



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**Facultad de Veterinaria**

**Dpto. de Ciencias Biomédicas**

**Efecto de un tratamiento experimental  
con el flavonoide quercetina sobre el  
desarrollo de esteatosis, esteatohepatitis,  
y hepatocarcinoma en modelos *in vivo* e *in  
vitro* de NAFLD.**

---

**Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por:**

**Ángel Martínez Ferreras**

**León, 2018**





## INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Dra. Dña. María Victoria García Mediavilla y la Dra. Dña. Sonia Sánchez Campos, como directoras de la Tesis Doctoral titulada “Efecto de un tratamiento experimental con el flavonoide quercetina sobre el desarrollo de esteatosis, esteatohepatitis, y hepatocarcinoma en modelos *in vivo* e *in vitro* de NAFLD” realizada por Don Ángel Martínez Ferreras, en el programa de doctorado Biomedicina, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, en León a \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 2018.

Las directoras de la Tesis Doctoral,

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Victoria García Mediavilla

Fdo.: Dra. Sonia Sánchez Campos





## ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado Biomedicina en su reunión celebrada el día \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Efecto de un tratamiento experimental con el flavonoide quercetina sobre el desarrollo de esteatosis, esteatohepatitis, y hepatocarcinoma en modelos *in vivo* e *in vitro* de NAFLD”, dirigida por las Dras. Dña. María Victoria García Mediavilla y Dña. Sonia Sánchez Campos, elaborada por Don Ángel Martínez Ferreras y cuyo título en inglés es el siguiente: “Effect of an experimental treatment with flavonoid quercetin on the development of steatosis, steatohepatitis, and hepatocarcinoma in *in vivo* and *in vitro* models of NAFLD”.

Lo que firmo, en León a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

La Secretaria,

Fdo.: Dra. María José Cuevas

Vº Bº

La Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Jesús Tuñón González



*Parte de los resultados expuestos en la presente memoria, así como otros originados durante el periodo de realización de la Tesis Doctoral, han sido objeto de la siguiente publicación:*

- 1) Pisonero-Vaquero S., Martínez-Ferreras A., García-Mediavilla M.V., Martínez-Flórez S., Fernández A., Benet M., Olcoz J.L., Jover R., González-Gallego J. and Sánchez-Campos S. **Quercetin ameliorates dysregulation of lipid metabolism genes via the PI3K/AKT pathway in a diet-induced mouse model of non-alcoholic fatty liver disease.** *Mol Nutr Food Res.* 2015. 59(5):879-893. doi: 10.1002/mnfr.201400913.

*Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos:*

- 1) XXXIX Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 19-21 febrero. Madrid, 2014. Oral. S. Pisonero-Vaquero, S. Martínez-Flórez, M. Benet, J.L. Olcoz, R. Jover, J. González-Gallego y S. Sánchez-Campos. Efecto del tratamiento con quercetina sobre el metabolismo lipídico y la inflamación en modelos nutricionales *in vivo* e *in vitro* de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD).
- 2) XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 24-26 septiembre. Granada, 2014. Póster. S. Pisonero-Vaquero, M.V. García-Mediavilla, A. Martínez-Ferreras, S. Martínez-Flórez, M. Benet, J.L. Olcoz, J. González-Gallego y S. Sánchez-Campos. Efecto de la quercetina sobre el metabolismo lipídico en modelos nutricionales de enfermedad de hígado graso no alcohólico.
- 3) XX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas (SEIQ). 23-24 octubre. Albacete, 2014. Póster. S. Pisonero-Vaquero, M.V. García-Mediavilla, A. Martínez-Ferreras, M. Esteban-Blanco, J.M. Culebras, A. García-Palomo, J.L. Olcoz, J. González-Gallego y S. Sánchez-Campos. Effect of treatment on lipid metabolism deregulation associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).
- 4) VIII Jornada Científica CIBERehd. 27-28 octubre. Barcelona, 2014. Póster. S. Pisonero-Vaquero, A. Martínez-Ferreras, MV García-Mediavilla, S. Martínez-Flórez, A. Fernández, M. Benet, JL Olcoz, R. Jover, J. González-Gallego and S. Sánchez-Campos. Quercetin ameliorates MCD-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice by modulating inflammatory, oxidative/nitrosative stress and lipid metabolism-related gene deregulation via the PI3K/AKT pathway.
- 5) XXXX Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. 24-27 febrero. Madrid, 2015. Póster. S. Pisonero-Vaquero, A. Martínez-Ferreras, MV García-Mediavilla, S. Martínez-Flórez, A. Fernández, M. Benet, JL Olcoz, R. Jover, J. González-Gallego y S. Sánchez-Campos. Efecto beneficioso de la quercetina en la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) en ratones mediante la regulación del metabolismo lipídico dependiente de la vía PI3K/AKT.
- 6) 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 22-26 abril. Viena, (Austria), 2015. Póster. S. Pisonero-Vaquero, A. Martínez-Ferreras, MV García-Mediavilla, S. Martínez-Flórez, A. Fernández, M. Benet, JL Olcoz, R. Jover, J. González-Gallego and S. Sánchez-Campos. Quercetin ameliorates MCD-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice by modulating inflammatory, oxidative/nitrosative stress and lipid metabolism-related gene deregulation via the PI3K/AKT pathway.
- 7) XLI Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. 17-19 febrero. Madrid, 2016. Póster. A. Martínez-Ferreras, MV García-Mediavilla, S. Martínez-Flórez, A. Gómez-Moreno, S. Pisonero-Vaquero, A. García-Palomo, JL Mauriz, González-Gallego y S. Sánchez-Campos. Papel de las vías de señalización NFKappaB y PI3K/AKT/PTEN en

el desarrollo de esteatosis, esteatohepatitis y hepatocarcinoma en un modelo nutricional *in vivo* de NAFLD. Efecto modulador del flavonoide quercetina.

*La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la financiación de los siguientes Proyectos de Investigación:*

“Efecto de flavonoides sobre el desarrollo de esteatosis, esteatohepatitis y hepatocarcinoma en modelos *in vivo* e *in vitro* de NAFLD”. Junta Castilla y León. Consejería de Educación 2014-2016 (LE135U13).

“Estudio del efecto del tratamiento con quercetina y del trasplante de microbiota intestinal en modelos experimentales de hígado graso no alcohólico” Ministerio de Economía y Competitividad 2014-2016 (BFU2013-48141-R).





Te juzgarás a ti mismo...es lo más difícil.  
Es mucho más difícil juzgarse a sí mismo que a los demás.  
Si logras juzgarte bien a ti mismo, eres un verdadero sabio.

“El Principito”, Antoine de Saint-Exupéry



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Universidad de León, al centro de investigación IBIOMED y a su director Javier González Gallego el haberme permitido realizar mis estudios de doctorado y por seguir fomentando la investigación biomédica con una posición firme y constante.

Gracias a mis directoras de tesis Sonia Sánchez Campos y M<sup>a</sup> Victoria García Mediavilla, agradecimiento que va más allá de lo evidente pero principalmente por acogerme en su grupo y por su disposición continua a pesar de mi naturaleza de hacerlo todo a última hora. Por otra parte, a Sandra Pisonero Vaquero, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por todas las explicaciones, consejos, por sufrir mis despistes y porque siempre supusiste un verdadero modelo a seguir y ahora que finaliza esta etapa sé que me he quedado a años luz de ti, por todo ello, te muestro mi agradecimiento y mi cariño. Gracias a las tres porque esta tesis es más fruto de vuestro trabajo y esfuerzo que mío.

A Sandra, Roberto, David y Marta que por el trabajo diario dentro del mismo sois más que compañeros incluso que amigos. Gracias por acompañarme durante esta etapa de aprendizaje, este trabajo es fruto de vuestro esfuerzo y espero que os esté sirviendo en vuestros actuales proyectos.

A todos aquellos que en algún momento me habéis ayudado en la elaboración de la tesis como Jorge Villaverde e Isabel de Pedro. En especial a María Santos Galdiano que además de su ayuda en la elaboración, con consejos y numerosas lecturas, ha sido un apoyo angular y espero devolverte pronto todos tus esfuerzos.

A todos los amigos de IBIOMED en especial a Bárbara, Rômulo, Yubisay, Ángel, Néstor, Laura, Ana, Raquel y Daniela (solo porque me nombro en su tesis).

Agradecimientos a mis familiares y amigos por recordarme en cada encuentro que tengo una tesis que escribir y que el tiempo no es infinito, formulando la pregunta: ¿Cuándo la presentas? A todos ellos, un sincero agradecimiento por el interés y el apoyo continuo. A mis padres, hermanas y sobrinos por acompañarme y apollarme en una etapa más.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Etiología y epidemiología del hígado graso no alcohólico (NAFLD) .....	2
1.2. Patogénesis de NAFLD.....	4
1.2.1. Metabolismo lipídico .....	5
1.2.1.1. Acúmulo lipídico.....	6
1.2.1.2. Regulación del metabolismo lipídico mediada por receptores nucleares .....	8
1.2.2. Lipotoxicidad y estrés oxidativo .....	13
1.2.2.1. Lipotoxicidad .....	14
1.2.2.2. Estrés oxidativo .....	16
1.2.3. Inflamación .....	17
1.2.3.1. Citocinas .....	18
1.2.3.2. Adipoquinas.....	19
1.3. Vías de señalización celular en NAFLD .....	19
1.3.1. Inflamasoma .....	20
1.3.2. Vía de PI3K/AKT/PTEN .....	22
1.3.2.1. Papel de la vía PI3K/AKT en el metabolismo y resistencia a la insulina.....	23
1.3.2.2. Vía PI3K/AKT/PTEN y la inflamación .....	25
1.3.2.3. Vía PI3K/AKT/PTEN en el desarrollo de fibrosis y cáncer.....	27
1.4. Diagnóstico y tratamiento.....	30
1.5. Modelos experimentales de NAFLD .....	32
1.6. Antioxidantes en el tratamiento de NAFLD .....	35
1.6.1. Flavonoides.....	35
1.6.1.1. Propiedades biológicas y mecanismo de acción .....	37
1.6.1.2. Quercetina como posible tratamiento de NAFLD .....	38
2. OBJETIVOS .....	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	45
3.1. Modelo <i>in vivo</i> de NAFLD .....	46
3.2. Modelo <i>in vitro</i> de NAFLD .....	47
3.3. Determinaciones analíticas .....	47
3.4. Western blot.....	50
3.5. PCR cuantitativa a tiempo real.....	53
3.6. Análisis estadístico .....	57
4. RESULTADOS .....	59

4.1. La quercetina mejora los hallazgos histológicos y bioquímicos en los ratones alimentados con MCD .....	60
4.2. La quercetina disminuye la acumulación de lípidos y la lipoperoxidación asociada a NAFLD en el modelo MCD de hígado graso .....	64
4.3. La quercetina reduce la lipoperoxidación regulando el estrés oxidativo/nitrosativo y los genes inflamatorios en el modelo MCD de hígado graso .....	65
4.4. La quercetina reduce el acúmulo de lípidos a través de la modulación de los genes relacionados con el metabolismo lipídico en el modelo MCD de hígado graso .....	67
4.5. La quercetina modula el estrés oxidativo/nitrosativo, la inflamación y el metabolismo lipídico en el modelo nutricional <i>in vitro</i> de NAFLD.....	69
4.6. La quercetina ejerce su efecto modulador en un mecanismo mediado por la regulación de las vía de señalización PI3K/AKT/PTEN y NF-κB, inhibiendo la activación del inflammasoma y el estrés de retículo endoplásmico.....	74
5. DISCUSIÓN.....	81
6. CONCLUSIONES .....	93
7. BIBLIOGRAFÍA.....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Progresión de la enfermedad de hígado graso no alcohólico.....	3
<b>Figura 2:</b> Teoría del doble impacto.. .....	5
<b>Figura 3:</b> Mecanismos moleculares del procesamiento fisiológico de los ácidos grasos en NAFLD.....	6
<b>Figura 4:</b> Regulación de metabolismo hepatocitario por LXR, ChREBP y SREBP1c.....	9
<b>Figura 5:</b> Regulación de la síntesis de ácidos biliares por SHP.....	11
<b>Figura 6</b> Regulación del metabolismo lipídico del hepatocito mediada por SHP. ....	12
<b>Figura 7</b> Mecanismo de inducción de la lipotoxicidad y el estrés oxidativo en NAFLD.. .....	14
<b>Figura 8</b> Derivados lipotóxicos de los TG. ....	15
<b>Figura 9:</b> Papel de los derivados lipídicos en la IR.....	16
<b>Figura 10:</b> Balance de proinflamatorios y anti inflamatorios en NAFLD.....	18
<b>Figura 11:</b> Mecanismos de translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. ....	21
<b>Figura 12:</b> Mecanismos de activación del inflamasoma. ....	22
<b>Figura 13:</b> Modulación de Foxo en IR por la vía PI3K/AKT .....	23
<b>Figura 14:</b> IR dependiente de la vía de PI3K/AKT.....	24
<b>Figura 15:</b> Modulación de la vía de PI3K/AKT por parte de los ROS. ....	25
<b>Figura 16:</b> Regulación de la vía PI3K/AKT en el desarrollo de NAFLD,mediada por NF- $\kappa$ B, ROS y FFA.....	26
<b>Figura 17:</b> Influencia de la Il-6 y TNF- $\alpha$ en la resistencia a la insulina. ....	27
<b>Figura 18:</b> Inhibición de la vía PI3K/AKT por PTEN.....	28
<b>Figura 19:</b> Modulación de ROS por PTEN.....	29
<b>Figura 20:</b> Activación de NF- $\kappa$ B por los UFAs.....	30
<b>Figura 21:</b> Estructura básica de un flavonoide.....	37
<b>Figura 22:</b> Reacción del anillo B de un flavonoide en la eliminación de ROS. ....	38
<b>Figura 23:</b> Efecto de la dieta MCD y la quercetina sobre la histología hepática.....	61
<b>Figura 24:</b> Efecto de la dieta MCD y la quercetina en la histología hepática.....	61



**Figura 25:** Efecto de la quercetina en la acumulación hepática de lípidos y la lipoperoxidación en los ratones alimentados con dieta MCD. .... 65

**Figura 26:** Efecto de la quercetina sobre la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo/nitrosativo y la inflamación en ratones alimentados con dieta MCD..... 66

**Figura 27:** Efecto de la quercetina sobre los genes relacionados con la captación y transporte de los ácidos grasos en ratones alimentados con dieta MCD..... 68

**Figura 28:** Efecto de la quercetina sobre la expresión génica de los genes implicados en la regulación transcripcional del metabolismo lipídico en ratones alimentados con dieta MCD.... 69

**Figura 29 :** Efecto de la quercetina sobre la captación de ácidos grasos en las células Huh7 tratadas con medio MCD.. .... 71

**Figura 300:** Efecto de la quercetina y/o del inhibidor de PI3K (LY294002) sobre genes relacionados con el metabolismo lipídico en las células tratadas con MCD..... 71

**Figura 31:** Efecto de la quercetina y/o de la inhibición de PI3K mediante el inhibidor LY294002 sobre la expresión de factores de transcripción involucrados en la regulación del metabolismo lipídico en las células tratadas con MCD y MCD Q..... 72

**Figura 32:** Efecto de la quercetina y/o de la inhibición de PI3K mediante el inhibidor LY294002 sobre el estrés oxidativo/nitrosativo en las células tratadas con MCD y MCD Q..... 73

**Figura 33:** Efecto de la quercetina y/o del inhibidor de PI3K (LY294002) sobre la inflamación en las células tratadas con MCD y MCD Q. .... 74

**Figura 34:** Efecto de la quercetina en la activación de la vía PI3K/AKT en nuestro modelo *in vivo* de NAFLD. .... 75

**Figura 35:** Efecto de la quercetina sobre la sobre la vía de señalización PI3K/AKT/PTEN en el modelo *in vivo* de NAFLD inducida por MCD. .... 76

**Figura 36:** Efecto de la quercetina sobre la expresión de genes relacionados con la activación del inflammasoma y el estrés de retículo endoplásmico en el modelo *in vivo* de NAFLD inducida por MCD. .... 77

**Figura 37:** Efecto de la quercetina sobre la activación del factor de transcripción NF-κB en el modelo *in vivo* de NAFLD inducida por MCD. .... 77

**Figura 38:** Efecto de la quercetina en la activación de la vía PI3K/AKT en nuestro modelo *in vitro* de NAFLD..... 78

**TABLAS**

<b>Tabla 1:</b> <i>Primers</i> y sondas utilizadas para RT-qPCR.....	55
<b>Tabla 2:</b> Efecto de la dieta MCD y de la quercetina sobre el peso corporal (PC) y hepático (PH) en los ratones C57BL/6J.....	60
<b>Tabla 3:</b> Efecto de la dieta MCD y de la quercetina sobre los marcadores bioquímicos en los ratones C57BL/6J.....	63

**ABREVIATURAS**

<b>ACC</b>	Acetil-CoA carboxilasa
<b>Akt</b>	Proteína Quinasa B
<b>ALD</b>	Enfermedad Hepática Alcohólica
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferasa
<b>AMPK</b>	Proteína Quinasa Dependiente de AMP Cíclico
<b>Apo</b>	Apolipoproteína
<b>APS</b>	Persulfato Amónico
<b>AST</b>	Aspartato Aminotrasferasa
<b>miR-21</b>	MicroARN-21
<b>BMI</b>	Índice de Masa Corporal
<b>C/EBPs</b>	Proteínas Potenciadoras de la Unión a CCAAT
<b>ChREBP</b>	Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a Carbohidratos
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CPT</b>	Carnitina O-palmitoiltransferasa
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAMPs</b>	Patrones Moleculares Asociados a Daño
<b>DGAT</b>	Diacilglicerol Aciltransferasa
<b>ELOVL</b>	Proteína de Elongación de Ácidos Grasos de Cadena Larga
<b>ERKs</b>	<i>Extracellular Signal–Regulated Kinases</i>
<b>FA</b>	Ácidos Grasos
<b>FABP</b>	Proteína de Unión a Ácidos Grasos
<b>FAS</b>	Sintasa de Ácidos grasos
<b>FAT/CD36</b>	Translocasa de Ácidos Grasos CD36
<b>FATP</b>	Proteína Transportadora de Ácidos Grasos
<b>FFA</b>	Ácidos Grasos Libres
<b>FOX</b>	Factor de Transcripción <i>Forkhead O1</i>
<b>FRX</b>	Receptor X Farnesoide
<b>G6P</b>	Glucosa-6-Fosfato
<b>G6Pase</b>	Glucosa-6-Fosfatasa
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GCK</b>	Glucoquinasa
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4

<b>GPAT</b>	Glicerol-3-Fosfato Aciltransferasa
<b>GSK</b>	Quinasa-3-Glucógeno Sintasa
<b>HBV</b>	Virus de la Hepatitis B
<b>HCC</b>	Carcinoma Hepatocelular
<b>HCV</b>	Virus de la Hepatitis C
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de Alta Densidad
<b>HNE</b>	<i>4-Hydroxynonenal</i>
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	Factor Nuclear 4- $\alpha$ del Hepatocito
<b>IKK</b>	Quinasa del Inhibidor del Factor Nuclear $\kappa$ B
<b>IL-1R</b>	Receptor de Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
<b>IR</b>	Resistencia a la Insulina
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibidor del Factor Nuclear $\kappa$ B
<b>JAK</b>	Quinasa Janus
<b>JNKs</b>	Quinasas c-Jun N-terminal
<b>L-PK</b>	Piruvato Quinasa Hepática
<b>LRH-1</b>	Receptor Homólogo Hepático 1
<b>LXR</b>	Receptor X Hepático
<b>MCAD</b>	Acil-CoA Deshidrogenasa de Cadena Larga
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MEKs</b>	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos fosforilados
<b>MS</b>	Síndrome Metabólico
<b>mTOR</b>	Diana de Rapamicina en Células de Mamífero
<b>MTP</b>	Proteína Microsómica de Transporte de Triglicéridos
<b>MUFA</b>	Ácido Graso Monoinsaturado
<b>NAFLD</b>	Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico
<b>NASH</b>	Esteatohepatitis No Alcohólica
<b>NEMO</b>	Modulador Esencial NF- $\kappa$ B
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor Nuclear $\kappa$ B
<b>NLR</b>	Receptores Tipo NOD
<b>NOXs</b>	NADPH oxidasas
<b>p53</b>	Proteína p53 Supresora de Tumor
<b>PAMPs</b>	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa

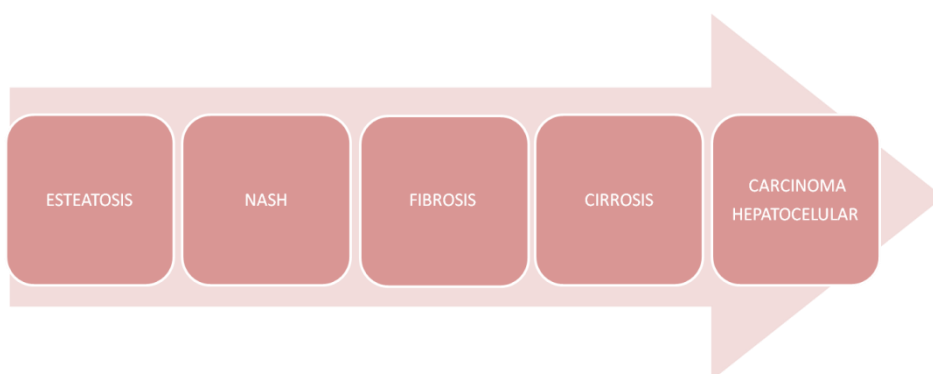
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Cofactor PPAR $\gamma$ Coactivador-1 $\alpha$
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3 Quinasa
<b>PKC</b>	Proteína Quinasa C
<b>PNPLA3</b>	<i>Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i>
<b>PP2A</b>	Proteína Fosfatasa 2A
<b>PPARs</b>	Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas $\alpha$
<b>PTEN</b>	Homólogo de Fosfatasa y Tensina
<b>RE</b>	Estrés de Retículo Endoplásmico
<b>RNS</b>	Especies Reactivas de Nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno
<b>RXR</b>	Receptor X Retinoide
<b>SDC</b>	Estearoil-CoA Desaturasa
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>SFA</b>	Ácidos Grasos Saturados
<b>SHP</b>	<i>Small heterodimer partner</i>
<b>SOCS3</b>	Supresor de Proteínas Señaladoras de Citocinas
<b>SRBP</b>	Proteína de Unión a los Elementos Reguladores de Esteroles
<b>STAT</b>	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción
<b>T2DM</b>	Diabetes mellitus tipo II
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamida
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
<b>TLR</b>	Receptor tipo <i>Toll</i>
<b>TNF-R</b>	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>UFAs</b>	Ácidos Grasos Insaturados
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad

# **INTRODUCCIÓN**

## 1.1. ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (NAFLD)

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) fue descrita por primera vez por Ludwig y colaboradores a comienzos de la década de 1980 en la clínica Mayo de San Francisco. La evolución de NAFLD se caracteriza por presentar un hígado con características histológicas similares a las observadas en la evolución de la enfermedad hepática alcohólica (ALD), pero en pacientes con un consumo diario de alcohol irrelevante (Ludwig y cols., 1980; Caballería y Rodés, 2003). La enfermedad de NAFLD muestra un espectro de alteraciones que comienza con una acumulación de lípidos en el hígado o esteatosis, que producirá una inflamación o esteatohepatitis, la cual formará zonas fibróticas que darán lugar a una cirrosis y que finalmente puede llegar a desarrollar un hepatocarcinoma (HCC). Las principales causas de hígado graso no alcohólico son la obesidad, síndrome metabólico (MS), diabetes mellitus tipo II (T2DM), dislipidemias, enfermedades genéticas, infecciones virales y fármacos (Berlanga y cols., 2014). Además, es muy frecuente la asociación o actuación sinérgica de varios de estos factores (Piñol y cols., 2000).

La NAFLD es una de las enfermedades hepáticas crónicas más frecuentes en los últimos tiempos. Actualmente se estima que en los países desarrollados, un 20%-40% de la población padece esteatosis no alcohólica, de los cuales un 5%-40% desarrollan esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que en el 14%-30% de los casos desemboca en una cirrosis hepática y finalmente de entre este grupo un 1%-27% llegará a desarrollar una cirrosis descompensada o hepatocarcinoma (HCC) (Yu y cols., 2013; Buzzetti y cols., 2016). Tanto es así que es considerada la enfermedad hepática pandémica del siglo XXI (Machado y Cortez-Pinto, 2014) La esteatosis supone el porcentaje mayoritario de los pacientes con NAFLD y esta no produce variaciones en la esperanza de vida de los pacientes, sin embargo a partir de que se diagnóstica NASH la supervivencia se ve alterada. Entorno al 3% de la población general padece NASH (Lima-Cabello y cols., 2011; Chalasani y cols., 2012). En Estados Unidos la prevalencia de NASH entre 1988-1994 era de 5,51%, entre 1999-2004 aumentó hasta alcanzar el 9,84% y entre los años 2005-2008 llegó a 11,01%. No solo se produce un aumento de la prevalencia, sino que también aumenta el porcentaje que suponen los enfermos de NAFLD respecto al global de enfermos crónicos del hígado, suponiendo un 47%, 63% y un 75% respectivamente para cada periodo. Durante dichos periodos aumentaron también las tasas de obesidad (21,74%, 30,02%, y 33,22%), resistencia a la insulina (IR) (23,29%, 32,50%, y 35%) y T2DM (5,55%, 7,88%, y 9,11%) (Younossi y cols., 2011; Lazo y cols., 2013).



**Figura 1:** Progresión de la enfermedad de hígado graso no alcohólico.

La prevalencia de NAFLD es mayor en hombres (34,2%) que en mujeres (21,0%) aunque no todos los estudios coinciden (Arun y cols., 2006; Brea y Puzo, 2013). En cuanto a la edad, la mayoría de pacientes son diagnosticados de NAFLD entre los 40-50 años de edad (Falck-Ytter y cols., 2001) También se encuentran diferencias en la prevalencia por razas, siendo la más alta la de los latinoamericanos con un 45%, seguida de los americanos caucásicos (33%), los asiáticos (25%) y, en último lugar, los afroamericanos, con un 24% (Brea y Puzo, 2013; Lazo y cols., 2013). En España la prevalencia es del 26% de los individuos con edades comprendidas entre 15 y 85 años (Caballería y cols., 2012).

