabla 38).

**Tabla 38. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones en la fase de prevención.**

	<b>DCM (n)</b>	<b>MCT (n)</b>	<b>PUFA (n)</b>	<b>MP (n)</b>	<b>p*</b>
Grado de esteatosis (0-2/3)	4/6	2/8	3/7	1/9	0.446
Grado de inflamación lobulillar (0-1/2-3)	5/5	3/7	3/7	3/7	0.725
Presencia de hialina (0/+)	7/3	9/1	10/0	10/0	0.083
Balonización (ausente/presente)	8/2	9/1	10/0	8/2	0.473
Lipogranulomas (0 - + / ++ - +++)	6/4	4/6	0/10	0/10	0.002
Grado de fibrosis central/perisinusoidal 0/1-3	6/4	8/2	10/0	10/0	0.035

\*  $\chi^2$

En las figuras 14 a 17 se pueden observar las diferencias en el grado de esteatosis, grado de inflamación lobulillar, cantidad de lipogranulomas y grado de fibrosis central/perisinusoidal entre los ratones de los grupos DCM, MCT, PUFA y MP en la fase de prevención.

No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos en el índice hepático (p=0.652):

- DCM: 6 (3-10).
- MCT: 7.5 (5-11).
- PUFA 8 (6-9).
- MP: 8 (6-10).

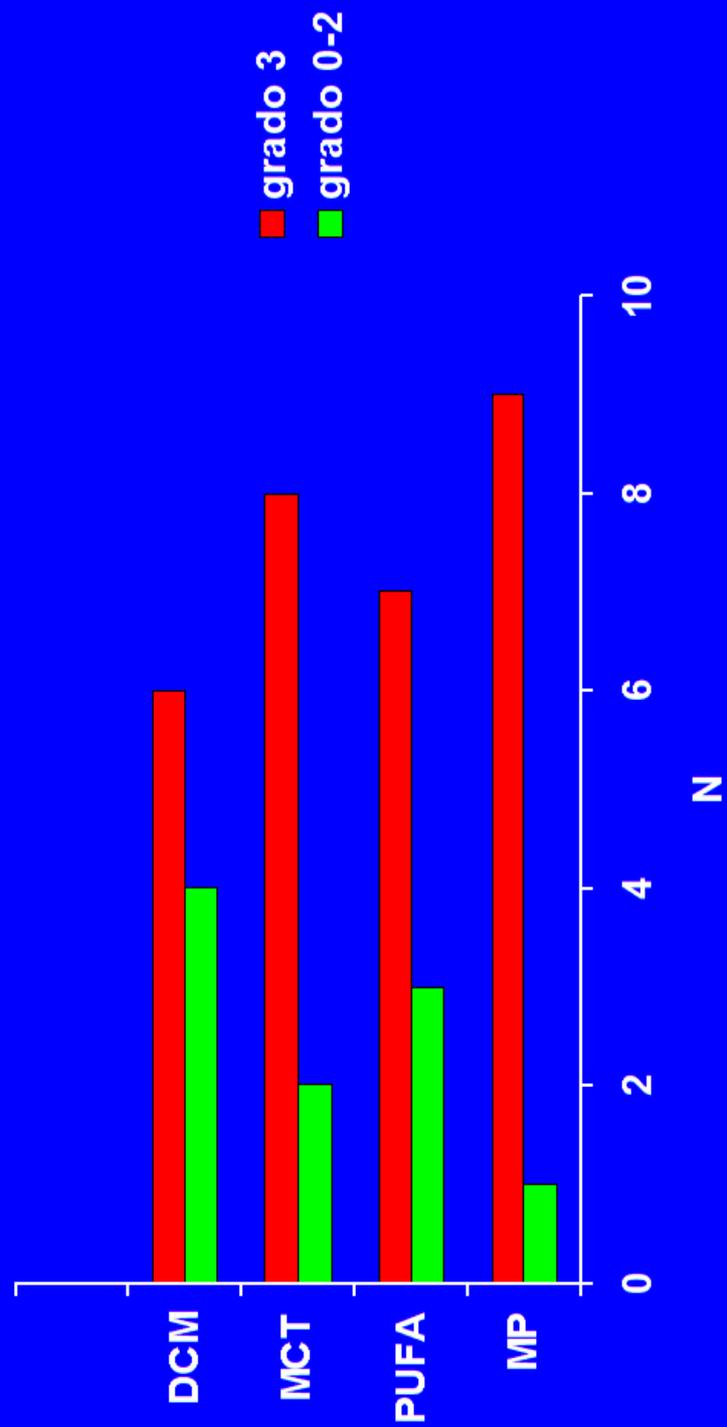


Figura 14. Comparación del grado de esteatosis en la fase de prevención.

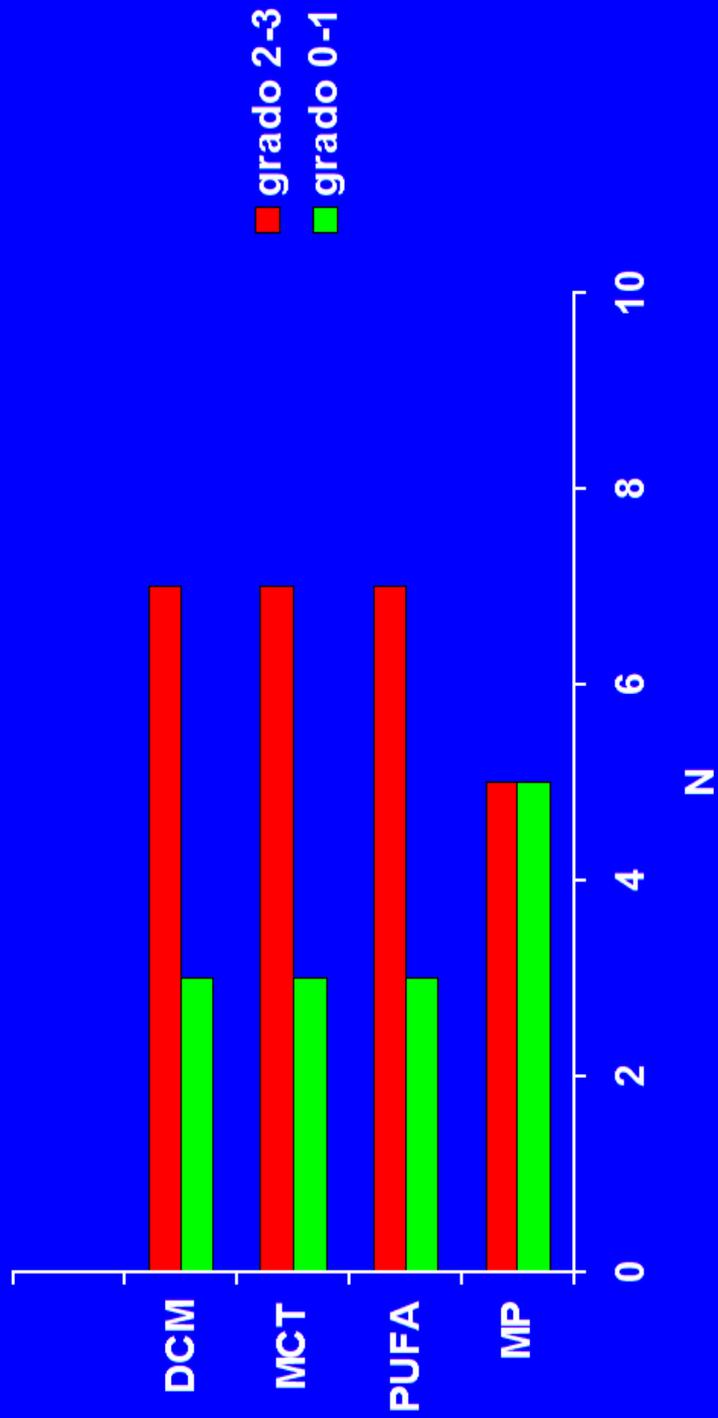


Figura 15. Comparación del grado de inflamación lobulillar en la fase de prevención.

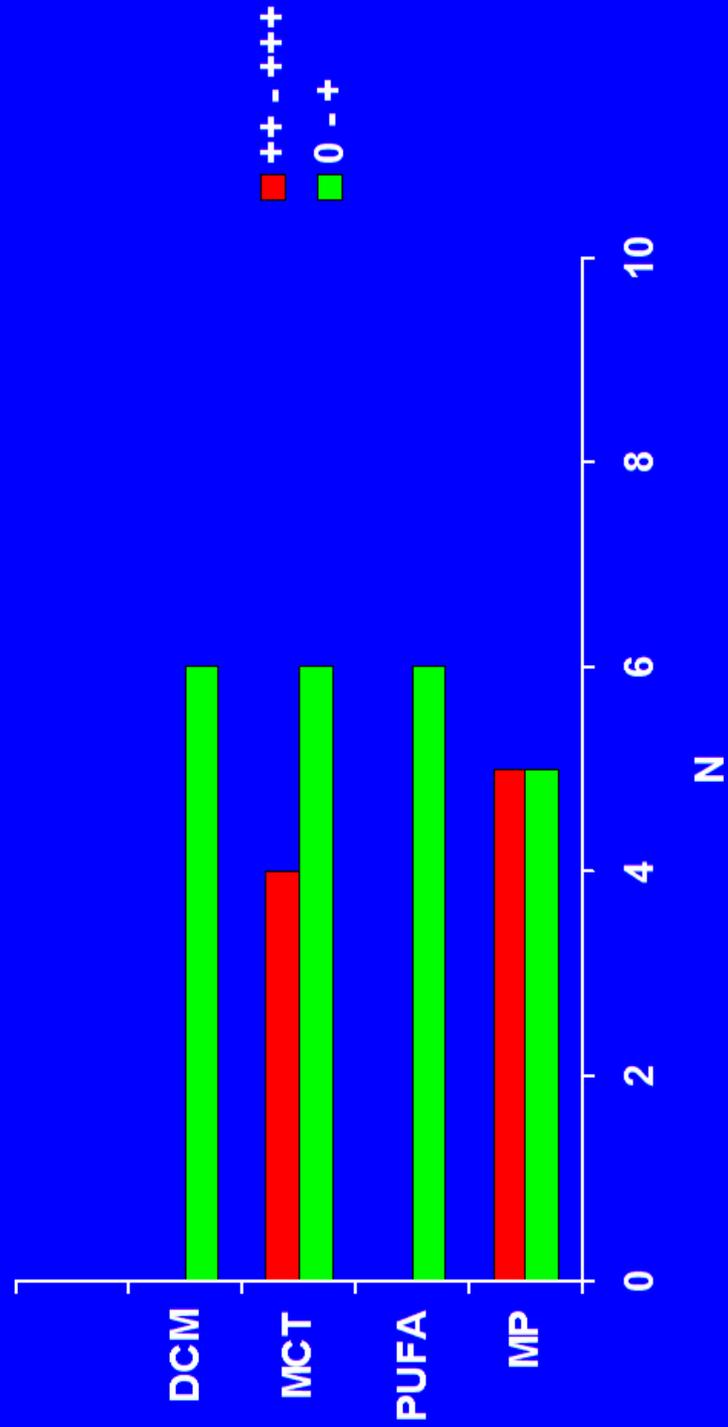


Figura 16. Comparación de la cantidad de lipogranulomas en la fase de prevención.

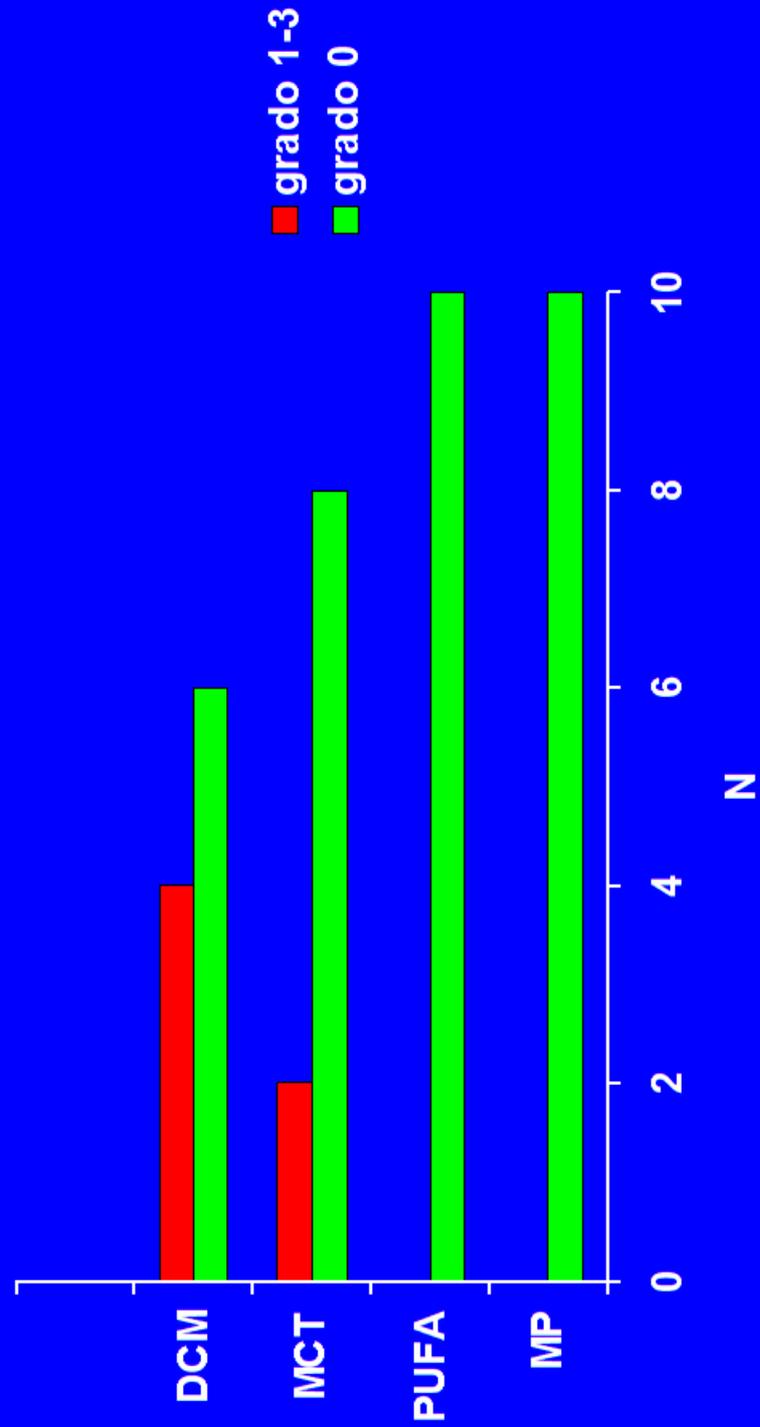


Figura 17. Comparación del grado de fibrosis central/perisinusoidal en la fase de prevención.

#### 7.4. Efecto de los diferentes ácidos grasos como tratamiento de la enfermedad.

##### *Evolución ponderal*

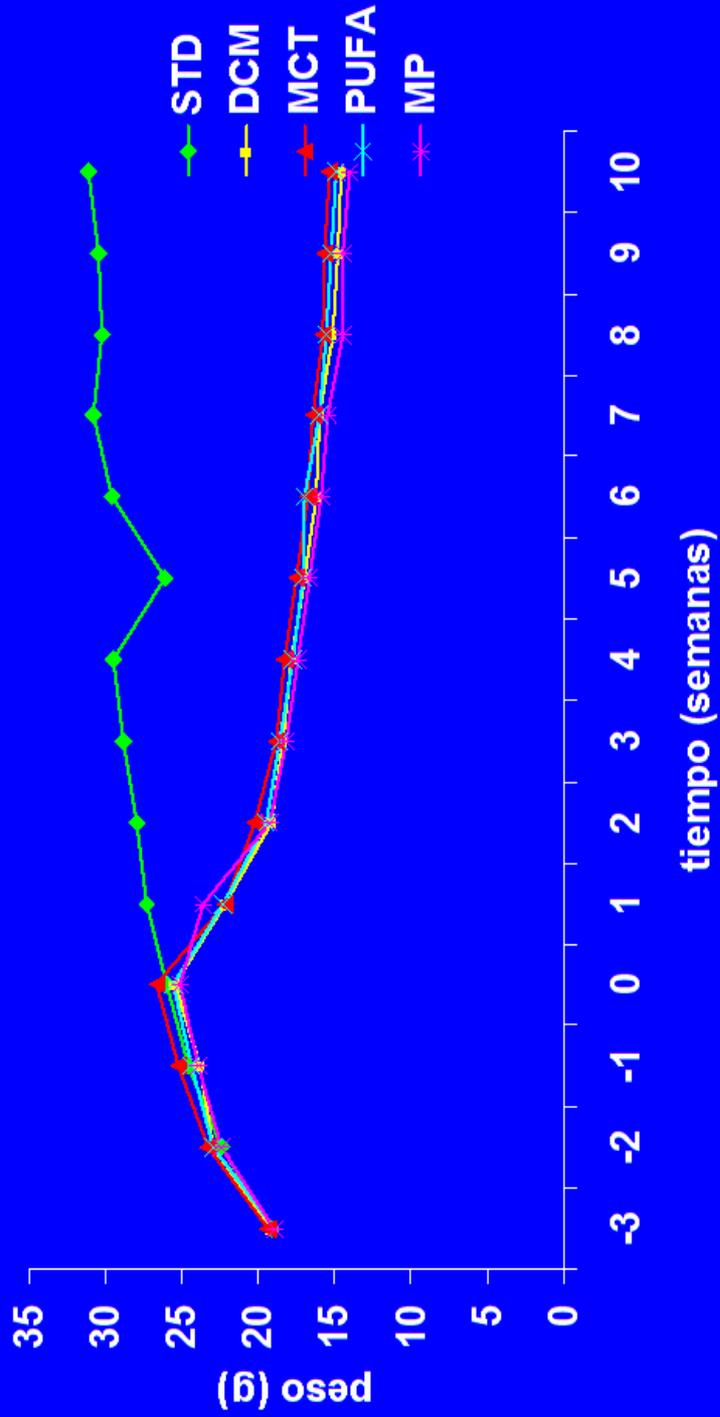
No se observó ninguna diferencia en el crecimiento ponderal en los grupos estudiados (tabla 39).

**Tabla 39. Peso semanal (g) de los ratones durante la fase de tratamiento.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Semana -3	19 (17.4-20.9)	19 (16.6-22.7)	18.7 (17.2-21.5)	18.85 (17.2-20.7)	0.887
Semana -2	22.8 (21.2-24.6)	22.7 (21.5-26.8)	22.75 (21.3-26)	22.55 (20.2-24.1)	0.704
Semana 0	24.6 (22.7-28.6)	26.75 (23.5-30.1)	25.35 (23.4-28.2)	25.65 (22.8-27.3)	0.363
Semana 1	22.85 (19.7-23.3)	20.75 (17.9-28.5)	21.8 (19.9-25.2)	23.6 (20.5-25.2)	0.282
Semana 2	19.45 (17.5-20.2)	19.9 (17.9-23.6)	19.1 (18.3-21.7)	19.35 (16.4-21)	0.665
Semana 3	17.95 (16.8-20.3)	18.25 (17.1-22.4)	18.25 (17.2-0.8)	18.55 (16.4-19.6)	0.965
Semana 4	17.4 (16.5-19.5)	17.4 (16.8-21.9)	17.55 (16.2-20.1)	17.65 (15.5-18.7)	0.979
Semana 5	16.65 (15.5-18.4)	16.85 (16.1-21.3)	16.95 (16-19.3)	16.95 (15.1-17.7)	0.947
Semana 6	15.9 (14.8-18)	16.15 (15.8-19.4)	16.7 (15.5-19.2)	15.95 (14.6-16.9)	0.164
Semana 7	15.75 (14.7-17.1)	15.9 (15.3-19.1)	15.8 (15.1-18)	15.7 (13.8-16.4)	0.690
Semana 8	14.95 (13.9-16.5)	15.3 (14.7-18.3)	15.35 (14.7-17.7)	14.95 (10.3-15.6)	0.298
Semana 9	14.55 (13.2-16.2)	15.35 (14.6-17.9)	15 (14.2-17.7)	14.75 (12.6-15.4)	0.152
Semana 10	14.4 (13.4-15.6)	14.8 (14.1-18.1)	14.6 (13.9-17.5)	14.15 (12.4-14.9)	0.155

\* Kruskal Wallis

De igual manera, y en comparación con la fase de prevención, se observa la drástica diferencia entre los ratones alimentados con dieta estándar (en continuo crecimiento) en contraste con los demás ratones, que por lo contrario disminuyeron de peso a lo largo de las 10 semanas de seguimiento (figura 18).