El principal factor de riesgo de NAFLD es la creciente epidemia de obesidad. Se estima que 1,4 billones de personas en el mundo tienen sobrepeso, de los cuales 500 millones son obesos (Finucane y cols., 2011; Milić y cols., 2014; Roman y cols., 2015). La esteatosis está asociada de manera proporcional al índice de masa corporal (BMI) (Mårin y cols., 1992). La prevalencia de NAFLD en obesos está en torno al 57% y supera el 80% en pacientes con obesidad mórbida, frente al 16% de prevalencia en la población con un BMI normal (Gaggini y cols., 2013; Milić y cols., 2014). La obesidad es un factor clave porque ésta a su vez está asociada con otros factores de riesgo como es la IR, la diabetes y las dislipidemias, considerándose al NAFLD como la afectación hepática del síndrome metabólico (Caballería y cols., 2012).

Otro factor de riesgo muy importante es la T2DM, de manera que los pacientes con esta patología presentan una prevalencia que varía del 40% al 70% (Prashanth y cols., 2009; Williamson y cols., 2011; Blachier y cols., 2013; Byrne y Targher, 2015). También se ha comprobado que en NAFLD aumenta el riesgo de desarrollar T2DM (Sung y cols., 2012; Kasturiratne y cols., 2013; Sung y cols., 2013). Por otra parte, la modificación de la microbiota intestinal promueve el desarrollo tanto de NAFLD como de T2DM (Yoshimoto y cols., 2013). Un porcentaje elevado de pacientes con NASH presentan dislipemia, incluyendo hipercolesteronemia, hipertrigliceridemia o ambas alteraciones y están presentes en el 20-80% de los pacientes (Cortez-Pinto y cols., 1999; Assy y cols., 2000).

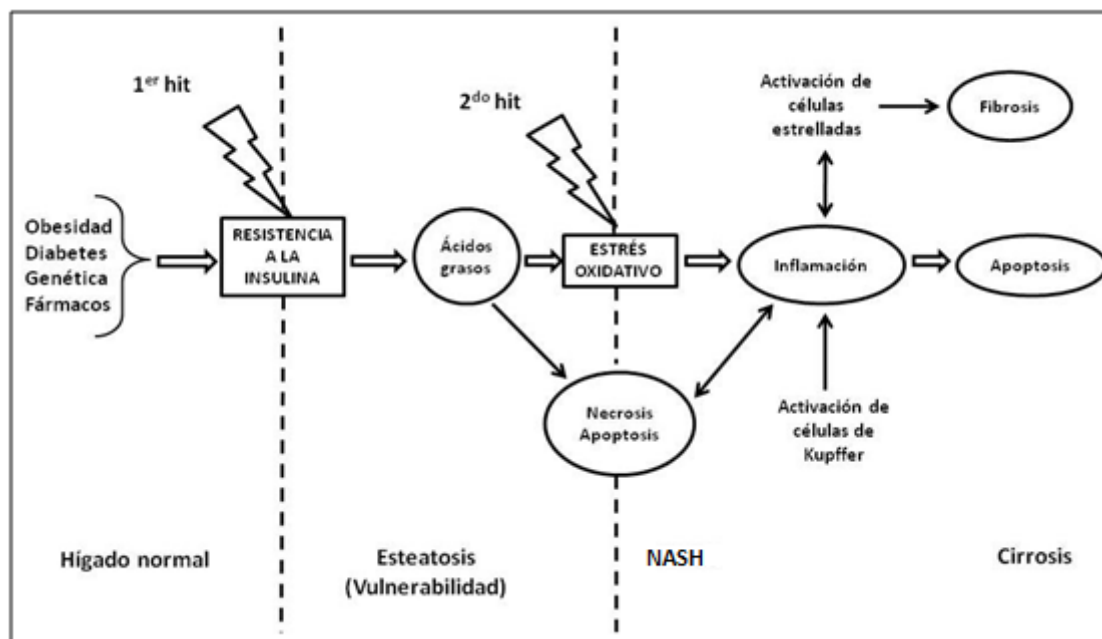


Con menos frecuencia, la aparición de NASH puede deberse a infecciones víricas, sobretodo de virus de la hepatitis B (HBV) y virus de la hepatitis C (HCV) (Younossi y cols., 2011), a causas genéticas como mutaciones en el gen PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*) (Yu y cols., 2013; Byrne y Targher, 2015), o a algunas enfermedades metabólicas hereditarias, como la abetalipoproteinemia, el síndrome de Weber-Christian, la galactosemia y la tirosinemia (Diehl, 1999). Muchos fármacos se han asociado al desarrollo de NASH, como pueden ser la amiodarona, el maleato de perhexilina, el tamoxifeno, los estrógenos, la nifedipina y los corticoides (Satapathy y cols., 2015).

## 1.2. PATOGÉNESIS DE NAFLD

Como se comentó anteriormente, NAFLD presenta un espectro de lesiones que va desde la simple esteatosis a esteatohepatitis, que en caso de que la inflamación perdure dará lugar a una fibrosis y más adelante producirá un estado irreversible de cirrosis hepática la cual puede desembocar en un HCC.

Inicialmente para explicar la evolución de NAFLD, Day y James presentaron la hipótesis del doble impacto o “two-hits” (Figura 2). Según la cual la resistencia a la insulina y el estrés oxidativo eran los desencadenantes que inducían la evolución de NAFLD (Auguet y cols., 2014; Day y James, 1998). La teoría del doble impacto se basaba en que los factores de riesgo de NAFLD producen en el hígado una resistencia a la insulina o primer impacto, debido al cual se acumulan lípidos en el citoplasma de los hepatocitos, dando lugar a la esteatosis hepática cuando más del 5% de los hepatocitos presentan acúmulo lipídico (Kleiner y cols., 2005). Este acúmulo de ácidos grasos (FA) produce un aumento del estrés oxidativo o segundo impacto, por el cual aumentan la inflamación y las citocinas proinflamatorias, produciendo NASH. Finalmente, debido a un estado continuado de inflamación aumenta la apoptosis y la autofagia, produciendo fibrosis seguida de cirrosis y en algunos casos dará lugar a hepatocarcinoma.



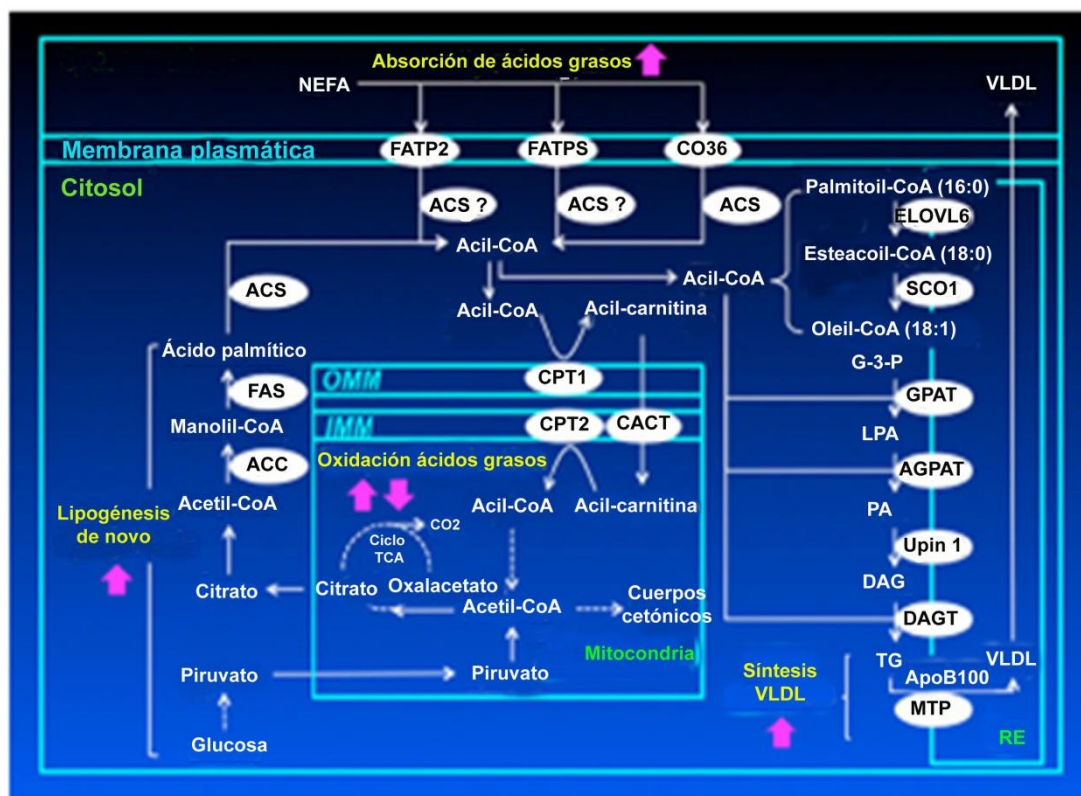
**Figura 2:** Teoría del doble impacto. Imagen modificada de Buqué y cols., (2008).

Posteriormente Tilg y Moschen describieron la teoría del múltiple impacto o “multiple parallel hits”. Ésta consiste en que tanto la resistencia a la insulina como el aumento del estrés oxidativo pueden suceder de manera simultánea (Tilg y Moschen, 2010). Por lo tanto, ambos desencadenantes (la IR y el estado de estrés oxidativo) se estimulan entre sí, de manera que, al aumentar el estrés oxidativo aumenta la expresión de genes (por ejemplo, citocinas) que influyen sobre la IR y esta a su vez, a través de acumulo lipídico, induce el estado de estrés oxidativo. Por otra parte, defiende que junto a la influencia del tejido adiposo, que libera numerosas adipocinas (adiponectina, resistina, etc.) y a través del eje intestino-hígado, que produce metabolitos liberados por la microbiota intestinal (endotoxinas), provocan la activación de los Receptor tipo Toll (TLR) que aumentan el estrés de retículo en el hígado, influyendo de manera paralela a la evolución de NAFLD como otros desencadenantes claves del desarrollo de la enfermedad. Finalmente, considera a los desencadenantes de la cirrosis y el HCC como nuevos “hits” (Buzzetti y cols., 2016).

### **1.2.1. METABOLISMO LIPÍDICO**

El hígado es el centro metabólico de procesamiento de los ácidos grasos del organismo. Se encarga de captarlos de la dieta y junto con los generados como resultado de la síntesis *de novo*, exportarlos al resto del cuerpo para utilizarlos o almacenarlos, así como para obtener energía de ellos. Para ello se dispone de una serie de vías metabólicas que se encuentran modificadas en NAFLD, produciendo el incremento y la acumulación de triglicéridos (TG) y de derivados de TG en el hígado, contribuyendo así al desarrollo de la enfermedad (Kawano y Cohen, 2013) (Figura 3). Se estima que en NAFLD el 15% de los ácidos grasos vienen de la dieta, el 25%

depende de la síntesis *de novo* y el 60 % de los FA proceden de la lipólisis del tejido adiposo (Berlanga y cols., 2015).



**Figura 3:** Mecanismos moleculares del procesamiento fisiológico de los ácidos grasos en NAFLD. Imagen modificada de Kawano y Cohen, 2013.

### 1.2.1.1. Acúmulo lipídico

Todos los factores de riesgo en NAFLD terminan por causar una resistencia a la insulina en hígado, tejido adiposo y tejido muscular que producirá un acúmulo lipídico en los hepatocitos (Gaggini y cols., 2013). Los mecanismos por los cuales se produce el acúmulo lipídico varían según el factor de riesgo desencadenante de NAFLD.

Podemos encontrar una situación de gran aporte lipídico como producto de la obesidad o producido por el síndrome metabólico, aumentando ambos el aporte de FA al hígado acompañado por resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina incrementa la liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo, aumentando la absorción y la acumulación de grasa en el hígado, promoviendo la síntesis *de novo*, disminuyendo la β-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y reduciendo la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL (Gastaldelli y cols., 2007; Koo, 2013). Por otra parte, las dietas ricas en grasa aumentan la cantidad de ácidos grasos que llegan al hígado en forma de quilomicrones (Miles y Nelson, 2007). Todo ello produce un aumento del acúmulo lipídico en el hígado y un aumento de los ácidos grasos libres (FFA).

Otra posible causa es la resistencia a la insulina en T2DM. Se ha comprobado que en células HepG2 expuestas a insulina durante largos periodos, disminuyen la transducción de la señal de la insulina a pesar de que esta señal no puede influir de manera directa en IR al encontrarse reducida (Zeng y cols., 2014). Esta IR promueve también la liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo y la esteatosis hepática.

Finalmente, el acúmulo lipídico también puede darse a través del bloqueo de las vías de liberación de los FA del hígado (VLDL), bien en dislipidemias o en enfermedades genéticas (mutaciones en PNPLA3, abetalipoproteinemia, etc.). Debido a la liberación defectuosa de los FA por parte del hepatocito se crea un acúmulo lipídico que irá seguido de IR que conduce al posible desarrollo de NAFLD (Diehl, 1999; Yu y cols., 2013; Byrne y Targher, 2015).

#### **1.2.1.1.1. Captación y transporte de lípidos**

El aumento de ácidos grasos en el plasma resulta tanto de la lipólisis en el tejido adiposo como de los provenientes de la vía porta hepática de la digestión, siendo introducidos en el hígado por proteínas de membrana transportadoras de FFA. Las principales proteínas encargadas de la captación de FFA en el hígado son la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), caveolinas, la traslocasa de ácidos grasos (FAT)/CD36 y la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) (Kawano y Cohen, 2013; Koo, 2013).

De la familia de las FATPs, las más expresadas en el hígado son la FATP2 y la FATP5 (Kawano y Cohen, 2013). La familia de las caveolinas está formada por tres proteínas, la caveolina 1, 2 y 3, las cuales se encuentran en las caveolas y cuya función es el tráfico de proteínas y la formación de gotas lipídicas. Por otra parte, la inducción de FAT/CD36 está relacionada con el desarrollo de NAFLD, puesto que está poco expresada en el hígado y su expresión solo se ve inducida en condiciones de obesidad (Hajri y cols., 2002; Silverstein y Febbraio, 2009). La FABP1 y FABP5 son las isoformas más expresadas de la familia de las FABPs en el hígado y se encargan del transporte intracelular de FFA (Newberry y cols., 2003).

#### **1.2.1.1.2. Síntesis de novo**

Normalmente la síntesis *de novo* supone un 5% de los ácidos grasos presentes en el hígado. Sin embargo, en el caso de los pacientes con NASH la síntesis *de novo* supone hasta un 26% (Donnelly y cols., 2005). La síntesis *de novo* comprende la glucólisis, la biosíntesis de ácidos grasos saturados, su desaturación y la formación de TG. Las enzimas limitantes en cada proceso son la glucoquinasa y la piruvato quinasa de tipo hepático en la glucólisis, la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) en la síntesis de ácidos grasos, la proteína de elongación de ácidos grasos de cadena larga (ELOVL6) y la estearoil-CoA desaturasa (SCD) en la formación de ácidos

grasos monoinsaturados y finalmente la acil-CoA, glicerol 3 fosfato aciltransferasa (GPAT) y diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) en la formación de TG (Towle y cols., 1997). La proteína FAS es la última en la síntesis y la más limitante. En el caso de que se diera una saturación de la ruta de síntesis de ácidos grasos, la acción enzimática de la ACC aumentaría la cantidad de malonil CoA que es inhibidor de la carnitina O-palmitoiltransferasa 1 (CPT1), influyendo en la oxidación de los ácidos grasos (Savage y cols., 2006).

#### **1.2.1.1.3. Secreción de VLDL**

El hígado secreta TG en forma de lipoproteínas de muy baja densidad. Se ha comprobado que la hipobetalipoproteinemia o la alipoproteinemia causan NAFLD (Tanoli y cols., 2004), así como también lo hacen las mutaciones en la proteína microsómica de transporte de triglicéridos (MTP) (Berriot-Varoqueaux y cols., 2000). En NAFLD se da una sobreproducción de VLDL en comparación con sujetos sanos, donde la IR impide que la acción de la insulina reduzca la síntesis de VLDL, mantiene en el núcleo al factor de transcripción *Forkhead O1* (FOXO1) desfosforilado, aumentando la expresión de la MTP (Kamagate y Dong, 2008). Por otra parte, el aumento de TG tiene un efecto protector impidiendo la degradación de la apolipoproteína B-100 (Apo B-100) (Choi y Ginsberg, 2011). Sin embargo, aunque la liberación de TG está incrementada, su secreción no compensa la excesiva formación. Esto se debe a que la expresión de Apo B-100 no se encuentra incrementada en pacientes con NAFLD, limitando la capacidad del hígado para liberar los TG (Fabbrini y cols., 2008; Choi y Ginsberg, 2011). Finalmente, la exposición prolongada de FFA promueve el estrés de retículo (RE) lo que conlleva a una degradación de la Apo B-100 y a un aumento de la esteatosis (Ota y cols., 2008).

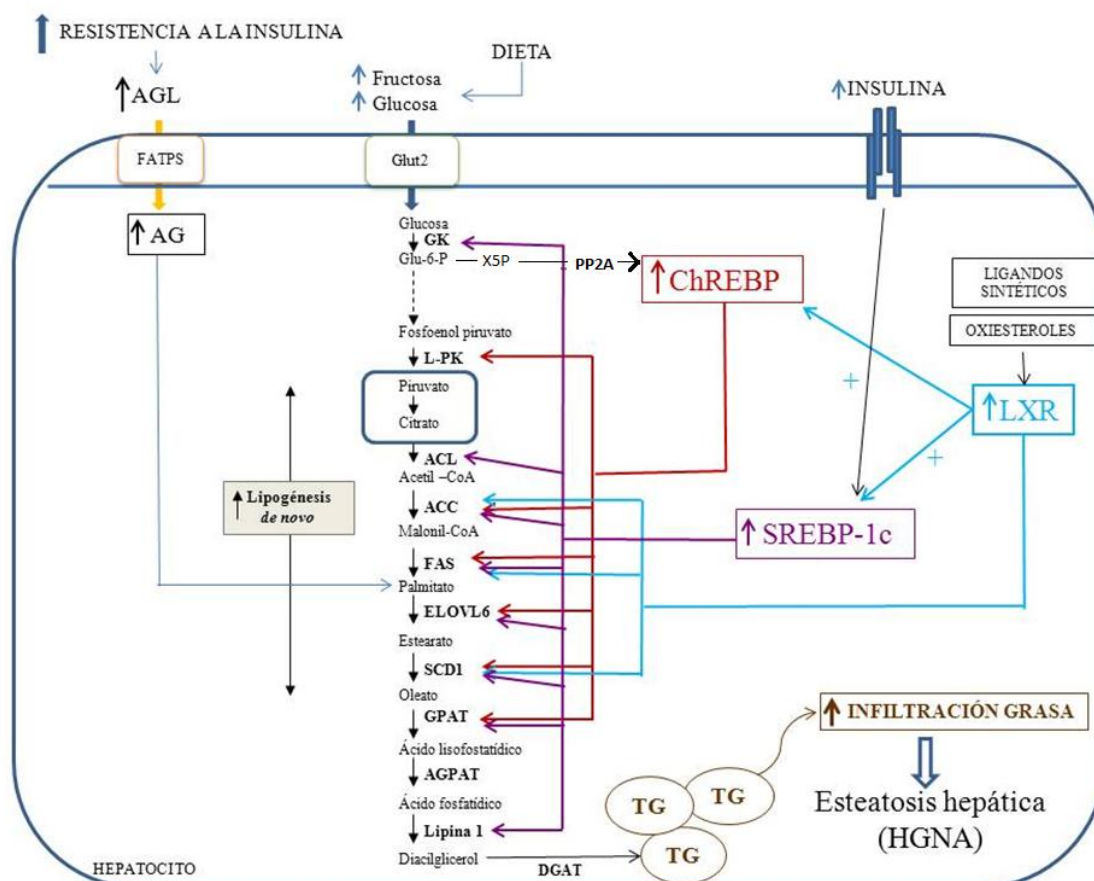
#### **1.2.1.2. Regulación del metabolismo lipídico mediada por receptores nucleares**

Todos los genes involucrados en el metabolismo lipídico están regulados por diferentes receptores nucleares. Éstos actúan uniéndose a los promotores de los genes lipogénicos, modulando su expresión y permitiendo al hepatocito adaptarse a la situación fisiológica en la que se encuentra el hígado. Existen diferentes tipos de receptores nucleares: LXR (receptor X hepático), ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) y SREBP-1c (proteína 1 de unión a los elementos reguladores de esteroides), que regulan la síntesis de TG; la familia de receptores nucleares PPARs (receptor activado por proliferadores de peroxisomas), promueven el consumo y almacenamiento de FA; el co-factor SHP (*small heterodimer partner*), especialmente importante en la regulación de ácidos biliares; las C/EBPs proteínas potenciadoras de la unión a CCAAT (C/EBPs), encargados de regular el metabolismo energético del hepatocito y su adaptación a diferentes ambientes fisiológicos; y la subfamilia de factores de transcripción *Forkhead* (Fox), reguladores de

la respuesta rápida del hepatocito a la glucosa y del metabolismo lipídico (Berlanga y cols., 2014).

### 1.2.1.2.1. LXR, ChREBP y SREBP-1c

El receptor nuclear LXR es considerado el principal regulador de la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado sobre todo la isoforma LXR $\alpha$  que es la más expresada en el hepatocito. Actúa formando heterodímeros con coactivadores y correpresores, como es el receptor X retinoide (RXR) (Viennois y cols., 2012). El LXR está inducido por sí mismo y por oxisteroles, los derivados oxigenados del colesterol, tales como 22 (R)-hidroxicolesterol, 24 (S)-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol, y ácido colestenoico, (Wójcicka y cols., 2007; Bełtowski, 2008). Principalmente, es capaz de inducir al factor de transcripción SREBP-1c, regulador de genes lipogénicos (Cha y Repa, 2007; Shimano, 2001) y al factor de transcripción ChREBP, regulador de los genes glucolíticos (Dentiny cols., 2005; Cha y Repa, 2007) (Figura 4). Por otra parte, también induce la expresión de los genes como FAS, ACC y SCD-1 (Postic y Girard, 2008). LXR $\alpha$  regula una serie de genes inflamatorios como iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) COX-2 (ciclooxigenasa 2) y osteopontina (Joseph y cols., 2003; Ogawa y cols., 2005).



**Figura 4:** Regulación del metabolismo hepático por LXR, ChREBP y SREBP-1c. Imagen modificada de López-Oliva Muñoz y Muñoz Martínez, 2014.

La familia de factores de transcripción SREBPs está formada por tres miembros (SREBP-1a, 1c y 2), de los cuales SREBP-1a y 1c tienen actividad reguladora del metabolismo lipídico y siendo SREBP-1c el más abundante en el hepatocito (López-Oliva Muñoz y Muñoz Martínez, 2014). En ratas, SREBP-1c es inducido por la insulina y por una regulación transcripcional llevada a cabo por la actividad incrementada de LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ , cuya expresión está inducida de manera indirecta por la vía de la insulina (Chen y cols., 2004). El SREBP-1c induce la expresión de genes glucolíticos (GCK) y lipogénicos (ACL, ACC, FAN, GPAT, ELOVL6, SCD-1, GPAT y LPIN1) (Postic y Girard, 2008).

EL ChREBP es inducido por la glucosa, habiéndose descrito asimismo que LXR tiene sitios de unión a su promotor (Cha y Repa, 2007). Por último, esta inducido indirectamente por la SREBP-1c a través del aumento de la expresión de la GCK, que a su vez incrementa la actividad glucosa-6 fosfato (G6P), que es un activador de ChREBP (Dentin y cols., 2005). ChREBP estimula la glucogénesis al inducir a la enzima piruvato quinasa hepática (L-PK), la lipogénesis *de novo* induciendo la expresión de GPAT y actuando sinérgicamente con SREBP-1c induciendo ACC1, FAS, ELOVL6 y SDC-1 (Dentin y cols., 2005; Cha y Repa, 2007). Ambas vías se encuentran inducidas en NAFLD (Liang y cols., 2002; Higuchi y cols., 2008; Lima-Cabello y cols., 2011) (Figura 4).

#### **1.2.1.2.2. PPARs**

Unos de los principales reguladores del metabolismo de los FFAs son los receptores nucleares PPAR que forman heterodímeros con RXR modificando la transcripción de genes lipogénicos. Por una parte, el PPAR $\gamma$  promueve el almacenamiento, mientras que el PPAR $\alpha$  promueve la utilización de los lípidos. Así, el PPAR $\alpha$  promueve la activación de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial (activando CPT-1, CPT-II MCAD), la  $\beta$ -oxidación peroxisomal (aumentando acil-CoA oxidasa o la 3-Cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal) y la  $\omega$ -oxidación mitocondrial (aumentando citocromo P450). Por otra parte, PPAR $\alpha$  influye en aspectos de la regulación del metabolismo lipídico y en la captación y transporte modificando la expresión de proteínas tales como FATP y FABP (Mandard y cols., 2004). Se ha descrito que PPAR $\alpha$  inhibe la inflamación y reduce el riesgo de fibrosis, disminuyendo la activación de células estrelladas (Zeng y cols., 2014).

PPAR $\gamma$  induce la captación y transporte de ácidos grasos (induciendo FAT/CD36, Caveolina1, Apo CIV), la síntesis *de novo* (induciendo FAS, ACC y SDC1) y la síntesis de TG (induciendo MAGT1, DAGT 1 y DAGT2) (Ables, 2012; Al Sharif y cols., 2014), presentando un efecto inhibitorio de las enzimas proinflamatorias e inhibiendo los efectos fibróticos de las células estrelladas (Westerbacka y cols., 2007; Zeng y cols., 2014). Además, en el tejido adiposo aumenta la producción de adiponectina, que a su vez aumenta la IR que produce un aumento de PPAR $\alpha$  y conduce a una activación de la vía proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico (AMPK). AMPK promueve la

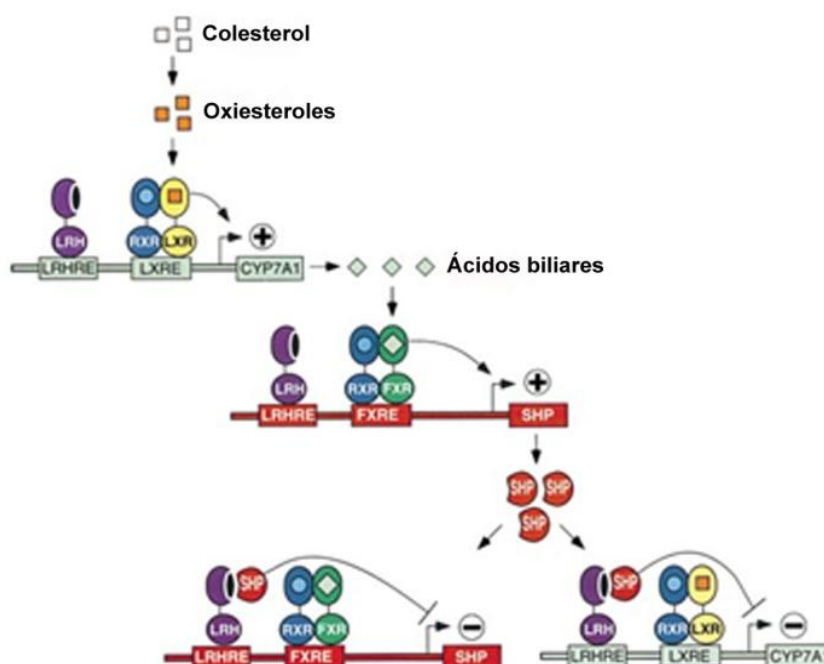
síntesis de FA modulando genes tales como ACC malonil-CoA y CPT-1, lo que puede aumentar tanto la lipotoxicidad como la esteatosis en el enfermo de NAFLD (Anderson y Borlak, 2008; Astapova y Leff, 2012; Sharif y cols., 2014).

### 1.2.1.2.3. SHP

Otro receptor nuclear importante es el *small heterodimer partner* (SHP), que a pesar de no tener ningún dominio de unión al ADN actúa como regulador transcripcional al unirse a una gran variedad de receptores nucleares afectando al metabolismo del colesterol y de los TG, a la homeostasis de la glucosa y a la formación de los ácidos biliares en el hígado (Yuk y cols., 2016).

SHP es inducido por PPAR $\gamma$  (Nishizawa y cols., 2002), LXR $\alpha$ , SREBP-1c, FXR (receptor X farnesoide), LRH-1 (receptor homólogo hepático 1) y HNF4 $\alpha$  (factor nuclear 4- $\alpha$  del hepatocito), entre otros (Goodwin y cols., 2003), y actúa como represor de la transcripción al unirse a receptores nucleares como pueden ser PPARs, LXRs, LRH-1, FXR o el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), entre otros (Zhang y cols., 2011).

La regulación de la síntesis de ácidos biliares por parte de SHP se debe a la capacidad que tiene de regular los genes que codifican para los citocromos CYP7A1, CYP8B1 y CYP7B1, que convierten el colesterol en ácidos biliares. Los promotores de CYP7A1 y CYP8B1 tienen dominios solapados para LRH-1 y HNF4 $\alpha$ . Además, la vía FXR/RXR induce al SHP al unirle FXR los ácidos biliares y este aumento de SHP inactiva a LRH-1 y HNF4 $\alpha$ , produciendo una represión de CYP7A1 y CYP8B1 (Lu y cols., 2000; Matakı y cols., 2007) (Figura 5 ).



**Figura 5:** Regulación de la síntesis de ácidos biliares por SHP. Imagen modificada de Lu y cols., 2000.



Por otra parte, el SHP induce la expresión de PPAR $\gamma$  y SREBP-1c regulando la lipogénesis y aumentando la expresión de genes como ACC, CD36, FAS y SCD1 (Boulias y cols., 2005), jugando un papel importante en el desarrollo de NAFLD ya que la función de SHP está relacionada con obesidad y diabetes en humanos (Nishigori y cols., 2001)

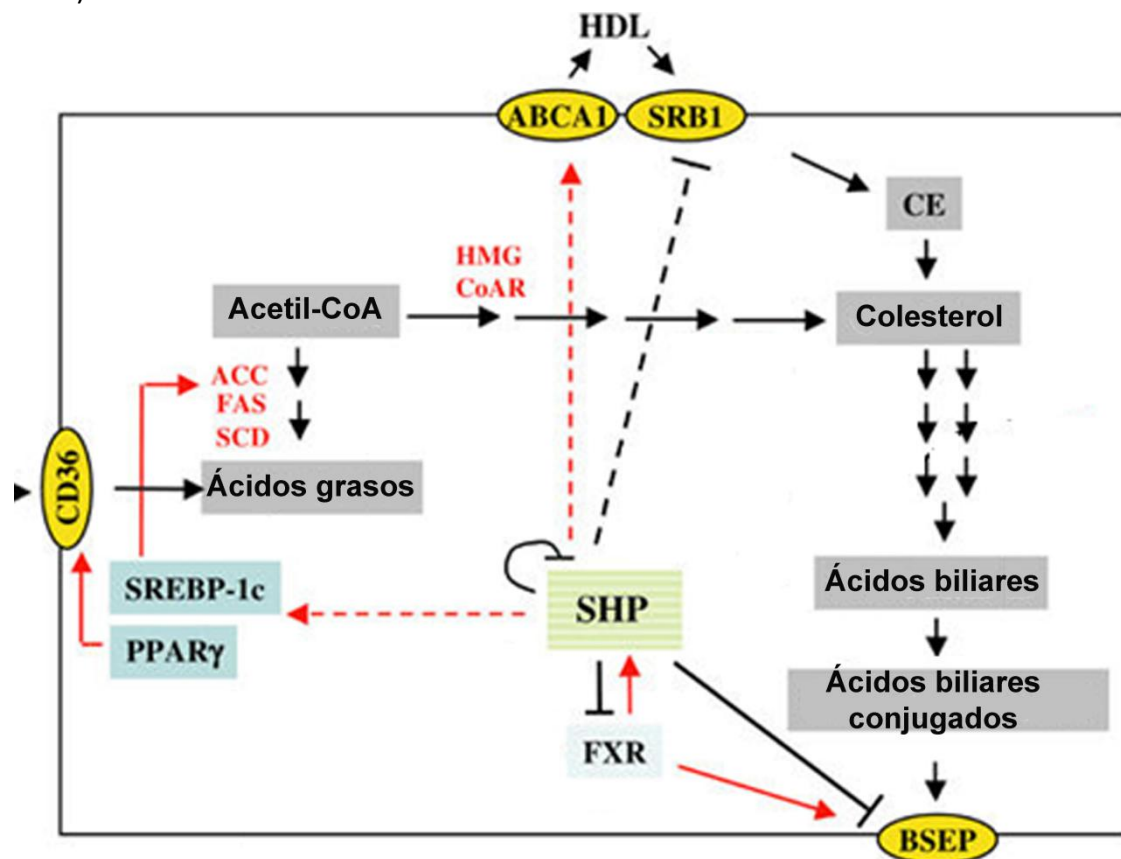
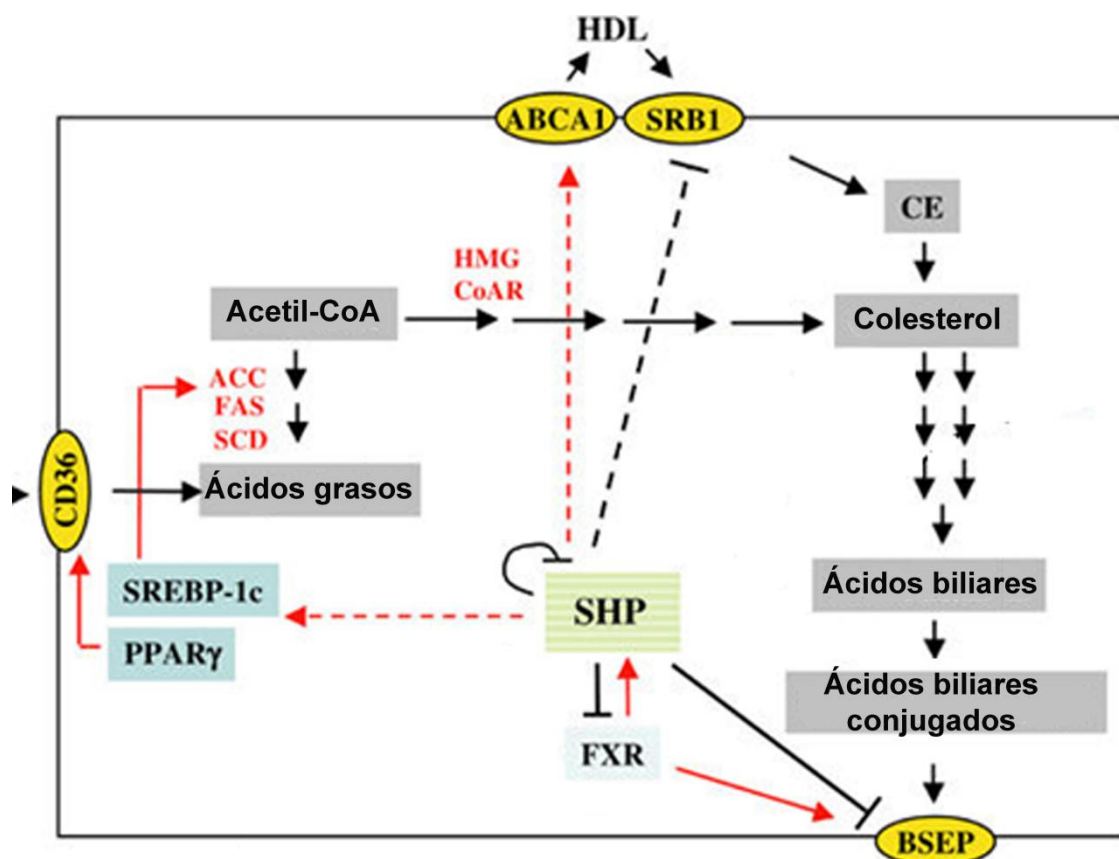


Figura 6).



**Figura 6** Regulación del metabolismo lipídico del hepatocito mediada por SHP. Imagen modificada de Boulias y cols., 2005.

#### 1.2.1.2.4. C/EBPs

Otro grupo de receptores nucleares importante en la regulación del metabolismo energético son C/EBPs, sobre todo C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\beta$ . De manera general, el C/EBP $\alpha$  tiene un papel más importante en el metabolismo energético, mientras que el C/EBP $\beta$  tiene como función la adaptación a cambios nutricionales (Ramji y Foka, 2002). Los ratones deficientes en C/EBP $\alpha$  mueren prematuramente porque presentan una hipoglucemia severa debido a las bajas concentraciones de las enzimas gluconeogénicas glucosa-6 fosfatasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), lo cual va acompañado de una disminución de la acumulación de lípidos (Flodby y cols., 1996). Normalmente C/EBP $\alpha$  induce la expresión de las enzimas gluconeogénicas pero se ha comprobado que la inducción de PEPCK es inhibida por SHP, ya que al formar heterodímeros con C/EBP $\alpha$  ya no es capaz de inducir su expresión (Park y cols., 2007). Por otra parte, se comprobó que C/EBP $\alpha$  es capaz de reprimir la expresión de SHP, uniéndose a su secuencia promotora, modificando de esta manera la regulación de SHP sobre genes como SREBP-1c y PPAR $\gamma$ , modulando así el metabolismo lipídico (Benet y cols., 2015). C/EBP $\alpha$  interviene directamente en el metabolismo lipídico induciendo fuertemente proteínas de transporte como es la FAT/CD36 (Qiao y cols., 2008) o la FABP1, al formar heterodímeros con CDX-1 e interactuar con HNF-1 $\alpha$  en el promotor de FABP1 (Guzmán y cols., 2013)

Los ratones deficientes en C/EBP  $\beta$  muestran dos fenotipos distintos. En el primer caso los ratones mueren por hipoglucemia severa por no poder movilizar el glucógeno hepático y no expresar PEPCCK; el segundo fenotipo llega a adulto mostrando hipoglucemia en ayunas y alteración de la producción hepática de glucosa y, por lo tanto, produciendo una disminución en la circulación y almacenamiento de los FFA (Liu y cols., 1999). En cuanto al metabolismo lipídico también es capaz de aumentar la expresión de FAT/CD36 aunque en menor medida que C/EBP $\alpha$  (Qiao y cols., 2008).

#### **1.2.1.2.5. FOXA**

En la subfamilia de factores de transcripción *Forkhead* destaca Foxa1 y Foxa2, que intervienen en la diferenciación de tejidos durante el desarrollo, siendo posteriormente receptores nucleares hepáticos que regulan el metabolismo energético del hepatocito (Friedman y Kaestner, 2006). Los genes Foxa1 y Foxa2 son fuertes reguladores de la homeostasis de la glucosa en el hepatocito sobre todo en la respuesta rápida, modificando genes como PERK, glucosa-6 fosfatasa (G6P) y tirosina aminotransferasa (Friedman y Kaestner, 2006) de manera que una baja expresión de estos genes da lugar a hipoglucemia.

También se ha demostrado que tienen un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico. En el caso de Foxa2, es capaz de aumentar el acúmulo de TG, activar la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y potenciar el metabolismo de los ácidos grasos (Wolfrum y Stoffel, 2006). La acción de Foxa2 está regulada por la activación de la ruta metabólica del fosfoinositol-3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT) de manera que cuando ésta se activa el Foxa2 es fosforilado y sale del núcleo (Wolfrum y cols., 2003), favoreciendo el acúmulo lipídico. Por otra parte, Foxa1 es un inhibidor de la síntesis y secreción de los TG, inhibe el almacenamiento de FA y estimula la oxidación de FA y a la formación de cuerpos cetónicos. Por lo tanto, favorece la disipación de la energía coordinando varias respuestas transcripcionales que reducen los lípidos intracelulares. Se ha comprobado que es capaz de modificar de manera directa la expresión de FABP1, FAS y SCD-1 (Divine y cols., 2003; Wolfrum y cols., 2004; Moya y cols., 2012).

#### **1.2.2. LIPOTOXICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO**

El aumento del estrés oxidativo y la lipoperoxidación son el segundo factor relevante o segundo impacto en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. Debido al aumento del tráfico de ácidos grasos se produce un acúmulo lipídico en los hepatocitos debido a la síntesis *de novo*, la disminución de la exportación de VLDL, la lipólisis y el aporte de la dieta. El hepatocito procesa fisiológicamente este aumento de FFA formando TG, que posteriormente serán exportados del hepatocito como VLDL, almacenándolos en vesículas lipídicas y aumentando el metabolismo de estos

mediante su oxidación. Durante el procesamiento de FFA, en una situación de aporte y almacenamiento excesivo, según sucede en NAFLD, se produce un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y de intermediarios lipídicos de TG que pueden tener un efecto tóxico en el hepatocito (

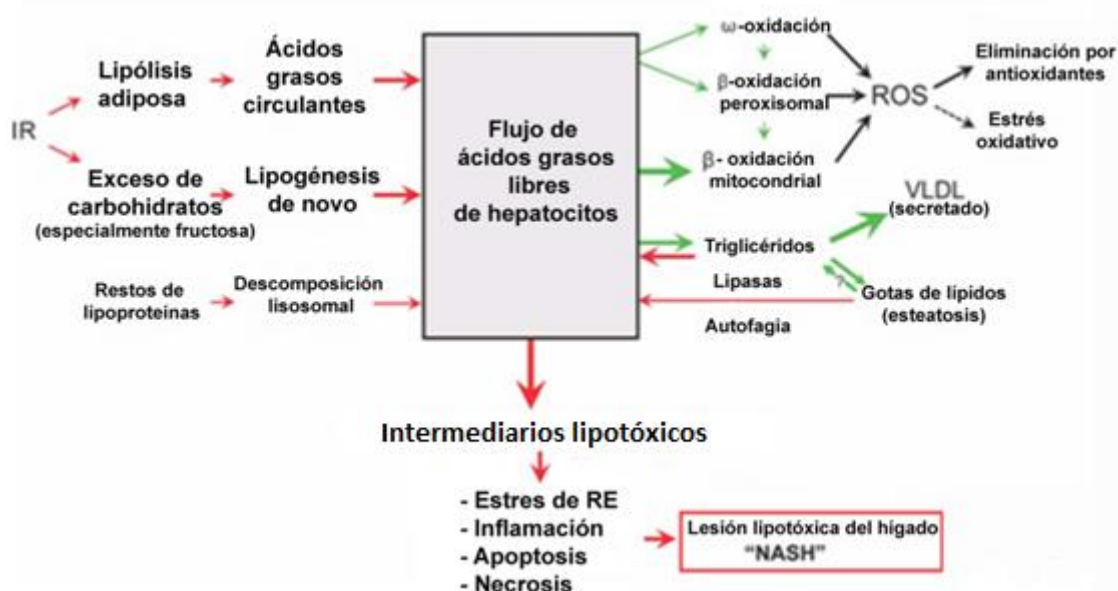
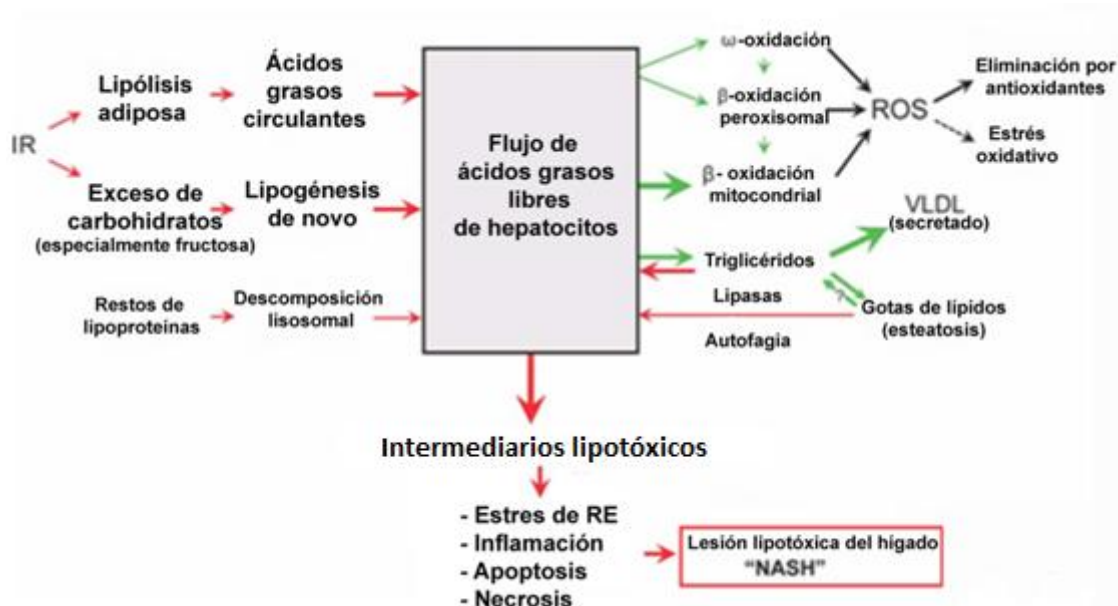


Figura 7).

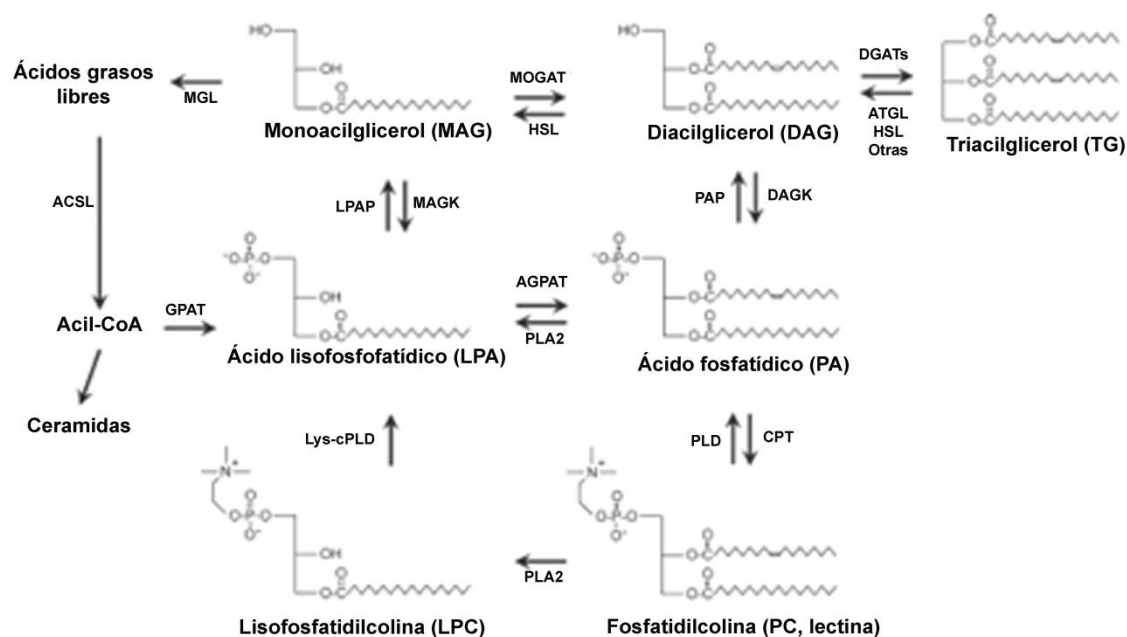


**Figura 7** Mecanismo de inducción de la lipotoxicidad y el estrés oxidativo en NAFLD. Imagen modificada de Neuschwander-Tetri, (2010).

### 1.2.2.1. Lipotoxicidad

Como respuesta al acúmulo lipídico que tiene lugar en NAFLD se producen múltiples intermediarios lipídicos con mayor o menor capacidad lipotóxica, que inducen estrés de retículo endoplásmico, inflamación, apoptosis y necrosis (Neuschwander-Tetri, 2010).

El acúmulo de TG en las vesículas lipídicas no es en realidad la causa del progreso de la esteatosis a NASH, produciendo la resistencia a la insulina, el aumento de estrés oxidativo y la lipotoxicidad, sino que es incluso un mecanismo protector frente a ellos (Choi y Diehl, 2008; Liu y cols., 2016). Se ha comprobado que en ratones que sobreexpresan la diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2), que es la última enzima y la limitante de la vía metabólica de los TG, no muestran un aumento de la IR ni un aumento de la inflamación, lo que sugiere dicho papel protector de lipotoxicidad (Monetti y cols., 2007; Neuschwander-Tetri, 2010). El acúmulo de TG sí que supone un aumento del estrés de retículo ya que se ha visto un aumento de PKCε. Además, mediante las lipasas puede dar lugar a multitud de intermediarios lipídicos lipotóxicos (Berlenga y cols., 2015)(Figura 8).



**Figura 8.** Derivados lipotóxicos de los TG. Imagen modificada de Neuschwander-Tetri, (2010).

Los FFA que hay en el citoplasma de la célula se encuentra unidos a FABPs y su expresión está relacionada con la concentración de FFA. A pesar de ello, se ha visto que en pacientes con NASH la expresión de FABP se encuentra disminuida, no está muy claro si como causa y/o consecuencia del aumento de FFA, de la lipotoxicidad y del aumento del estrés oxidativo (Monetti y cols., 2007). Es difícil saber cuál es el mecanismo por el que los FFA o sus derivados metabólicos son capaces de generar lipotoxicidad. Por una parte, los ácidos grasos insaturados (SFA) parecen ser los principales responsables de la lipotoxicidad, aumentando el estrés de retículo y activando las vías apoptóticas, mediante su unión a TLR-4 (Wei y cols., 2006; Spruss y cols., 2009), activando las vías proinflamatorias de NF-κB (Feldstein y cols., 2004), de una liberación de catepsina B que desestabiliza las membranas y produciendo una disfunción mitocondrial (Zheng y cols., 2008; Alkhoury y cols., 2009). Por otra parte, al actuar como precursores de las ceramidas (como es el caso del ácido palmítico) pueden intervenir en la resistencia a la insulina. Además, los SFA y sobre todo los

ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) son capaces de aumentar la expresión de PPAR $\alpha$  Y PPAR $\gamma$ . La activación de los PPARs por parte de MUFA y una mayor facilidad de estos para formar parte de los TG, puede ser considerada una medida preventiva de la lipotoxicidad (Hihi y cols., 2002; Ricchi y cols., 2009) y además los PPARs inhiben la respuesta proinflamatoria de NF- $\kappa$ B (Hardy y cols., 2003), mientras que a los SFA les cuesta más incorporarse a los TG pudiendo aumentar los intermediarios lipotóxicos de los TG como pueden ser el diacilglicerol (DAG) o las ceramidas (Hardy y cols., 2003; Alkhoury y cols., 2009).

Las concentraciones de ceramidas están elevadas en pacientes con NAFLD y tienen un papel importante en la IR que conduce al desarrollo de NAFLD. Los SFA activan los TLR4 aumentando el inhibidor- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) que promueve la síntesis *de novo* de ceramidas a partir de SFA (Holland y cols., 2011). El aumento de ceramidas incrementa la expresión de proteína quinasa C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) (Hajduch y cols., 2008) y de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Chavez y cols., 2003), produciendo resistencia a la insulina al inhibir la vía de PI3K/AKT a nivel de la fosforilación de proteína quinasa B (Akt). A pesar de ello, la inhibición de la síntesis de ceramidas no disminuye el efecto lipotóxico de los precursores de SFA. Esto indica que las ceramidas no son necesarias para la inducción de estrés de retículo y la apoptosis inducida por lipotoxicidad, sino que el acúmulo de SFA es suficiente para producirlo (Wei y cols., 2006).