**Figura 18. Crecimiento ponderal de todos los ratones (seguimiento: 10 semanas).**  
 (no se muestran medidas de dispersión para lograr una clara apreciación)

### ***Peso del hígado y del ratón al sacrificio***

El peso hepático absoluto y relativo y del ratón al sacrificio fue similar en los cuatro grupos experimentales estudiados (tabla 40).

**Tabla 40. Peso del hígado y del ratón al sacrificio de los ratones en la fase de tratamiento.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Peso hígado (g)	0.7 (0.6-0.8)	0.7 (0.5-0.9)	0.8 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.8)	0.189
Peso del ratón Al sacrificio (g)	14.4 (13.4-15.6)	14.8 (14.1-18.1)	14.6 (13.9-17.5)	14.15 (12.4-14.9)	0.155
Peso hígado/peso ratón al sacrificio (%)	4.76 (4.23-5.23)	4.89 (3.29-5.67)	5.31 (4.32-5.81)	4.88 (4.11-6.02)	0.323

\* Kruskal Wallis

### ***Pruebas de función hepática***

No se observaron diferencias significativas en la función sintética hepática, enzimas o bilirrubinas en los grupos estudiados (tabla 41).

**Tabla 41. Pruebas de función hepática de los ratones en la fase de tratamiento.**

	<b>DCM (1) Mediana (min-max)</b>	<b>MCT (2) Mediana (min-max)</b>	<b>PUFA (3) Mediana (min-max)</b>	<b>MP (4) Mediana (min-max)</b>	<b>p*</b>
Bilirrubina total ( $\mu$ M/l)	4 (1.4-9)	6.3 (2.7-50.5)	8.4 (3-13.2)	6.6 (2.8-16)	0.310
Bilirrubina directa ( $\mu$ M/l)	3.3 (1.5-8.1)	3.2 (2-48.2)	6 (1.2-10.7)	5.15 (2.1-13.8)	0.471
ALT (U/l)	341 (105-642)	298 (70-681)	324 (219-610)	311.5 (103-649)	0.995
AST (U/l)	268 (121-564)	243 (160-420)	274 (29-328)	284 (146-463)	0.906
FA (U/l)	19 (1-52)	11 (6-91)	14 (3-54)	17.5 (6-32)	0.909
Albúmina (g/l)	28.1 (15.9-35.2)	30.6 (23.6-42.6)	29.3 (26.4-34)	29.15 (27-32.2)	0.552

\* Kruskal Wallis

### ***Glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma***

La tabla 42 muestra que los cuatro grupos de ratones a los que se le dio dieta DCM (con o sin modificación del tipo de grasa) presentaron valores similares de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma.

**Tabla 42. Concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma de los ratones en la fase de tratamiento.**

	DCM (1) Mediana (min-max)	MCT (2) Mediana (min-max)	PUFA (3) Mediana (min-max)	MP (4) Mediana (min-max)	p*
Glucosa (mM/l)	5.3 (2.9-8.3)	3.9 (0.5-6)	4.4 (3.9-6.4)	5.2 (3.5-5.8)	0.818
Triglicéridos (mM/l)	0.56 (0.27-1.20)	0.74 (0.4-1.1)	0.66 (0.46-0.88)	0.5 (0.26-0.84)	0.123
Colesterol (mM/l)	0.6 (0.2-1.4)	1 (0.4-1.6)	0.6 (0.3-1.2)	0.65 (0.4-1)	0.194

\* Kruskal Wallis

### ***Insulina, leptina y adiponectina en plasma***

En la tabla 43 se muestra que únicamente los ratones MP mostraron alguna diferencia estadística con respecto a los otros ratones, ya que la insulinemia fue menor en este grupo.

**Tabla 43. Concentración de insulina, leptina y adiponectina en plasma de los ratones de la fase de tratamiento.**

	DCM (1) Mediana (min-max)	MCT (2) Mediana (min-max)	PUFA (3) Mediana (min-max)	MP (4) Mediana (min-max)	p*	Observaciones **
Insulina (ng/ml)	0.36 (0.27-1)	0.29 (0.26-0.38)	0.31 (0.25-0.78)	0.27 (0.24-0.38)	0.027	4 vs 1 y 3
Leptina (ng/ml)	0.81 (0.66-0.97)	1.02 (0.75-1.56)	0.91 (0.83-1.27)	0.88 (0.5-1)	0.089	
Adiponectina (ng/ml)	14.55 (12.38-20.86)	12.98 (8.98-33.13)	14.9 (10.51-22.55)	20.7 (9.45-32.46)	0.115	

\* Kruskal Wallis

\*\* U de Mann Whitney

### ***Carnitina libre, acilcarnitinas, carnitina total, acilcarnitinas/carnitina total y carnitina libre/carnitina total en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 en hígado***

Ninguno de los grupos estudiados mostró diferencias en las concentraciones de carnitinas o actividad de CPT-2 (tabla 44).

**Tabla 44. Concentración de carnitina libre (CL), acilcarnitinas (AC), carnitina total (CT), AC/CT y CL/CT en plasma; y actividad de carnitín-palmitoil transferasa-2 (CPT-2) en hígado de los ratones en fase de tratamiento.**

	DCM (1) Mediana (min-max)	MCT (2) Mediana (min-max)	PUFA (3) Mediana (min-max)	MP (4) Mediana (min-max)	p*
Carnitina libre (μM/l)	32.23 (25.46-63.51)	47.37 (28.04-87)	49.12 (26.88-75.95)	44 (26.5-70.11)	0.499
Acilcarnitinas (μM/l)	2.98 (0-8.31)	1 (0.18-11.2)	0.9 (0-7.55)	4.42 (0.63-47.33)	0.544
Carnitina total (μM/l)	34.5 (26.56-71.82)	51.27 (32.13-87.44)	50.02 (26.88-76.52)	45.58 (28.71-117.44)	0.405
AC/CT	0.1 (0.01-0.13)	0.02 (0-0.17)	0.69 (0.01-0.13)	0.13 (0.02-0.4)	0.345
CL/CT	0.91 (0.87-1.01)	0.98 (0.83-1)	0.98 (0.87-1)	0.89 (0.6-1.01)	0.351
Actividad CPT-2 (nM sustrato/min/mg proteína)	5.87 (4.64-8.65)	5.89 (5.07-8.49)	5.78 (4.34-6.7)	5.55 (4.35-6.7)	0.726

\* Kruskal Wallis

## Citocinas

No se encontraron, tampoco, diferencias en las concentraciones de citocinas proinflamatorias en los grupos estudiados durante la fase de tratamiento (tabla 45).

**Tabla 45. Concentración de IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en plasma de los ratones en la fase de tratamiento.**

	<b>DCM (1)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>MCT (2)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>PUFA (3)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>MP (4)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>p*</b>
IL-1 $\alpha$ (pg/ml)	78.76 (0-143.55)	34.7 (0-102.23)	50.57 (0-136.02)	17.58 (0-102.23)	0.201
IL-6 (pg/ml)	0	0 (0-148.77)	0 (0-90.43)	0 (0-96.86)	0.547
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0	0	0	0	1

\* Kruskal Wallis

## Malondialdehido y triglicéridos en hígado

No se encontraron diferencias francas en los valores de malondialdehido o triglicéridos hepáticos en los grupos estudiados (tabla 46).

**Tabla 46. Contenido de malondialdehido y triglicéridos en hígado de los ratones en la fase de tratamiento.**

	<b>DCM (1)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>MCT (2)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>PUFA (3)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>MP (4)</b> <b>Mediana</b> <b>(min-max)</b>	<b>p*</b>
Malondialdehido ( $\mu$ M/g proteína)	0.62 (0.25-1.12)	0.66 (0.28-2.17)	0.63 (0.32-1.93)	0.97 (0.66-5.29)	0.070
Triglicéridos ( $\mu$ M/g hígado)	0.47 (0.26-2.34)	0.66 (0.37-3.74)	0.44 (0.31-1.18)	0.39 (0.26-0.6)	0.080

\* Kruskal Wallis

En la tabla 47 se resumen las lesiones histológicas halladas en los ratones DCM, MCT, PUFA y MP. Se observa, al igual que en la fase de prevención, una elevada incidencia (y grado) de esteatosis hepática (siempre macrovesicular) en casi todos los ratones, inflamación lobulillar de diversos grados, mínima inflamación portal, balonización en algunos casos, y presencia de lipogranulomas en prácticamente todos los grupos, en diferente grado. Se observó, además, más fibrosis central que en la fase de prevención; la fibrosis portal fue, de la misma manera, muy poco frecuente.

**Tabla 47. Lesiones histológicas de los ratones en la fase de tratamiento.**

	DCM (n)	MCT (n)	PUFA (n)	MP (n)
Grado de esteatosis				
0	0	0	0	0
1 (0-33%)	2	1	0	0
2 (33-66%)	6	3	9	6
3 (> 66%)	2	6	1	4
Tipo de esteatosis				
Microvesicular	0	0	0	0
Macrovesicular	10	10	10	10
Localización de esteatosis (zona de Rappaport)				
1				
2	1	4	0	0
3	6	4	7	7
	3	2	3	3
Grado de inflamación lobulillar				
0 (sin focos)	0	0	0	0
1 (1-2 focos/campo 40x)	7	1	2	3
2 (2-4 focos/campo 40x)	2	6	5	6
3 (> 4 focos/campo 40x)	1	3	3	1
Grado de inflamación portal				
Sin inflamación	9	9	10	10
Leve	1	1	0	0
Moderada	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0
Presencia de hialina				
No	8	6	8	8
+	2	4	2	2
Balonización				
No	7	5	7	10
Sí	3	5	3	0
Núcleos con glucógeno				
No	10	10	10	10
Sí	0	0	0	0
Lipogranulomas				
No	0	0	1	0
+	5	1	0	2
++	3	6	3	5
+++	2	3	6	3
Grado de fibrosis central/perisinusoidal				
0	6	3	1	7
1	3	5	8	3
2	0	2	1	0
3	1	0	0	0
Grado de fibrosis portal				
0	9	7	10	10
1	0	3	0	0
2	0	0	0	0
3	1	0	0	0

Al recategorizar nuevamente el grado de las lesiones, para incrementar el poder de la prueba estadística, no se observaron beneficios atribuibles a las modificaciones dietéticas evaluadas. En cambio, se observó un aumento significativo de la incidencia de inflamación lobulillar en el grupo MCT y en el grado de fibrosis central/perisinusoidal en el grupo PUFA (tabla 48).

**Tabla 48. Comparación de las lesiones histológicas de los ratones en la fase de tratamiento.**

	<b>DCM (n)</b>	<b>MCT (n)</b>	<b>PUFA (n)</b>	<b>MP (n)</b>	<b>p*</b>
Grado de esteatosis (0-2/3)	8/2	4/6	9/1	6/4	0.081
Grado de inflamación lobulillar (0-1/2-3)	7/3	1/9	2/8	3/7	0.024
Presencia de hialina (0/+)	8/2	6/4	8/2	8/2	0.659
Balonización (ausente/presente)	7/3	5/5	7/3	10/0	0.094
Lipogranulomas (0 - + / ++ - +++)	5/5	1/9	1/9	2/8	0.104
Grado de fibrosis central/perisinusoidal 0/1-3	6/4	3/7	1/9	7/3	0.025

\*  $\chi^2$

Por último, en las figuras 19 a 22 se pueden observar las diferencias en el grado de esteatosis, grado de inflamación lobulillar, cantidad de lipogranulomas y grado de fibrosis central/perisinusoidal entre los ratones de los grupos DCM, MCT, PUFA y MP en la fase de tratamiento.

Como consecuencia, tanto la dieta MCT como la dieta PUFA contribuyeron a incrementar significativamente el índice hepático respecto al grupo control DCM. Este efecto se atenuó cuando se utilizaron mezclas MCT/PUFA  $\omega$ -3 (MP) (p=0.026, prueba de Kruskal-Wallis):

- DCM: 6 (3-17).
- MCT: 9.5 (4-12).
- PUFA 8.5 (5-10).
- MP: 7 (4-11).

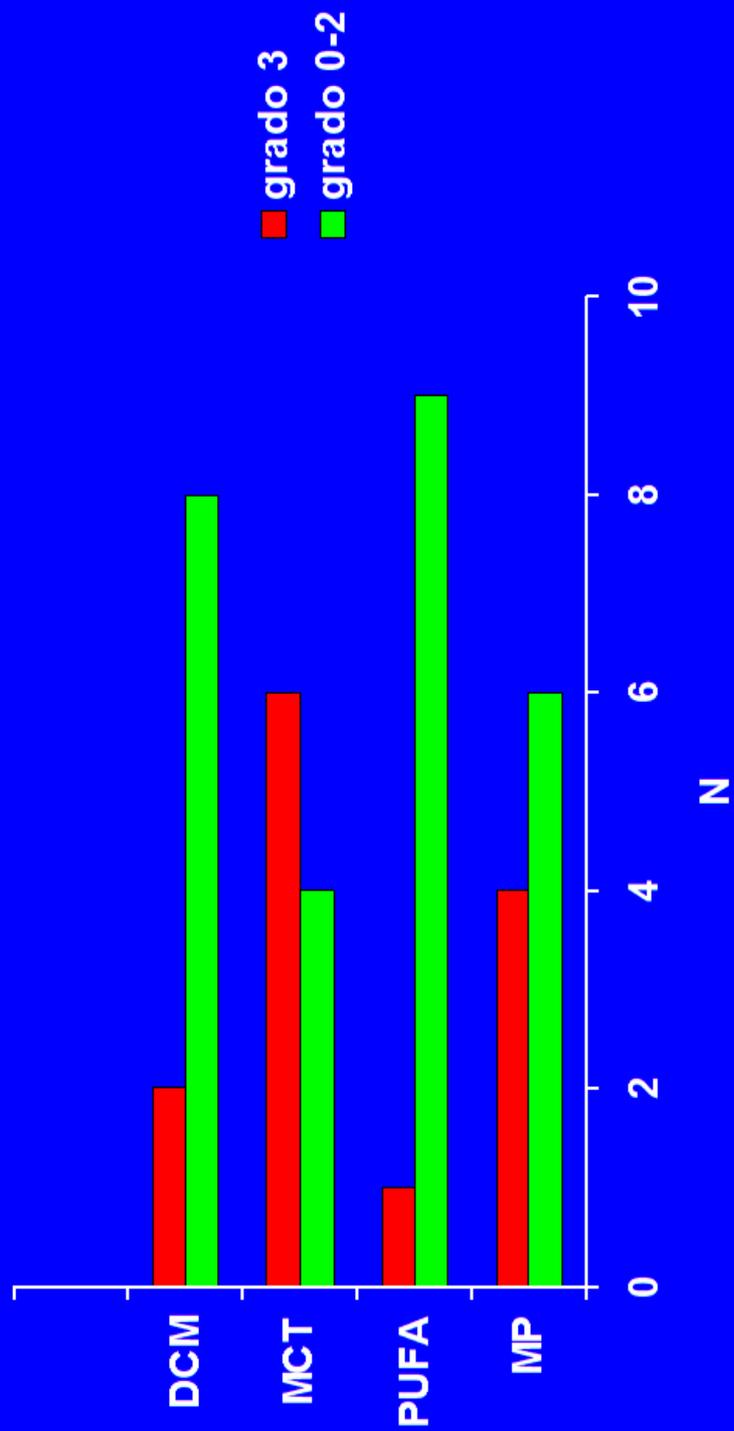


Figura 19. Comparación del grado de esteatosis en la fase de tratamiento.

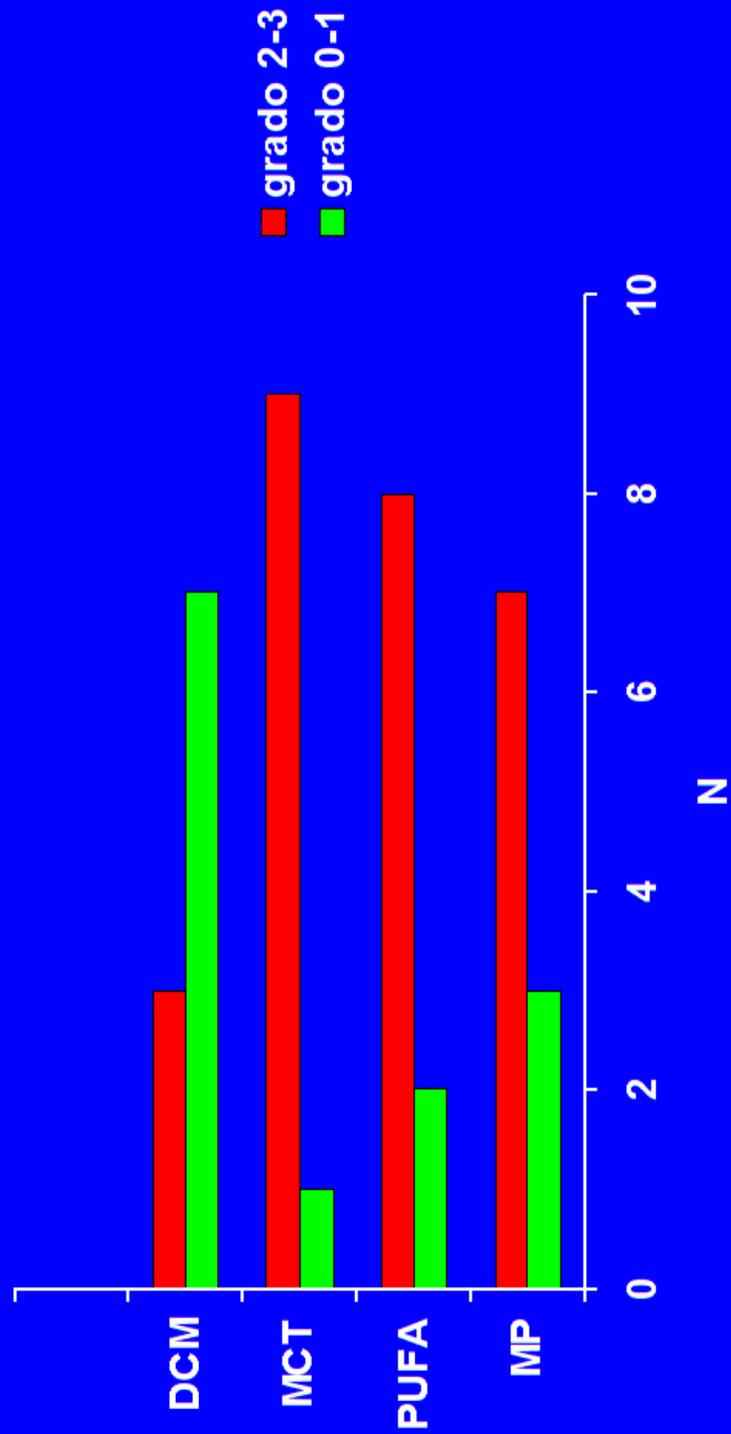


Figura 20. Comparación del grado de inflamación lobulillar en la fase de tratamiento.

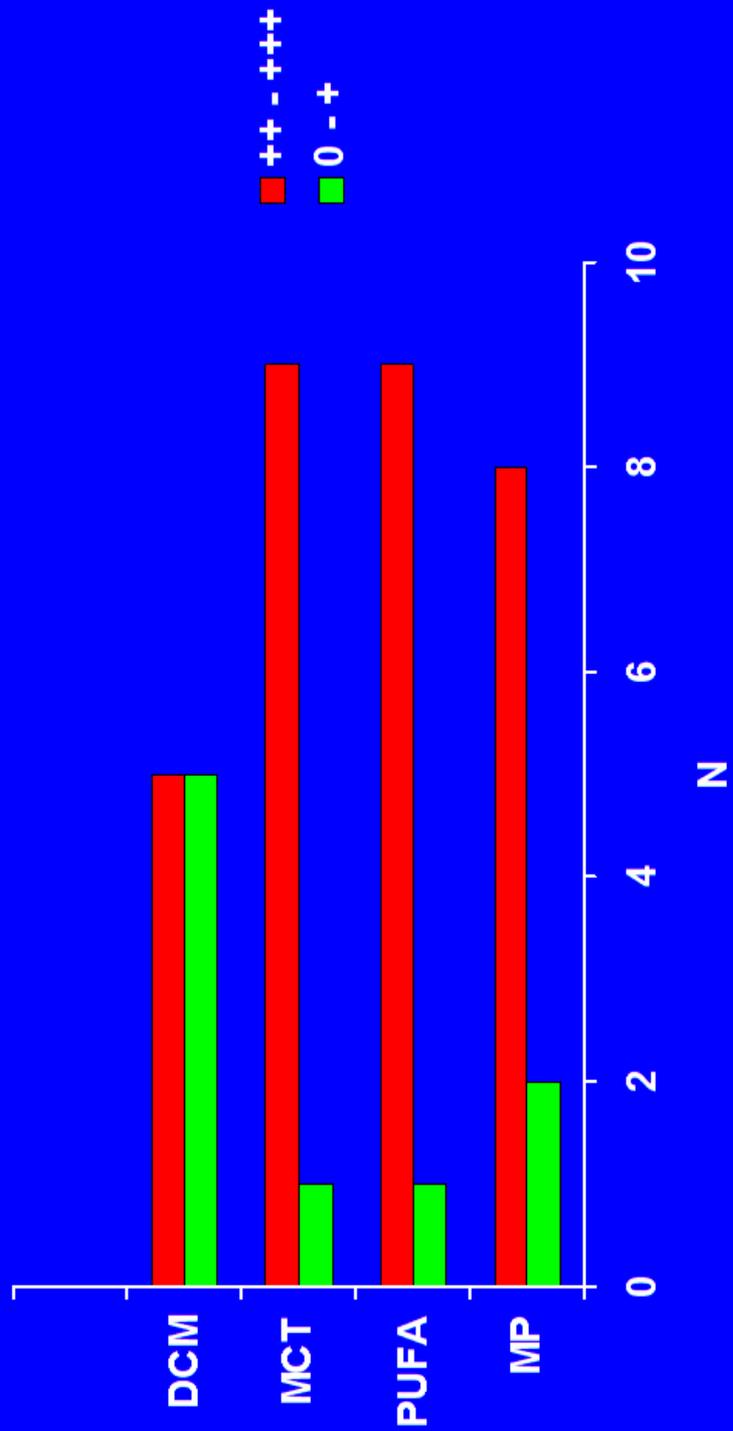


Figura 21. Comparación de la cantidad de lipogranulomas en la fase de tratamiento.