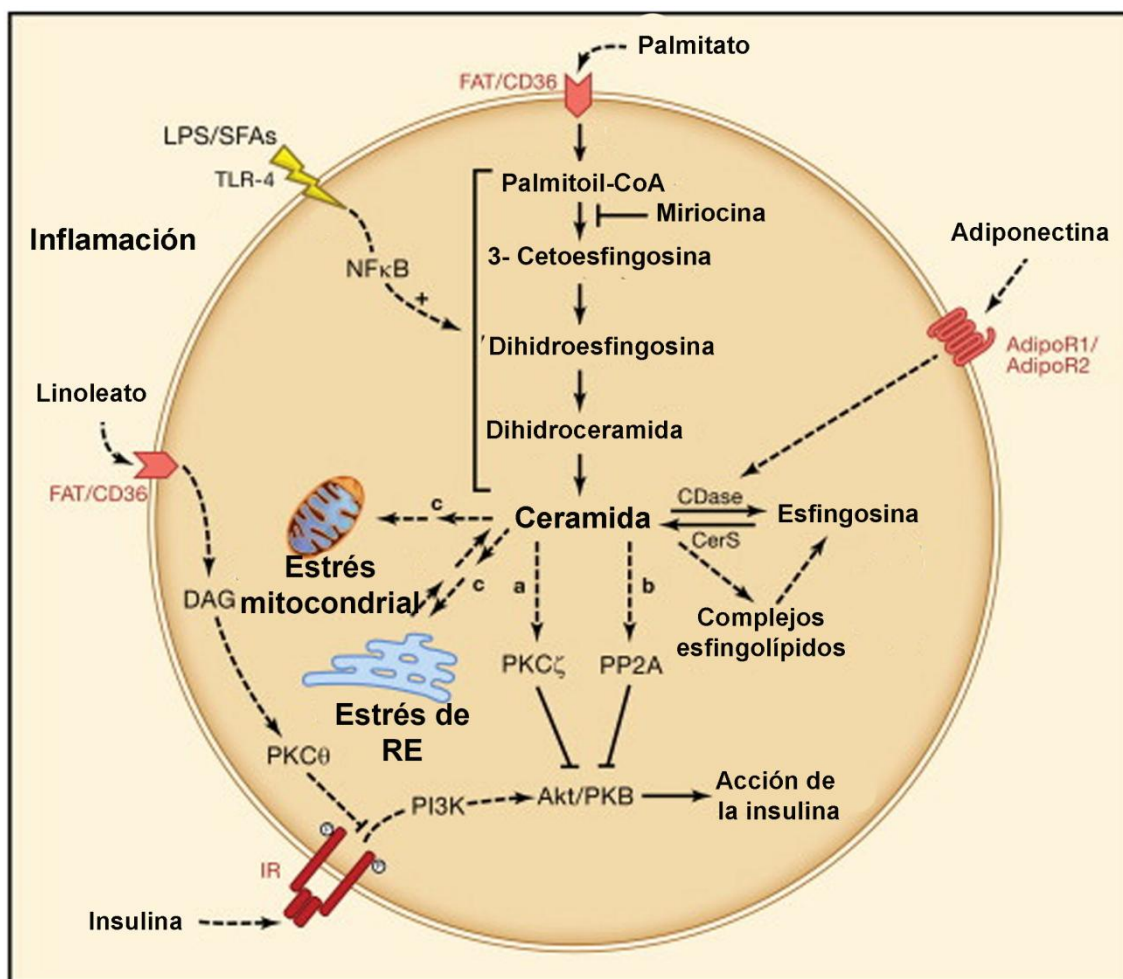


Figura 9: Papel de los derivados lipídicos en la IR. Imagen modificada de Chavez y Summers, (2012)

#### 1.2.2.2. Estrés oxidativo

Debido al acúmulo lipídico en el hígado aumenta la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, aumenta la  $\beta$ -oxidación peroxisomal y la  $\omega$ -oxidación por parte del citocromo P450, inducida principalmente por PPAR $\alpha$ . Esto produce un aumento de la cantidad de ROS (radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, principalmente) que producen en el hepatocito un estado de estrés oxidativo, induciendo el desarrollo de inflamación, muerte celular (al dañar tejidos y ADN) y fibrosis (Mandard y cols., 2004).

El estrés oxidativo se produce porque la cantidad de radicales libres aumenta de tal manera respecto a los sistemas antioxidantes que se produce un desequilibrio, permitiendo a los ROS reducir la concentración de ATP y de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), produciendo daño en el ADN y en las proteínas (Tilg y cols., 2006; Azad y col., 2009; Li y cols., 2011;). El estrés oxidativo aumenta la cantidad de lípidos peroxidados que altera la estructura y función de las membranas lipídicas, produciendo una disfunción mitocondrial acompañada de la disminución de muchas de las proteínas de la mitocondria (catalasa, superóxido dismutasa, aldehído oxidasa

etc.) y produciendo una retroalimentación positiva que aumenta la cantidad de ROS (Sreekumar y cols., 2003). La disfunción mitocondrial produce la activación de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal y a través del citocromo P450 aumenta la  $\omega$ -oxidación. Ambas producen un aumento de especies altamente reactivas como 4-hydroxynonenal (HNE) y malondialdehído (MDA). En cuanto a la modulación del metabolismo por parte de ROS, este es capaz de inducir la vía de PI3K/AKT (Azad y cols.,2009; Jixiang Zhang y cols., 2016). Finalmente, el aumento de ROS aumenta la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$ , factor de crecimiento transformante (TGF) $\beta$  y el ligando Fas conduciendo a la apoptosis celular y fibrosis (García-Ruiz y cols., 1995).

### 1.2.3. INFLAMACIÓN

En el desarrollo de NAFLD las adipocitocinas y las citocinas son las principales reguladoras de los procesos inflamatorios, inmunitarios y metabólicos (interviniendo en la IR). Del balance entre adipocitocinas/citocinas anti/proinflamatorias depende el paso de esteatosis a NASH, pudiendo llegar a producir una cirrosis hepática (Tilg y Hotamisligil, 2006)

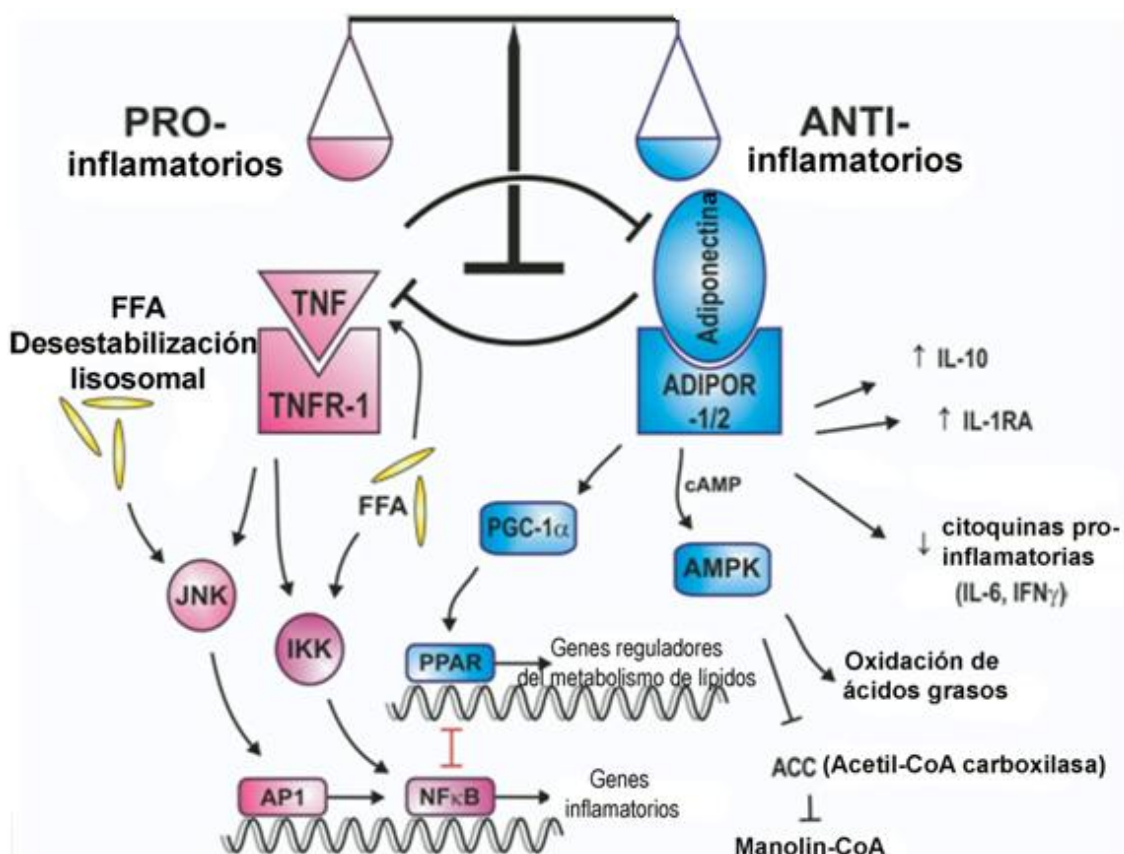
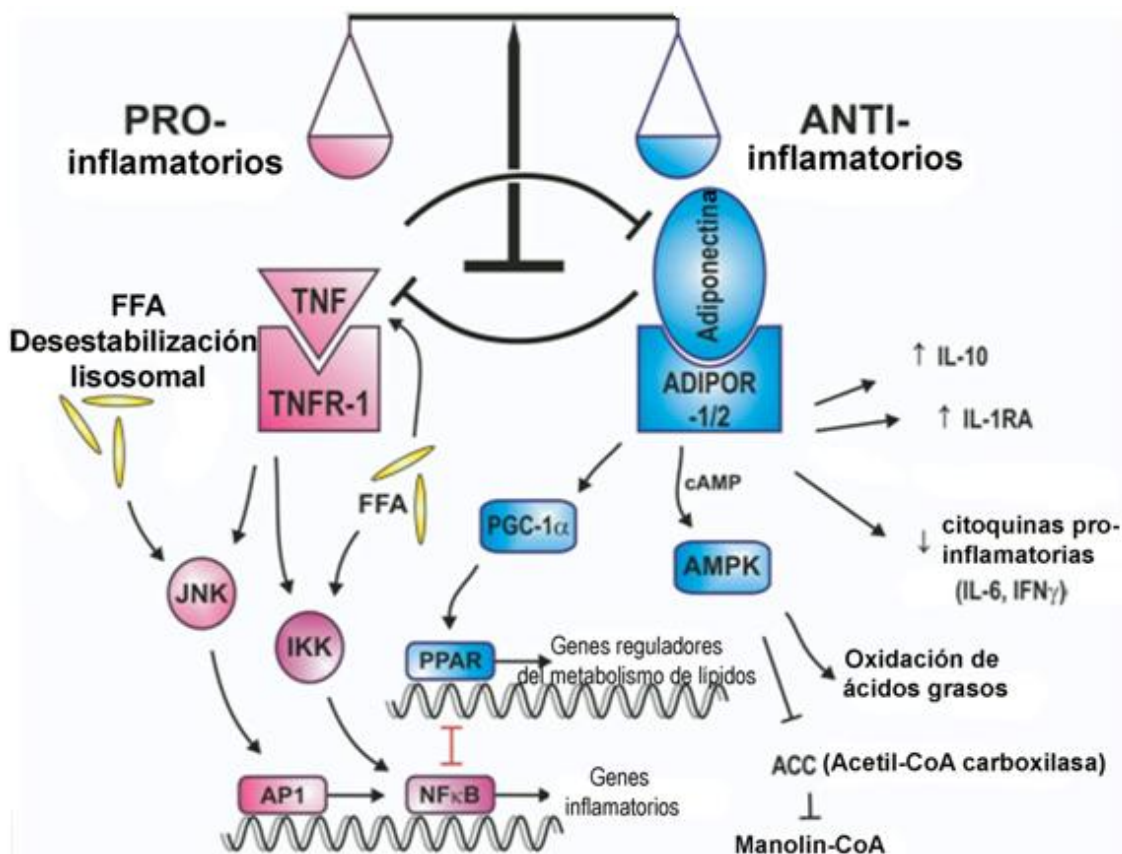


Figura 10).





**Figura 10:** Balance de proinflamatorios y anti inflamatorios en NAFLD. Imagen modificada de Tilg y Hotamisligil, (2006).

### 1.2.3.1. Citocinas

NF- $\kappa$ B induce la expresión de multitud de citocinas inflamatorias entre ellas IL-6, TNF- $\alpha$ , lo cual supone una retroalimentación que conduce a un empeoramiento de la inflamación. Por lo tanto, NF- $\kappa$ B desempeña un papel importante en la inflamación, apoptosis y fibrosis hepática (Duvnjak y cols., 2007). En humanos, las principales citocinas proinflamatorias son el TNF- $\alpha$  y la IL-6, actuando en la respuesta temprana del daño hepático y desencadenando procesos de curación induciendo a otras citocinas, reclutando células inflamatorias o incluso promoviendo la fibrosis hepática (Tilg y Diehl, 2000). Por otra parte, se ha mostrado una correlación positiva entre la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 y el índice de masa corporal y que ambos tienen un papel importante en la IR (Hotamisligil y cols., 1993; Tilg, 2010) (

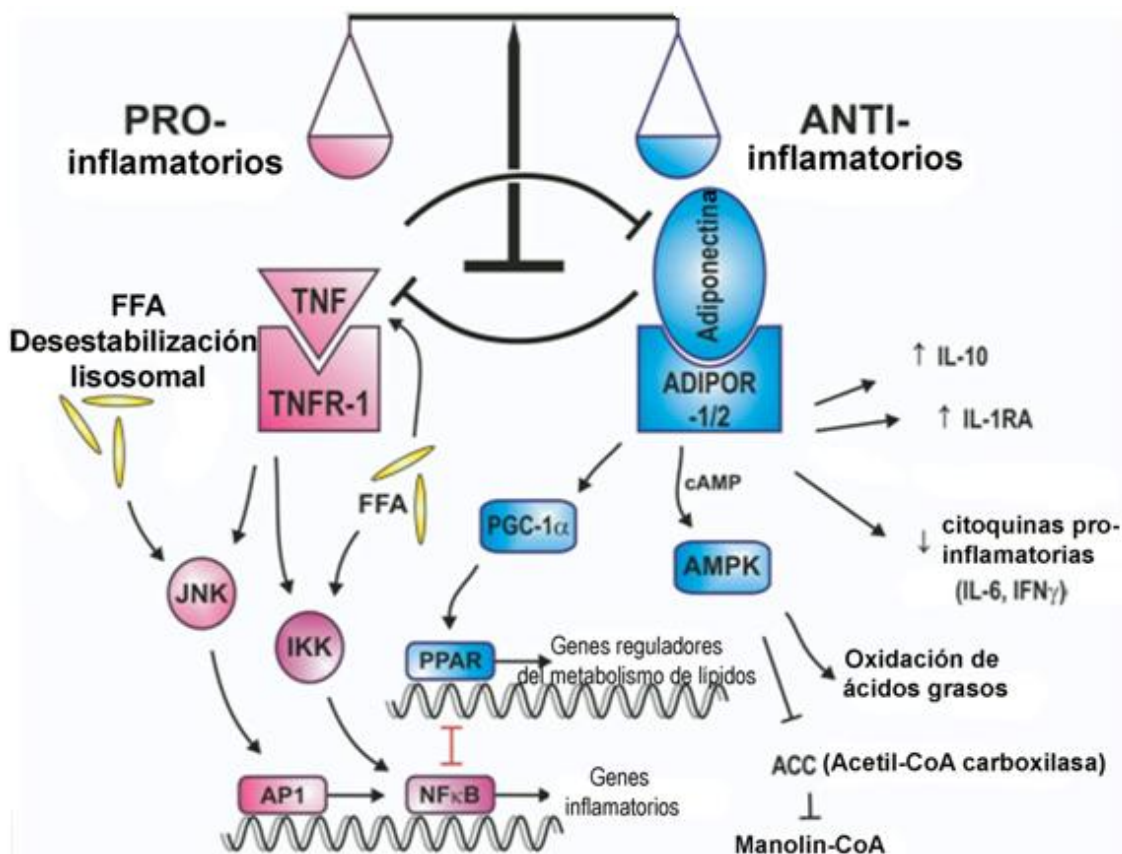


Figura 10).

TNF- $\alpha$  es producido por los hepatocitos y las células de Kupffer, e indirectamente llega al hígado producida por la grasa abdominal. Se ha visto un aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  en tejido hepático de pacientes con NASH respecto a los pacientes con esteatosis simple (Crespo y cols., 2001). La acumulación de FFA y colesterol en la mitocondria aumenta TNF- $\alpha$  debido al aumento de ROS (Feldstein y cols., 2004; Marí y cols., 2006;). Por otra parte, se ha comprobado que participa en la IR al inducir las vía de las JNK quinasas (*c-Jun N-terminal kinases*) y la IKK $\beta$  (Quinasa del inhibidor de  $\kappa$ B subunidad beta), promoviendo una retroalimentación positiva que lleva al progreso de NAFLD (Marí y cols., 2006; Tilg y cols., 2006; Tilg, 2010). Se ha comprobado que la IR mejora en ratones que carecen de TNF- $\alpha$  (Uysal y cols., 1997).

La IL-6 tiene un efecto protector frente a NASH, disminuyendo el estrés oxidativo y previniendo la disfunción mitocondrial (Cressman y cols., 1996). Por otra parte, es capaz de aumentar la IR al inducir la expresión del supresor de proteínas señaladoras de citocinas (SOCS3) (Sabio y cols., 2008). La sobreexpresión de SOCS3 está presente en ratones con IR, ya que es capaz de unirse a los receptores de insulina inhibiendo los IRS1 e IRS2 (Senn y cols., 2003) y promoviendo su degradación mediada por ubiquitina, produciendo resistencia a la insulina (Rui y cols., 2002).

Otra citocina/factor de crecimiento importante en el desarrollo de NAFLD es el TGF- $\beta$  como marcador de fibrosis (Annoni y cols., 1992). El TGF- $\beta$ 1 promueve la fibrosis

y la activación de las células estrelladas. El TGF- $\beta$  es producido por las células de Kupffer y las células estrelladas, transformando a estas últimas en miofibroblastos dando lugar a la fibrosis hepática (Bissell y cols., 2001).

### 1.2.3.2. Adipoquinas

Mientras que en la esteatosis hepática la expresión de las citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y IL-6 aumenta, las adipocitocinas como la adiponectina, ghrelina y la leptina disminuyen (Tessari y cols., 2009). La adiponectina principalmente está producida por el tejido adiposo y tiene actividad antiinflamatoria y mejora la sensibilidad a la insulina al inducir la expresión de citocinas antiinflamatorias, bloqueando la expresión de NF- $\kappa$ B y la consecuente inhibición de TNF- $\alpha$  y IL-6 (Wolf y cols., 2004; Schäffler y cols., 2005). Por otra parte, la adiponectina del tejido adiposo, que es inducida por PPAR $\gamma$ , es capaz de estimular la vía de las MAPK y PPAR $\alpha$  promoviendo la síntesis y la oxidación de los FFA (Al Sharif y cols., 2014; Berlanga y cols., 2014). En pacientes con NASH se ha comprobado que la adiponectina sérica se encuentra disminuida (Shimada y cols., 2007).

La leptina tiene capacidad de mejorar la resistencia a la insulina y es capaz de disminuir la expresión de SREBP-1 activando la  $\beta$ -oxidación y reduciendo la lipogénesis (Chitturi y cols., 2002). En pacientes con NAFLD la leptina disminuye progresivamente (Polyzos y cols., 2015), siendo fundamental en el desarrollo de fibrosis (Leclercq y cols., 2002; Tilg y Hotamisligil, 2006).

## 1.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN NAFLD

Las vías de señalización celular juegan un importante papel regulador en el desarrollo de NAFLD coordinando la IR, la acumulación de lípidos, el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis. Las principales vías de señalización celular implicadas en el desarrollo de NAFLD son NF- $\kappa$ B, JAK/STAT (*Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*), PPRs, TLR y PI3K/AKT (Zeng y cols., 2014). Las vías que mayor impacto tienen en la IR son la de PI3K/AKT (por estar directamente relacionada con la insulina) y la de NF- $\kappa$ B que influye indirectamente en la inflamación y en la IR, mediante la inducción de citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  y la IL-6, que como ya hemos visto, inducen la resistencia a la insulina.

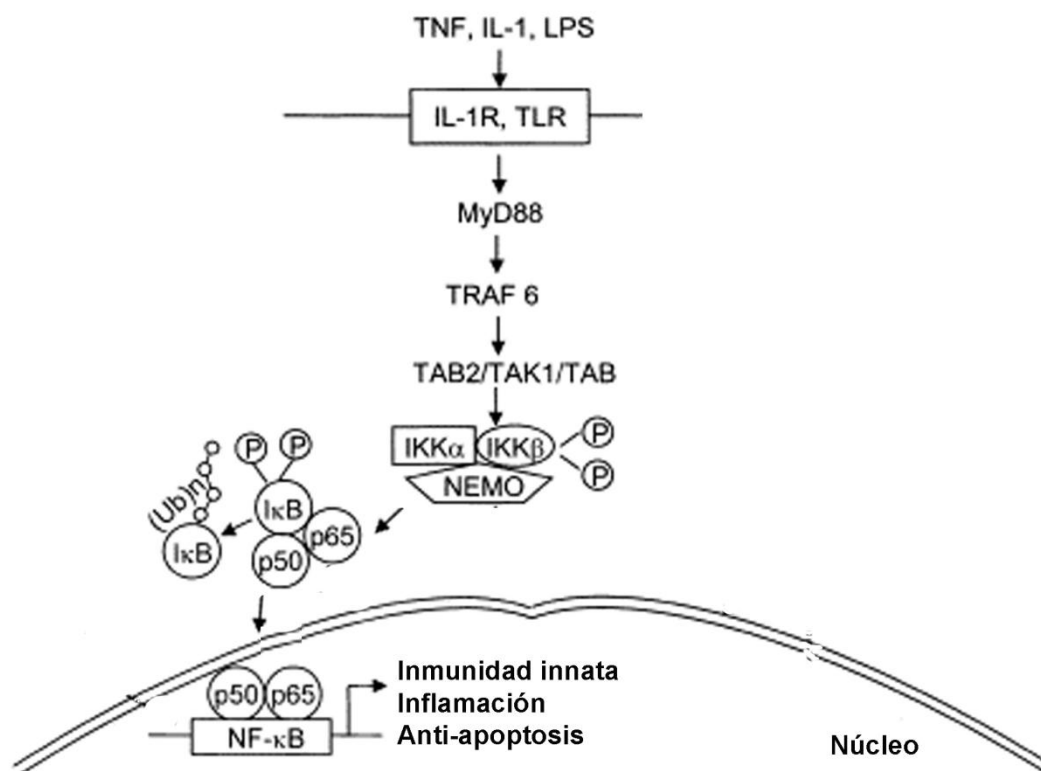
### 1.3.1. INFLAMASOMA

El inflamasoma es un complejo proteico expresado tanto en las células parenquimales como no parenquimales del hígado que se activa en respuesta a señales de daño celular. Este complejo tiene un papel muy importante en el avance de la hepatitis a cirrosis y en la activación de las células del sistema inmune (Szabo y Csak,

2012). La activación del inflamasoma cuenta con dos pasos secuenciales. La transducción de la señal de los TLR conduce primero a la activación de NF- $\kappa$ B (favoreciendo la liberación de Pro-IL-1 $\beta$  y Pro-IL-1 $\alpha$ ) y en segundo lugar a la activación del inflamasoma (liberando caspasa-1) (Wan y cols., 2016).

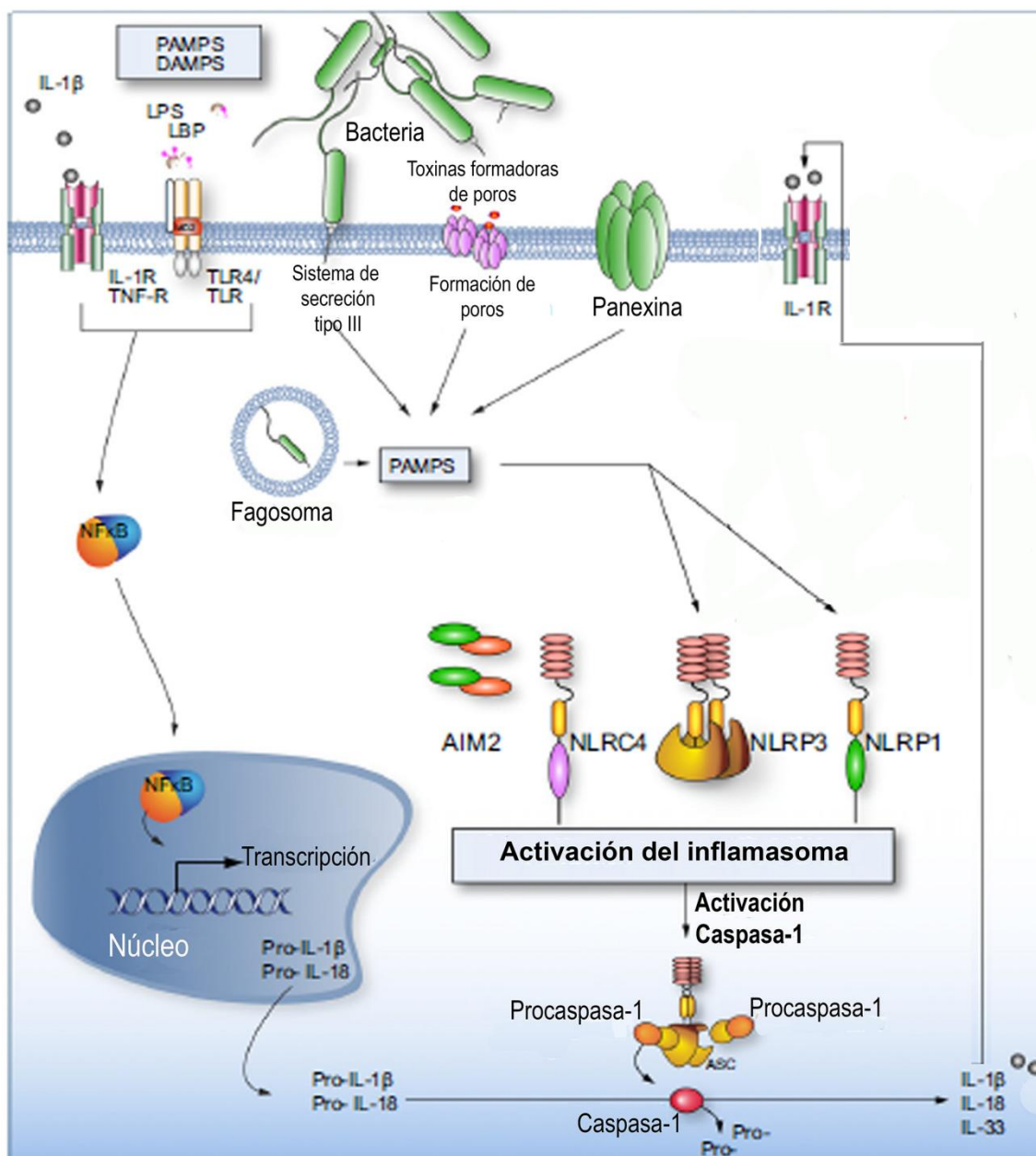
Los TLR se expresan en células del sistema inmune y células parenquimatosas del hígado. Son un grupo de proteínas transmembrana encargadas de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), entre las que se encuentran la endotoxinas y los ácidos grasos lipoperoxidados, entre otros (Szabo y Csak, 2012). La transducción de la señal de los TLR conduce a la activación de NF- $\kappa$ B (Michelotti y cols., 2013).

La vía de NF- $\kappa$ B está presente en multitud de variedades celulares, estando estrechamente relacionada con la respuesta inflamatoria y la IR, siendo el principal factor proinflamatorio en el desarrollo de NAFLD (Kaïdashev, 2012). La activación de NF- $\kappa$ B es principalmente producida por los PAMPs y DAMPs a través de la activación de los TLR, por el receptor de interleucina 1 (IL-1R), por el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), factores de crecimiento (insulina) y estrés del retículo endoplásmico (Szabo y Csak 2012; Zeng y cols., 2014). En un inicio, las proteínas del dímero NF- $\kappa$ B (p50 y p65) están secuestradas en el citosol por I $\kappa$ B. La fosforilación de I $\kappa$ B por la IKK. El complejo IKK eta constituido por IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  y NEMO (modulador esencial NF- $\kappa$ B) que provoca la degradación por ubiquitinación de I $\kappa$ B, liberando el NF- $\kappa$ B, permitiendo su localización nuclear y favoreciendo la transcripción de los genes proinflamatorios, entre los que se encuentran pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 (Michelotti y cols., 2013) (Figura 11).



**Figura 11:** Mecanismos de translocación de NF-κB al núcleo. Imagen modificada de Dixit y Mak, (2002).

Además, el inflamasoma es capaz de detectar señales de daño celular a través de los receptores tipo NOD (NLR). Los cuatro principales tipos de NLR son NLRP1 (NALP1), NLRP3 (NALP3, criporina), NLRC4 (IPAF) y AIM2, los cuales son activados tanto por PAMPs como por DAMPs (Szabo y Csak, 2012). Los NLR activados se unen al complejo proteico que contiene la pro-caspasa-1, esta se escinde y en su maduración transforma pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 en formas maduras, inhibiendo a IL-33 y facilita la liberación de la IL-1 $\alpha$  (Bauernfeind y cols., 2009; Cayrol y Girard, 2009; Wan y cols., 2016). La IL-18 es un activador de las células *natural killer* (NK) y la inhibición de IL-33 impulsa la respuestas de los linfocitos Th2 (Dinarello, 2011) (Figura 12).



**Figura 12:** Mecanismos de activación del inflammasoma. Imagen modificada de Szabo y Csak, (2012).

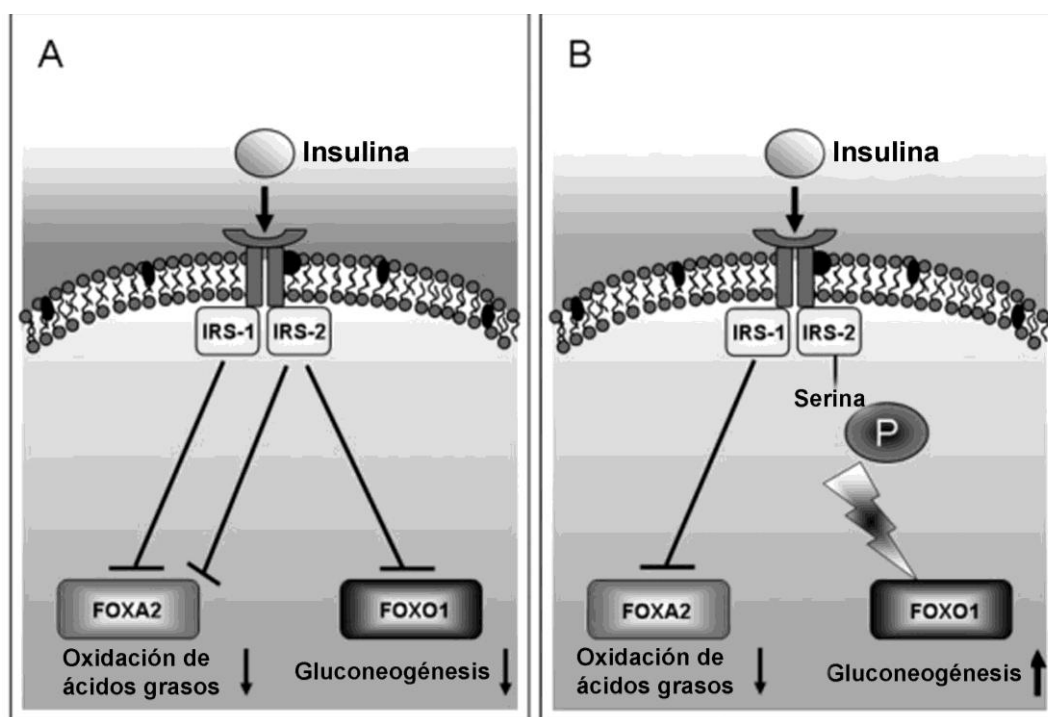
### 1.3.2. VÍA DE PI3K/AKT/PTEN

La vía de señalización PI3K/AKT/PTEN es la principal vía de transducción de la señal de la insulina y juega un papel muy importante en la regulación del metabolismo, el crecimiento celular y la supervivencia celular (Cantley y cols., 2002; Ou y cols., 2014). Se ha comprobado que en células HepG2 expuestas a insulina durante largos periodos de tiempo muestran una disminución de la transducción de la señal de la insulina, impidiendo la captación de la glucosa y provocando IR mediante un mecanismo de retroalimentación. La activación de AKT, suprime la expresión de los genes que intervienen en la oxidación de ácidos grasos, regulando así el proceso de la glucosa hepática y el metabolismo de los lípidos (Zeng y cols., 2014). Por último, el supresor de tumores PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) regula negativamente la vía PI3K/AKT

jugando un papel importante en el desarrollo de múltiples cánceres humanos incluido HCC. PTEN es considerado el segundo supresor tumoral, cuya supresión o delección provocan cáncer en humanos, después de P53 (Chow y cols., 2006).

### 1.3.2.1. Papel de la vía PI3K/AKT en el metabolismo y resistencia a la insulina

La vía PI3K/AKT es capaz de regular tanto el metabolismo de la glucosa como el metabolismo lipídico. Así, mediante una cascada de fosforilaciones modula la función de algunos factores de transcripción claves en la regulación del metabolismo. Mediante la activación de la vía por la insulina a través de IRS-2 se fosforila FOXO, el cual queda excluido del núcleo, impidiendo que FOXO actúe como factor de transcripción, disminuyendo la expresión de genes gluconeogénicos como glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y PEPCK (Puigserver y cols., 2003; Berlanga y cols., 2015). Mediante el mismo mecanismo, pero a través de IRS-1 e IRS-2, el factor de transcripción Foxa2 es capaz de regular la  $\beta$ -oxidación al aumentar la expresión de genes como PPAR $\gamma$ , G6Pasa e inhibir los genes involucrados en la síntesis de lípidos y TG que codifican para proteínas tales como FAS o SCD1 (Wolfrum y cols., 2004)(Figura 13).



**Figura 13:** Modulación de Foxo en IR por la vía PI3K/AKT. Imagen modificada de Wolfrum y cols., (2004)

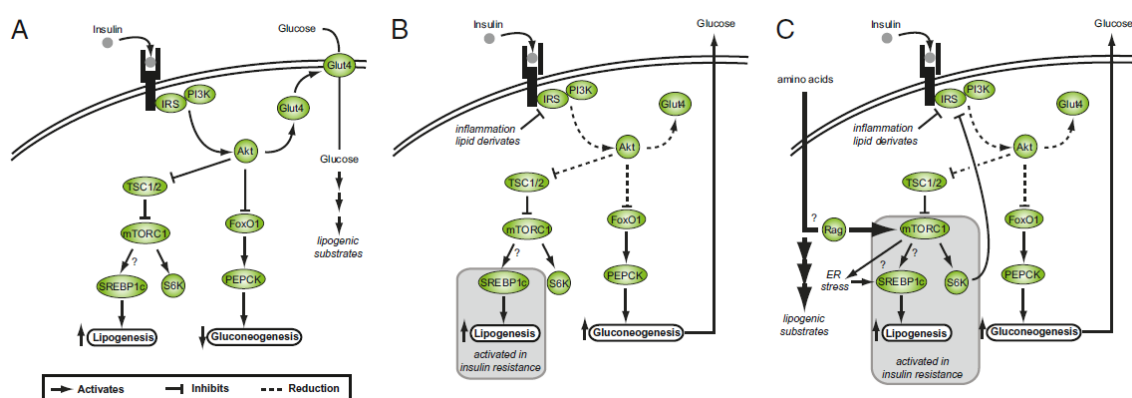
Se ha comprobado que la vía de señalización PI3K/AKT modula la actividad de PGC-1 $\alpha$  (cofactor PPAR $\gamma$  coactivador-1 $\alpha$ ) que es un co-activador de HNF4 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , GR, FOXO, FXR, LXR y por lo tanto es un modulador de metabolismo de los lípidos y de la glucosa (Lin y cols., 2005). Por otra parte, la vía de señalización PI3K/AKT, al excluir del núcleo por fosforilación al PGC-1 $\alpha$ , impide la dimerización con FOXO reduciendo la expresión de G6Pasa y de PEPCK (Puigserver y cols., 2003). PGC-1 $\alpha$  reduce la expresión

de SHP y de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (MCAD) implicados en la síntesis de ácidos biliares y en la oxidación de los ácidos grasos respectivamente, independientemente de la coactivación de FOXO (Li y cols., 2007).

La vía de PI3K/AKT inhibe la quinasa 3 glucógeno sintasa (GSK3) (Ross y cols., 1999) que junto a la inducción de ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) y gracias a MEK1/2 (*phosphorylates mitogen-activated protein kinase 1/2*), inhiben la expresión de C/EBP $\alpha$  y este a su vez inhibe SHP (Benet y cols., 2015).

En el hepatocito sensible a la insulina se activa la cascada de fosforilaciones de la vía PI3K/AKT produciendo la exclusión nuclear de FOXO1 (disminución de la gluconeogénesis), el aumento de la expresión y la liberación de SREBP-1c maduro a través de mTORC1 (aumento de la lipogénesis) y el aumento de la translocación de GLUT4 (transportador de glucosa tipo 4) que induce a ChREBP (Ferré y Foufelle, 2010).

Durante el desarrollo de NAFLD se produce una paradójica resistencia a la insulina presentando un aumento de la gluconeogénesis y de la lipogénesis mediante mecanismos poco conocidos. Como ya vimos, la gluconeogénesis aumenta en IR debido a que los IRS-2 presentan una capacidad reducida para fosforilar FOXO1, manteniéndose ésta activa en el núcleo y aumentando la gluconeogénesis (Berlanga y cols., 2015). La lipogénesis se mantiene inducida a través de mTORC1 (diana de rapamicina en células de mamífero), que es capaz de inducir a S6K y SREBP-1c de manera independiente (Li y cols., 2010). Para explicar la inducción de la lipólisis cuando existe IR, se ha planteado que esta inducción puede ser debida a la sensibilidad de mTORC1 para ser activada por aminoácidos a través de RAG GTPasa, que aumenta la expresión de SREBP-1c (Shaw, 2008). Por otra parte, la retroalimentación negativa de S6K fosforilado y la inducción de estrés de retículo facilita la escisión de los precursores de SREBP-1c, produciendo un aumento de la proteína activa madura (Ferré y Foufelle, 2010; Laplante y Sabatini, 2010) (Figura 14).



**Figura 14:** IR dependiente de la vía de PI3K/AKT. Imagen modificada de Ferré y Foufelle, (2010).

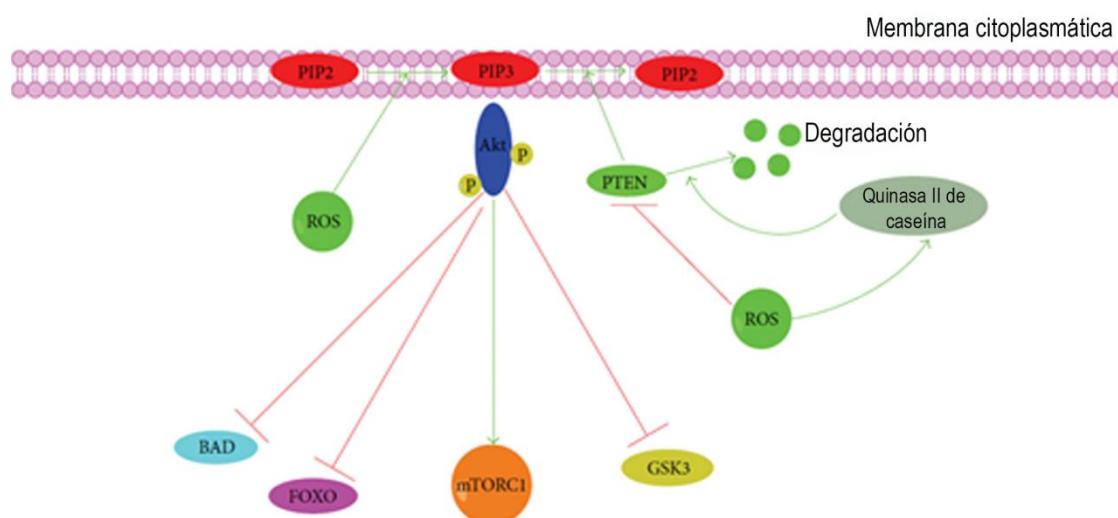
El acumulo de grasa en el hepatocito durante la formación de la esteatosis produce un aumento de derivados lipogénicos que causan resistencia a la insulina. El



DAG actúa como activador de la mayoría de las PKC, sobre todo de la PKC $\epsilon$ , proteína que inducida por DAG es capaz de inducir IR al inhibir la vía de señalización del PI3K/AKT (Berlanga y cols., 2015) y el aumento de ceramidas incrementa la expresión de PKC $\zeta$  y de la proteína fosfatasa 2A (PP2) (Jose y cols., 2012) (Figura 9).

### 1.3.2.1.1. Vía PI3K/AKT/PTEN y estrés oxidativo

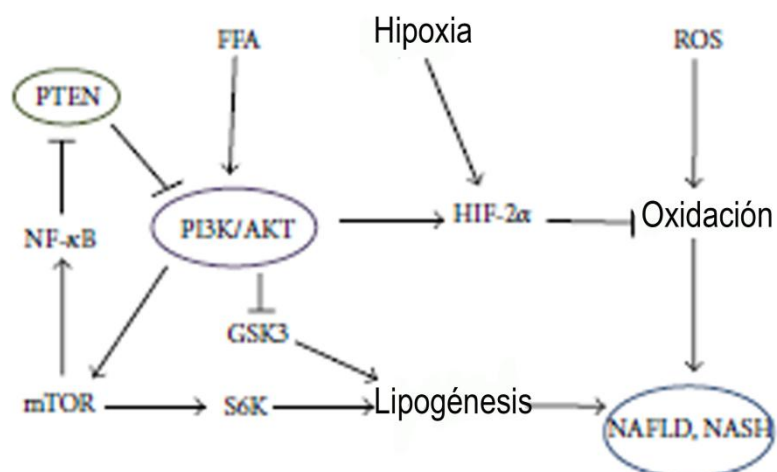
Encontramos una actividad aumentada de la vía PI3K/AKT/PTEN respecto a los individuos sanos (Liu y cols., 2012; Matsuda y cols., 2013). Los ROS son capaces de interactuar con numerosas vías de señalización, tales como, ATG4–ATG8/LC3, Beclina-1, p53 (proteína p53 supresora de tumor), PTEN, PI3K/AKT/mTOR y MAPK (Li y cols., 2011). La regulación de la vía PI3K/AKT por ROS se realiza directamente induciendo la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) que son moléculas implicadas en la transducción de la señal en la vía y mediante la oxidación de los centros catalíticos de la cisteína del PTEN, impidiendo que ésta sea capaz de inhibir la vía (Leslie y Downes 2002; Azad y cols., 2009; Jixiang Zhang y cols., 2016) (Figura 15).



**Figura 15:** Modulación de la vía de PI3K/AKT por parte de los ROS. Imagen modificada de Zhang y cols., (2016).

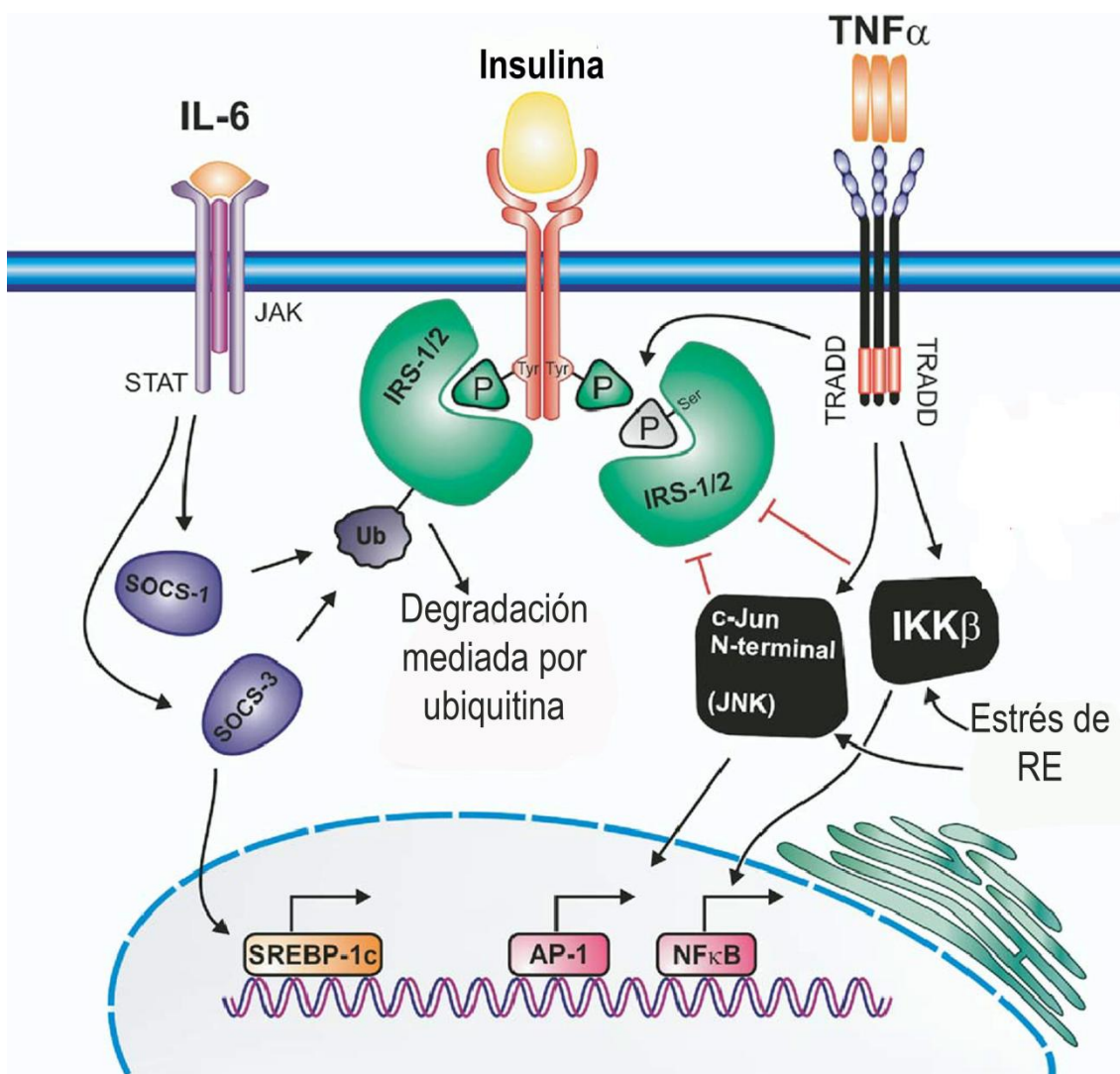
### 1.3.2.2. Vía PI3K/AKT/PTEN y la inflamación

La capacidad de producir IR en el caso de las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  que se comentó anteriormente se debe a que son capaces de interactuar con la vía PI3K/AKT. Así, a través de mTOR la vía de PI3K/AKT aumenta la expresión de NF- $\kappa$ B (Matsuda y cols., 2013). NF- $\kappa$ B induce la expresión de multitud de citocinas inflamatorias, entre las que se encuentran IL 6 y TNF- $\alpha$  (Duvnjak y cols., 2007). Por otra parte, NF- $\kappa$ B es capaz de regular negativamente PTEN mejorando la respuesta a la insulina (Matsuda y cols., 2013) (Figura 16).



**Figura 16:** Regulación de la vía PI3K/AKT en el desarrollo de NAFLD, mediada por NF- $\kappa$ B, ROS y FFA. Imagen modificada de Matsuda y cols., (2013).

La IL-6 es capaz de inducir la expresión de SOCS-1 y de SOCS-3. Este último induce a su vez la expresión de SREBP-1 produciendo esteatosis y ambos son capaces de bloquear la vía PI3K/AKT al realizar una degradación mediada por ubiquitinación de IRS-1 y IRS-2 (Tilg y cols., 2006). Por otra parte, TNF- $\alpha$  es capaz de originar IR al inducir las vías JNK y IKK $\beta$ , inhibitoras de IRS-1 y IRS-2 (Cai y cols., 2005). Finalmente, los FFA también son capaces de regular la vía de señalización de la insulina, mediante vías inflamatorias, actuando como inductores de TNF- $\alpha$ , JNK y IKK $\beta$  (Tilg y cols., 2006) (Figura 17).



**Figura 17:** Influencia de la IL-6 y TNF- $\alpha$  en la resistencia a la insulina. Imagen modificada de Tilg y Hotamisligil, (2006).

### 1.3.2.3. Vía PI3K/AKT/PTEN en el desarrollo de fibrosis y cáncer

Las principales vías involucradas en el desarrollo de HCC son las vías WNT/ $\beta$ -catenina, Ras y la PI3K/AKT/mTOR (Yam, Wong, y Ng, 2010). La vía PI3K/AKT tiene un papel importantísimo en la supervivencia y crecimiento celular, ya que es capaz de inducir moléculas antiapoptóticas como NF- $\kappa$ B y GSK- $\beta$  y de inhibir otras proapoptóticas como FOXO1 y BAD (Azad y cols., 2009).

Como se mencionó anteriormente PTEN regula negativamente la vía PI3K/AKT y es considerado el segundo supresor tumoral, cuya supresión o delección provocan cáncer en humanos, después de P53 (Chow y cols., 2006).

Mediante la transformación PIP3 en PIP2 por parte de PTEN, este es capaz de inhibir la vía PI3K/AKT (Downes y cols., 2007; Nakanishi y cols., 2014). Un aumento de PTEN produce una disminución de la IR, mejora la tolerancia a la glucosa, puede disminuir los ROS y fomenta la expresión de genes que conducen al avance de NAFLD

(Peyrou y cols., 2010). Por el contrario una disminución de su actividad conduce a un aumento de la esteatosis y de ROS, por tanto aumenta el estrés oxidativo y el desarrollo de HCC (Vinciguerra y cols., 2008; Peyrou y cols., 2010).

Entre los activadores de PTEN se encuentra p53, el cual es a su vez inducido por PTEN (Wu y cols., 2014) y PPAR $\gamma$ , pudiendo constituir un mecanismo contra el HCC en NAFLD (W. Zhang y cols., 2006). Por otra parte, como reguladores negativos de PTEN cabe citar al NF- $\kappa$ B, el TGF- $\beta$ , el TNF- $\alpha$ , los ácidos grasos insaturados (UFAs) y las adipocinas (leptina, adiponectina y resistina) (Peyrou y cols., 2010) (

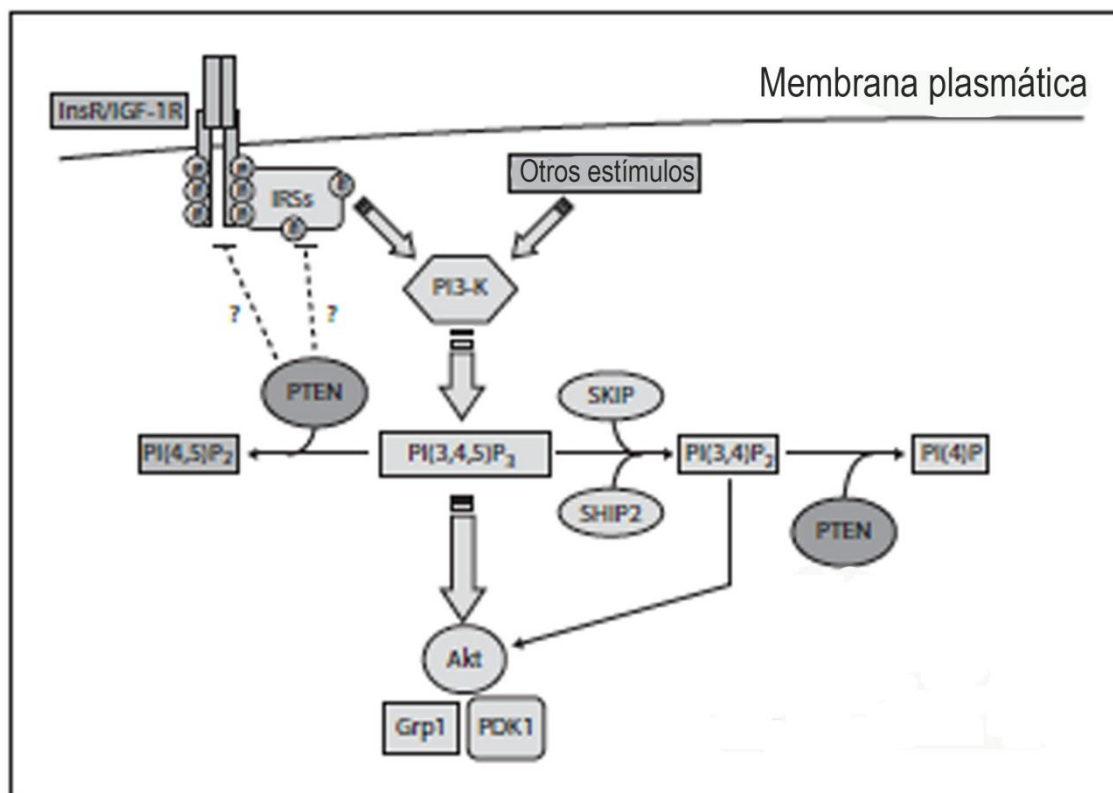
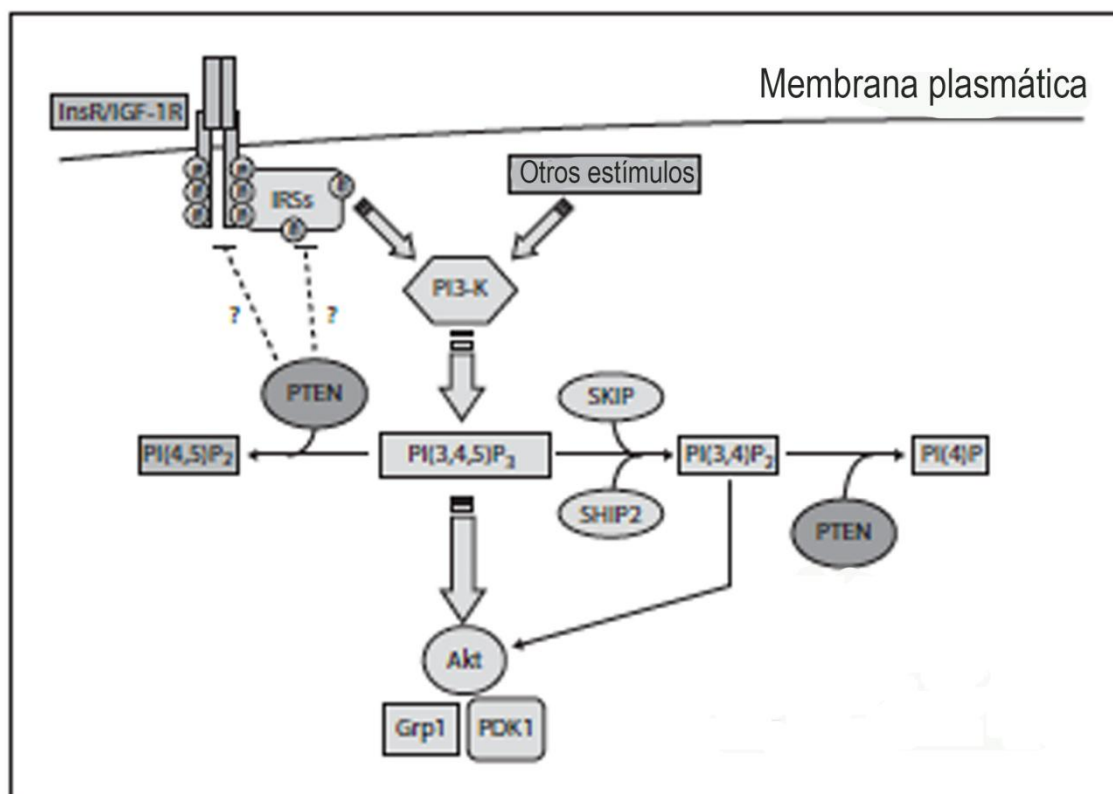


Figura 18).