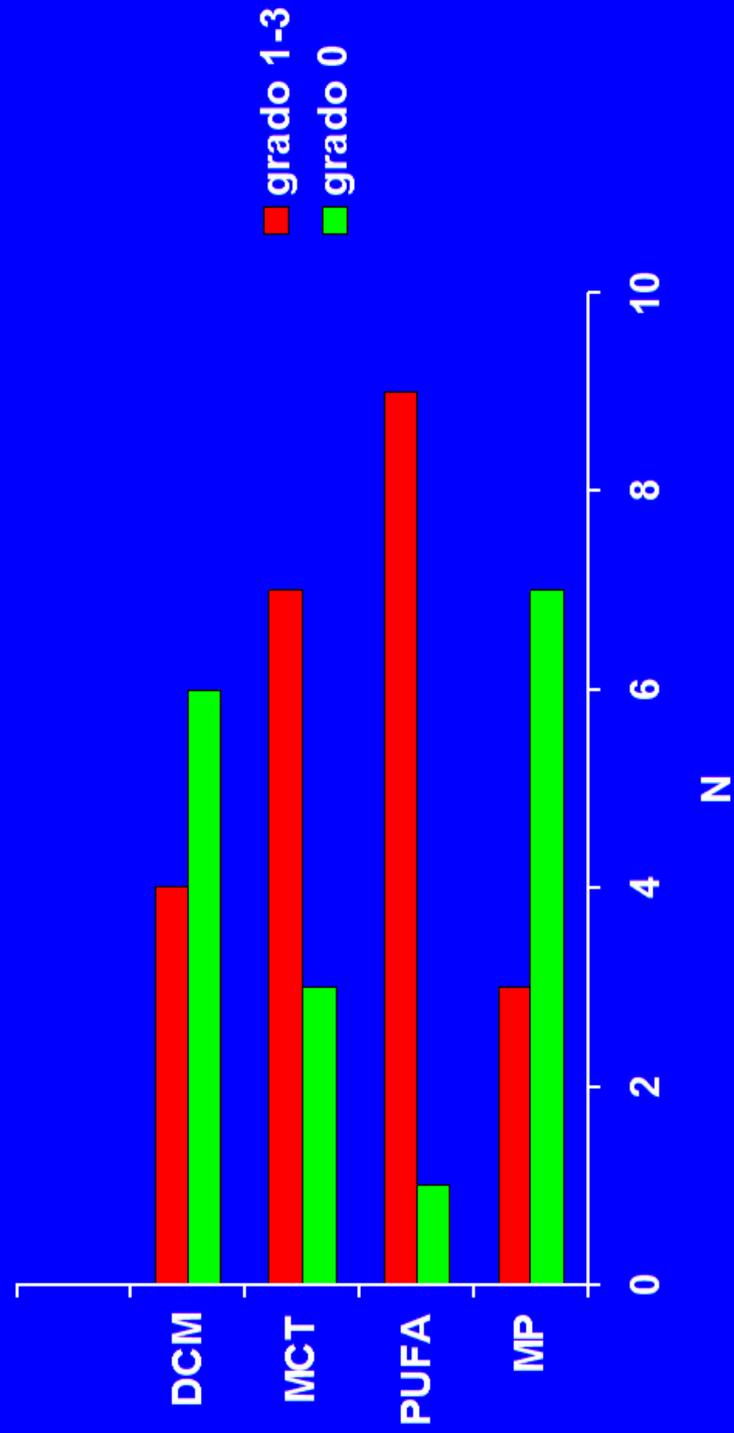


Figura 22. Comparación del grado de fibrosis central/perisinusoidal en la fase de tratamiento.

La tabla 49 resume las diferencias encontradas entre los grupos de experimentación (DCM, MCT, PUFA y MP) en la fase de prevención y en la de tratamiento, sin pretender comparar las fases entre sí.

Se observó que en la fase de *prevención* los ratones que tuvieron menor peso en la primera semana después de iniciar la dieta de inducción fueron los ratones MP, mientras que en la segunda, fueron los ratones PUFA. Exceptuando estas dos semanas, el decremento ponderal no fue diferente entre los grupos estudiados. El peso hepático fue similar en todos los grupos, exceptuando el de los ratones DCM, que fue el menor. El peso hepático relativo también fue menor en los ratones DCM, seguido de los ratones MCT, aunque fue similar en los ratones PUFA y MP. Las transaminasas fueron más elevadas en los ratones DCM, MCT y PUFA que en los ratones MP. La fosfatasa alcalina fue mayor en los ratones MCT. Los triglicéridos plasmáticos también fueron más elevados en los ratones MCT que en los PUFA, y en éstos últimos que en los ratones MP; los ratones MP presentaron la mayor concentración de malondialdehído hepático; se encontraron más lipogranulomas en los ratones PUFA y MP que en los DCM y MCT y, finalmente, el grado de fibrosis en los ratones DCM fue mayor que en el resto de los ratones.

Se observó que en la fase de *tratamiento* la concentración de insulina fue menor en el grupo MP; que el grupo de ratones DCM presentó la mayor frecuencia y grado de inflamación lobulillar, seguido de los ratones MCT y PUFA; que los ratones MCT presentaron el mayor grado de fibrosis central y que los ratones DCM, sin embargo, tuvieron mayor índice hepático que los ratones MCT y PUFA.

**Tabla 49. Peso corporal y hepático, y parámetros bioquímicos e histológicos de los ratones en las fases de prevención y de tratamiento.**

	<b>Prevención</b>	<b>Tratamiento</b>
Peso semanal	S1: 4<1=2=3 S2: 3<1=2=4	=
Peso del hígado	1<2=3=4	=
Peso del ratón al sacrificio	=	=
Peso del hígado/peso del ratón al sacrificio (%)	1<2<3=4	=
Bilirrubina total (BT)	=	=
Bilirrubina directa (BD)	=	=
Alanino aminotransferasa (ALT)	4<1=2=3	=
Aspartato aminotransferasa (AST)	4<1=2=3	=
Fosfatasa alcalina (FA)	3>4; 1=2	=
Albúmina	=	=
Glucosa	=	=
Triglicéridos	2>3>4	=
Colesterol	=	=
Insulina	=	4<1=3
Leptina	=	=
Adiponectina	=	=
Carnitina libre (CL)	=	=
Acilcarnitinas (AC)	=	=
Carnitina total (CT)	=	=
AC/CT	=	=
CL/CT	=	=
Actividad de la CPT-2	-	=
IL-1 $\alpha$	=	=
IL-6	=	=
TNF- $\alpha$	=	=
Malondialdehido	4>1=2=3	=
Triglicéridos hepáticos	=	=
Grado de esteatosis	=	=
Grado de inflamación lobulillar	=	2>3>4=1
Hialina	=	=
Balonización	=	=
Lipogranulomas	3=4>2=1	=
Grado de fibrosis central/perisinusoidal	1>2=3=4	3>2=1=4
Indice hepático	=	1<2=3; 2>4

DCM=1; MCT=2; PUFA=3; MP=4

### **7.5. Correlación de las variables indicadoras de esteatosis y esteatohepatitis en el modelo estudiado.**

En el modelo estudiado (ratón DCM), las variables indicadoras de esteatosis (grado de esteatosis y triglicéridos hepáticos) y esteatohepatitis [“inflamación” (diversos parámetros) y fibrosis] no mostraron ninguna correlación relevante (coeficiente de correlación o “R” muy bajo y/o p no significativa):

- A las 6 semanas. salvo en el caso de la adiponectina con los lipogranulomas ( $r=-0.866$ ,  $p=0.012$ ), la leptina con la fibrosis central/perisinusoidal ( $r=-0.264$ ,  $p=0.020$ ) y los triglicéridos hepáticos con el grado de esteatosis ( $r=0.245$ ,  $p=0.019$ ).
- A las 10 semanas, salvo en el caso del grado de inflamación central/perisinusoidal con la AST ( $r=0.677$ ,  $p=0.045$ ), la hialina con la AST ( $r=0.73$ ,  $p=0.025$ ). la balonización con la adiponectina ( $r=-0.570$ ,  $p=0.086$ ). los lipogranulomas con la leptina ( $r=0.935$ ,  $p<0.001$ ) y los triglicéridos hepáticos con la AC/CT ( $r=0.9$ ,  $p=0.037$ ).

### 7.6. Incorporación de los ácidos grasos en la membrana eritrocitaria.

En la tabla 50 se puede observar que los ratones tratados con PUFA incorporaron más C16:0 que los STD y MCT; en cambio, los ratones MCT incorporaron menos C16:1  $\omega$ -7, C18:0, C18:1  $\omega$ -9 y C18:2  $\omega$ -6 que los ratones PUFA.

**Tabla 50. Incorporación de ácidos grasos en la membrana membrana eritrocitaria (mg/g proteína).**

	STD (1) Mediana (min-max)	MCT (2) Mediana (min-max)	PUFA (3) Mediana (min-max)	P	Observaciones
C10	0	0 (0-0.02)	0	0.136	
C12	0 (0-0.03)	0 (0-0.01)	0 (0-0.08)	0.638	
C14	0.03 (0.02-0.06)	0.1 (0.03-0.15)	0.12 (0.04-1.06)	0.347	
C16:0	3.05 (2.05-3.65)	2.11 (1.87-2.97)	3.77 (3.12-25.8)	0.009	3 vs 1 y 2
C16:1 $\omega$ -7	0.08 (0.03-0.1)	0.05 (0.4-0.09)	0.18 (0.07-7.76)	0.016	2 vs 3
C18:0	1.67 (1.06-2.88)	1.21 (1.08-2.26)	2.13 (1.8-13)	0.047	2 vs 3
C18:1 $\omega$ -9	0.99 (0.66-1.19)	0.48 (0.41-0.84)	0.84 (0.62-6.07)	0.047	2 vs 1 y 3
C18:2 $\omega$ -6	0.84 (0.66-1.18)	0.68 (0.61-1.13)	0.99 (0.91-6.42)	0.047	2 vs 3
C18:3 $\omega$ -3	0.05 (0.02-0.07)	0.02 (0-0.04)	0.05 (0-0.28)	0.402	
C18:3 $\omega$ -6	0.07 (0.03-0.12)	0.04 (0.03-0.11)	0.06 (0.04-0.34)	0.175	
C20:3 $\omega$ -6	0.27 (0.12-0.33)	0.12 (0-0.42)	0.16 (0.11-0.83)	0.251	
C20:3 $\omega$ -9	0 (0-0.41)	0 (0-0.1)	0	0.136	
C20:4 $\omega$ -6	1.93 (1.14-2.37)	1.7 (1.32-2.98)	1.09 (0.96-7.2)	0.465	
C20:5 $\omega$ -3	0.04 (0-0.04)	0.01 (0-0.32)	1.71 (0-10.23)	0.072	
C24:0	0.34 (0.23-0.47)	0.31 (0-0.51)	0.96 (0.24-2.3)	0.075	
C22:4 $\omega$ -6	0.36 (0.2-0.5)	0.24 (0.19-0.99)	0.34 (0.17-0.52)	0.917	
C22:6 $\omega$ -3	0.16 (0.09-1.1)	0.58 (0-1.58)	0.64 (0.5-3.83)	0.251	

## **8. Discusión.**

### **8.1. Validación del modelo.**

Los modelos experimentales de NAFLD se clasifican en:

1. Modelos que muestran características del síndrome metabólico asociado a NASH.
2. Modelos lipoatróficos que desarrollan finalmente NAFLD (como en el hombre).
3. Modelos que permiten el estudio del estrés oxidativo como el inducido por la dieta DCM. Este modelo es útil para investigar propuestas terapéuticas para la NAFLD diferentes a la pérdida de peso y mejoramiento de la resistencia a la insulina/disminución en la acumulación hepática de grasa.

A continuación se contrastarán los resultados de las variables estudiadas con el fin de constatar la validez del modelo elegido (dieta DCM).

### **Peso corporal**

El incremento ponderal refleja, en buena medida, un desarrollo normal, por lo que su detención y, aún peor, su decremento, reflejan enfermedad o desnutrición. Se comprobó, con este modelo, que los ratones STD mantuvieron una tendencia a ganar peso y, por el contrario, todos los ratones alimentados con dieta DCM, no sólo no ganaron peso, sino que empezaron a perder lo que habían ganado en las tres semanas previas de estabilización. Esta pérdida de peso inició apenas a la semana de comenzar este tratamiento dietético, por lo que su efecto (al menos, sobre el estado de nutrición) se produce de forma casi inmediata.

La dieta DCM induce esteatosis hepática y pérdida de peso corporal, sobre todo en la primera semana (88,198,208) por razones aún desconocidas (290). La deficiencia de colina y metionina causa supresión profunda del gen que codifica para la SCD-1, una enzima implicada en la tasa metabólica. Desde la primera semana disminuye el mRNA de esta enzima a concentraciones prácticamente indetectables, y para el día 21 está ausente del tejido hepático, disminuyen los MUFA y hay hipermetabolismo (estos ratones consumen un 37% más energía que los controles y se estimula la oxidación de ácidos grasos pero no se acompaña de un aumento ulterior en el consumo de alimentos). Probablemente la pérdida de peso también se debe a que la inflamación hepática inducida causa un estado catabólico (y probablemente anoréxico) mediado por citocinas como el TNF- $\alpha$  y a que hay un aumento en la tasa metabólica inducida por la dieta (290). Aún así, los ratones se mantienen en buenas condiciones. En contraste, los modelos basados en la administración de una dieta alta en grasa (rata Sprague Dawley) aumentan de peso (260).

### **Peso hepático y del ratón al sacrificio**

El peso al sacrificio, reflejo del crecimiento longitudinal, se toma en cuenta para referir el peso del hígado en proporción al del ratón ("peso proporcional del

hígado” o peso hepático relativo). No siempre el peso de un órgano aumenta paralelamente al peso corporal, ya que puede tener diferente velocidad de crecimiento al del organismo según sus necesidades. En ratas adultas (183-242 g) con alimentación DCM el peso hepático permanece estable las primeras seis semanas y disminuye posteriormente) (88). En este estudio, dado su diseño y objetivo general, no se pudo hacer un seguimiento del peso hepático una vez iniciada la dieta DCM, pero se observó que el peso hepático, al igual que el peso corporal, no sólo no aumentó, sino que disminuyó drásticamente por lo menos desde la sexta semana con respecto al de los ratones STD, lo que es un claro indicio de que esta dieta produce enfermedad hepática “crónica” importante que naturalmente también repercute en el crecimiento ponderal.

El peso hepático relativo de los ratones DCM no fue diferente al de los ratones STD a las 6 semanas, pero sí fue menor a las 10 semanas, lo que debe interpretarse como una mayor disminución en el peso hepático que en el peso corporal en los ratones DCM en las fases tardías del modelo; quizá el hecho de que disminuya el peso hepático relativo significa una mejoría ya que, por ejemplo, en un modelo de ratas alimentadas con dieta alta en grasa, el peso hepático relativo fue menor en las ratas tratadas con pentoxifilina (que, a su vez, mejoró la histología hepática) que en las no tratadas (318). Esto puede estar relacionado con una disminución en el contenido de grasa o en la inflamación del hígado. De hecho, el grado de esteatosis a las 10 semanas tendió a ser inferior que a las 6 semanas (*vide infra*). Por otra parte, no debe olvidarse que la pérdida de funcionalidad hepática previa (y mayor pérdida de peso hepático) condiciona una parte de la pérdida de peso corporal que se da posteriormente.

### **Pruebas de función hepática**

Los ratones con dieta STD no mostraron alteraciones en su función hepática ni inflamación (elevación de ALT y AST), no así los ratones con dieta DCM. Destacó la marcada hiperbilirrubinemia (directa e indirecta), hipertransaminasemia y elevación de FA. La albúmina, en cambio, no fue diferente ya que su disminución implica una hepatopatía crónica (que tal vez no se llegó a desarrollar con el tiempo de seguimiento) en donde esté alterada la función sintética del hígado y/o haya expansión del volumen plasmático (como en la cirrosis con ascitis). El aumento de ALT, consistente con un proceso necroinflamatorio, se ha descrito anteriormente en este modelo, y se acompaña de una disminución del colesterol y triglicéridos séricos (180,208). En el hombre, la ALT es un indicador de progresión de esteatosis a NASH.

### **Glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma**

La NASH en el hombre se relaciona frecuentemente con diabetes mellitus y dislipidemias, y sería esperable encontrar cifras altas de glucosa y lípidos (triglicéridos y colesterol) de haber estudiado un modelo con dieta alta en grasa. Sin embargo, en el modelo de DCM empleado se encontraron concentraciones plasmáticas de glucosa, triglicéridos (hasta en un 50%) y colesterol significativamente más bajas que en los animales control

alimentados con dieta estándar, tal como se ha descrito en la literatura (180,208,277,296,329). La hipoglucemia es probable reflejo de la pérdida de peso de estos ratones y de la alteración hepática producida que incapacita al hígado a mantener la glucemia, sobre todo en un probable contexto de menor consumo de alimentos causado por la hepatopatía. La hipolipidemia podría deberse a la disminución en la exportación hepática de lípidos secundaria a la dieta DCM (*vide supra*). La hipocolesterolemia, además, es un índice bioquímico de desnutrición, y en este modelo podría también deberse a ella.

### **Insulina, leptina y adiponectina en plasma**

Hubo una importante disminución de la insulinemia en los ratones DCM. Pese a que esta dieta es lipogénica, se ha informado que disminuye significativamente la insulina sérica (277) y produce, en cambio, resistencia *intrahepática* a la insulina asociada a una menor fosforilación del receptor de insulina hepático y del Akt (171). Los factores etiopatogénicos del modelo por dieta DCM no involucran la resistencia *sistémica* a la insulina: los ratones adelgazan a las pocas semanas de consumir esta dieta y tienen tendencia a la hipoglucemia más que a la hiperglucemia (312), por lo que no es necesario estimular la producción de insulina; de esta forma se puede explicar la hipoinsulinemia en los ratones DCM. Otros autores informan que en este modelo no se produce un cambio significativo en la resistencia o respuesta a la insulina pero sí un aumento en la acumulación de grasa en hígado y en la esteatohepatitis. En cambio, en ratones *db/db* alimentados con esta misma dieta y en donde también se manifiesta lipotoxicidad, se produce resistencia a la insulina (por su genética) pero ésta mejora posiblemente porque la alteración en la eliminación de los metabolitos tóxicos de los ácidos grasos estimula compensatoriamente la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina (339).

Los ratones DCM, pese a desarrollar esteatohepatitis (enfermedad que cursa con inflamación), presentaron una disminución significativa de la leptina, probablemente por la ausencia de tejido adiposo secundaria a la pérdida de peso. La leptina, hormona producida por el tejido adiposo, se encuentra elevada en la obesidad y en estados inflamatorios, induce resistencia a la insulina (407) y es fibrogénica. En teoría, la leptina aumenta la expresión de la IL-6, el TNF- $\alpha$  y el TGF $\beta$ -1, y todas ellas contribuyen en la progresión de la fibrosis.

La adiponectina, hormona relacionada negativamente con el desarrollo de esteatohepatitis (al disminuir la concentración de adiponectina se incrementa el riesgo de esteatohepatitis), aumentó paradójicamente en los ratones DCM. Por lo contrario, algunos autores han informado la esperada disminución en la secreción de adiponectina en estos ratones (171). La adiponectina incrementa la  $\beta$ -oxidación; tiene efectos antagónicos con respecto al TNF- $\alpha$  (408), por lo que mejora la NAFLD y la AFLD (163); revierte los procesos fibrogénicos en las células estelares hepáticas y su concentración aumenta durante la pérdida de peso (176). Aún cuando histológicamente se demostró la esperada inflamación en el tejido hepático de los ratones DCM, el aumento en la concentración de adiponectina en plasma pudo obedecer a la pérdida de peso.