**Figura 18:** Inhibición de la vía PI3K/AKT por PTEN. Imagen modificada de Peyrou y cols., (2010).

Por una parte, PTEN es capaz de regular la producción de ROS inhibiendo la vía de PI3K/AKT, que no es capaz de inducir la translocación de NADPH oxidasas (NOXs) y disminuye la producción de ROS (Nakanishi y cols., 2014), o mediante la activación de p53 que actúa como inductor de la enzima glutatión peroxidasa (GPX)-1 (Wu y cols., 2014). A pesar de que los mecanismos no están bien definidos, PTEN inhibe la vía PI3K/AKT y es capaz de reducir la esteatosis (Vinciguerra y cols., 2008), modulando la función de los reguladores del metabolismo lipídico, que de manera directa o indirecta tienen una función determinante sobre la inflamación y por tanto en la progresión de NAFLD a HCC (Peyrou y cols., 2010) (

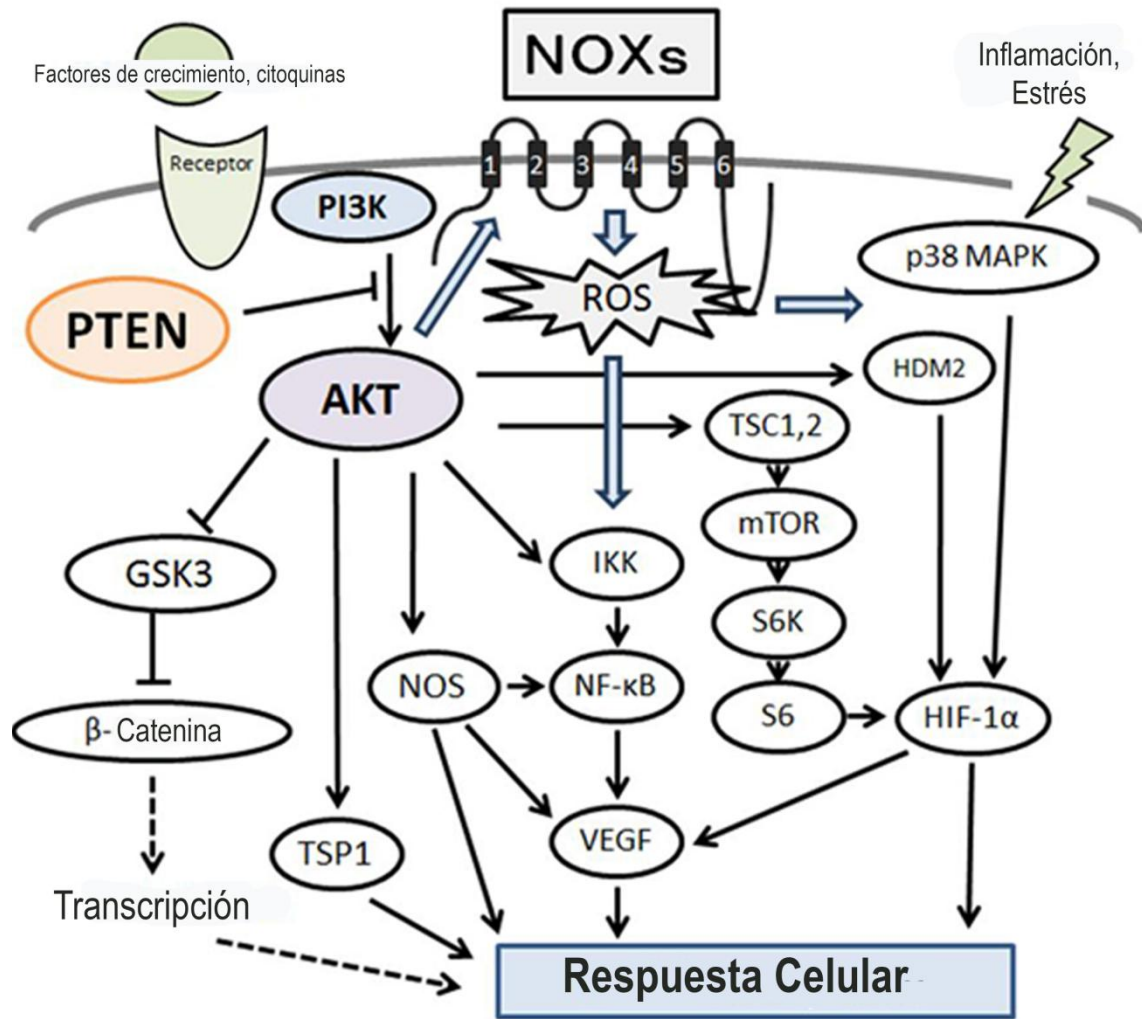
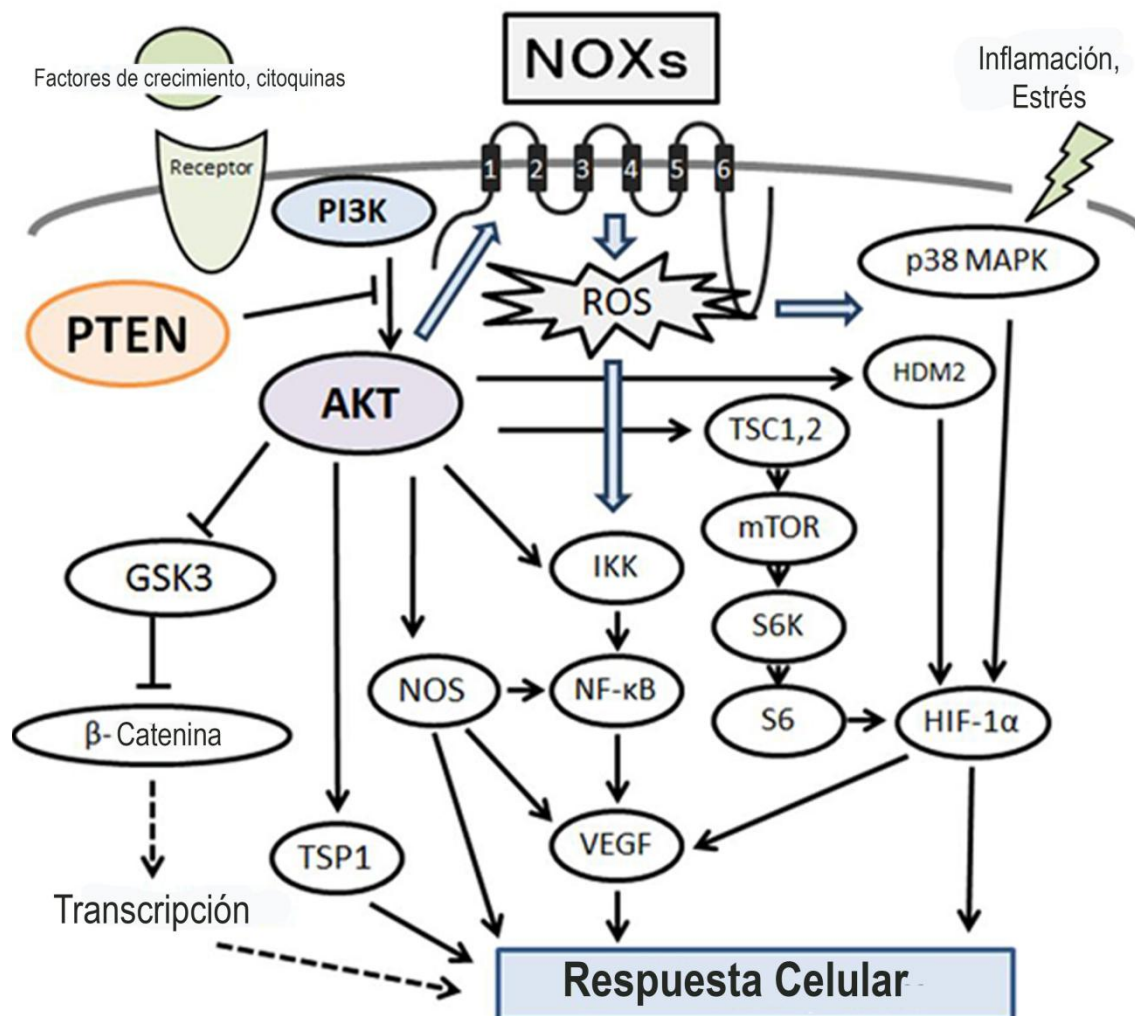


Figura 19).

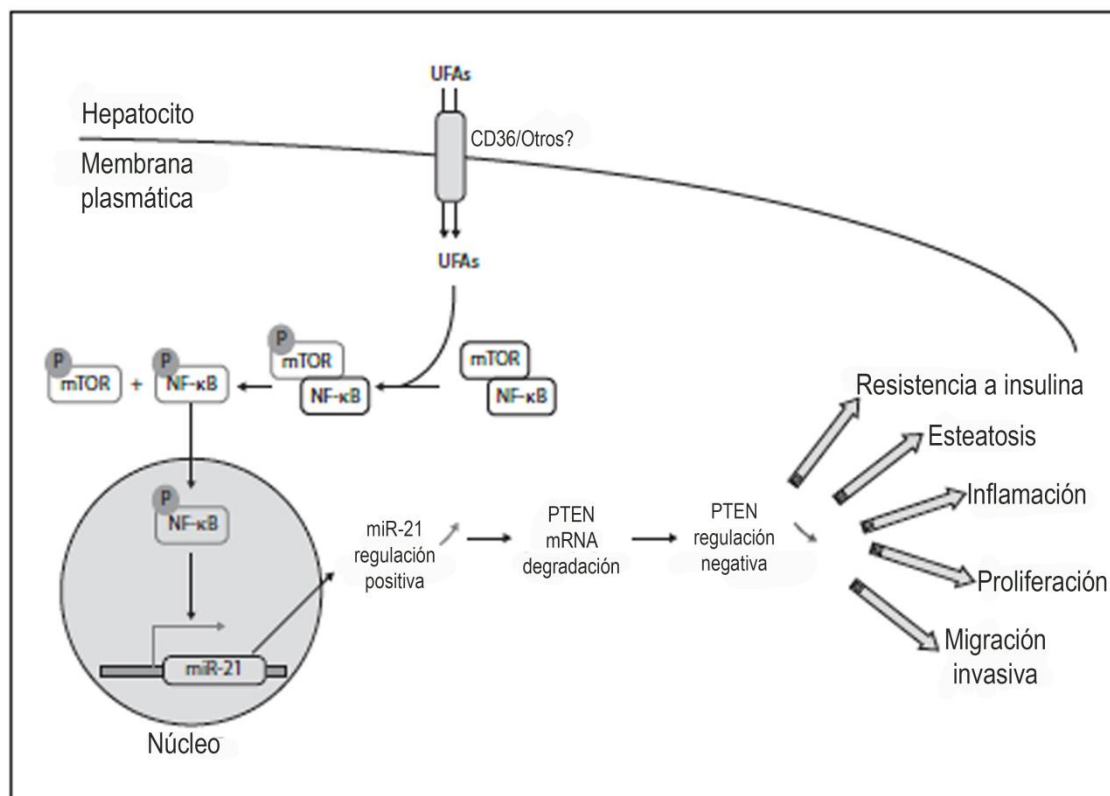


**Figura 19:** Modulación de ROS por PTEN. Imagen modificada de Nakanishi y cols., (2014).

Como ya vimos anteriormente, los ROS son capaces de interactuar con el centro catalítico de PTEN inactivando la función inhibitoria de la vía (Leslie y Downes 2002; Leslie y cols., 2003; Azad y cols., 2009; Jixiang y cols., 2016). La vía PI3K/AKT regula la función de PTEN mediante la fosforilación de NF-κB, el cual, una vez fosforilado entra en el núcleo, induciendo microRNA-21 (miR-21), el cual es capaz de inhibir la traducción de PTEN (Vasudevan y cols., 2004; Vinciguerra y cols., 2008). También se ha comprobado que de manera independiente a la vía PI3K/AKT, los UFAs son capaces de inhibir la expresión de PTEN mediante la inducción de miR-21 al fosforilar el complejo formado por mTOR/NF-κB (Vinciguerra y cols., 2008) (Figura20).

Por otra parte, PTEN también tiene una función nuclear como potenciador de la transcripción de p53, muy interrelacionada con el desarrollo de cánceres como el HCC (Li y cols., 2006). Los FFA de manera independiente a la vía PI3K/AKT son capaces de fosforilar el complejo mTOR/S6K, lo que provoca una ubiquitinización de PTEN que lo fuerza a salir del núcleo, evitando la activación de p53 que no puede actuar como inductor de la GPX-1, produciendo un aumento de ROS. Tanto el aumento de ROS

como de PTEN citoplasmático modulan negativamente la vía PI3K/AKT (Wu y cols., 2014).



**Figura 20:** Activación de NF-κB por los UFAs. Imagen modificada de Vinciguerra y cols., (2008).

## 1.4. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

### 1.4.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS EN NAFLD

La alteración más frecuente de parámetros sanguíneos es la elevación de entre 2-5 veces de las transaminasas hepáticas en plasma, que ocasionalmente llega hasta las 10-15 veces (Bacon y cols., 1994), pero que a menudo permanecen normales (Mofrad y cols., 2003). Aunque la mayoría de las veces las concentraciones de alanina transaminasa (ALT) son más altas que las de la aspartato aminotransferasa (AST), ocasionalmente las concentraciones de AST pueden ser más elevadas, especialmente en el estadio de cirrosis (Bacon y cols., 1994). La relación AST/ALT suele ser inferior a uno en el 65-90% de pacientes con NASH. Sin embargo, la relación mayor de uno sugiere una esteatohepatitis alcohólica o una forma avanzada de NASH que evoluciona hacia cirrosis (Sorbi y cols., 1999; McCullough y cols., 2004). Con menor frecuencia existe una elevación de la actividad plasmática de la fosfatasa alcalina y de la  $\alpha$ -glutamil-transpeptidasa. Los parámetros bioquímicos de función hepatocelular (albúmina, actividad de protrombina y bilirrubina) no suelen estar alterados (Kumar y



cols., 2000; Falck-Ytter y cols., 2001; Pérez-Aguilar y cols., 2004; De la Peña y cols., 2007; Gyamfi y cols., 2008).

En el 25-75% de pacientes con NASH se detectan concentraciones anormales del perfil lipídico (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y/o aumento en la concentración de glucosa en suero (Donati y cols., 2004; Portincasa y cols., 2005).

No es infrecuente el aumento de la sideremia y/o ferritina sérica y hasta un 15% de los pacientes presentan aumento de la saturación de transferrina, aunque sin evidencias histológicas de hemocromatosis. Sin embargo, los concentraciones hepáticas de hierro son normales (Kowdley y cols., 2012). Se ha demostrado en pacientes con NAFLD que una elevación persistente de las concentraciones de ferritina presentan un mayor riesgo de desarrollar NASH, especialmente si están asociados a desórdenes en el metabolismo de los lípidos o la glucosa (Fargion y cols., 2001).

#### **1.4.2. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la enfermedad de hígado graso no alcohólico requiere de una demostración de la esteatosis hepática mediante diagnóstico por imágenes, estudios de elastografía hepática o la biopsia, la exclusión de un consumo relevante de alcohol y la exclusión de otras causas de esteatosis hepática (Chalasanani y cols., 2012). En el diagnóstico de NAFLD, primero se utilizan técnicas no invasivas (ecografía o resonancia magnética principalmente) que nos permite determinar si hay esteatosis, y también se realizan las pruebas de laboratorio (análisis de sangre y búsqueda de marcadores de NAFLD). Posteriormente se buscan las causas potenciales de la esteatosis y se descarta que sea por consumo de alcohol o causadas por virus de la hepatitis. Para evitar la biopsia hepática se han desarrollado en los últimos años técnicas no invasivas como método diagnóstico (Schwenzer y cols., 2009). Destacan las elastografía transitoria con parámetro de atenuación controlada, resonancia magnética y la elastografía con RM elastógrafos como principales herramientas diagnósticas no invasivas altamente precisas para cuantificar la esteatosis hepática y la fibrosis (Han y cols., 2017). La técnica no invasiva más utilizada es la elastografía transitoria con parámetro de atenuación controlada por ser rápida (unos 15 minutos) con bajo riesgo y barata, coincidiendo con la biopsia hepática en un 85-94% de las veces (Hernaiz y cols., 2011). Las principales limitaciones de la elastografía transitoria con parámetro de atenuación controlada son la incapacidad de las ondas para traspasar líquidos como en la ascitis o espacios intercostales, errores en la medición de la rigidez hepática debido a hepatitis agudas, hepatitis con altos niveles de ALT o colestasis extrahepáticas y finalmente la obesidad que se ha mejorado mediante el uso de sondas XL (Mikolasevic y cols., 2016). En cuanto a la biopsia hepática, a pesar de resultar la técnica más determinante, muestra limitaciones presentando errores de muestreo, variación inter y

extraobservador, riesgos y complicaciones debidos a las cirugías y altos costes en recursos y tiempo, lo cual la hace inviable para un seguimiento de NAFLD en la población (Mikolasevic y cols., 2016).

El criterio mínimo para un diagnóstico histológico del hígado graso no alcohólico es tener >5% de los hepatocitos esteatósicos en una sección de tejido hepático. El grado de esteatosis puede ser descrita como leve (5% a 33% de los hepatocitos son esteatósicos), moderada (34% a 66% de los hepatocitos), o grave (>66% de los hepatocitos) (Brunt y Tiniakos, 2010). A partir de la biopsia hepática se calcula el índice de actividad de la enfermedad (NAS). El NAS es la suma de las puntuaciones individuales de la biopsia para esteatosis (0-3), inflamación lobulillar (0-2), balonización hepatocelular (0 a 2), y fibrosis (0-4). Un NAS de 1 o 2 corresponde a esteatosis, de 3 a 4 corresponde casi con NASH, y un puntaje  $\geq 5$  corresponde a NASH (Kleiner y cols., 2005).

A pesar de los notables avances en el conocimiento de esta enfermedad no existe un tratamiento definido para la misma. En pacientes con simple esteatosis, la terapia más beneficiosa y segura precisa únicamente de modificaciones en su estilo de vida y hábitos alimenticios que conduzca a los pacientes a una pérdida de peso y una reducción del consumo de alcohol, aunque en ocasiones es necesaria una cirugía bariátrica cuando se asocia a obesidad (Promrat y cols., 2010). Por otra parte, el uso de vitamina E y pioglitazona también puede tener un efecto beneficioso en NAFLD (Sanyal y cols., 2010). La vitamina E tiene capacidad antioxidante y su uso parece mejorar las actividades plasmáticas de las transaminasas (Hoofnagle y cols., 2013), recomendándose en pacientes con fibrosis, aunque las altas dosis del suplemento de vitamina E pueden aumentar la mortalidad en circunstancias concretas (Sanyal y cols., 2010). Otro tipo de fármacos o terapias optan por mejorar la IR (tiazolidinedionas), actúan en la modulación hepática de la bilis (el ácido ursodesoxicólico, Aramchol o el ácido obticólico), actúan contra el estrés oxidativo (Probuco) e incluso contra la inflamación (pentoxifilina como inhibidor de TNF- $\alpha$ ) (Chalasani y cols., 2012).

La gestión de la cirrosis por NAFLD es similar a la de la cirrosis debido a otras etiologías e incluye manejo de la hipertensión portal, la detección de carcinoma hepatocelular y la consideración de un trasplante de hígado para los pacientes con cirrosis descompensada.

## **1.5. MODELOS EXPERIMENTALES DE NAFLD**

La literatura describe diferentes modelos animales que exhiben evidencias histológicas de esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica. Sin embargo, pocos desarrollan la totalidad de cambios correspondientes al fenotipo de la enfermedad en humanos. Los principales enfoques de NAFLD a través de modelos animales pueden

dividirse en 2 grandes grupos: aquellos que tienen un fenotipo adquirido para NAFLD (modelos nutricionales y modelos farmacológicos) y aquellos originados por una mutación genética espontánea o adquirida (modelos genéticos) (Anstee y Goldin, 2006; Almonacid-Urrego y cols., 2012; Lau y cols., 2017). Debido a que en la presente investigación se indujo NASH mediante la administración de una dieta deficiente en metionina y colina a ratones C57BL/6 y a células Huh7 a continuación se revisará brevemente este modelo nutricional.

La dieta deficiente en metionina y colina (MCD) es el modelo nutricional clásico para inducir rápidamente esteatohepatitis en roedores. La dieta MCD contiene sacarosa y grasa en proporciones de 40% y 10% respectivamente, pero carece de los aminoácidos esenciales metionina y colina. La colina es fundamental para la integridad de la membrana celular, la neurotransmisión y la síntesis de la fosfatidilcolina, que es esencial en la exportación de las VLDL. La metionina es fundamental para la síntesis de SAM y GSH, dos moléculas antioxidantes claves en la reducción de los ROS, de manera que en el hígado se acumulan los lípidos y aumenta las ROS, produciendo una histología similar a la de humanos con NAFLD (Anstee y Goldin 2006; Freitas y cols., 2016). Estudios en roedores demuestran que ratas y ratones alimentados con la dieta MCD disminuyen significativamente de peso (más de 40% en 10 semanas) y que el hígado reduce su tamaño de manera proporcional con la pérdida del tejido adiposo blanco, de manera que la relación peso del hígado/peso corporal no se incrementa a medida que pasa el tiempo para cada grupo (Kirsch y cols., 2006; Hebbard y George 2011).

Los análisis histológicos muestran que los animales alimentados con MCD desarrollan inflamación hepática (después de 3 días), esteatosis macrovesicular severa en la zona pericentral (dentro de la 1ª y 2ª semanas) y necroinflamación (después de dos semanas), seguida por fibrosis pericelular y pericentral. El infiltrado inflamatorio hepático incluye linfocitos y polimorfonucleares neutrófilos (Kirsch y cols., 2006; Hebbard y George 2011).

El contexto metabólico para el modelo MCD se caracteriza por el incremento de las concentraciones séricas de ALT y AST, con una paralela reducción en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol (Gyamfi y cols., 2008; Fisher y cols., 2009; Hebbard y George 2011). Este último hallazgo es contrario a lo observado en individuos obesos y con sobrepeso diagnosticados con hígado graso no alcohólico, de manera similar a lo referido a los pesos corporal y hepático (Bhat y cols., 2012). Otras de las características de este modelo son el incremento de la lipoperoxidación hepática que se observa aproximadamente a las 3 semanas como consecuencia de la inducción de los citocromos P450 (CYP) 2E1, CYP4A10 y CYP4A14, y la disminución de las concentraciones basales de glucosa, con incremento de la sensibilidad sistémica a la insulina (London y cols., 2007; Sundaresan y cols., 2011).

La magnitud y severidad del efecto de esta dieta en roedores varía de acuerdo con la especie, la cepa y el género del animal estudiado, reflejando la gran variación fenotípica interindividual que se observa en pacientes con NASH. Es así como en ratas Sprague-Dawley la dieta MCD induce esteatohepatitis más lentamente. Después de 5 semanas de tratamiento se observa un incremento tres veces menor en la actividad sérica de ALT, mientras que el estrés oxidativo se presenta tempranamente (segunda semana). Los roedores más afectados por la dieta MCD son los ratones C57BL/6. En contraste con otros grupos, estos animales desarrollan las características histológicas que más estrechamente se asemejan con las observadas en la NASH humana (Kirsch y cols., 2006; London y cols., 2007).

Los principales mecanismos patológicos descritos para este modelo son: (1) disrupción de la síntesis de la fosfatidilcolina, que conlleva a la disminución en el ensamble y secreción de las VLDL y, por lo tanto, a la reducción en el aclaramiento de los triglicéridos ((Anstee y Goldin, 2006); (2) incremento en la inflamación hepática debido al aumento de la producción de moléculas proinflamatorias y profibróticas tales como interleucina (IL)-6, factor transformador de crecimiento TGF- $\beta$  y factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  y moléculas de adhesión como, molécula intercelular de adhesión ICAM-1, molécula de adhesión vascular VCAM-1, y proteína quimiotáctica de macrófagos MCP-1 (Ip y cols., 2004); (3) inducción de estrés oxidativo. La dieta MCD induce la producción de ROS y reduce las concentraciones de antioxidantes hepáticos como el glutatión (GSH) y la S-adenosil metionina (S-AMe) (Oz y cols., 2006); (4) activación de NF- $\kappa$ B el cual es responsable en parte, de muchos de los posteriores cambios proinflamatorios y constituye un vínculo importante entre el estrés oxidativo, la inflamación crónica y la fibrogénesis hepática (de la Peña y cols., 2007; Sundaresan y cols., 2011); y (5) han demostrado que este modelo causa una significativa reducción en las concentraciones y expresión de los transportadores de captación hepática OAT2 y OAT3, que conduce a una alteración en la farmacocinética de xenobióticos (Fisher y cols., 2009).