## **Carnitina libre, acilcarnitinas, carnitina total, AC/CT, CL/CT y actividad de la CPT-2**

La carnitina es un transportador que introduce ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria y se sintetiza a partir de precursores como la lisina y metionina. Los ratones en los que se limitó el aporte de este último aminoácido (ratones DCM) presentaron, como era de esperar, concentraciones menores de carnitina libre y total, así como de acilcarnitinas, con respecto a los ratones STD; sin embargo, sus concentraciones no sólo dependen de su síntesis endógena, sino del adecuado funcionamiento del complejo enzimático de la carnitín-palmitoil transferasa.

La función de la CPT-2 es reconvertir las acilcarnitinas a ésteres de CoA (acil-Co A), liberando carnitina libre. En los ratones DCM se encontró una mayor actividad de esta enzima que en los ratones STD, y una consecuente disminución de acilcarnitinas; no se verificó, sin embargo, que hubiera paralelamente una disminución en la actividad de la CPT-1, que esterifica las acil-CoAs a la carnitina. Llama la atención que, a pesar de estar elevada la actividad de la CPT-2 la concentración de carnitina libre haya estado disminuida (y no aumentada, como se esperaría). La posibilidad de una sobreexpresión o una mayor actividad de la CPT-1 queda descartada por la baja concentración de acilcarnitina. La única explicación es, por tanto, la disminución en la síntesis de carnitina (que se verificó) provocada por la propia deficiencia de metionina de la dieta en los ratones DCM. La actividad de la CPT-2, entonces, podría estar aumentada compensatoriamente (como pasa con cualquier otra enzima, cuando existe déficit de sustrato) pero esta mayor actividad es inefectiva (no hay suficiente acilcarnitina formada por una probable disminución en la actividad de la CPT-1) y es por eso que no aumenta la carnitina libre por esta vía (no se libera carnitina). Todo ello, en conjunto, refleja una importante alteración en el sistema de transporte de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria y, más allá de eso, corrobora la existencia de una considerable alteración mitocondrial en la NAFLD.

Por otra parte, la disminución de la relación AC/CT en los ratones DCM podría significar una disminución en la actividad de la CPT-1 (no se tienen datos) o una sobreexpresión de la CPT-2 (corroborada); el aumento de la relación CL/CT podría explicarse por los mismo motivos. Existen otras enzimas como la CATR y CAT (*vide supra*) y la misma CPT-1 cuya actividad podría haber estado también afectada. No se ha informado a la fecha sobre el estado de este importante conjunto de enzimas y transportadores y se requerirían más estudios para dilucidar su importancia real en este modelo.

Las situaciones que estimulan la cetogénesis en el hígado (ayuno, diabetes, hipertiroidismo o tratamiento con algunos agonistas de los PPARs) inducen la síntesis de CPT-1. El mRNA de la CPT-1 aumenta con pan-agonistas de los PPAR- $\alpha$  (bezafibrato), lo que produce un aumento en la  $\beta$ -oxidación y una disminución de las citocinas proinflamatorias (329). El principal efecto del fenofibrato es la oxidación de grasa (vía aumento en la expresión de la CPT-1 hepática), por lo que disminuyen los lípidos circulantes; adicionalmente, disminuye la ganancia de peso (266,409), adiposidad, consumo de alimentos y

eficiencia alimentaria (266). Esta disminución de peso se observó en ratas Sprague Dawley (409) (con tendencia a ser obesas); en ratones C57/BL6 el fenofibrato previene la obesidad inducida por la dieta sin afectar la ingestión de alimentos (410) pero tal vez no interviene en la reducción del peso ganado (409). Además, su efecto en el consumo de alimentos es variable según el tipo y especie de roedor y el modelo animal de obesidad empleado (genético o inducido por dieta). El fenofibrato no sólo aumenta la CPT-1 sino también el contenido de carnitina en hígado (411), por lo podría pensarse que la oxidación de grasas se da más por la vía mitocondrial que por la vía peroxisómica (409,411), aún cuando los genes peroxisómicos se encuentren más expresados. Esto puede explicarse porque la  $\beta$ -oxidación peroxisómica únicamente acorta la cadena del ácido graso de cadena larga, y así estos ácidos grasos acortados pueden eventualmente oxidarse en la mitocondria (409).

Por otra parte, debe recordarse que aunque el fenofibrato es un agonista PPAR- $\alpha$  al igual que los ácidos grasos  $\omega$ -3, éstos pueden tener un efecto más débil o diferente.

La homeostasis de lípidos en hígado requiere un balance entre la síntesis y catabolismo, y es evidente que el aumento del flujo de FFA y la lipogénesis *de novo* en hígado contribuyen en la NAFLD (385). No es tan clara, sin embargo, la influencia de la disminución de la oxidación de ácidos grasos en la esteatosis.

## Citocinas

Las cifras de citocinas fueron muy variables y, en muchos casos, indetectables, sobre todo la del TNF- $\alpha$ . Esta citocina está positivamente relacionada con el desarrollo de NASH. De hecho, se ha descrito que el TNF- $\alpha$  hepático aumenta 10 veces en las ratas alimentadas con DCM a las 7 semanas. Larter informó que la concentración de TNF- $\alpha$  plasmático fue indetectable en ratas controles pero 10 veces mayor en las ratas alimentadas con DCM (269) y Yalniz incluso propuso la concentración plasmática de esta citocina como indicador de efectividad del tratamiento con pentoxifilina en un modelo por dieta alta en grasa (318).

Es posible que en la especie murina que se utilizó en este estudio el aumento de TNF- $\alpha$  secundario a la dieta DCM se haya circunscrito al hígado. Desgraciadamente, no se dispuso de más tejido hepático de los ratones estudiados para poder evaluar esta hipótesis. La posibilidad de que el TNF- $\alpha$  se hubiera podido degradar en las muestras plasmáticas antes de su cuantificación no se puede descartar.

Con respecto a la IL-1 $\alpha$  y la IL-6, los datos aportados muestran inconsistencias porque se esperaba su aumento en ambos tiempos de seguimiento en los ratones DCM y, en cambio, se encontró una disminución en la IL-6 a las 10 semanas de seguimiento. Nuevamente, la variabilidad de estos datos fue tal que no es apropiado comprometerse a su interpretación.

## Lipoperoxidación

La dieta DCM tiene, entre sus objetivos, disminuir la producción de antioxidantes endógenos como el GSH y el SAME, por lo que el estrés oxidativo aumenta y, por ende, se incrementa el TNF- $\alpha$  y otras citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\alpha$  (hallazgo que no se pudo comprobar)(*vide supra*). La lipoperoxidación es importante en cualquier modelo de NAFLD, incluso en el metabólico, ya que activa el I $\kappa$ k $\beta$ , que hace que se perpetúe la resistencia a la insulina.

Como índice de lipoperoxidación, se midió únicamente la concentración de MDA hepático pero no se observó que aumentara en los ratones DCM, en donde se ha descrito extensamente un aumento en la lipoperoxidación. Veteläinen, por ejemplo, observó un aumento de TBARS hepático y una disminución del GSH plasmático y hepático en ratas (296) y Weltman encontró un aumento del CYP 2E1, ROS y otros radicales generados probablemente por esta vía (180). La medición del CYP 2E1, sin embargo, es controvertida ya que se ha encontrado tanto una disminución (210,412) como un aumento (180) en la expresión de su proteína y en su actividad en varios modelos de esteatosis, incluyendo el inducido por la dieta DCM. Hipotéticamente, si se hubiera encontrado un aumento de MDA -como se esperaba- podría haberse explicado por la inducción de otras enzimas oxidantes como el CYP4A. Y aún cuando la actividad de ambos citocromos hubiese disminuido, el daño provocado por los lipoperóxidos producidos no podría “compensarse” (ser reparado) por la misma desnutrición de los ratones (88).

Los lípidos que se acumulan en el hígado de los ratones alimentados con dieta DCM están directamente relacionados con la composición nutrimental de la dieta (10% aceite de maíz, un aceite muy insaturado, con un alto contenido de  $\omega$ -6). Debido a que los PUFA son un excelente sustrato para la lipoperoxidación, la misma composición lipídica de esta dieta puede producir la necroinflamación e inducción hepática de genes de citocinas proinflamatorias observadas en algunos estudios como el de Lee, quien encontró que los ratones cuya dieta contenía PUFA  $\omega$ -9 (sebo de res) mostraron una mayor concentración de TBARS y un mayor grado de inflamación a diferencia de los ratones alimentados con SFA (277).

La importancia de la lipoperoxidación es tal en la NAFLD (sobre todo, en el modelo estudiado) que se ha llegado a comprobar en algunos casos que el reclutamiento de células inflamatorias puede no estar relacionado con la activación de NF- $\kappa$ B o COX2 sino simplemente por el efecto directo de los lipoperóxidos. Con esto se concluye que la lipoperoxidación, la inflamación y el daño hepático pueden o no ser eventos consecutivos (en ese orden) y así puede haber inflamación sin previa lipoperoxidación y daño hepático sin inflamación pero causado directamente por lipoperoxidación.

## Triglicéridos hepáticos

Probablemente el mecanismo más importante por el que la DCM produce NAFLD es por la inducción de la acumulación de triglicéridos hepáticos al

inhibir la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de ácidos grasos y bloquear la exportación de VLDL hepáticas (64). A diferencia de las dietas altas en grasa que producen poca necroinflamación hepática o fibrosis, la dieta DCM induce NASH porque, al mismo tiempo que inhibe la  $\beta$ -oxidación mitocondrial habitual de los ácidos grasos, induce las enzimas microsomales de oxidación de ácidos grasos como el CYP 2E1, que sustituye a la  $\beta$ -oxidación en la formación de ROS en cantidades suficientes como para producir “impactos” secundarios que se requieren para la progresión de NAFLD a etapas más avanzadas de enfermedad hepática (199).

Los ratones DCM mostraron una mayor acumulación de triglicéridos hepáticos (y un mayor grado histológico de esteatosis) con respecto a los controles a las 6 semanas, aunque no a las 10 semanas de seguimiento –hecho de difícil interpretación al margen de considerar el grado de inflamación.

La confusión sobre la historia natural del hígado graso se ha basado en un modelo estático de contenido de triglicéridos hepáticos (339). Sin embargo, por muchos años se ignoró la importancia del flujo de FFA en los diferentes compartimientos hepatocelulares, y aún cuando en unos casos sea inocuo (incorporación a triglicéridos) en otros es potencialmente tóxico (oxidación mitocondrial y peroxisómica). Es por ello que la implicación de la esteatosis en el desarrollo de la NAFLD depende del contexto metabólico en el que ocurra. Un bajo contenido de triglicéridos puede reflejar una baja exposición hepática a FFA y, por tanto, una escasa necesidad de sintetizar triglicéridos (positivo); o, por lo contrario, una falta de capacidad del hígado para “depurar” los FFA acumulados – no se “neutralizan” a través de su conversión a triglicéridos (negativo). Las personas con resistencia a la insulina no llegan a compensar esta alteración en la síntesis hepática de triglicéridos a partir de los FFA acumulados a través del mejoramiento en la señalización de la insulina en los depósitos adiposos periféricos, por lo que estos depósitos continúan liberando FFA y el hígado sigue siendo “inundado” de FFA, lo que compromete aún más los mecanismos hepáticos de manejo de lípidos y aumenta la lipotoxicidad (339).

## **Histología**

### *Esteatosis*

La esteatosis se refiere a la acumulación de grasa en forma de vacuolas intracitoplasmáticas que pueden ser grandes (macrovesículas) o pequeñas (microvesículas). Es un reflejo directo de la cantidad de grasa almacenada en hígado; es normal una ligera acumulación a lo largo de los años pero se vuelve patológica (por su susceptibilidad a oxidarse y participar en el proceso fibrogénico) dependiendo del grado de afectación hepática, expresado por presencia, grado (porcentaje de hepatocitos afectados), tipo y localización de la esteatosis ya que, al ser un sustrato para la oxidación, el daño producido puede tener diferente gravedad según la zona hepática afectada.

En definitiva, los ratones DCM mostraron un aumento en el grado histológico de la esteatosis (al igual que en el contenido hepático de triglicéridos, aunque

también –como se mencionó- sólo hasta las 6 semanas). Ninguno de los ratones STD desarrollaron esteatosis. Lee describió que los ratones alimentados con dieta DCM con aceite de maíz pueden quintuplicar su contenido de triglicéridos hepáticos (277). La esteatosis, en todos los casos, fue macrovesicular –y no microvesicular- lo que indica que el daño producido no fue por toxicidad. La localización de ésta (zona 2 ó 3 de Rappaport mayoritariamente), sin embargo, puede implicar una mayor susceptibilidad al daño oxidativo, ya que la zona 3 es la menos oxigenada.

El hecho de que se haya encontrado una mayor acumulación de triglicéridos/mayor esteatosis y no se haya elevado el MDA podría interpretarse como que, de alguna forma, el aumento en la síntesis de triglicéridos (esteatosis) protege al hígado de la lipotoxicidad ya que amortigua el efecto de la acumulación de FFA que pudieran haberse peroxidado.

Cuando se inhibe experimentalmente la CPT-1 (por ácido tetradecilglicídico), disminuye el contenido hepático de PUFA y SFA y aumenta el de MUFA (141). La inhibición farmacológica de la CPT-1 produce esteatosis hepática severa sin afectar la sensibilidad a la insulina. Esto quiere decir que no todas las formas de esteatosis se asocian a resistencia a la insulina. En este sentido, los datos encontrados concuerdan con este hallazgo ya que se produjo esteatosis sin hiperglucemia/resistencia a la insulina (incluso, hipoglucemia/hipoinsulinemia). Hasta la fecha, no existen estudios publicados en donde se demuestre que la deficiencia de colina y metionina produzca una alteración en la CPT-1, sino sólo de SCO-1.

En el hombre, la severidad de la esteatosis hepática correlaciona con el grado de fibrosis hepática, Sin embargo, aún se desconoce si la acumulación de triglicéridos en el hepatocito *per se*, aumenta la respuesta necroinflamatoria y fibrótica del hígado. Los triglicéridos pueden, en sí, no ser hepatotóxicos y, de hecho, incluso proteger de la lipotoxicidad al amortiguar la acumulación de FFA (339).

Los FFA pueden evocar el daño hepático por diferentes mecanismos. Son sustrato para las enzimas microsomales generadoras de ROS como el CYP 2E1 (210), Los propios ácidos grasos oxidados pueden también catalizar la lipoperoxidación, que en sí es un proceso citotóxico (413). Finalmente, debido a que algunos ácidos grasos actúan como ligandos endógenos de receptores nucleares para hormonas, como los PPAR y el factor nuclear de hepatocitos 4-a, su acumulación puede alterar globalmente la expresión de genes a nivel hepático (414), En la obesidad y resistencia a la insulina, los principales mecanismos que conducen a la acumulación de triglicéridos hepáticos son el aumento en el ingreso de FFA de los depósitos adiposos periféricos al hígado y el aumento en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos *de novo* (339). La utilización hepática de lípidos por  $\beta$ -oxidación y la exportación de lipoproteínas se conserva relativamente intacta (415), por lo que el hígado mantiene sus mecanismos para librarse de los efectos de los FFA potencialmente tóxicos, y por ello el hígado tolera el que se evite la esteatosis al inhibir la síntesis de triglicéridos hepáticos. En cambio, en la NAFLD hay una alteración en la  $\beta$ -oxidación y síntesis de lipoproteínas aunado a un aumento en el contenido de

FFA hepáticos que sobrepasan la capacidad hepática para neutralizar sus potenciales efectos negativos.

### *Inflamación*

Se observó una diferencia significativa en el grado de inflamación lobulillar de los ratones DCM a las 6 semanas –no así a las 10 semanas- y un aumento en el número de lipogranulomas en los ratones DCM a las 10 semanas (una tendencia en los ratones a las 6 semanas). Los lipogranulomas son indicio de necrosis de células con infiltración grasa: alrededor de una acumulación lipídica se observa una reacción inflamatoria en la que participan polimorfonucleares o linfocitos; por tanto, podrían interpretarse como un proceso de “limpieza” de material ajeno al hígado: una manera de degradar este material.

Además del infiltrado linfocitario y de otras células inmunológicas tanto en el parénquima (lobulillo) como en la zona portal, se buscaron intencionalmente (pero no se encontraron) otros indicadores asociados a cambios inflamatorios como la presencia de *hialina de Mallory* (cambios degenerativos de la queratina asociados principalmente al abuso del alcohol aunque también a causas fundamentalmente tóxicas que corresponden a una acumulación intracitoplasmática de filamentos de esta proteína) y *degeneración balonoide* (degeneración de causa inespecífica del hepatocito por la que aumenta el tamaño celular a expensas de citoplasma) y *núcleos con glucógeno*.

### *Fibrosis*

Se observó una marcada, aunque no significativa, tendencia a que los ratones DCM tuvieran, a las 6 y 10 semanas, mayor fibrosis central/perisinusoidal. Esta diferencia hubiera muy probablemente sido significativa de haberse estudiado un mayor número de ratones por grupo.

### *Índice hepático*

En ambos casos, éste fue mayor en los ratones DCM, como se esperaba.

Todos estos hallazgos, en conjunto con los anteriormente expuestos, permiten constatar la validez del modelo estudiado.

## **8.2. Desarrollo de alteraciones bioquímicas e histológicas a las 6 y 10 semanas.**

### **Peso corporal**

Hubo una inesperada disminución del peso corporal en las semanas 5 y 6 de los ratones seguidos durante 10 semanas (la maniobra ejercida fue la misma para ambos grupos de ratones). Esta diferencia no puede interpretarse y carece de relevancia.

## **Peso hepático y del ratón al sacrificio**

El peso hepático fue menor a las 10 que a las 6 semanas, y es indicio de que la enfermedad fue empeorando al paso del tiempo. El peso hepático relativo, en cambio, aumentó y esto pudo deberse a que la pérdida de peso corporal superó la pérdida de peso hepática. Quizá esta menor pérdida de peso del hígado (relativa a la corporal) se haya debido a un aumento en el contenido de triglicéridos en el mismo.

## **Pruebas de función hepática**

Se observó una disminución de BT a las 10 semanas con respecto a las 6 semanas, sin ninguna otra alteración, por lo que tampoco es posible interpretar esta diferencia y también carece de importancia.

## **Insulina, leptina y adiponectina en plasma**

Hubo un aumento significativo en la concentración de insulina –aunque no de la glucosa, por lo que su interpretación es compleja- y una disminución en la de leptina a lo largo del tiempo, que contrasta con lo esperado para un proceso inflamatorio crónico aunque podría relacionarse a la constante pérdida de peso. La glucosa, sin embargo, se mantuvo en un valor normal.

El resto de los parámetros estudiados no fueron diferentes a las 6 y a las 10 semanas de seguimiento.

## **8.3. Efecto profiláctico de los ácidos grasos en el desarrollo de la NAFLD.**

### **Peso corporal**

Se observó una mayor disminución de peso en los ratones DCM (sin modificación en la composición de ácidos grasos) en la primera semana, y en los ratones PUFA en la segunda semana. Estos hallazgos no tienen relevancia ya que al final todos los ratones fueron disminuyendo de peso de la misma manera.

### **Peso hepático y del ratón al sacrificio**

El peso hepático en los ratones DCM fue el menor y, consecuentemente (el peso corporal disminuyó en forma igual en todos los ratones), el peso hepático relativo. Quizá el aceite de maíz (PUFA  $\omega$ -6), en mucho mayor proporción en la dieta de los ratones DCM que en la de los ratones MCT y PUFA, fue la causa, aunque se tendría que descartar que el peso hepático en los ratones MCT, PUFA y MP no hubiera incrementado a expensas de esteatosis e inflamación. A continuación se describirá el efecto diferencial de los distintos ácidos grasos en los demás parámetros que podrían haber influido en o ser reflejo de esta disminución de peso.

## **Pruebas de función hepática**

No hubo diferencia en las cifras de BT y BD, pero los ratones MP mostraron una menor elevación de ALT y AST. La FA en los ratones MCT fue la más elevada. Sólo se ha informado que los PUFA  $\omega$ -3 disminuyen la ALT en un modelo de NAFLD con ratones *ob/ob* (53).

## **Glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma**

No se observaron diferencias en la glucosa y colesterol, pero los MCT aumentaron los triglicéridos en plasma, seguidos por los PUFA  $\omega$ -3, con respecto a los ratones DCM. Cuando la oxidación de grasa es lenta, la hipertrigliceridemia que la acompaña produce hiperfagia y, en un tiempo razonable, ganancia de peso (409). Esto no ocurrió en los ratones MCT.

De haberse estudiado un modelo de NAFLD por sobrealimentación es probable que se hubiese producido hipertrigliceridemia en todos los grupos terapéuticos. En cambio, en el presente caso, no hubo hipertrigliceridemia más que en el grupo MCT y se notó una pérdida de peso en todos los grupos de ratones por el efecto de la dieta DCM en el peso corporal anteriormente descrito; los PUFA  $\omega$ -3 en este contexto, hubieran tenido un efecto muy limitado en comparación con las drásticas alteraciones causadas por la dieta DCM.

## **Lipoperoxidación**

Hubo, curiosamente, un aumento en la producción de MDA en los ratones alimentados con la mezcla 50:50 de MCT-PUFA  $\omega$ -3. Recientemente, se ha informado que los MCT modulan el metabolismo de los PUFA (390,391) y se podría especular que, quizá por ello, haya aumentado su lipoperoxidación.

No se encontró ninguna diferencia en los ratones con dieta DCM y sus variantes con respecto a la concentración de las hormonas estudiadas, transporte mitocondrial de ácidos grasos (carnitinas y actividad de CPT-2), citocinas y contenido de triglicéridos hepáticos.

## **Histología**

La dieta DCM ofrece una oportunidad única para estudiar el impacto de ácidos grasos específicos en el desarrollo de la enfermedad hepática en el contexto de la esteatosis hepática. En este modelo, cualquier ácido graso (sea incorporado o producido endógenamente en hígado) queda atrapado dentro del hepatocito.

En este estudio, no se observó ningún cambio en el grado de esteatosis en los diferentes grupos de dieta DCM, aún cuando se formularon estas dietas con el doble del requerimiento de lípidos (10% en lugar de 5%). Una vez desarrollada la NAFLD, el hecho de reducir el aporte de lípidos de 10% a 5% no influye en la acumulación de triglicéridos (277). Siempre que se administre dieta DCM, independientemente de la fuente de grasa, se observa hipolipidemia, hipoglucemia e hipoinsulinemia. En cambio, el tipo de lípidos sí puede tener diferentes efectos cuando se administra una dieta que contenga colina y

metionina. El aceite de coco, por ejemplo, produce más esteatosis hepática y menos trigliceridemia debido a la inducción de la SCD-1 (416).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que los ratones PUFA y MP desarrollaron más lipogranulomas que los ratones MCT y, finalmente, que los ratones DCM; mientras que el desarrollo de fibrosis se redujo en los ratones alimentados con PUFA  $\omega$ -3 o mezcla de PUFA  $\omega$ 3 y MCT, y en menor grado en los alimentados con MCT, respecto al control con dieta DCM convencional.

La inflamación precede a la fibrosis, y que una vez que hay daño hepático el hígado es incapaz de ejercer una respuesta inflamatoria adecuada. El hecho de haber encontrado más inflamación en los ratones PUFA y MP y más fibrosis en los ratones DCM y MCT significa que los PUFA  $\omega$ -3 retardaron la inflamación y, por tanto, al cabo de seis semanas, no se pudo observar aún tejido fibroso; en cambio, en los ratones DCM la inflamación muy probablemente se dio con mucha más antelación: tanto que al final de esta fase ya se pudo detectar fibrosis. De esta forma, puede interpretarse que los PUFA retardan la inflamación y fibrosis, aunque finalmente tal vez no la evitan. La razón por la que la dieta de los ratones PUFA y la de los MP tuvieron exactamente el mismo efecto en el desarrollo de lipogranulomas y fibrosis (aún cuando la dieta MP contenía la mitad de PUFA  $\omega$ -3) obedece a que recientemente se ha descrito que los MCT facilitan el metabolismo de los PUFA, sea para incorporación de membranas, sea para su oxidación/catabolismo. El efecto antifibrogénico de los MCT aislados parece menos marcado.

Los estudios experimentales en enfermedad hepática por alcohol han destacado el papel de los PUFA en la promoción del daño hepático por alcohol (417). Estos ácidos grasos (abundantes en aceite de maíz y de pescado) exacerbaban el daño hepático por alcohol al favorecer el estrés oxidativo, mientras que los SFA son protectores (91). Una dieta alta en PUFA podría teóricamente, contrario a lo que se encontró, acelerar el desarrollo de los cambios patológicos en la NASH (285).

El cambio en la composición de la grasa de la dieta DCM (sustitución del aceite de maíz por sebo de res –MUFA- o aceite de coco- MCT saturados) no afecta el grado de esteatosis hepática ni el contenido total de ácidos grasos de los principales compartimientos lipídicos del hígado (FFA, di y triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos), incluso cuando se sustituyó parcialmente el aceite de maíz por MCT, PUFA o una combinación 50:50 de éstos, tal y como se comprobó en este estudio, aunque sí su composición o perfil en dichos compartimientos (aspecto no estudiado). La disminución de PUFA  $\omega$ -3 de los diferentes compartimientos lipídicos es paralela a su contenido en la dieta, excepto en la fracción de los fosfolípidos, que siempre conserva una alta concentración de AA (C20:4n6) y DHA (C22:6n3) dada su importante funcionalidad en la membrana celular (277). Los SFA tampoco aumentan en el tejido hepático al disminuir el aporte de PUFA  $\omega$ -3, ya que el hígado convierte eficientemente las grasas saturadas (coco) a MUFA (C18:1n9) para ser incorporados a los lípidos hepáticos. Sin embargo, debe recordarse que la mayoría de las veces estos SFA están esterificados formando MCT y, como tales, son una fuente energética primordialmente.

En el contexto de la enfermedad en el hombre, los PUFA  $\omega$ -6 (aceite de maíz, como en la dieta DCM que se empleó) son más nocivos que los PUFA  $\omega$ -9 o SFA (418); en cambio, los PUFA  $\omega$ -3 aparentemente mejoran la NAFLD (384). Se puede especular su papel terapéutico por su capacidad de inducir la actividad del PPAR- $\alpha$  y reducir las concentraciones de AA (419,420). Cuando se utilizan agonistas del PPAR- $\alpha$  como el Wy 14543 en un modelo con dieta DCM, no sólo se previene sino que se revierte la esteatohepatitis experimental (196,308), probablemente por un rápido catabolismo de los triglicéridos y también de los lipoperóxidos); en cambio, el uso de ligandos de este proliferador como los PUFA  $\omega$ -3 (aceite de pescado) sólo atenúa la acumulación de triglicéridos pero aún así se desarrolla esteatohepatitis (385) asociada a una marcada acumulación de lipoperóxidos hepáticos no relacionada con el aumento de NF- $\kappa$ B o COX2 sino a su efecto directo (*vide supra*). En este modelo se ha informado que los PUFA  $\omega$ -9 (aceite de oliva) no previenen la esteatohepatitis (418) y que los PUFA  $\omega$ -3 reducen la esteatosis en comparación con los PUFA  $\omega$ -9. En este estudio se pudo, en cierta forma, destacar un efecto benéfico más débil de los PUFA  $\omega$ -3, ya que sólo lograron *retardar* la inflamación, y no se pudo corroborar que disminuyesen el grado de esteatosis.

A diferencia de la estrecha relación entre el tipo de grasa de la dieta y la lipoperoxidación e inflamación hepática en el modelo de NAFLD por DCM, Lee no informó una diferencia en el daño hepático (277), en tanto que los datos aquí expuestos demostraron mayor fibrosis en los ratones DCM y MCT. Este grupo de investigación no encontró que la eliminación de los PUFA  $\omega$ -9 de la fórmula de la dieta DCM mejorara la apoptosis histológicamente o la liberación de ALT, aunque hayan habido menos lipoperoxidación y expresión de genes proinflamatorios. Esto indica, una vez más (*vide supra*) una clara separación entre la lipoperoxidación y el daño hepatocelular en este modelo, y sugiere la existencia de un factor común en los diferentes tipos de dieta DCM que causa el daño hepático además de la misma deficiencia de colina y metionina.

Cuando se eliminan los lípidos de la composición de la dieta DCM se corrige el daño mediado por esta dieta previamente (196,308); sin embargo, los SFA de cadena larga permanecen ya después invariablemente "atrapados" en el hígado y, sobre todo, en cantidades constantes en todos los casos de DCM modificada y podrían actuar, probablemente, como este "factor común" causante del daño por DCM. De hecho, se ha demostrado que los SFA son citotóxicos en cultivos de hepatocitos (421). En conclusión, es posible que los SFA sean también responsables del daño hepatocelular en el modelo de NAFLD inducido por dieta DCM.

Los efectos hipolipidémicos de los PUFA  $\omega$ -3 se deben, en parte, a la inhibición del ensamblaje de VLDL por los lipoperóxidos que se derivan de éstos y a la inhibición de la secreción de estas lipoproteínas (422). Los lipoperóxidos, además, son activadores del PPAR- $\alpha$  aún más potentes que los ácidos grasos originales (423) y al activarlo aumentan, a su vez, su propio catabolismo, que puede competir con el catabolismo de los ácidos grasos no peroxidados. De

esta forma, los PUFA  $\omega$ -3 pueden, en un momento dado, incrementar la oxidación de ácidos grasos y suprimir la expresión de genes lipogénicos y, aún así, desarrollarse esteatohepatitis.

En esta misma línea de ideas, los PUFA se acumulan en el hígado y aumenta la lipoperoxidación tanto en un modelo de NAFLD por dieta DCM (277) como en uno de AFLD (424), hallazgos parcialmente corroborados en este estudio. Los SFA, en cambio, disminuyen mucho más la esteatosis en la AFLD (393) que en la NAFLD (416), ya que la deficiencia de metionina y colina probablemente hace que los MUFA sean “secuestrados” en un compartimiento intracelular (*vide supra*) que los hace no disponibles para la secreción de VLDL y, además, impide la secreción de triglicéridos hepáticos. De esta forma, los lípidos dietéticos se retienen en el hígado, independientemente de su composición. Esto puede explicar el por qué la esteatosis mediada por la dieta DCM no varía con el tipo de grasa (como se observó), a diferencia de la esteatosis hepática inducida por alcohol. Sin embargo, este modelo de NAFLD permite demostrar directamente la relación entre los PUFA intrahepáticos y la lipoperoxidación hepática.

#### **8.4. Efecto terapéutico de los ácidos grasos en la NAFLD.**

En esta fase se pretendió analizar el efecto de MCT, PUFA  $\omega$ -3 y su combinación sobre la esteatosis hepática ya establecida, después de alimentar durante 6 semanas con dieta DCM a ratones susceptibles. De hecho, en esta fase se evalúa la capacidad de estos ácidos grasos de prevenir “segundos impactos” (*second hits*) que modifican el estrés oxidativo. Se sabe que estos “segundos impactos” actúan en el hígado y, cuando favorecen la NASH, producen ROS e inducen citocinas como el TNF- $\alpha$ . Este, a su vez, puede activar el I $\kappa$ k $\beta$ , que activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y finalmente induce a mayor producción de TNF- $\alpha$ .

No se encontraron diferencias entre los cuatro grupos de estudio en ninguno de los parámetros estudiados, excepto en algunos histológicos y en la insulinemia, que fue menor en el grupo MP sin que haya tenido relación con la concentración de glucosa. Se ha demostrado que tanto los agonistas del PPAR- $\alpha$  (410) como los PUFA  $\omega$ -3 disminuyen la resistencia a la insulina (53) en un modelo de ratones *ob/ob*, aunque esta explicación no es plausible en este modelo en el que no se desarrolló una resistencia a la insulina previa. El MDA en los ratones MP, además, tuvo una fuerte tendencia a ser el más elevado, replicando lo hallado en la fase de prevención.

#### **Histología**

La inflamación lobulillar fue más evidente en los ratones MCT, seguido de los PUFA y MP; los ratones con menos inflamación lobulillar fueron los alimentados con la dieta DCM. Estas diferencias no se vieron reflejadas en los lipogranulomas, en contraste a lo observado en la fase de prevención. La fibrosis fue mayor en los ratones PUFA, seguida de los ratones MCT, MP y DCM (sin diferencias entre ellos). Con respecto al índice hepático, tanto los ratones MCT como los PUFA tuvieron la mayor puntuación, esto debido a que

en este índice (arbitrario) se asignaron más puntos (del total) a los hallazgos relacionados con la inflamación y sólo un punto a la fibrosis. Al parecer, el efecto de los diferentes ácidos grasos una vez establecida la NAFLD no es del todo consistente, y más en la línea de lo sucedido en la fase de prevención, ya que los ratones MCT tuvieron más inflamación y, en cambio, los ratones PUFA más fibrosis. Nuevamente podría decirse que la toxicidad de los SFA (sintetizados a nivel hepático a partir de hidratos de carbono simples) en todos los ratones en los que se creó una deficiencia de colina y metionina (ratones DCM, MCT, PUFA y MP) podría haber evitado que estos ácidos grasos tuviesen un efecto terapéutico.

La dieta DCM produce inflamación y daño hepático por mecanismos independientes. En este modelo, la inflamación provocada por stress oxidativo y lipoperoxidación podría mejorar disminuyendo la concentración de PUFA mientras que el daño hepático (muerte de hepatocitos) por lipotoxicidad *per se* podría mejorar disminuyendo la concentración intrahepática de SFA a través de una disminución en el contenido de hidratos de carbono simples (como la sacarosa) de la dieta DCM.

La aparente controversia sobre el efecto de los PUFA en la NAFLD radica en que ejercen una regulación positiva del PPAR- $\alpha$ , por lo que mejora la resistencia a la insulina y, con ello, disminuye la acumulación de triglicéridos en hígado, sustrato indispensable para el desarrollo de NASH. Por otro lado los PUFA, en general, son altamente susceptibles al daño oxidativo cuando se exponen al aire o *in vivo* (425), y los lipoperoxidos resultantes y sus metabolitos son directamente proinflamatorios. Debido a que la NAFLD se relaciona con el stress oxidativo, su empleo sería teóricamente perjudicial. Sin embargo, el papel de los PUFA  $\omega$ -3 en la inflamación y stress oxidativo es controvertido (385). Su acción antiinflamatoria está asociada a la activación del PPAR- $\alpha$  (426) y a la inhibición competitiva directa de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa (COX) (427). La vía de la síntesis de eicosanoides últimamente se ha invocado como una vía potencial proinflamatoria de la esteatohepatitis (333). Comparados con los metabolitos de los PUFA  $\omega$ -6 como el leucotrieno B<sub>4</sub>, que es sin duda proinflamatorio, los metabolitos de los PUFA  $\omega$ -3 son generalmente antiinflamatorios (428). No obstante, en el contexto de la AFLD, se ha informado que el aceite de pescado provoca un alto grado de estrés oxidativo, lo que produce la depleción de las enzimas antioxidantes (429) y exacerba el daño hepático por alcohol.

La disminución del aporte dietético de PUFA en un modelo deficiente en colina y metionina disminuye la inducción de los genes proinflamatorios hepáticos (COX-2 y TNF, dependientes de NF- $\kappa$ B; e iNOS y CXCL-2, no dependientes de NF- $\kappa$ B), paralelamente a la formación de TBARS, lo que enfatiza el papel de la lipoperoxidación como un evento clave en la patogénesis de la esteatosis inducida por una dieta DCM (277), razón por la que posiblemente se encontró mayor inflamación en el grupo de ratones MCT, aún cuando se intentó formular una dieta base que contuviera, como mínimo, el requerimiento de PUFA  $\omega$ -3 de los ratones. La lipoperoxidación no es la única causa de la inflamación (infiltración leucocitaria) en este modelo, sino también el aumento en el contenido hepático de AA y sus derivados. Probablemente los factores

liberados a partir de los hepatocitos necróticos también producen reclutamiento de leucocitos.

### **8.5. Correlación de las variables que participan en la NAFLD.**

Al correlacionar las variables involucradas en esta enfermedad, pocas mostraron una fuerte correlación que fuera, además, significativa. Se corroboró el papel antiinflamatorio de la adiponectina a las 6 semanas (el aumento de adiponectina en plasma correlacionó con la disminución en el número de lipogranulomas) y a las 10 semanas (el aumento de adiponectina tendió a disminuir la balonización); la relación de la leptina con la inflamación (a mayor aumento de leptina, más lipogranulomas) a las 10 semanas, y que el contenido de triglicéridos hepáticos correlaciona positivamente con la relación AC/CT (a mayor cantidad de acilcarnitina con respecto a la carnitina total, más triglicéridos hepáticos) a las 10 semanas. Aparentemente, esta última correlación no tendría sentido bioquímico en un contexto normal, ya que se esperaría lo contrario; sin embargo, como se había indicado, la actividad de la CPT-2, aumentada, posiblemente fue inefectiva y no logró liberar la carnitina de las acilcarnitinas en el lumen mitocondrial, lo que es un reflejo de daño mitocondrial, descrito en múltiples ocasiones como una importante alteración en la NAFLD.

Adicionalmente, se comprobó que la AST es un indicador de inflamación hepática (correlacionó con la inflamación central/perisinusoidal y con la hialina a las 10 semanas).

### **8.6. Incorporación de ácidos grasos a la membrana de eritrocitos.**

Los ácidos grasos que pueden sintetizarse *de novo* por enzimas lipogénicas hepáticas son el C16:0, el C16:1  $\omega$ -7 y el C18:1  $\omega$ -9, que son los ácidos grasos más abundantes en el hígado.

La incorporación de ácidos grasos a la membrana eritrocitaria en este estudio tuvo dos propósitos:

1. Conocer que, efectivamente, las dietas se hallaran adecuadamente formuladas y fueran capaces de modificar el perfil lipídico de las membranas celulares. El perfil de ácidos grasos en la membrana eritrocitaria es un reflejo directo de su consumo dietético. Debido a que los MCT se absorben por vía portal y son llevados directamente a los tejidos para ser oxidados, es prácticamente imposible detectarlos en los eritrocitos ya que no poseen mitocondrias para oxidarlos. En cambio, los PUFA se absorben por vía linfática y por lo general no son oxidados, sino que se incorporan directamente en los fosfolípidos de la membrana eritrocitaria y del resto de las células, desde donde desempeñan importantes funciones de señalización de procesos inmunológicos (producción de mediadores pro y antiinflamatorios) y metabólicos (sensibilidad a la insulina), entre otros procesos. De haberse demostrado que los MCT se incorporaban a la membrana, hubiera significado que los MCT tienen influencia en el metabolismo celular, además de su consabida facilidad para ser  $\beta$ -oxidados.

Llama la atención que en el caso de los ratones en los que se administró la dieta con MCT hubo una menor elevación de LCFA (SFA y LA). La disminución de este último favorecería al hígado, ya que se formarían menos mediadores proinflamatorios.

2. Comprobar que la absorción de los ratones fuese adecuada. Dado que, como se mencionó arriba, esta incorporación refleja en forma directa la ingestión de estos ácidos grasos, su no incorporación implicaría una absorción defectuosa y, con ello, no se podrían comprobar siquiera los efectos de los diferentes ácidos grasos administrados.

La interpretación del perfil de ácidos grasos en membrana eritrocitaria ofrece grandes dificultades, ya que no sólo implica el hecho de que se absorban, sino en qué medida dependiendo de los otros ácidos grasos que compiten por los mismos sistemas de transporte (bien conocido es el hecho que el AA compite con los ácidos grasos  $\omega$ -3).

La técnica descrita para la medición de ácidos grasos cuantifica todos los ácidos grasos existentes en el eritrocito, mismos que corresponden exclusivamente a su membrana celular; en otros tejidos, esta medición sería mucho más compleja ya que supondría cuantificar los ácidos grasos de la membrana celular así como la de otros compartimientos (la membrana de los diferentes organelos que contengan estos tejidos y los lípidos paracelulares).

Se observó una mayor incorporación de C16:0, C16:1  $\omega$ -7, C18:0, C 18:1 $\omega$ -9 y C18:2  $\omega$ -6 en los eritrocitos de los ratones PUFA en comparación con los ratones MCT. Sekiya, por su parte, informó que en un modelo de ratones obesos *ob/ob* consiguió mejorar la esteatosis hepática, encontrando menor cantidad de estos ácidos grasos (y, por ende, de grasa) al suprimir el SREBP-1 mediante la administración de PUFA  $\omega$ -3 (53). De la misma forma, al disminuir la cantidad de lípidos hepáticos decrecieron las concentraciones de insulina y glucosa.