En resumen, aunque el modelo nutricional MCD es uno de los métodos mejor establecidos para el estudio de la inflamación, el estrés oxidativo y los cambios fibróticos relacionados con la NASH, no replica la totalidad de la patogénesis producida en humanos. En contraste con la enfermedad de hígado graso humana, los animales alimentados con la dieta MCD son caquéticos, tienen bajas concentraciones de triglicéridos plasmáticos, reducen la relación peso del hígado/peso corporal respecto a los grupos control, exhiben concentraciones de ALT mucho mayores que las que se han observado en pacientes con NASH y la distribución de la esteatosis hepática difiere del patrón observado en humanos. La mayor desventaja del modelo MCD es que el perfil metabólico es opuesto al demostrado en humanos. Por ejemplo, las concentraciones de insulina, leptina y glucosa se encuentran reducidas, la adiponectina sérica no está

disminuida y los animales tienen sensibilidad periférica a la insulina (Hebbard y George 2011; Sundaresan y cols., 2011).

## **1.6. ANTIOXIDANTES EN EL TRATAMIENTO DE NAFLD**

El estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel central en la progresión de NAFLD, el uso de compuestos relacionados con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias han mostrado efectos beneficiosos sobre NAFLD y otras enfermedades crónicas. La peroxidación lipídica y el incremento de ROS pueden agotar la capacidad antioxidante celular en la que intervienen moléculas antioxidantes como el glutatión, la vitamina E, el  $\beta$ -caroteno y vitamina C, facilitando que el hígado sea susceptible al daño oxidativo (Javier González-Gallego, García-Mediavilla, Sánchez-Campos, & Tuñón, 2010). La terapia con vitamina E disminuye las elevaciones de transaminasas en suero de enfermos de NAFLD (Chalasani y cols., 2012; Sanyal y cols., 2010). En otro informe se muestra que la terapia combinada de vitamina E y una mejoría histológica significativa de la inflamación y la fibrosis en pacientes (Caldwell, 2017; Harrison y cols., 2003). Finalmente, se ha comprobado en ratones con una ingesta diaria de antioxidantes mejoras en la inflamación hepática y el daño hepatocitario (Ji y cols., 2015).

Está descrito que la suplementación dietética con antioxidantes en el tratamiento de NAFLD ha mostrado grandes beneficios (D'Andrea, 2015; Ji y cols., 2015; Schmidt y cols., 2015), pero aun así no ha tenido los resultados esperados, habiéndose descrito incluso efectos deletéreos como el aumentar de la mortalidad asociada a la enfermedad (Miller y cols., 2005; Bjelakovic y cols., 2007; Caldwell, 2017). Los resultados negativos que puede tener una dieta suplementada por antioxidantes en las diferentes aplicaciones médicas de estos, puede deberse a un desconocimiento de los mecanismos por los que actúan los antioxidantes, al tipo y la dosis de los antioxidantes, duración y momento del tratamiento, etc...(Görlach y cols., 2015; Schmidt y cols., 2015). Por eso es necesario comprender los mecanismos de actuación e incorporar nuevos antioxidantes más seguros.

### **1.6.1. FLAVONOIDES**

En los últimos años se ha demostrado los efectos protectores de diferentes compuestos polifenólicos tales como catequinas del té verde (Masterjohn y Bruno, 2012), la genisteína (Ji y cols., 2011), la curcumina (Jomezadeh y cols., 2012), flavonoides totales de *Litsea coreana* (Hu y cols., 2012), una combinación de antocianinas, flavonoles, y derivados de ácidos fenólicos (Joven y cols., 2012) u otros antioxidantes como S-nitroso-N-acetilcisteína (Vercelino y cols., 2010) en modelos experimentales de NAFLD.

Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en alimentos tales como frutas, vegetales y diversas bebidas (D'Andrea, 2015). Se ha demostrado que los flavonoides poseen un amplio rango de actividad en la prevención de enfermedades comunes como enfermedades neurodegenerativas, desórdenes gastrointestinales y cáncer entre otras (D'Andrea, 2015; González-Gallego y cols., 2007)

En cuanto al estrés oxidativo, los flavonoides son capaces de inhibir ciertos mediadores que se activan en condiciones de inflamación. A este respecto, se ha demostrado que los flavonoides son capaces de disminuir la formación de isoformas de la óxido nítrico sintasa, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, responsables de la producción de óxido nítrico, prostanoïdes y leucotrienos, así como otros mediadores de procesos inflamatorios como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Tuñón y cols., 2009). El efecto de los flavonoides ha sido estudiado en relación con la enzima iNOS y existen datos experimentales que apoyan la idea de que estos compuestos son capaces de inhibir la expresión o la actividad de iNOS debido a su potencial como agentes antiinflamatorios (Middleton y cols., 2000 Crespo y cols., 2008). Del mismo modo se ha demostrado, en estudios in vitro, que la quercetina o el kaempferol inhiben la producción de óxido nítrico y la expresión de iNOS (Shen y cols., 2002; García-Mediavilla y cols., 2007).

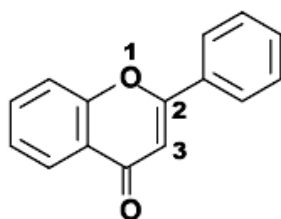
Numerosas publicaciones sugieren que dichos compuestos poseen una capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria, mostrando el efecto inhibitorio de los flavonoides sobre la expresión y la actividad de determinadas proteínas involucradas en la generación de mediadores inflamatorios (Tuñón y cols., 2009). Además de la relación de los flavonoides con la expresión de iNOS, también parece ser que existe una relación con citocinas inflamatorias como NF- $\kappa$ B entre otras (García-Mediavilla y cols., 2007; Santangelo y cols., 2007). De hecho, un gran número de flavonoides son capaces de inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias, como se ha demostrado que la expresión de genes y la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 son inhibidos por quercetina y kaempferol en células RBL-2H3 (Park y cols., 2008) y en HUVECs (Crespo y cols., 2008).

Los flavonoides poseen la capacidad de modular la expresión de varios genes cuya desregulación contribuye a la acumulación de lípidos, fibrosis, inflamación, estrés oxidativo y/o resistencia a la insulina en el desarrollo de NAFLD. Su efecto en la reducción del acúmulo de lípidos parecen estar asociados con su capacidad para regular la expresión de genes principalmente implicados en la síntesis *de novo* y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Tuñón y cols., 2009; Pisonero-Vaquero y cols., 2015). Se ha comprobado que la naringerina es capaz de inducir la actividad de PPAR $\alpha$  y al mismo tiempo inhibe la actividad de LXR $\alpha$ . Las propiedades antiinflamatorias de la naringerina se podrían deber a la activación de la proteína reguladora del metabolismo PPAR $\gamma$  (Goldwasser y cols., 2010). Se ha descrito que la quercetina es

capaz de reducir la acumulación de lípidos, lo que sugiere que regula la expresión de determinados genes lipogénicos como FAS (Jung y cols., 2013b).

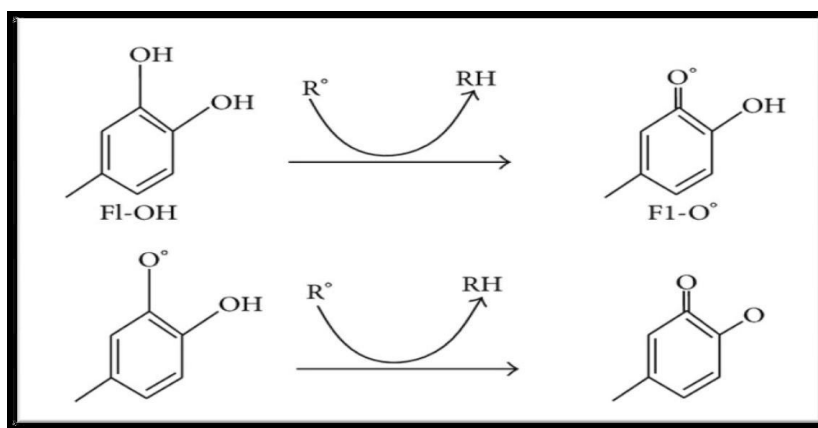
### 1.6.1.1. PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN

Los efectos biológicos de estas moléculas se han asociado principalmente a su capacidad como antioxidantes, lo que depende directamente de su estructura química (Silva y cols., 2002; González-Gallego y cols., 2010;). La estructura básica se caracteriza por diversos patrones de sustitución de grupos hidroxilos en los dos anillos bencénicos A, B y un anillo oxigenado C que diferencia la clase de flavonoide. Los flavonoides pueden dividirse en diferentes subclases, siendo las más representativas: flavonoles (como la quercetina o el kaempferol), flavonas (apigenina), flavanonas (taxifolina), isoflavonas, antocianinas y flavanoles (proantocianinas y catequinas) (D'Andrea, 2015; Pisonero-Vaquero y cols., 2015). Existen más de 5000 flavonoides aislados e identificados que se agrupan en varios grupos basándose en las diferencias estructurales en el anillo C (Figura 21).



**Figura 21:** Estructura básica de un flavonoide.

Todos los polifenoles presentan una fuerte actividad antioxidante, la cual depende principalmente del número y posición de los grupos hidroxilo de la estructura nuclear. La configuración del hidroxilo del anillo B es el determinante más importante para la captación de ROS, ya que dona un hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilo, peróxido y peroxinitrito estabilizándolos y adquiriendo una estructura bastante estable (Kumar y Pandey, 2013) (Figura 22).



**Figura 22:** Reacción del anillo B de un flavonoide en la eliminación de ROS. Imagen modificada de Kumar y Pandey, (2013).

Los tres principales mecanismos de acción antioxidante son la eliminación directa de ROS, evitando la formación de ROS mediante la inhibición de elementos que los genera como enzimas o quelantes de oligoelementos y por intervenir en la regulación y protección de defensas antioxidantes (Kumar y Pandey 2013; Schmidt y cols., 2015). Por otra parte, mantener el balance de ROS y antioxidantes es importante, ya que se ha comprobado que los ROS desempeñan una función como moléculas de señalización capaces de actuar contra el desarrollo de la enfermedad (Bruning, 2013; Brown y Griendling, 2015).

Los antioxidantes también tienen mecanismos de actuación que no tiene que ver con su función reductora. Los antioxidantes o compuestos con capacidad antioxidante pueden actuar intercalándose en el ADN, inhibiendo las actividades topoisomerasa, ADN polimerasa y ribonucleotido reductasa (Fox y cols., 2012). Los polifenoles pueden dirigirse a miRNAs específicos que regulan varias vías metabólicas, incluyendo el metabolismo de los lípidos, lo que sugiere un mecanismo alternativo por el cual estos compuestos podrían proteger de NAFLD. El desarrollo y la progresión de la NAFLD está ligada a la proliferación de bacterias intestinales, por lo que la suplementación con probióticos con capacidades antioxidantes parece mejorar el daño hepático, reduciendo el estrés oxidativo y la inflamación al fortalecer la pared intestinal, reduciendo la permeabilidad, impidiendo la translocación bacteriana y disminuyendo la endotoxemia en el Hígado (Kawabata y cols., 2013; Pisonero-Vaquero y cols., 2015). Los fenoles actúan como hepatoprotectores gracias a su capacidad de modular los genes antiinflamatorios, como anticancerígenos al reducir la expresión de p53 (Lamson & Brignall, 2000) tienen función antivírica mostrando resultado en la infección de VIH, virus del herpes simple (Kumar y Pandey 2013) o el virus de la hepatitis C (Lamson y Brignall, 2000) y antibacteriana

#### **1.6.1.2. QUERCETINA COMO POSIBLE TRATAMIENTO DE NAFLD**

La quercetina es uno de los principales flavonoides presente en la dieta y por ello es uno de los compuestos antioxidantes más estudiados, gracias a sus funciones biológicas. Alimentos como las alcaparras, la cebolla, las uvas, e incluso el vino y la cerveza tienen alto contenido en quercetina. La biodisponibilidad de la quercetina administrada mediante vía oral se encuentra en torno al 2%, aumentando su solubilidad con grasa, etanol y otros compuestos emulsionantes, puede llegar a un 45% (D'Andrea, 2015).

Un estudio comparativo del papel de la pioglitazona, la quercetina y el ácido hidroxícitrico en la esteatosis, la inflamación, la expresión del citocromo P450 (CYP) 2E1 y diversos parámetros bioquímicos en ratas alimentadas con dieta rica en grasas



(HFD), ha mostrado un efecto protector contra la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), siendo la quercetina la que presentó mejores resultados de los tres compuestos (Lamson y Brignall, 2000). En otro estudio en el que se comparaban el efecto de varios flavonoides en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática, donde células HepG2 crecen en un medio enriquecido con ácido oleico, la quercetina demostró tener una gran capacidad para disminuir los ROS y los TG mostrando una citotoxicidad muy baja en comparación al resto de flavonoides utilizados en el ensayo (Lamson y Brignall, 2000) Finalmente, la farmacocinética de la quercetina ha mostrado que tiene una vida media en sangre elevada que está en torno a 11-28 h dependiendo de si el suministro de quercetina es puntual o continuo (Boots y cols., 2008).

Varios estudios han demostrado que la quercetina es capaz de mejorar la resistencia a la insulina y la acumulación de lípidos hepáticos en diferentes modelos de NAFLD. La quercetina indujo en modelo *in vitro*, la fosforilación del receptor de insulina (IR)  $\beta$  y el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1), lo que sugiere que el flavonoide mejora la resistencia a la insulina mediante el aumento de la transducción de la señal de insulina (Tuñón y cols., 2009; Pisonero-Vaquero y cols., 2015)

La quercetina también tiene la capacidad de regular el metabolismo lipídico a través de los propios genes implicados en el metabolismo de los lípidos o a través de los genes implicados en su regulación. Se ha comprobado en modelos *in vitro* usando medios ricos en ácido oleico, que el contenido de TG y de lípidos intracelulares en general se reducen de forma dependiente de la dosis de quercetina suministrada y han mostrado que la quercetina mejoraba la acumulación de lípidos hepáticos mediante la regulación de PPAR $\alpha$ , SREBP-1c y síntesis de ácidos grasos mediada por FAS, ApoB-100 (Vidyashankar y cols., 2013; Zhang y cols., 2011).

Estudios realizados en modelos *in vitro* de inflamación hepática indican que el flavonoide quercetina tiene un claro efecto protector frente a las alteraciones de carácter oxidativo e inflamatorio, actuando sobre la formación de ROS y la inducción de iNOS, IL-6 y TNF- $\alpha$  mediada por NF- $\kappa$ B, mostrando una cierta relación dosis-efecto y siendo capaz de bloquear, asimismo, vías de inflamación relacionadas con la PKC e inhibir la expresión génica de la enzima COX-2 (García-Mediavilla y cols., 2007). Los efectos beneficiosos de la quercetina sobre la fibrogénesis y el estado inflamatorio podrían estar relacionados con la capacidad del flavonoide para reducir la expresión de TLR-4 (Marcolin y cols., 2012) y reducción de la fosforilación de la quinasa terminal c-Jun (JNK) y la inactivación de la ruta del NF- $\kappa$ B/iNOS silenciando la regulación sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD, lo que conduce a una menor transcripción de las citoquina inflamatoria (Marcolin y cols., 2012).

En cuanto a la función anticancerígena de los flavonoides, además de eliminar ROS como inductor de cáncer, la quercetina puede actuar modulando múltiples vías de señalización (Vargas y Burd, 2010; Bruning 2013; Kumar y Pandey 2013; D'Andrea

2015; Schmidt y cols., 2015). Entre ellas, destacar la activación de la vías de señalización celular PI3K/AKT, impidiendo la transducción de la señal al inhibir la fosforilación de Akt (Bruning, 2013), que como ya hemos visto anteriormente tiene una gran influencia sobre los mecanismos de NAFLD.

Además del efecto antioxidante de la quercetina, esta puede tener un efecto beneficioso en el tratamiento del cáncer, del envejecimiento celular, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias en el asma, en la diabetes, como gastroprotector e incluso como antibacteriana (D'Andrea, 2015). Por lo tanto, cabe esperar que la quercetina tenga aplicación en el tratamiento de NAFLD modulando el metabolismo del hepatocito, el estrés oxidativo, la IR, la inflamación y previniendo del HCC (Pisonero-Vaquero y cols., 2015).



## **OBJETIVOS**

El objetivo general de la presente tesis doctoral es profundizar en los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo y evolución de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, esclareciendo cómo las vías de señalización modulan la inflamación y la regulación del metabolismo lipídico a través de reguladores transcripcionales. Para alcanzar dicho objetivo general se utilizaron modelos nutricionales basados en la deficiencia en metionina y colina (MCD) en los modelos *in vivo* e *in vitro* (ratones alimentados con dieta MCD o células Huh7 suplementadas con un medio MCD, respectivamente), en los que se estudiaron los posibles efectos beneficiosos del tratamiento experimental con el flavonoide quercetina sobre los mecanismos de establecimiento y evolución de NAFLD, incluyendo aquellos involucrados en su progresión a hepatocarcinoma.

Con el fin de alcanzar dicho objetivo general en el presente estudio se abordan los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer en qué grado nuestros modelos MCD son capaces de reproducir la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Evaluar en condiciones basales y tras el tratamiento con quercetina en el modelo *in vivo* las alteraciones histopatológicas del hígado, los parámetros bioquímicos plasmáticos, el acúmulo lipídico intrahepatocitario y la peroxidación lipídica. En el modelo *in vitro*, comprobar el acúmulo de lípidos en las células, el desarrollo de estrés oxidativo y la subsecuente peroxidación lipídica.
2. Estudiar la expresión génica de los principales genes implicados en la regulación del metabolismo lipídico en condiciones basales y tras la suplementación del medio o de la dieta con quercetina para ambos modelos. Evaluar la expresión de genes implicados en la captación y transporte de ácidos grasos (FAT/CD36, FABP1 o FATP5) y los que participan en la síntesis *de novo* de dichos ácidos grasos (LXR $\alpha$  y SREBP-1c) y de sus principales reguladores transcripcionales (FOXA1, PPAR $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  y SHP), al actuar como moduladores del metabolismo lipídico hepatocitario.
3. Evaluar la respuesta inflamatoria en los modelos *in vivo* e *in vitro* de NAFLD en presencia y ausencia de quercetina. Estudiar la expresión génica de los principales marcadores de inflamación en NAFLD (TNF- $\alpha$ , iNOS, SOCS3 y osteopontina) y su evolución a lo largo del desarrollo de la enfermedad.
4. Estudiar la repercusión de la deficiencia en metionina y colina y de la suplementación con quercetina en las principales vías de señalización celular involucradas en el desarrollo y evolución de NAFLD en nuestros modelos experimentales. Estudio de la activación de la vía PI3K/AKT/PTEN, estableciéndose la relación entre la proteína Akt activada y no activada y la expresión de PTEN. Evaluación de la activación de la vía dependiente del factor nuclear NF- $\kappa$ B, mediante la cuantificación de la proteína p65 en el núcleo en el desarrollo de la enfermedad.

5. Establecer en nuestro modelo *in vivo* de NAFLD la contribución de la activación del inflammasoma y del desarrollo de estrés de retículo endoplásmico y el posible efecto protector del tratamiento con quercetina. Estudio de la expresión génica de los genes involucrados en la activación de la respuesta del inflammasoma (NLRP3) y de la aparición de estrés de retículo (GRP78 y CHOP).
6. Establecer el efecto de la inhibición de la vía de señalización dependiente de PI3K mediante la administración de LY294002 en los distintos grupos de estudio de nuestro modelo *in vitro* de NAFLD, en aspectos relacionados con el acúmulo lipídico, el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, la inflamación y la desregulación del metabolismo lipídico.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1.7. MODELO *IN VIVO* DE NAFLD

### *Animales y protocolo experimental*

Para llevar a cabo el modelo *in vivo* de NAFLD, se ha utilizado un modelo nutricional (dieta deficiente en colina y metionina) en ratones macho C57BL/6J de 7 semanas. La elección de dicha cepa se debe a que los animales son capaces de desarrollar características histológicas muy parecidas a las que existen en la esteatohepatitis no alcohólica en humanos (Leclercq y cols., 2007; Koppe y cols., 2004; Yu y cols., 2007). Dicha dieta induce el desarrollo de una enfermedad hepática similar a la esteatohepatitis humana (Anstee y Goldin, 2006; Leclercq y cols., 2000). Una vez que los animales se aclimataron fueron divididos en 4 grupos experimentales en función de la dieta:

1. **Grupo CONTROL:** Animales alimentados durante 4 semanas con dieta control (dieta deficiente en metionina y colina suplementada con DL-metionina (3g/kg) y colina (2g/Kg)). n=10
2. **Grupo CONTROL + quercetina:** Animales alimentados durante 4 semanas con la dieta control suplementada con quercetina (0,05% p/p). n=10
3. **Grupo MCD:** Animales alimentados durante 4 semanas con dieta deficiente en metionina y colina (MCD). n=10
4. **Grupo MCD + quercetina (MCD Q):** Animales alimentados durante 4 semanas con dieta MCD suplementada con quercetina (0,05% p/p). n=10

Esta parte del proyecto se llevo a cabo en el Servicio de Animalario de la Universidad de León, el cual nos proporcionó la infraestructura general para la ejecución de los estudios experimentales con animales, así como el mantenimiento de los mismos en las condiciones adecuadas de alojamiento y cuidados, respetando la normativa vigente recogida en el Real Decreto 53/2013 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, en la Directiva Europea 2010/63/UE y en las pautas recogidas en la normativa GLP (*Good Laboratory Practices*).

Durante el estudio, se procedió al sacrificio de los animales a distintos intervalos de tiempo (2, 3 y 4 semanas). Para ello, los animales fueron previamente anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina/xilacina, procediéndose a la recogida de la sangre mediante punción cardíaca, extrayéndose posteriormente el hígado. La sangre recogida fue centrifugada para la obtención del plasma. Del hígado, una fracción fue congelada a -80°C hasta el momento de las determinaciones analíticas (determinación de proteínas, bioquímica, estudios de fluorescencia), otra fracción fue protegida adecuadamente para la extracción posterior de ARN (*RNA later*). Finalmente, otra parte será fijada en formaldehído al 10% para llevar a cabo los estudios histológicos.

## 1.8. MODELO *IN VITRO* DE NAFLD

### *Células, cultivo celular y tratamientos*

Para llevar a cabo el modelo *in vitro* de NAFLD, se utilizó la línea celular establecida derivada de hepatocarcinoma humano Huh7 (*American Type Culture Collection* (ATCC)). El mantenimiento de dichas células se llevó a cabo utilizando los incubadores de CO<sub>2</sub> y las cabinas de seguridad biológica de las salas de cultivo del Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León.

Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM/Ham'sF12 (Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor y 50 mg/ml de gentamicina hasta alcanzar una confluencia del 80%. En dicho momento, las células se incubaron en medio de cultivo completo control o en medio deficiente en metionina y colina (MCD) durante 24 h (Sahai y cols., 2006). En dicho modelo experimental de NAFLD se probó la posible utilidad terapéutica del tratamiento experimental con el flavonol quercetina (Sigma-Aldrich) administrándolo a una concentración de 10 µM en disolución en DMSO durante 24 h y el efecto de la inhibición de la vía PI3K/AKT mediante la incubación de las células con LY294002 50 µM (Tocris Bioscience) durante las últimas 8 h de tratamiento. Las células sin inhibidor fueron incubadas también con DMSO a la misma concentración (0,05%). La quercetina a la dosis considerada en el presente estudio tiene un claro efecto protector frente a las alteraciones de carácter oxidativo e inflamatorio (Crespo y cols., 2008; Dionisio y cols., 2009; García-Mediavilla y cols., 2007).

## 1.9. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 1.9.1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y DE FLUORESCENCIA EN EL MODELO *IN VIVO* DE NAFLD

Dichos estudios se llevaron a cabo con el fin de valorar las lesiones histopatológicas y cuantificar el grado de inflamación hepática en nuestro modelo de enfermedad de hígado graso no alcohólico. Las muestras de hígado se fijaron mediante inmersión en formaldehído al 10% durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se deshidrataron en etanol de graduación creciente y posteriormente en xileno. Después de la deshidratación se incluyeron en parafina en estufa a 60°C durante 24 h, obteniéndose bloques que se cortaron con microtomo. Las secciones obtenidas se tiñeron con hematoxilina y eosina para evaluar semicuantitativamente el grado de esteatosis y esteatohepatitis. Las lesiones fueron evaluadas de acuerdo el índice de actividad de la enfermedad (*NAS; NAFLD Activity Score*) estandarizado por Kleiner (Kleiner y cols., 2005), clasificándose la esteatosis (0-3), la inflamación lobulillar (0-3) y la balonización (0-2). Las muestras con puntuaciones de más de 5 se diagnosticaran

como NASH, y con puntuación de menos de 3 se diagnosticarán como "no NASH". Asimismo se realizaron cortes de 5  $\mu\text{M}$  de las muestras de hígado congelado y se tiñeron posteriormente con *Oil red O* para la visualización histológica de las grasas neutras.

Para los estudios de fluorescencia e inmunofluorescencia se utilizaron cortes de 5  $\mu\text{M}$  de las muestras de hígado congelado. Para cuantificar el acúmulo intrahepático de lípidos se utilizó el fluoróforo Bodipy 493/503 y para cuantificar la lipoperoxidación, Bodipy 581/591 C11 a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los cortes fueron incubados 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron con PBS 1X. Después de dicho marcaje las muestras se incubaron durante 1 minuto con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción de los núcleos celulares, tras lo cual se lavaron con PBS 1X y se montaron con el medio de montaje *DakoCytomation Fluorescent* (DAKO) para su observación mediante un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse).

Para los estudios de inmunofluorescencia dichos cortes hepáticos se incubaron con el anticuerpo anti-FAT/CD36 (Santa Cruz Biotechnology), a 4°C durante toda la noche, incubándose posteriormente con el anticuerpo secundario de burro anti-conejo conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch) durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las preparaciones fueron incubadas con DAPI y Bodipy 493/503 para la tinción de los núcleos y de los lípidos intracelulares, respectivamente, tras lo cual fueron lavadas con PBS 1X y montadas con medio de montaje *DakoCytomation Fluorescent* (DAKO) para su observación mediante un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse).

### **1.9.2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS EN EL MODELO *IN VIVO* DE NAFLD**

Las muestras sanguíneas se centrifugaron el mismo día de la recogida (4°C, 2.500 xg, 5 min) y los plasmas obtenidos se procesaron inmediatamente en el autoanalizador Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics), mediante técnicas colorimétricas, siguiendo el protocolo experimental proporcionado por la empresa. Los parámetros valorados en cada uno de ellos fueron: albúmina, alanina amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y glucosa.