La dieta MCT no hizo que se incorporara menos C18:3  $\omega$ -3, C18:3  $\omega$ -6, C20:3  $\omega$ -6, C20:4  $\omega$ -6, C22:4  $\omega$ -6 o C22:6  $\omega$ -3 a la membrana que con la dieta STD o la dieta PUFA. Es posible que la dieta con MCT (a pesar de tener una mucho menor concentración de PUFA que la misma dieta con PUFA  $\omega$ -3) haya sido capaz de incorporar la misma cantidad de PUFA que las otras dietas que tenían una concentración mayor de PUFA (la dieta STD y, sobre todo, la dieta PUFA). Esto podría deberse a que los MCT facilitan la incorporación de PUFA o bien a que repercuten en su distribución final en la membrana celular, fruto de interacciones en el metabolismo aún no conocidas. De cualquier manera, todos estos PUFA son, precisamente, los que tienen mayor influencia en el metabolismo inflamatorio y en la fluidez de membrana y, por tanto, en los receptores de membrana.

## 9. Conclusiones.

### 9.1. Validación del modelo.

Se consiguió replicar el modelo anteriormente descrito en ratones C57BL/6 con una dieta deficiente en colina y metionina. Se corroboró:

- La pérdida de peso.
- La disminución del peso hepático desde la sexta semana.
- La disminución del peso relativo.
- La alteración de la función hepática y una mayor inflamación hepática (elevación de ALT y AST).
- La disminución de glucosa, colesterol y triglicéridos plasmáticos.
- La disminución de insulina plasmática.
- El aumento en el contenido de triglicéridos hepáticos.
- El aumento en la esteatosis.
- El aumento en la inflamación lobulillar/lipogranulomas.
- El aumento en la fibrosis (aunque fuese una tendencia, que seguramente hubiera alcanzado significancia estadística de aumentar la n de los grupos estudiados).

No se encontró, sin embargo, un aumento en la lipoperoxidación, expresado como un aumento en el contenido hepático de MDA.

Sin embargo, opuesto a lo descrito en la literatura previa no relacionada con la NAFLD, se encontró (y se considera como aportación propia al conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad):

- Una disminución de la leptina plasmática en un contexto de inflamación, probablemente secundaria a la ausencia de tejido adiposo.
- Un aumento de la adiponectina plasmática, probablemente por el efecto de la pérdida de peso.
- Una disminución en la carnitina libre, acilcarnitinas, carnitina total y sus relaciones, así como un aumento en la actividad de la CPT-2, aunque inefectiva.

El modelo, además, no mostró prácticamente diferencias en sus características a las 6 y 10 semanas de seguimiento.

En resumen:

1. Se confirman las características bioquímicas y morfológicas previamente descritas para este modelo, pero no aumenta la lipoperoxidación (expresada como MDA hepático).
2. Se demuestra una disminución en la concentración de leptina, CL, AC y CT plasmáticas y un aumento en la concentración de adiponectina y actividad de CPT-2.

3. No se encontraron diferencias en las características bioquímicas o morfológicas observadas a las 6 y 10 semanas de seguimiento.
4. Seis semanas es un tiempo suficiente de seguimiento.

### **9.2. Efecto profiláctico de los ácidos grasos en el desarrollo de la NAFLD.**

- Hubo una mayor pérdida de peso hepático y de peso hepático relativo en los ratones DCM, probablemente por el efecto proinflamatorio del aceite de maíz que normalmente contiene esta formulación comercial.
- Los ratones MP mostraron una menor inflamación (ALT y AST) pero paradójicamente un mayor contenido de MDA hepático.
- Se comprobó que los diferentes ácidos grasos empleados no afectan la acumulación de triglicéridos en hígado ni el grado de esteatosis.
- Los ratones PUFA y MP mostraron más lipogranulomas mientras que los DCM más fibrosis, por lo que plausiblemente los PUFA  $\omega$ -3 pueden retrasar la inflamación y, por tanto, la fibrosis.

En resumen:

1. Se observaron efectos bioquímicos moderados con los diferentes ácidos grasos empleados.
2. Los diferentes ácidos grasos no afectan la acumulación de triglicéridos en hígado (contenido o grado de esteatosis).
3. Los ácidos grasos PUFA 2-3 (aislados o en combinación) aumentan los lipogranulomas pero pueden disminuir la fibrosis.

### **9.3. Efecto terapéutico de los ácidos grasos en la NAFLD.**

- No se encontraron diferencias en los parámetros estudiados.
- Los ratones MCT mostraron más inflamación que los ratones PUFA y MP.
- Los ratones PUFA mostraron más fibrosis.
- Tanto los MCT como los PUFA  $\omega$ -3 afectan negativamente el índice hepático.

En resumen:

1. No se observó ningún efecto benéfico bioquímico o morfológico.
2. Se observó, incluso, un empeoramiento de los parámetros histológicos con el empleo de MCT, PUFA  $\omega$ -3 o su combinación.

### **9.4. Correlación de las variables que participan en la NAFLD.**

- Se corroboró el papel antiinflamatorio de la adiponectina tanto a las 6 como a las 10 semanas.
- Se confirmó el papel proinflamatorio de la leptina a las 10 semanas.
- Se encontró que el contenido de triglicéridos hepáticos correlaciona con la AC/CT en un contexto de una CPT-2 no funcionando.

## 10.Recomendaciones, limitaciones y últimas consideraciones.

La investigación clínica en NAFLD ha aumentado exponencialmente, con un promedio de seis estudios publicados al mes durante los últimos dos a tres años (430).

El progreso en el conocimiento de la NASH se ha visto obstaculizado por falta de un modelo experimental que reproduzca adecuadamente las características de la enfermedad en el hombre. La mayoría de la evidencia se deriva de modelos con deficiencia genética de leptina, resistentes al desarrollo de fibrosis, o al uso de dieta DCM, que produce esteatosis, necroinflamación y fibrosis en la zona 3 por una deficiencia nutrimental a la que los roedores –pero no el hombre- son sensibles (78). Por esta razón se justifica el uso de una dieta alta en grasa o sacarosa (431) en animales sin modificaciones genéticas, ya que así muestran obesidad visceral, resistencia a la insulina (aumento en glucosa e insulina plasmáticas), disminución en expresión del PPAR- $\alpha$  y alteraciones en la señalización de insulina y esteatosis hepática. Estas alteraciones, en conjunto pueden llevar a estrés oxidativo, daño necroinflamatorio, apoptosis celular y deposición de colágeno. La dieta alta en grasa es útil para simular la enfermedad humana porque contiene mayoritariamente SFA (30.4 g/100 g dieta) y no PUFA (5.3 g/100 g dieta). La grasa saturada correlaciona con el índice de sensibilidad a la insulina y con la concentración de ALT en pacientes con NASH y con el aumento de esteatosis hepática en mujeres obesas (432,433).

El modelo DCM, cuyas características permiten la regulación fina de la composición de lípidos en el hígado, permite distinguir el papel individual de diferentes nutrimentos en la enfermedad hepática *in vivo*, por lo que es de invaluable ayuda para investigar el papel de los hidratos de carbono y grasa en la patogénesis de la NASH.

El estudio del efecto de los PUFA  $\omega$ -3 en la NAFLD muestra una complejidad llamativa tanto en su diseño como en su interpretación, ya que puede tener aspectos positivos en un modelo experimental aunque negativos en otro. Es por ello indispensable definir el propósito de su uso terapéutico para elegir entre uno u otro modelo experimental, ya que, por su comportamiento biológico, los PUFA  $\omega$ -3 en la NAFLD puede tener efectos benéficos en un modelo inducido con dieta alta en grasa, como la supresión de la lipogénesis hepática, aumento en la oxidación de ácidos grasos periféricos (disminuyendo, con ello, la potencial carga de FFA que lleguen al hígado) y hepáticos, aumento en la síntesis de adiponectina y reducción de TNF- $\alpha$ , y consiguientemente, de inflamación. En cambio, en un modelo inducido con dieta DCM, los PUFA  $\omega$ -3 pueden aumentar la lipoperoxidación e inflamación aunque no necesariamente llegan a producir daño hepático.

Es muy importante considerar para futuras investigaciones que si el tratamiento dietético de la NAFLD intenta disminuir la acumulación de grasa en hígado, deben tomarse las acciones necesarias para también evitar la lipoperoxidación, ya que ésta puede subestimar la protección contra la esteatohepatitis que podría conferir la activación del PPAR- $\alpha$ .

Los modelos animales de NAFLD constituyen herramientas fenotípicamente consistentes con las que se puede diseccionar la patogénesis de esta enfermedad, permitiendo apreciarla como una faceta de una enfermedad sistémica y no tanto como un fenómeno órgano-específico.

El modelo murino elegido es el que, a juicio de la autora de este trabajo -y después de exhaustivas búsquedas y comparaciones de modelos- pudo proporcionar el mejor terreno para estudiar el efecto de los diferentes ácidos grasos en la profilaxis y terapéutica de esta enfermedad. Los PUFA  $\omega$ -3 pueden ser utilizados con toda seguridad ya que son ligandos naturales de los PPAR- $\alpha$  y estos últimos, a su vez son menos tóxicos en el hombre que en los roedores porque no producen hepatomegalia o hepatotoxicidad (434). Una vez corroborada la eficacia ya observada de esta maniobra en la profilaxis de la NAFLD, podrían plantearse más estudios, además de los publicados por Capanni (384), entre otros autores, en donde se pudiese verificar la utilidad preventiva de los PUFA  $\omega$ -3 en los pacientes con esteatosis hepática (sobre todo, la no relacionada con obesidad o diabetes mellitus) con respecto al desarrollo de NASH. Desafortunadamente, al parecer la modificación de ácidos grasos en la dieta no comportó ningún efecto en el tratamiento de esta enfermedad pero el no haber encontrado un beneficio en este estudio no excluye la posibilidad de realizar otros estudios al respecto. Es probable que el efecto terapéutico que se esperaba de los ácidos grasos se consiga aumentando la dosis empleada, o bien administrando fenobarbital a los ratones, ya que es una maniobra que acelera muchos de los procesos metabólicos.

La deficiencia de colina y metionina provocan en los ratones el desarrollo de esteatohepatitis con fibrosis progresiva, pero éstos pierden peso y tienen mayor sensibilidad a la insulina, en contraste con la resistencia a la insulina y síndrome metabólico que acompañan la mayoría de los casos de la NAFLD humana. Así, mientras que estos modelos han sido útiles para conocer la patogénesis inflamatoria y por lipoperoxidación de la esteatohepatitis, es ahora momento de enfocarse en propuestas experimentales más cercanas a la enfermedad humana que intenten involucrar tanto la resistencia a la insulina como el stress oxidativo y así estudiar aspectos innovadores tanto en la fisiopatología como en lo referente a diferentes opciones terapéuticas de la NAFLD.

Debido a una limitación de recursos, propia de una investigación exploratoria, se estudiaron los parámetros mínimos o indispensables de los principales indicadores (resistencia a la insulina, concentraciones de leptina y adiponectina, peroxidación, inflamación, fibrosis) relacionados con la NASH. Se considera que estos indicadores pueden estudiarse justificadamente en profundidad por medio de otros parámetros más elaborados y de mayor costo en estudios posteriores - incluyendo el análisis de la concentración de la lipoproteína Apo B100, la actividad de CPT-1, citocinas en tejido hepático y otros indicadores de lipoperoxidación y fibrogénesis- una vez comprobada la utilidad de la maniobra propuesta.

Debido a los pocos antecedentes que se tienen del tema y a las hipótesis planteadas -fundamentadas pero especulativas- se considera que este estudio es naturaleza exploratoria. Así, los resultados obtenidos deben tomarse con cautela y se recomendaría una aproximación estadística por medio de un análisis de regresión para elegir las variables realmente relacionadas con la inflamación en este modelo y así centrar en éstas los estudios ulteriores.

## Bibliografía

1. Lehninger AL. Principios de Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona 1988: 511-526.
2. Bivins BA, Bell RM, Griffen WO. Linoleic acid versus linolenic acid: what is essential? JPEN 1983; 7: 473-478.
3. Passmore R, Eastwood MA. Human nutrition and dietetics. 8<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone. Hong Kong 1986.
4. Mataix J, Gil A. Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y monoinsaturados tipo oléico y su papel en la salud. Instituto Omega 3. Puleva Food. Granada 2003.
5. Diehl AM. Lesson from animal models of NASH. Hepatol Res 2005; 33: 138-144.
6. Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, Ghenev PI. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. Curr Pharm Des 2003; 9: 1023-1031.
7. Harry DS, McIntyre N. Plasma lipids and lipoproteins. En: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodés J (eds). Oxford textbook of Clinical Hepatology. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford Medical Publications. Oxford University Press. Oxford 1999: 287-288 y 742-743.
8. Meunier Durmort C, Poirier H, Niot I, Forest C, Besnard P. Up-regulation of the expression of the gene for liver fatty acid-binding protein by long-chain fatty acids. Biochem J 1996; 319: 483-487.
9. Velasco Diez G. Regulación a corto plazo de la carnitina palmitoiltransferasa I del hígado de rata. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, 1997.
10. Elsing C, Kassner A, Stremmel W. Effect of surface and intracellular pH on hepatocellular fatty acid uptake. Am J Physiol 1996; 271: G1067-G1073.
11. Van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ, Glatz JFC. Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins. Lipids 1996; 31 (Suppl): S223-S227.
12. Zammit VA. Mechanisms of regulation of the partition of fatty acids between oxidation and esterification in the liver. Progr Lipid Res 1984; 23: 39-67.
13. Galán Ortega A. Valor diagnóstico de la carnitina. Ed Cont Lab Clin 1999; 3: 1-7.

14. Murthy MS, Pande SV. Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 378-382.
15. Martín Casanueva MA. Aspectos bioquímicos y genético-moleculares de las intolerancias al ejercicio. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, 2001.
16. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546: 21-43.
17. Zammit ZA. Carnitine acyltransferases in the physiological setting: the liver. *Biochem Soc Trans* 1986; 14: 676-679.
18. Mc Garry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997; 244: 1-14.
19. Brownsey RW, Zhande R, Boone AN. Isoforms of acetyl CoA carboxylase: structures, regulatory properties and metabolic functions. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 1232-1238.
20. Mc Garry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Ann Rev Biochem* 1980; 49: 395-420.
21. Sebastián Muñoz D. Resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos en células de músculo esquelético L6E9: papel de la carnitina. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia. Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular, 2006.
22. Saggerson ED, Carpenter CA. Regulation of hepatic carnitine palmitoyltransferase activity during the foetal-neonatal transition. *FEBS Letts* 1982; 150: 177-180.
23. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res* 2002; 41: 197-239.
24. Bertrand C, Largillière C, Zobot MT, Mathieu M, Vianey-Saban C. Very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency : identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid oxidation in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1180: 327-329.
25. Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid metabolism. *Ann Rev Nutr* 1994; 14: 343-370.
26. Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis: III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1333-G1339.

27. Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JI. Metabolic aspects of peroxisomal  $\alpha$ -oxidation. *Biochem Biophys Acta* 1991; 85: 141-158.
28. Ferdinandusse S, Mulders J, Ijlst L, Denis S, Dacremont G, Waterham HR, Wnaders RJ. Molecular cloning and expression of human octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal  $\beta$ -oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 213-218.
29. Hamel FG, Bennett RG, Upward JL, Duckworth WC. Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology* 2001; 142: 2702-2706.
30. Willumsen N, Hexeberg S, Skorve J, Lundquist M, Berge RK. Docosahexaenoic acid shows no triglyceride-lowering effects but increases the peroxisomal fatty acid oxidation in liver of rats. *J Lipid Res* 1993; 34: 13-22.
31. Skorin C, Necochea C, Johow V, Soto V, Grau AM, Bremer J, Leighton F. Peroxisomal fatty acid oxidation and inhibitors of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1992; 281: 561-567.
32. Yu S, Rao S, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 2003; 3: 561-572.
33. Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlind AC, Watts T, Witters LA. Identification of an isozymic form of acetyl-Co A carboxylase. *J Biol Chem* 1990; 265: 1502-1509.
34. Hollands MA, Cawthorne MA. Important sites of lipogenesis in the mouse other than liver and white adipose tissue. *Biochem J* 1981; 198: 239-242.
35. Foufelle F, Girard J, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Adv Enzyme Regul* 1996; 36: 199-226.
36. Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr* 2001; 131:1129-1132.
37. Holtman RT. Nutritional and metabolic interrelationship between fatty acids. *Federation Proc* 1964; 23: 1062-1067.
38. Brenner RR. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog Lipid Res* 1981; 20: 41-47.
39. Bordoni A, López-Jiménez JA, Spano C, Biagi P, Horrobin DF, Hrelia S. Metabolism of linoleic and alpha-linolenic acids in cultured cardiomyocytes: effect of different n6 and n3 fatty acids supplementation. *Mol Cell Biochem* 1996; 157: 217-222.

40. British Nutrition Foundation Task Force. Unsaturated fatty acids and cancer. En: Unsaturated fatty acids. Nutritional and physiological significance (1<sup>st</sup> ed). Chapman & Hall. London, 1992: 120-128.
41. De Tomas ME, Mercuri O, Rodrigo A. Effects of dietary protein and EFA deficiency on liver delta-5, delta-6 and delta-9 desaturase activities in the early developing rat. J Nutr 1980; 110: 595-599.
42. Cunnane SC, Mc Adoo KR. Iron intake influences essential fatty acids and lipid composition of rat plasma and erythrocytes. J Nutr 1987; 117: 1514-1519.
43. Cunnane SC. Differential regulation of essential fatty acids metabolism to the prostaglandins: possible basis for the interactions of zinc and copper in biological systems. Prog Lipid Res 1982; 21: 73-90.
44. Clandinin MT, van Aerde JEE. Developmental aspects of long chain polyunsaturated fatty acid metabolism: CNS development. En: Polyunsaturated fatty acids in human nutrition. Bracco U, Deckelbaum J (eds). Nestlé Nutrition Workshop Series vol. 28. Nestec Ltd., Vevey/ Raven Ltd., New York 1992: 111-119.
45. Brenner RR, Peluffo RO. Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. I. Effect of unsaturated fatty acids of 18 carbons on the microsomal desaturation of linoleic acid into gamma-linoleic acid. Biochem Biophys Acta 1969; 176: 471-479.
46. Weiner TW, Sprecher H. Arachidonic acid, 5,8,11-eicosatrienoic acid and 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid. Dietary manipulation of the levels of these acids in the rat liver and platelet phospholipids and their incorporation into human platelet phospholipids. Biochem Biophys Acta 1984; 792: 293-303.
47. Dougherty RM, Galli C, Ferro-Luzzi A, Iacomo JM. Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland and the USA. Am J Clin Nutr 1987; 45: 443-455.
48. Hovik R, Osmundsen H. Peroxisomal  $\alpha$ -oxidation of long-chain fatty acids possessing different extents of unsaturation. Biochem J 1987; 247: 531-535.
49. Mañé Almero J. Efecte de l'oli d'oliva sobre la carcinogènesi i la producció local d'eicosanoides en un model de càncer colorrectal per azoximetà. Tesis doctoral. Universidad Autònoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona, 2002.
50. Carrero JJ, Martín Bautista E, Baró L, Fonollá J, Jiménez J, Boza JJ, López Huertas E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. Nutr Hosp 200; 20: 63-69.
51. Browning J, Horton J. Molecular mediators of hepatic steatosis in liver injury. J Clin Invest 2004; 114: 147-152.

52. Svegliati Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, de Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and non-alcoholic steatohepatitis in rats. Role of peroxisome proliferators-activated receptor- $\alpha$  and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 846-860..
53. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology* 2003; 38: 1529-1539.
54. Kohijima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Enjoji M, Takayanagi R, Nakamuta M. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*. 2008;21:507-511.
55. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 274: 30028-30032.
56. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006; 55: 2159-2170.
57. Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 2075-2080.
58. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12737-12742.
59. He Z, Jian T, Wang Z, Levi M, Li J. Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E424-E430.
60. Ishii M, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15597-15602.
61. Cases S, Stone SJ, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal KD, Voelker T, Farese RV Jr. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* 2001; 276: 33870-33876.
62. De Taeye BM, Novitskaya T, Mc Guinness OP, Gleaves L, Medda M, Convington JW, Vaughan DE. Macrophage TNF- $\alpha$  contributes to insulin

resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E713-E725.

63. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferators-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles of inflammation. *J Ster Biochem Mol Biol* 2003; 85: 267- 273.

64. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 1-16.

65. Tanaka Y, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodoma T, Sakai J. Activation of peroxisome proliferators-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15924-15929.

66. Beier K, Volkl A, Fahimi DH. TNF- $\alpha$  downregulates the peroxisome proliferator activated receptor-alpha and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. *FEBS Lett* 1997; 412: 385-387.

67. You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 2005; 42:568-577.

68. Li X, Han de W, ZZhao LF, Yin L. Effect of endotoxin on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the development of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Zhonghua Gan Zang Bin Za Hi* 2005; 13: 89-91.

69. Tanaka T, Masuzaki H, Ebiharal K, Ogawa Y, Yasue S, Yukioka H, Chusho H, Miyanagal F, Miyazawa T, Fujimoto M, Kusakabe T, Kobayashi N, Hayashi T, Hosoda K, Nakao K. Transgenic expression of mutant peroxisome proliferators-activated receptor PPAR- $\alpha$  in liver precipitates fasting-induced hepatic steatosis but protects against hgh fat diet-induced hepatic steatosis in mice. *Metabolism* 2005; 54: 1490-1498.

70. Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferators-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 245-257.

71. Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2002; 8: 422-430.

72. Fougelle F, Ferré P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role of the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 2003; 366: 377-391.

73. Sparks JD, Sparks CE. Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of adipoliporpottein B by rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 8854-8862.

74. Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 477-502.
75. Institute of Medicine. Dietary referente intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, colesterol, protein and amino acids. Washington D.C. National Academies Press 2002.
76. European Commission Directorate General for Health and Consumer Protection. Eurodiet: Nutrition and diet for healthy lifestyles in Europe. 2001. <http://eurodiet.med.uoc.gr/>
77. Clarke S. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis: I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G865-869.
78. Koteish A, Diehl A. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 89-104.
79. Alba LM, Lindor K. Review article: nonalcohollic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 977-986.
80. Kirsch T, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall P de la M. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1272-1282.
81. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107.
82. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438.
83. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of non-alcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74-80.
84. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Solinger HW. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 51: 1536-1537.
85. Teramoto K, Bowers JL, Khetry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 1993; 55: 737-741.
86. Zhang BH, Weltman M, Farrell GC. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 133-137.

87. Veteläinen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg* 2007; 241: 44-50.
88. Stärkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, Desager JP, Horsmans Y. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor- $\beta$  up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol* 2003; 39: 538-546.
89. Diehl AM. Alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. En: Arias IM, Boyer JL, Chissari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA (eds). *The liver, biology and pathobiology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA. Lippincott Williams and Wilkins 2001: 739-753.
90. Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001; 121: 710-723.
91. Purohit V, Russo D, Coates PM. Role of fatty liver, dietary fatty acid supplements, and obesity in the progression of alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* 2004; 34: 3-8.
92. Angulo P, Lindor KD. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 797-810.
93. Propst A, Propst T, Judmaier G, Vogel W. Prognosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1607 (letter).
94. Hultcrantz R, Glaumann H. Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. *Scand J Gastroenterol* 1986;1: 109-113.
95. Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard J. Liver histology in a normal population –examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scand J Gastroenterol* 1977; 12: 593-597.
96. Nonomura A, Mizukami Y, Unoura M, Kobayashi K, Takeda R. Clinicopathologic study of alcohol-like liver disease in non-alcoholics; non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Gastroenterol Jpn* 1992; 27: 521-528.
97. Hornboll P, Olsen T. Fatty changes in the liver: the relation to age, overweight and diabetes mellitus. *Acta Path Microbiol Immunol Scand (A)* 1982; 90: 199-205.
98. Underwood Ground KE. Prevalence of fatty liver in healthy male adults accidentally killed. *Aviat Space Environ Med* 1984; 55: 59-61.
99. Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 374-377.

100. Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca G, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 293-303.
101. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002; 35: 367-372.
102. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379.
103. Brunt E. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-20.
104. Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue-emerging role in non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 273-280.
105. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1513-1517.
106. Mc Clain CJ, Mokshagundam SP, Barve SS, Song Z, Hill DB, Chen T, Deaciuc I. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2004; 34: 67-79.
107. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41.
108. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-1110.
109. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibaut V, Theodorou I, Khalil L, Turpin G, Opolon P, Poynard T. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118: 1117-1123.
110. García Monzón C, Martín Pérez E, Iacono OL. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000; 33: 716-724.
111. Kral JG, Schaffner F, Pierson RN Jr, Wang J. Body fat topography as an independent predictor of fatty liver. *Metabolism* 1993; 42: 548-551.
112. Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance-causative or correlative? *Br J Nutr* 2000; 83 (suppl 1): S71-S77.

113. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien HE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121: 91-100.
114. Pérez Aguilar F, Benlloch S, Berenguer M, Beltrán B, Berenguer J. Non-alcoholic steatohepatitis: physiopathological, clinical and therapeutic implications. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 96: 628-648.
115. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-923.
116. Sanyal AJ. AGA Technical Review on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2002; 123:1705-1725.
117. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
118. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bigianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of non-alcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; 107: 450-455.
119. Kemmer NM, McKinney KH, Xiao SY, Singh H, Murray R, Abdo B. High prevalence of NASH among Mexican American females with type II diabetes mellitus. *Gastroenterology* 2001; 120: A117.
120. Browning JD, Kumar KS; Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 292-298.
121. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.
122. Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, Erdil A, Yaman H, Saka M, Deveci MS; Baqci S, Gulsen M, Karaenen N, Daqalp K. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3584-3589.
123. Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1929-1934.
124. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6: 1-18.
125. Bragoszewski P, Hablior A, Walewska-Zielecka B, Ostrowski J. Expression of genes encoding mitochondrial proteins can distinguish non-alcoholic steatosis from steatohepatitis. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 341-348.

126. Rubio A, Guruceaga E, Vázquez Chantada M, Sandoval J, Martínez Cruz ALA, Segura V, Sevilla JL, Podhorski A, Corrales FJ, Torres L, Rodríguez M, Aillet F, Ariz U, Arrieta FM, Caballería J, Martín Duce A, Lu SC, Martínez Chantar ML, Mato MJ. Identification of a gene-pathway associated with nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007; 46: 708-718.
127. Day CP, James OF: Steatohepatitis: a tale of two "hit"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.
128. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- $\alpha$  or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54.
129. Bahcecioglu IH, Yalniz M, Ilhan N, Ataseven H, Ozercan IH. Levels of serum vitamin A, alpha-tocopherol and malondialdehyde in patients with non-alcoholic steatohepatitis: relationship with histopathologic severity. *Int J Clin Pract* 2005; 59: 318-323.
130. Harrison SA, Kadakia S, Lang K, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2714-2724.
131. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192.
132. Pérez Carreras M, del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007.
133. Caldwell SH, Swerdlow RH, Hkan EM, Iezzoni JC, Hespenheide EE; Parks JK, Parker Jr WD. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 430-434.
134. Alwayn IP, Andersson C, Lee S, Arsenault DA, Bistrain BR, Gura KM; Nose V, Zauscher B, Moses M, Puder M. Inhibition of matrix metalloproteinases increases PPAR- $\alpha$  and IL-6 and prevents dietary-induced steatosis and injury in a murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1011-G1019.
135. Samuel VT, Liu Z, Zu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353.
136. Adams LA, Lindor KD. Treatment of hyperlipidemia in nonalcoholic fatty liver disease: fat for thought. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23: 127-128.
137. Mc Garry JD. Banting lecture 2001. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 2001. 51: 7-18.

138. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 1997; 46: 983-988.
139. Bugianesi E, Mc Cullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 987-1000.
140. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1: 785-789.
141. Grefhorst A, Hoekstra J, Derks TG, Ouwens DM, Baller JF, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Kuipers F. Acute hepatic steatosis in mice by blocking beta-oxidation does not reduce insulin sensitivity of very-low-density lipoprotein production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G592-G598.
142. Loftus TM; Jaworsky DE, Freynord GL, Townsend CA, Ronet GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000; 288: 2379-2381.
143. Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhihl H, Mc Garry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes* 2001; 50: 123-130.
144. Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, Igura T, Maeda N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Hayashi N. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J Hepatol* 2007; 47: 556-564.
145. Jarrar MH, Baranova A, Colantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennet C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 412-421.
146. Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH; Barzilai N. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J* 2007; 21: 53-60.
147. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2000; 21: 263-307.
148. Poordad FF. The role of leptin in NAFLD: contender or pretender? *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 841-843.
149. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL: Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401: 73-76.

150. Pérez C, Fernández Galaz C, Fernández Agullo T, ARribas C, Andres A, Ros M. Leptin impairs insulin signalling in rat dipocytes . *Diabetes* 2004; 53: 347-353.
151. Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: S87-S92.
152. Leclercq IA, Field J, Farrell GC. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology* 2003; 124: 1451-1464.
153. Marra F. Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1529-1532.
154. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatohepatitis. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 679-690.
155. Chitturi S, Farrell G, Frost L; Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403-409.
156. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Consideine RV. Does leptin play a role in the pathogenesis of human non-alcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2771-2776.
157. Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, De Paoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* 2002; 109: 1285-1286.
158. Hookman P, Barkin JS. Current biochemical studies of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) suggest a new therapeutic approach. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 495-499 (comentario sobre
159. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219: 9-15.
160. Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin. A novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166: 1655-1669.
161. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; 26: 2442-2450.

162. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froquel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7: 941-946.
163. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100.
164. Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, de Michieli F, Cassader M, Durazzo M, Rizzetto M, Pagano G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438-46.
165. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, de Michieli F, Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 1175-1183.
166. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Scala L, Zenari L, Falezza G. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 697-683.
167. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Fukui K, Maeda N, Nishizawa H, Nagaretani H, Okamoto Y, Kihara S, Miyagawa J, Shinomura Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125: 1796-1807.
168. Okumura K, Ikejima K, Kon K, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, Sato N. Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-A (y) mice. *Hepatol Res* 2006; 36: 217-228.
169. Czaja MJ. Liver injury in the setting of steatosis: crosstalk between adipokine and cytokine. *Hepatology* 2004; 40: 19-22.
170. Shklyayev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpace PJ, Zolotukhin S. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14217-14222.
171. Leclercq IA, Lebrun VA, Stärkel P, Horsmans YJ. Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPAR- $\alpha$  agonist pioglitazone. *Lab Invest* 2007; 56-65.

172. Tietge UJ, Böker KH, Manns MP, Bahr MJ. Elevated circulating adiponectin levels in liver cirrhosis are associated with reduced liver function and altered hepatic hemodynamics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E82-E89.
173. Hotamisligil GS. The role of TNF alpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 1999; 245: 621-625.
174. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389: 610-614.
175. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350.
176. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, y cols. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3815-3819.
177. Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 18: 1221-1231.
178. Solomon SS, Mishra SK, Cwik C y cols. Pioglitazone and metformin reverse insulin resistance induced by tumour necrosis factor-alpha in liver cells. *Horm Metab Res* 1997; 29: 379-382.
179. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nature Med* 2000; 6: 998-1003. Comentario en: Current biochemical studies of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) suggest a new therapeutic approach. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 495-499.
180. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996; 111:1645-1653.
181. Nagle CA, An J, Shiota M, Torres TP, Cline GW, Liu ZX, Wang S, Catlin RL, Shulman GI, Newgard CB, Coleman RA. Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance. *J Biol Chem* 2007; 282: 14807-14815.
182. Liu LF, Purushotham A, Wendel AA, Belury MA. Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1671-1682.
183. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 663-678.

184. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana N, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acids n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* 2004; 106: 635-643.
185. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005; 87:81-86.
186. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 639-671.
187. Brown AM, Castle J, Hebbachi AM, Gibbons GF. Administration of n-3 fatty acids in the diets of rats or directly to hepatocyte cultures results in different effect on hepatocellular ApoB metabolism and secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 106-114.
188. Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 43-55.
189. Galán A, Arambarri M, Cuatrecasas G, Matute B, Granada ML, Alastrué A, Rull M, Formiguera X. Influence of plasmatic carnitine and hepatic carnitine palmitoyltransferase in the hepatic steatosis of visceral obesity. *Obesity* 1999; 23 (Suppl 5): 380.
190. Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 2005; 128: 1381-1390.
191. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1499-1507.
192. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688.
193. Bocher V, Pineda Torra L, Fruchart JC, STaels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 7-18.
194. Lalor PF, Faint J, Aarbodem Y, Hubshcer SG, Adams DH. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 173-193.
195. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokiyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 2007; 46: 1392-403.

196. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPAR- $\alpha$ -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 123-132.
197. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 1998; 273: 5678-5684.
198. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 128-133.
199. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1135-G1139.
200. Portincasa P, Grttagliano I, Palmieri VO, Palasciano G. Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management. *Clin Biochem* 2005; 38: 203-217.
201. Park KS, Jang BK, Kwon KM, Chung WJ, Cho KB, Hwang JS, Ahn SH, Mun KC, Kim YH. Antioxidant status in non-alcoholic steatohepatitis. *Korean J Hepatol* 2005; 11: 135-143.
202. Lieber CS. Cytochrome P450 2E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 1997; 77: 517-544.
203. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37: 544-550.
204. Lieber CS, de Carli LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: a adaptive increase after ethanol feeding. *Science* 1968; 162: 917-918.
205. Raucy JL, Lasker JM, Kramer JC, Salazar DE, Lieber CS, Corcoran GB. Induction of P450IIE1 in the obese rat. *Mol Pharmacol* 1991; 39: 275-280.
206. Dong H, Lu FE; Gao ZQ, Xu LJ, Wang KF, Zou X. Effects of emodin on treating murine non-alcoholic fatty liver induced by high caloric laboratory chow. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1339-1344.
207. James OF, Day CP. Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.
208. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, González FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075.

209. Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, Thummel KE. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 38: 428-435.
210. Leclercq I, Horsmans Y, Desager JP, Delzenne N, Geubel AP. Reduction in hepatic cytochrome P-450 is correlated to the degree of liver fat content in animal models of steatosis in the absence of inflammation. *J Hepatol* 1998; 28: 410-416.
211. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Bio Med* 1991; 11: 81-128.
212. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-69.
213. Nocito A, Dahm F, Jochum W, Jang JH, Georgiev P, Bader M, Renner EL; Clavien PA. Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007; 133: 608-618.
214. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G193-G199.
215. Oliveira CP, da Costa Gayotto LC; Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Laudanna AA. Oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 399-406.
216. Albano E. Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 9-16.
217. Torer N, Ozenirler S, Yucel A, Bukan N, Erdem O. Importance of cytokines, oxidative stress and expression of BCL-2 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1095-1101.
218. Willis MS; Thiele GM; Tuma DJ, Klassen LW. T cell proliferative responses to malondialdehyde-acetaldehyde haptenated protein are scavenger receptor mediated. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 1381-1399.
219. James OFW, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol* 1998; 29: 495-501.
220. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34: 57-62.

221. Yoo JSH, Ning SM, Pantuck CB, Pantuck EJ, Yang CS. Regulation of hepatic microsomal cytochrome P450<sub>1e1</sub> levels by dietary lipids and carbohydrates in rats. *J Nutr* 1991; 121: 959-965.
222. Mavrelis PG, Ammon HV, Gleysteen JJ, Komorowski RA, Charaf UK. Hepatic free fatty acids in alcoholic liver disease and morbid obesity. *Hepatology* 1983; 3: 226-231.
223. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. A lipidomic analysis of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007; 46: 1081-90.
224. Mc Cuskey RS, Ito Y, Robertson GR, Mc Cuskey MK, Perry M, Farrell GC. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 386-393.
225. Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU. Possible roles of aldehydic lipid peroxidation products as chemoattractants. *Int J Tissue React* 1987; 9: 295-306.
226. Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MV. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React* 1985; 7: 137-142.
227. Hoffman A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 2002; 299: 1241-1245.
228. Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, de la Peña A, Horsmans Y. Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J Hepatol* 2004; 41: 926-934.
229. Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004; 5: 27-42.
230. Crespo J, Cayon A, Fernandez Gil P, Hernandez Guerra M, Mayorga M, Domínguez Diez A, Fernandez Escalante JC, Pons Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in non-alcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163.
231. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, Mc Charthy PJ, Crose RH, Cummings AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 148-149.
232. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994; 43: 1271-1278.

233. Diehl AM. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage functions and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1-G5.
234. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Adipose tissue as a source of inflammatory cytokines in health and disease: a focus on end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003; Suppl: S65-S68.
235. Friedman S, Arthur M. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989; 84: 1780-1785.
236. Kirsch R, Clarkson V, Verdonk RC, Marais AD, Shephard EG, Rifle B, de la M Hall P. Rodent nutritional model of steatohepatitis: effects of endotoxin (lipopolysaccharide) and tumor necrosis factor alpha deficiency. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 174-182.
237. Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Muzutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006; 55: 415-424.
238. Bastard JP, Jardel C, Brucker E, Blondy P, Capeau J, Laville M. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3338-3342.
239. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-140.
240. Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl MA. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999; 29: 1131-1138.
241. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-145.
242. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419.
243. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Frnaklin BA, Gordon DJ, Kraus RM, Savage PJ, Smith SC, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement: Executive Summary. *Circulation* 2005; 112: 285-290.

244. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Non-alcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-1850.
245. Haffner SM, Miettinen H, Stem MP. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1997; 20: 1087-1092.
246. García Galiano D, Sánchez Garrido MA, Espejo I, Montero JL, Costán G, Marchal T, Membrives A, Gallardo Valverde JM, Muñoz Castañeda JR, Arévalo E, de la Mata M, Muntané J. IL-6 and IGF-1 are independent prognostic factors of liver steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2007; 17: 493-503.
247. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1497-1502.
248. Jain SK, Pemberton PW, Smith A, Mc Mahon RF, Burrows PC, Aboutwerat A, Warnes TW. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol* 2002; 36: 805-811.
249. Cortez Pinto H, Baptista A, Camilo ME, Valente A, Saragoça A, de Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 172-179.
250. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219.
251. Salt WB. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a comprehensive review. *J Insur Med* 2004; 36: 27-41.
252. Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 282-293.
253. Barbujo R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 2007; 194: 539-550.
254. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-468
255. Sanjeevi A, Lyden E, Sunderman B, Weseman R, Ashwathnarayan R, Mukherjee S. Outcomes of liver transplantation for cryptogenic cirrhosis: a single-center study of 71 patients. *Transplant Proc* 2003; 35: 2977-2980.

256. Molloy R, Komorowski R, Varma R. Recurrent nonalcoholic steatohepatitis and cirrhosis after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1997; 3: 177-178.
257. Palmer M, Schaffner F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterol* 1990; 99: 1408-1411.
258. Vajro P, Fontanella A, Perna C, Orso G, Tedesco M, de Vincenzo A. Persistent hyperaminotransferasemia resolving after weight reduction in obese children. *J Pediatr* 1994; 125: 239-241.
259. Huang MA, Greenon JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, Emick D, Lok AS, Conjeevaram HS. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1072-1081.
260. Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, Tia LY, Ding XD, Li MS, Wang GL. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2045-2049.
261. Rozental P, Biava C, Spencer H, Zimmerman HJ. Liver morphology and function tests in obesity and during total starvation. *Am J Dig Dis* 1967; 12: 198-208.
262. Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991; 12: 224-229.
263. Lavine JE. Vitamin E treatment of non-alcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Ped* 2000; 136: 734-738.
264. Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Silvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with non-alcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2711-2717.
265. Samara FF, Iqbal N, Seshadri P, Chicano KL, Daily DA, McGrory J, Williams M, Gracely EJ, Stern L. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2074-2081.
266. Larsen PJ, Jensen PB, Sorensen RV Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and -alpha on food intake and energy homeostasis. *Diabetes* 2003; 42: 2249-2259.
267. Hashimoto T, Fujita T, Usuda N, Cook W, Oi C, Peters JM, Gonzalez FJ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal and mitochondrial fatty acid  $\beta$  oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *J Biol Chem* 1000; 275:19228-19236.

268. Schoonjans K, Peinado Onsurbe J, Fruchart JC; Tailleux A, Fiévert C, Auwerx J. 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase. *FEBS Letters* 1999; 452: 160-164.
269. Larter CZ. Not all models of fatty liver are created equal: understanding mechanisms of steatosis development is important. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1353-1354.
270. Rangnekar AS, Lammert F, Igoznikov A, Green RM. Quantitative trait loci analysis of mice administered the methionine-choline deficient dietary model of experimental steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 1000-1005.
271. Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 48-52.
272. Silver LM. *Mouse Genetics: concepts and applications*. New York, Oxford: Oxford University Press, 1995.
273. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Toberson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, Mc Cullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321.
274. Deng Q, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S, Tuskamoto H. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 2005; 42: 905-914.
275. Tous M, Ferré N, Camps J, Riu F, Joven J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Biochem* 2005; 268: 53-58.
276. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, de Carli LM. Acarbose attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; 315: 699-703.
277. Lee GS, Yan JS; Ng RK, Kakar S, Maher JJ. Polyunsaturated fat in the methionine-choline-deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury. *J Lipid Res* 2007; 48: 1885-1896.
278. Mayer J, Bates MW, Dickie MM. Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science* 1951; 113: 746-747.
279. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 1966; 153: 1127-1128.
280. Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin Aldana H, Green RM, Whittington PF. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of non-alcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1035-G1043.

281. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57/BL6 mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81: 243-248.
282. Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bonk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to FAS mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003; 39: 978-983.
283. Hill JO, Fried SK, Di Girolamo M. Effects of a high-fat diet on energy intake and expenditure in rats. *Life Sciences* 1983; 33: 141-149.
284. Harris RB. Factors influencing energy intake in rats fed either a high-fat or a fat mimetic diet. *Int J Obes Rel Metab Dis* 1994; 18: 632-640.
285. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, de Carli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502-509.
286. Harrold JA, Widdowson PS, Clapham JC, Williams G. Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E340-E347.
287. Arsov T, Larter CZ, Nolan CJ, Petrovsky N, Goodnow CC, Teoh NC, Yeh MM, Farrell GC. Adaptive failure to high-fat diet characterizes steatohepatitis in *Alms1* mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 1152-1159.
288. Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids cause massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 1996; 98: 1575-1584.
289. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7281-7286.
290. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ. Mice fed a lipogenic methionine- choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res* 2006; 47: 2280-2290.
291. Ghoshal AK, Ahluwalia M, Farber E. The rapid induction of liver cell death in rats fed a choline-deficient methionine-low diet. *Am J Pathol* 1983; 113: 309-314.
292. Datko AH, Aksamit RR, Mudd SH. Phosphatidylcholine synthesis in the rat: the substrate for methylation and regulation by choline. *Lipids* 1990; 25: 135-142.

293. Yao ZM, Vance DE. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1988; 263: 2998-3004.
294. Lindblad L, Schesten T. Incorporation rate *in vitro* of choline and methyl-methionine into human lecithins. *Scand J Gastroenterol* 1976; 11: 587-591.
295. Rahman SM, Schroeder-Gloeckler JM, Janssen RC, Jiang H, Qadri I, Maclean KN, Friedman JE. CCAT/enhancing binding protein beta deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 45: 1108-1117.
296. Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1526-1533.
297. Picard C, Lambotte L, Stärkel P, Sempoux C, Saliez A, van den Berge V, de Saeger C, Horsmans Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2002; 32: 645-652.
298. George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J; Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003; 39: 756-764.
299. Kulinski A, Vance DE, Vance JE. A choline-deficient diet in mice inhibits neither the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein b secretion. *J Biol Chem* 2004; 23: 23916-23924.
300. Raabe M, Veniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Bjorkegren J, Nielsen LB, Wong JS, Hamilton RL, Young SG. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* 1999; 103: 1287-1298.
301. Bjorkegren J, Beigneux A, Bergo MO, Maher JJ, Young SG. Blocking the secretion of hepatic very low density lipoproteins renders the liver more susceptible to toxin-induced injury. *J Biol Chem* 2002; 277: 5476-5483.
302. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J Lipid Res* 2001; 42: 1018-1024.
303. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 11482-11486.

304. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline deficient (MCD) diet. *J Lipid Res* 2008; 49: 1068-1076.
305. Gyamfi MA, Damjanov I, French S, Wan YJ. The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 981-995.
306. Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl Am. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1070-G1077.
307. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002; 65: 166-176.
308. Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPAR- $\alpha$  agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39: 1286-96.
309. De la Peña A, Leclercq IA, Williams J, Farrell GC. NADPH oxidase is not an essential mediator of oxidative stress or liver injury in murine MCD diet-induced steatohepatitis. *J Hepatol* 2007; 46: 304-313.
310. Vendermiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in fatty liver: effect of nutritional status. *Hepatology* 2001; 33: 808-815.
311. De la Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF- $\kappa$ B activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1663-1674.
312. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004; 40: 47-51.
313. Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP 2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signalling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-9894.
314. Pera N, Phung N, Leclercq I, Farrell GC, George J. Oxidative stress and the evolution of hepatic fibrogenesis in a rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16 (Supl): A77.
315. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzales FJ, Robertson GR. Role of CYP2E1 and CYP4A enzymes as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075.

316. Struben VMD, Hespenheide EE, Caldwell SH. Non-alcoholic steatohepatitis and crypto genic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 2000; 108: 9-13.
317. Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohol-like liver disease in non-alcoholics. A clinical and histological comparison with alcohol induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-1062.
318. Yalniz M, Bahcecioglu IH, Kuzu N, Celebi S, Ataseven H, Ustündag B, Ozercan IH, Sahin K. Amelioration of steatohepatitis with pentoxifylline in a novel non-alcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2380-2386.
319. Sundaram SS, Whitington PF, Green RM. Steatohepatitis develops rapidly in transgenic mice overexpressing Abcb11 and fed a methionine-choline-deficient diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1321-G1327.
320. Tous M, Ferre N, Camps J, Riu F, Joven J. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Biochem* 2005; 268: 53-58.
321. Kashireddy PV, Rao MS. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatol Res* 2004; 30: 104-110.
322. Martinez Chantar ML, Corrales FJ, Martinez Cruz LA, García Trevijano ER, Huang ZZ, Chen L Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB* 2002; 16: 1292-1294.
323. Sahai A, Malladi P, Green RM, Whitington PF. Steatohepatitis and liver fibrosis associated with upregulated osteopontin expression in diabetic/insulin-resistant db/db mice fed a methionine and choline deficient diet. *Hepatology* 2003; 38: 497A.
324. Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whitington PF. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of non-alcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 287: G264-G273.
325. Sahai A, Pan X, Malladi P, Kohli R, Whitington PF. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and osteopontin in steatosis and aminotransferase release by hepatocytes treated with methionine-choline-deficient medium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G55-G62.
326. Yamazaki Y, Kakizaki S, Horiguchi N, Sohara N, Sato K, Takagi H, Mori M, Negishi M. The role of the nuclear receptor constitutive androstane receptor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2007; 56: 565-574.

327. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006; 43: 163-172.
328. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G15-G26.
329. Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, Yamazaki Y, Kuroda J, Shibata N. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW5016, PPAR- $\alpha$  agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol* 2006; 24: 181-191.
330. Harano Y, Yasui K, Toyama T, Nakajima T, Mitsuyoshi H, Mimani M, Hirasawa T, Itoh Y, Okanoue T. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver Int* 2006;26:613-620.
331. Saibara T, Onishi S, Ogawa Y, Yoshida S, Enzan H. Bezafibrate for tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 1999; 353: 1802.
332. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPAR- $\alpha$ . *Science* 2003; 302: 453-457.
333. Yu J, Hui AY, Chu ESH, Cheng ASL, Go MYY, Chan HLY, Leung WK, Cheung KF, CHing AKK, Chui YL, Chan KK, Sung JJY. Expression of a cyclooxygenase-2 transgene in murine liver causes hepatitis. *Gut* 2007; 56: 991-999.
334. Uto H, Nakanishi C, Ido A, Hasuike S, Kusumoto K, Abe H, Numata M, Nagata K, Hayashi K, Tsubouchi H. The peroxisome proliferators-activated receptor- $\alpha$  agonist, pioglitazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Hepatology* 2005; 42: 235-242.
335. Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; 321: 187-195.
336. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 2005-2010.
337. Ding X, Saxena NK, Lin S, Gupta NA, Anania FA. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology* 2006; 43:173-181.

338. Yu XX, Murray SF, Pandey SK, Booten SL, Bao D, Song XZ, Kelly S, Chen S, Mc Kay R, Monia BP, Bhanot S. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology* 2005; 42: 362-371.
339. Yamaguchi K, Yang L, Mc Call S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Mae Diehl A. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 45: 1366-1374.
340. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, Stevens RD, Bain JR, Newgard CB, Farese RV Sr, Hevener AL, Farese RV Jr. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* 2007; 6: 69-78.
341. Yamaguchi K, Yang L, Mc Call S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YK, Diehl AM. Diacylglycerol acyltransferase 1 anti-sense oligonucleotide reduce hepatic fibrosis in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 47: 625-35.
342. Irmay Y, Varela GM, Jackson MB, Graham MJ, Crooke RM, Ahima RS. Reduction of hepatosteatosis and lipid levels by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide. *Gastroenterology* 2007; 132: 1947-54.
343. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu ZX, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Cline GW, Yu XX, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-Co A carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 2006; 116: 817-824.
344. Nagao K, Inoue N, wang YM, Shirouchi B, Yanagita T. Dietary conjugated linoleic acid alleviates non-alcoholic fatty liver disease in Zucker (fa/fa) rats. *J Nutr* 2005; 135: 9-13.
345. Dey A, Caro AA, Cederbaum AI. S-adenosylmethionine protects ob/ob mice from CYP 2E1- mediated liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G91-G103.
346. Koppe SW, Sahai A, Malladi P, Whittington PF, Green RM. Pentoxifylline attenuates steatohepatitis induced by the methionine choline deficient diet. *J Hepatol* 2004; 41: 592-598.
347. Chen SW, Chen YX, Shi J, Lin Y, Xie WF. The restorative effect of taurine on experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2225-2234.
348. Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, Klaikeaw N. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5127-5132.

349. Samuhasaneeto S, Thong Ngam D, Kulaputana O, Patumraj S, Klaikeaw N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J Med Assoc Thai* 2007; 90: 788-797.
350. Quazzani-Chahdi A, Elimadi A, Chabli A, Spénard J, Colin P, Haddad PS. Combining ursodeoxycholic acid or its NO-releasing derivative NCX-1000 with lipophilic antioxidants better protects mouse hepatocytes against amiodarone toxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 233-242.
351. Ustundag B, Bahcecioglu IH, Sahin K, Duzgun S, Koca S, Glucu F, Ozercan IH. Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental non-alcoholic steatohepatitis model. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2006-2014.
352. Sakaida I, Okita K. The role of oxidative stress in NASH and fatty liver model. *Hepatol Res* 2005; 33: 128-131.
353. Takahashi N, Qi Y, Patel HR, Ahima RS. A novel aminosterol reverses diabetes and fatty liver disease in obese mice. *J Hepatol* 2004; 41: 391-398.
354. Stefano JT, de Oliveira CP, Corrêa –Giannella ML, de Lima VM, de Sá SV, de Oliveira EP, de Mello ES, Giannella-Neto D, Alves VA, Carrillo FJ. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in ob/ob mice treated with yo jyo hen shi ko (YHK): effects on peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3448-3454.
355. De Lima VM, de Oliveira CP, Sawada LY, Barbeiro HV, de Mello ES, Soriano FG, Alves VA, Caldwell SH, Carrilho FJ. Yo iyo hen shi ko, a novel chinese herbal, prevents nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice fed a high fat or methionine-choline-deficient diet. *Liver Int* 2007; 27: 227-234.
356. Davis LM, Pei Z, Trush MA, Cheskin LJ, Contoreggi C, McCullough K, Watkins PA, Moran TH. Bromocriptine reduces steatosis in obese rodent models. *J Hepatol* 2006; 45: 439-444.
357. Takeuchi H, Nakamoto T, Mori Y, Kawakami M, Mabuchi H, Ohishi Y, Ichikawa N, Koike A, Masuda K. Comparative effects of dietary fat types on hepatic enzyme activities related to the synthesis and oxidation of fatty acid and to lipogenesis in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 1748-1754.
358. Guo W, Xie W, Lei TG, Hamilton JA. Eicosapentaenoic acid, but not oleic acid, stimulates  $\beta$ -oxidation in adipocytes. *Lipids* 2005; 40: 815-821.
359. Phillipson BE, Rothrock DW, Connor WE, Harris WS, Illingsworth RD: Reduction of plasma lipids, lipoproteins and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* 1985; 312: 1210-1216.

360. Wong S, Nestel PJ. Eicosapentaenoic acid inhibits the secretion of triacylglycerol and of apolipoprotein B and the binding of LDL in HepG2 cells. *Atherosclerosis* 1987; 64: 139-146.
361. Clarke SD, Jump DB. Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J Nutr* 1996; 126: 1105S-1109S.
362. Aarsland A, Lundquist M, Borretsen B, Berge RK. On the effect of peroxisomal  $\beta$ -oxidation and carnitine palmitoyl-transferase activity by eicosapentaenoic acid in liver and heart from rats. *Lipids* 1990; 25: 546-548.
363. Berge RK, Madsen L, Vaagenes H, Tronstad KJ, Gottlicher M, Rustan AC. In contrast with docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid and hypolipidaemic derivatives decrease hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreased diacylglycerol acyltransferase activity and stimulation of fatty acid oxidation. *Biochem J* 1999; 343: 191-197.
364. Sessler AM, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Nutr* 1998; 128: 923-926.
365. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kud M, Matsuzka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga Ji J, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 2002; 277:1705-1711.
366. Clarke SD, Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* 1994; 14: 83-98.
367. Xu J, Teran García M, Park JH, Nakamura MT, Clarke SD. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 2001; 276: 9800-9807.
368. Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 155-164.
369. Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kakoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 779-791.
370. Ren B, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, Jump DB. Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthetase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *J Biol Chem* 1997; 272: 26827-26832.

371. Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purrello F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liv Dis* 2008; 40: 194-199.
372. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; 83 (Suppl): 1505S-1519S.
373. Lee S, Gura KM, Puder M. Omega-3 fatty acids and liver disease. *Hepatology* 2007; 45: 841-845.
374. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 423-427.
375. Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signalling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E664-E671.
376. Cabré E, Pariago JL, Abad Lacruz. Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver cirrhosis. Its relation to associated protein-energy malnutrition (preliminary report). *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 712-717.
377. González J, Pariago JL, Gil A. Malnutrition-related polyunsaturated fatty acid changes in plasma lipid fractions of cirrhotic patients. *Metabolism* 1992; 41:954-960.
378. Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med* 1993; 328:238-244.
379. Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, Fougelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 2005; 115: 2843-2854.
380. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem* 1999; 274: 23577-23583.
381. Storlien LH, Kraegen WE, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 1987; 237: 885-888.
382. Levy JR, Clore JN, Stevens W. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fisher 344 rats. *Hepatology* 2004; 39: 608-616.

383. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh Attar MJ, Hensler M, Rizickova J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 2006; 49: 394-397.
384. Capanni M, Calella F, Centenaro G, Biagini M, Svegliati-Baroni G, Milani S, Raimondi L, Mugelli A, Surrenti C, Casini A. Prolonged n-3 PUFA dietary supplementation improves fatty liver in patients with NAFLD. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1143-1151.
385. Larter CZ, Yeh MM, Cheng J, Williams J, Brown S, de la Pena A, Bell Anderson KS, Farrell GC. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by dietary fish oil attenuates steatosis, but does not prevent experimental steatohepatitis because of hepatic lipoperoxide accumulation. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 267-275.
386. González Périz A, Planagumà A, Gronert K, Miquel R, López Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferré N, Deulofeu R, Arroyo V, Rodés J, Clària J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J* 2006; 20: 2537-2539.
387. St-Onge MP, Jones PJH. Physiological effects of medium-chain triglycerides: Potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr* 2002; 132:329-332.
388. Cabré E, Hernández Pérez JM, Fluvà L, Pastor C, Corominas A, Gassull MA. Absorption and transport of dietary long-chain fatty acids in cirrhosis: A stable isotope tracing study. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:692-701.
389. Lieber CS, Cao Q, de Carli LM, Leo MA, Mak KM, Ponomarenko A, Ren C, Wang X. Role of medium-chain triglycerides in the alcohol-mediated cytochrome P450 2E1 induction of mitochondria. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: 1660-1668.
390. Carpentier YA, Hacquebard M. Intravenous lipid emulsions to deliver omega 3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75: 145-148.
391. Treskova E, Carpentier YA, Ramakrishnan R, Al-Haideri M, Seo T, Deckelbaum RJ. Blood clearance and tissue uptake of intravenous lipid emulsions containing long-chain and medium-chain triglycerides and fish oil in a mouse model. *J Parenteral Enteral Nutr* 1999; 23: 253-257 y discusión: 258-259.
392. Beermann C, Jelinek J, Reinecker T, Hauenschild A, Boehm G, Klör HU. Short-term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. *Lipid Health Dis* 2003; 2:10.

393. Nanji AA, Jokelainen K, Tipoel GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 299; 638-644.
394. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 81-128.
395. De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F, Van Thiel DH, Floyd RA. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radical Biol Med* 1996; 21: 291-295.
396. Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* 1999; 9: 147-163.
397. Vento R, D'Alessandro N, Giuliano M, Lauricella M, Carabillò M, Tesoriere G. Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: involvement of oxidative stress. *Exp Eye Res* 2000; 70: 503-517.
398. Valerio LG, Petersen DR. Formation of liver microsomal MDA-protein adducts in mice with chronic dietary iron overload. *Toxicol Lett* 1998; 98: 31-39.
399. Beppu M, Fukata Y, Kikugawa K. Interaction of malondialdehyde-modified bovine serum albumin and mouse peritoneal-macrophages. *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 4519-4526.
400. Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC no. 150*: 17-27.
401. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424: 83-95.
402. Botsoglou NA. Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 1994; 42:1931-1937.
403. Gonzalo R, Vives-Bauza C, Andreu AL, García Arumí E. Preventing in vitro lipoperoxidation in the malondialdehyde-thiobarbituric assay. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 903-906.
404. Bryan DL, Forsyth KD, Hart PH, Gibson RA. Polyunsaturated fatty acids regulate cytokine and prostaglandin E2 production by respiratory cells in response to mast cell mediators. *Lipids* 2006; 41: 1101-1107.
405. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108: 15-23.
406. Berlin E, Hannah JS, Yamane K, Peters RC, Howard BV. Fatty acid modification of membrane fluidity in Chinese hamster ovary (TR715-19) cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28: 1131-1139.

407. Valle Jiménez M, Martos Estepa R, Morales Camacho R. Obesidad infantil: ¿una situación de riesgo? *Rev Esp Obes* 2005; 3: 340-351.
408. Yokota T, Meka CS, Kouro T, Medina KL, Igarashi H, Takahashi M, Oritani K, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y, Kincade PW. Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J Immunol* 2003; 171: 5091-5099.
409. Ji H, Outterbridge LV, Friedman MI. Phenotype-based treatment of dietary obesity: differential effects of fenofibrate in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Metabolism* 2005; 54: 421-429.
410. Guerre-Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 2000; 275: 16638-16642.
411. Henninger C, Clouet P, Cao Danh H, Pascal M, Bezard J. Effects of fenofibrate treatment on fatty acid oxidation in liver mitochondria of obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 3231-3236.
412. Enríquez A, Leclercq I, Farrell GC, Robertson G. Altered expression of hepatic CPY2E1 and CYP4A in obese, diabetic ob/ob mice, and *fa/fa* Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 300-306.
413. Pacifici EH, McLeod LL, Peterson H, Sevanian A. Linoleic acid hydroperoxide-induced peroxidation of endothelial cell phospholipids and cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1994; 17:285-295.
414. Pegorier JP, Le May C, Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr* 2004; 134: S2444-2449.
415. Schuler AM Wood PA: Mouse models for disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *ILAR J* 2002; 43: 57-65.
416. Sampath HM, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem* 2007; 282: 2483-2493.
417. Nanji AA. Another animal model for non-alcoholic steatohepatitis: how close to the human condition? *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 350-351.
418. Cortez Pinto H, Jesús L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr* 2006; 25: 816-823.
419. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 (Suppl 3): 14-19.

420. Lin Q, Ruuska SE, Shaw NS, Dong D, Noy N. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry* 1999; 38: 185-190.
421. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliasotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E275-E281.
422. Botham KM, Zheng X, Napolitano M, Avella M, Cavalli C, Rivabene R, Bravo E. The effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids delivered in chylomicron remnants on the transcription of genes regulation synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by the liver: modulation by cellular oxidative state. *Exp Biol med* 2003; 228:143-151.
423. Sethi S, Ziouzenkova O, Ni H, Wagner DD, Plutzky J, Mayadas TN. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leucocyte-endothelial interactions through activation of PPAR-alpha. *Blood* 2002; 100: 1340-1346.
424. Polavarapu RD, Spitz R, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, Nanji AA. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 1998; 27:1317-1323.
425. Eritsland J. Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 197S-201S.
426. Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of I $\kappa$ B $\alpha$  expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 2000; 275: 36703-36707.
427. Tapiero H, Ba GN, Couvreur P, Tew KD. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 215-222.
428. Broughton KS, Wade JW. Total fat and (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice. *J Nutr* 2002; 132: 88-94.
429. Miret S, Saiz MP, Mitjavila MT. Effects of fish oil- and olive oil-rich diets on iron metabolism and oxidative stress in the rat. *Br J Nutr* 2003; 89: 11-18.
430. Marchesini G, Forlani G. From liver disease to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology* 2002; 35: 497-499.
431. Surwit R, Feinglos M, Rodin J, Sutherland A, Petro A, Opara E, Kuhn C, Rebutte Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 1995; 44: 645-651.

432. Tiikkainen M, Bergholm R, Vehkavaara S, Rissanen A, Hakkinen AM, Tamminen M, Teramo K, Yki-Jarvinen H. Effects of identical weight loss on body composition and features of insulin resistance in obese women with high and low liver fat content. *Diabetes* 2003; 52: 701-707.

433. Musso G, Gambino R, de Michieli F, Cassader M, Rizzeto M, Durazzo M, Faga E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37: 909-916.

434. Lawrence JW, Li Y, Chen S, de Luca JG, Berger JP, Umbenhauer DR, Moller DE, Zhou G. Differential gene regulation in human versus rodent hepatocytes by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. PPAR alpha fails to induce peroxisome proliferation-associated genes in human cells independently of the level of receptor expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 31521-31527.