### **1.9.3. CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS Y ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN EL MODELO *IN VIVO* DE NAFLD**

La cuantificación de los triglicéridos (TG) y de los ácidos grasos libres (FFA) en el tejido hepático se realizó en el homogeneizado hepático usando kits comerciales siguiendo el protocolo indicado (Biovision Research Products).

#### **1.9.4. VIABILIDAD CELULAR**

Con el fin de determinar si los distintos tratamientos empleados en el estudio afectaban a la viabilidad celular, se usó una prueba basada en la capacidad de las deshidrogenasas de las células viables de hidrolizar el compuesto MTT (*3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*), dando lugar a cristales de formazán de color púrpura. Para ello, se cultivaron las células a una densidad de 40.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos con los diferentes tratamientos. Tras finalizar los tratamientos, se aspiró el medio, se lavó con PBS y se añadió a cada pocillo 1 ml de medio sin suero, ya que éste interfiere en la lectura, añadiéndose 100 µl de MTT (Sigma-Aldrich) disuelto en PBS a 5 mg/ml, sonificado previamente durante 5 minutos. Posteriormente las células se incubaron durante 3 horas, a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se retiró el medio con el MTT y se añadió 1 ml de DMSO por pocillo, agitándose en un vórtex durante 5 minutos para disolver el precipitado y se leyó la placa a 560 nm en el lector de placas (Bio-Rad Laboratories). Por último, la viabilidad se calculó a partir de la absorbancia por comparación con las células control (% de viabilidad).

#### **1.9.5. CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN EL MODELO *IN VITRO* DE NAFLD**

Inmediatamente después de la recogida de las células, se procedió a la cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), los lípidos totales, así como la peroxidación lipídica mediante citometría de flujo, utilizando la diferente intensidad de fluorescencia emitida por las células como medida de las mismas.

Así, para la producción de ROS y RNS se utilizó el fluoróforo 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (Sigma-Aldrich), la cuantificación del acúmulo intrahepatocitario de lípidos y la peroxidación lipídica se analizaron utilizando Bodipy 493/503 y Bodipy 581/591 C11 (Invitrogen™), respectivamente.

Para ello, se procedió a la recogida de las células mediante tripsinización y la suspensión celular obtenida se incubó con el fluoróforo correspondiente (5 µM para DCFH-DA y Bodipy 493/503 o 1 µg/ml para Bodipy 581/591 C11) durante 30 minutos a 37°C, en condiciones de agitación y oscuridad. Posteriormente, se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS 1X, analizándose en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences). La fluorescencia emitida por la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF, canal FL-1), por el Bodipy 493/503 (canal FL-1) y por el Bodipy 581/591 C11 (FL-2) correspondiente a 10.000 células se cuantificó mediante el *software* CellQuest (Becton Dickinson Biosciences), siendo la fluorescencia emitida por las células proporcional a la concentración de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, de lípidos intracelulares o peroxidación lipídica.

Asimismo, la acumulación intrahepatocitaria de lípidos, la existencia de peroxidación lipídica, así como la captación de ácidos grasos se determinó por microscopía de fluorescencia utilizando los fluoróforos Bodipy 493/503, Bodipy 581/591 C11 y Bodipy FL C12 (Invitrogen), respectivamente. Para ello, se lavaron las células con PBS 1X y se fijaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 3,7% en PBS 1X. Transcurrido este tiempo las células se lavaron de nuevo y se incubaron con 1 µg/ml de Bodipy 581/591 C11 o Bodipy 493/503 en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para cuantificar la captación de ácidos grasos, se añadió el Bodipy FL C12 al cultivo celular al comienzo de los distintos tratamientos y las células se fijaron a 0, 8 y 24 horas después de la adición del fluoróforo.

Después del marcaje con los fluoróforos correspondientes, las preparaciones se incubaron durante 1 minuto con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción de los núcleos, tras lo cual se lavaron con PBS 1X y se montaron con medio de montaje DakoCytomation Fluorescent (DAKO) para su observación mediante un microscopio de invertido (Nikon Eclipse Ti).

## 1.10. WESTERN BLOT

El estudio de la activación de la vía PI3K/AKT/PTEN y de la vía dependiente del factor nuclear NF-κB, se llevó a cabo mediante la cuantificación de la proteína AKT, tanto fosforilada como sin fosforilar, de la proteína PTEN, tanto fosforilada como sin fosforilar y de la proteína p65, mediante la técnica de Western blot.

### 1.10.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

**Fracción citoplasmática:** Para la extracción de la fracción citoplasmática, las muestras hepáticas o celulares se homogeneizaron o sonicaron (Ciclo: 1, Amplitud: 60%, en hielo, mediante dos pulsos de 20 segundos), en tampón sacarosa 0,25M, EDTA 1 mM y Tris 10 mM, suplementado con una mezcla de inhibidores de fosfatasa y de proteasas (Roche Diagnostics), el homogenizado así obtenido se conservó a -80°C.

**Fracción nuclear:** Para la extracción de la fracción nuclear, se homogeneizaron 50 mg de tejido en tampón A (10 mM de Hepes, 10 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA-Na y 0,1 mM de EGTA), suplementado con una mezcla de inhibidores de fosfatasa y de proteasas (Roche Diagnostics). Posteriormente, se dejó en hielo durante 15 min, y se añadieron 50 µL de Nonidet™ P-40 (Sigma-Aldrich®) al 10% en tampón A, agitándose la muestra durante 10 segundos en un vórtex, se incubó en hielo durante 1 min, centrifugándose posteriormente a 14.000 xg a 4°C. El *pellet* resultante se resuspendió en 60µl del tampón B (20 mM de Hepes, 0,4 mM de NaCl, 1 mM EDTA-Na, 1 mM EGTA y 20% glicerol), suplementado con una mezcla de inhibidores de fosfatasa y de

proteasas (Roche Diagnostics), y se incubó durante 15 minutos en hielo y se agitó cada 5 min con el vórtex, centrifugándose a 14.000 xg durante 4 min a 4°C, el *pellet* así obtenido se conservó a -80°C.

### **1.10.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA**

Una vez obtenidos los homogenizados, se procedió a la cuantificación proteica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, en una placa de 96 pocillos se preparó una recta patrón de albúmina y se añadió 1 µl de muestra más 159 µl de agua milliQ en cada pocillo. A todos los pocillos de la recta patrón y de las muestras se les añadió 40 µl de Azul Brillante Coomassie (Bio-Rad), agitándose posteriormente e incubándose en oscuridad durante 10 minutos. Después se procedió a leer la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (BioTek), usando el programa Gen 5. Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se calculó la concentración de proteína en las muestras por comparación con la recta patrón.

### **1.10.3. PREPARACIÓN DEL GEL**

La electroforesis se llevó a cabo en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), la cual, mediante la acción detergente del SDS separa la proteína exclusivamente en función del peso molecular. Para ello se utilizó un gel discontinuo formado por dos zonas diferenciadas, el *stacking* y el *running*.

El *running* se preparó a diferentes concentraciones, que van del 9% al 12%, dependiendo de peso molecular de la proteína a analizar. En esta zona es donde realmente se produce la separación de la proteína. Para preparar el gel se realizó la siguiente mezcla:

1,8-2,4 ml de acrilamida/bis acrilamida 29:1 (Bio-Rad)

2,6-2 ml de H<sub>2</sub>O milliQ

1,5 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

60 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% (Bio-Rad)

30 µl de persulfato amónico (APS) al 10% (Bio-Rad)

3 µl de tetrametiletilendiamida (TEMED) (Bio-Rad)

El *stacking* se preparó a una concentración baja de poliacrilamida (4%), es la parte donde cargamos la muestra y la encargada de hacer una primera separación por tamaño de las proteínas de la muestra permitiendo que las del mismo tamaño entren

en el *running* a la vez, aumentando la resolución de las bandas. Para preparar el gel se realizó la siguiente mezcla:

0,4 ml de acrilamida/bis acrilamida 29:1 (Bio-Rad)

2 ml de H<sub>2</sub>O milliQ

3,3 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

33,3 µl de SDS al 10% (Bio-Rad)

16,7 µl de APS al 10% (Bio-Rad)

3,3 µl de TEMED (Bio-Rad)

#### **1.10.4. PREPARACIÓN Y CARGA DE LAS MUESTRAS**

Las muestras a cargar en el gel se prepararon mezclando los microlitros de muestra correspondientes a 100 µg de proteína con agua milli-Q hasta un volumen de 75 µl y se le añadieron 25 µl del tampón de Laemmli 4X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 40%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,008% y β-mercaptoetanol 10%). Una vez realizada la mezcla, se calentó a 100°C durante 3 minutos para que el β-mercaptoetanol actúe como reductor. De esta mezcla, se cargaron hasta 20 µg en cada pocillo. Del marcador de peso molecular (Thermo Scientific) se cargaron 3 µl. Una vez cargadas todas las muestras en el gel, se llevó a cabo la electroforesis a bajo voltaje (40-60 V) hasta que las muestras pasaron el *stacking* y posteriormente se subió a un voltaje de 80-120 V hasta el final.

#### **1.10.5. TRANSFERENCIA**

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la transferencia semiseca de las proteínas del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Bio-Rad), la cual es activada por inmersión en metanol 15 segundos, posteriormente se lava en agua milli-Q 2 minutos y se pasa a solución de transferencia hasta su utilización. Para la transferencia, se sacaron los geles de los cristales y se introdujeron en solución de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 13 V durante 30 minutos (*Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* de BioRad).

#### **1.10.6. BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS**

Una vez finalizada la transferencia, se llevó a cabo el bloqueo de los sitios inespecíficos de las proteínas mediante la introducción de la membrana en leche al 2,5% disuelta en PBS Tween, 30 minutos a 37°C. Transcurridos los 30 minutos, se añadió el anticuerpo primario de conejo anti-pAKT (Ser 473; Santa Cruz Biotechnology), anti-AKT (Santa Cruz Biotechnology), anti-PTEN (Abcam), anti-pPTEN

(Abcam) o anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology) disuelto en leche al 2,5% en PBS Tween, para detectar las proteínas de interés. El anticuerpo primario se dejó toda la noche a 4°C, y al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS Tween (0,05%) cada 10 minutos, se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo disuelto en leche al 3% en PBS Tween. El anticuerpo secundario se dejó incubando durante 90 min temperatura ambiente y al finalizar, se realizaron tres lavados con PBS Tween y uno con PBS 1x, cada 10 minutos aproximadamente.

#### **1.10.7. REVELADO**

Para el revelado, se introdujo la membrana durante 1 minuto en ECL (potenciador de quimioluminiscencia) (ECL kit, Amersham Pharmacia), se metió en una funda de plástico dentro de un *cassette* y en oscuridad se colocó una película (Bio-Rad) encima de la membrana. Transcurrido un tiempo, se reveló la película introduciéndola en revelador (Fujifilm Hunt Chemicals) hasta aparecer las bandas deseadas, agua, fijador (Fujifilm Hunt Chemicals) y por último tras un lavado con agua se dejó secar. La densidad óptica de las bandas específicas se cuantificó mediante el programa *ImageJ* (Bethesda).

### **1.11. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL**

#### **1.11.1. EXTRACCIÓN DE ARN**

Para la extracción de ARN total se siguió una modificación del protocolo descrito por Chomczynsky y Satchi (1987). Para el lisado de las muestras se usó el reactivo Trizol (*TRI Reagent® Solution*, Life Technologies).

Para el modelo *in vitro*, una vez retirado el medio de cultivo se añadieron 3 ml de *TRI Reagent® Solution* por cada frasco (de 75 cm<sup>2</sup> de superficie), se rascó la superficie y se recogieron las células en *ependorfs* estériles. Las muestras de hígado conservadas en *RNAlater* se homogeneizaron en un *potter* empleando 1 ml del reactivo Trizol. A cada uno de los lisados con Trizol se le añadió cloroformo (1:4) y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, agitándose posteriormente en vórtex durante 15 segundos. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose después 12.000 xg durante 10-15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se recogió la fase acuosa obtenida en la fase de separación y se añadieron 500 µl de isopropanol por cada ml de Trizol. Se agitó la mezcla en vórtex a velocidad moderada durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose posteriormente a 12.000 xg durante 8 minutos a 4°C desechando el sobrenadante con cuidado de no tocar el *pellet*. El precipitado así obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75% preparado con agua DEPC (Ambion®) y se realizó otra centrifugación a 7.500 xg durante 5 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante, el *pellet* obtenido se resuspendió



en 100  $\mu$ l de agua DEPC y finalmente se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior cuantificación.

### **1.11.2. CUANTIFICACIÓN DE ARN**

El ARN obtenido se cuantificó midiendo la densidad óptica (DO) a 260 nm mediante un espectrofotómetro Nano Drop 2000 (1 unidad de DO equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ARN). La pureza del ARN se comprobó a través de la relación DO 260/280 debiendo encontrarse dicho valor dentro del intervalo  $1,7 < \text{DO} < 2$ .

### **1.11.3. TRATAMIENTO CON ADNAsas**

Una vez determinada la concentración final de ARN, se trató con ADNAsas utilizando el kit *RQ1 RNase free DNase* (Promega Corporation). Para ello, se mezclaron 8  $\mu$ l de agua DEPC conteniendo 1  $\mu\text{g}$  de ARN, 1  $\mu$ l de *RQ1 RNase-Free DNase Reaction Buffer* 10X, y 1  $\mu$ l de *RQ1 RNase-Free DNase*. La mezcla se incubó 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido ese tiempo se añadió 1  $\mu$ l de solución STOP y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  10 minutos.

### **1.11.4. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA**

Para la transformación del ARN en ADNc se utilizó el sistema *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems). Se usó la misma concentración de ARN en todas las muestras. Por cada 10  $\mu$ l (1  $\mu\text{g}$  de ARN) de la solución procedente del tratamiento con ADNAsas se preparó la siguiente mezcla de reacción:

2  $\mu$ l de tampón RT 10X

0,8  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs 25X

2  $\mu$ l de *random primers* 10X

1  $\mu$ l de Transcriptasa Reversa *MultiScribe™* (50 U/ $\mu$ l)

4,2  $\mu$ l de agua libre de nucleasas

La mezcla de reacción se incubó:

10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$

120 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$

5 minutos a  $85^{\circ}\text{C}$

Con el ADNc así obtenido, o bien se procedió a su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### 1.11.5. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR)

Para el estudio de la estimación de la concentración de ARNm de los principales genes involucrados en el desarrollo de NAFLD se realizaron PCRs cuantitativas a tiempo real utilizando una reacción multiplex mediante el uso de ensayos TaqMan (Applied Biosystems) (Tabla 1).

**Tabla 1:** *Primers* y sondas utilizadas para qPCR (bloque superior frente a muestras procedentes de los modelos *in vivo* en ratones; bloque inferior frente a muestras procedentes del modelo *in vitro*). Abreviaturas en el texto.

Gen	Genbank	ID del ensayo	Tamaño del amplicon	Fluoróforo
LXR $\alpha$	NM_001177730.1	Mm00443454_m1	79	FAM <sup>TM</sup>
SREBP-1c	NM_011480.3	Mm00550338_m1	62	FAM <sup>TM</sup>
FAT/CD36	NM_001159555.1	Mm01135198_m1	112	FAM <sup>TM</sup>
FATP5	NM_009512.2	Mm00447768_m1	96	FAM <sup>TM</sup>
FABP1	NM_017399.4	Mm00444340_m1	72	FAM <sup>TM</sup>
FOXA1	NM_008259.3	Mm00484713_m1	68	FAM <sup>TM</sup>
PPAR $\alpha$	NM_001113418.1	Mm00440939_m1	74	FAM <sup>TM</sup>
C/EBP $\alpha$	NM_007678.3	Mm00514283_s1	99	FAM <sup>TM</sup>
C/EBP $\beta$	NM_009883.3	Mm00843434_s1	159	FAM <sup>TM</sup>
SHP	NM_011850.2	Mm00442278_m1	73	FAM <sup>TM</sup>
TNF- $\alpha$	NM_001278601.1	Mm00443258_m1	81	FAM <sup>TM</sup>
OPN	NM_001204201.1	Mm01204014_m1	64	FAM <sup>TM</sup>
SOCS3	NM_007707.3	Mm00545913_s1	76	FAM <sup>TM</sup>
iNOS	NM_010927.3	Mm00440485_m1	70	FAM <sup>TM</sup>
NLRP3	NM_145827.3	Mm00840904_m1	84	FAM <sup>TM</sup>
GRP78	NM_001163434.1	Mm00517691_m1	75	FAM <sup>TM</sup>

CHOP	NM_007837.4	Mm00492097_m1	82	FAM <sup>TM</sup>
GAPDH	NM_008084.2	4352339E	107	VIC <sup>TM</sup>
LXR $\alpha$	NM_005693.2	Hs00172885_m1	78	FAM <sup>TM</sup>
SREBP-1c	NM_001005291.2	Hs01088691_m1	90	FAM <sup>TM</sup>
FAT/CD36	NM_000072.3	Hs01567186-m1	126	FAM <sup>TM</sup>
FATP5	NM_012254.2	Hs00202073_m1	73	FAM <sup>TM</sup>
FABP1	NM_001443.2	Hs00155026_m1	71	FAM <sup>TM</sup>
FOXA1	NM_004496.3	Hs00270129_m1	74	FAM <sup>TM</sup>
PPAR $\alpha$	NM_001001928.2	Hs00947539_m1	126	FAM <sup>TM</sup>
C/EBP $\alpha$	NM_004364.3	HS00269972_s1	77	FAM <sup>TM</sup>
C/EBP $\beta$	NM_005194.3	Hs00270923_s1	75	FAM <sup>TM</sup>
SHP	NM_021969.2	Hs00222677_m1	87	FAM <sup>TM</sup>
TNF- $\alpha$	NM_000594.3	Hs00174128_m1	80	FAM <sup>TM</sup>
SOCS3	NM_003955.4	Hs01000485_g1	111	FAM <sup>TM</sup>
iNOS	NM_000625.4	Hs00167248_m1	74	FAM <sup>TM</sup>
GAPDH	NM_002046.3	4326317E	122	VIC <sup>TM</sup>

Para cada placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 20  $\mu$ l:

1  $\mu$ l de la mezcla *primers*/sonda del gen problema

1  $\mu$ l de la mezcla *primers*/sonda del gen de referencia

7  $\mu$ l de agua libre de nucleasas

1  $\mu$ l de ADNc

10  $\mu$ l de Taqman Universal PCR master mix (2x, Applied Biosystems)

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

Etapa inicial de 10 minutos a 95°C

Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C

Etapas de anillamiento y elongación de 1 minuto a 60°C

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 45 ciclos. Como gen de referencia para normalizar la señal entre las diferentes muestras se amplificó un fragmento específico del gen GAPDH (AppliedBiosystems) marcado en VIC. Además, cada experimento incluyó un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no fueron sometidas a la transcripción reversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que contaminase previamente la muestra. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador *StepOne Plus* (AppliedBiosystems). Los cambios relativos de la expresión génica se determinaron mediante cálculo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **1.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como medias y error estándar de la media (EEM). Los datos se evaluaron mediante la prueba ANOVA combinada con la prueba t-Student. Se exigió una  $P < 0,05$  para conceder significación estadística a los resultados. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 17.0 (*SPSS Federal*).



## **RESULTADOS**

Debido a la falta de diferencias significativas en los resultados obtenidos para el grupo control y el grupo control suplementado con quercetina, hemos considerado al grupo control suplementado con quercetina como grupo control.

### 1.13. LA QUERCETINA MEJORA LOS HALLAZGOS HISTOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN LOS RATONES ALIMENTADOS CON MCD

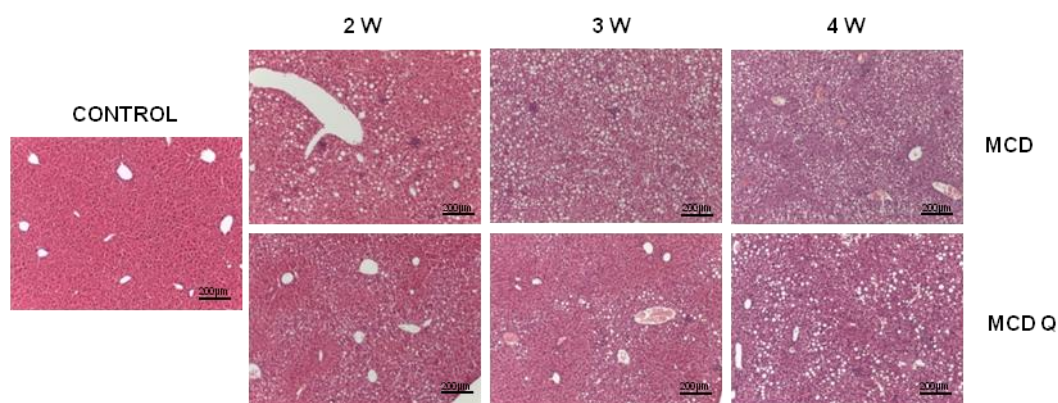
En la Tabla 2 se muestra la evolución del peso corporal y hepático en los distintos grupos experimentales (Control, MCD o MCD Q). Los ratones alimentados con la dieta MCD mostraron una reducción significativa en el peso corporal y hepático en comparación con el grupo control (2S: -24,3%; 3S: -36,4%; 4S: -40% y 2S: -47%; 3S: -52%; 4S: -47%, respectivamente), no viéndose modificados por el tratamiento con quercetina.

**Tabla 2:** Efecto de la dieta MCD y de la quercetina sobre el peso corporal y hepático en los ratones C57BL/6J.

2S	CONTROL	MCD	MCD Q
<b>Peso Corporal (g)</b>	24,00 ± 1,00	18,17 ± 0,40***	18,00 ± 0,52***
<b>Peso Hepático (g)</b>	1,35 ± 0,05	0,72 ± 0,02***	0,72 ± 0,03***
<b>Relación Hepatosomática (%)</b>	5,63 ± 0,03	3,95 ± 0,04**	3,98 ± 0,10**
3S	CONTROL	MCD	MCD Q
<b>Peso Corporal (g)</b>	25,67 ± 1,45	16,33 ± 0,49***	17,00 ± 0,26***
<b>Peso Hepático (g)</b>	1,30 ± 0,06	0,62 ± 0,03***	0,63 ± 0,05***
<b>Relación Hepatosomática (%)</b>	5,07 ± 0,07	3,81 ± 0,29**	3,72 ± 0,27**
4S	CONTROL	MCD	MCD Q
<b>Peso Corporal (g)</b>	26,00 ± 0,58	15,67 ± 0,33***	15,67 ± 0,42***
<b>Peso Hepático (g)</b>	1,17 ± 0,03	0,62 ± 0,03***	0,58 ± 0,03***
<b>Relación Hepatosomática (%)</b>	4,49 ± 0,07	3,94 ± 0,21	3,71 ± 0,11

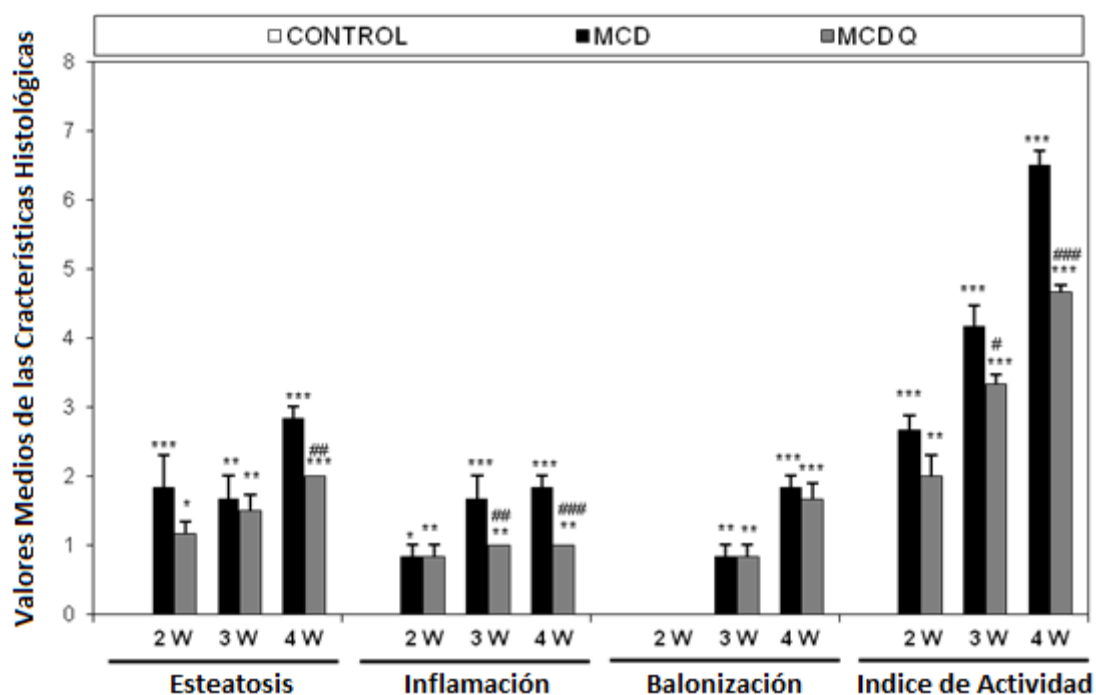
Valores medios ± EEM (n=6 ratones por grupo). \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL.

Como se muestra en la Figura 23, la administración de la dieta MCD provocó el desarrollo fisiopatológico clásico de NASH, con esteatosis micro y macrovesicular, indicando una alteración del metabolismo lipídico, y con la presencia de múltiples focos de inflamación. Los ratones alimentados con la dieta MCD suplementada con quercetina, mostraron una apariencia histológica muy próxima al hígado normal.



**Figura 23:** Efecto de la dieta MCD y la quercetina sobre la histología hepática. Microfotografías representativas de secciones de hígados de ratones C57BL/6J después de la alimentación con la dieta MCD suplementada o no con quercetina durante 2, 3 y 4 semanas comparado con el control (x100).

El análisis histopatológico reveló un aumento de la esteatosis, inflamación y balonización a lo largo de las 4 semanas. El tratamiento con quercetina provocó una reducción en el índice de actividad de la enfermedad (*NAS score*, esteatosis, inflamación y balonización) (Figura 24).



**Figura 24:** Efecto de la dieta MCD y la quercetina en la histología hepática. Puntuación del índice de actividad en el desarrollo de NAFLD (calculado a partir de las puntuaciones individuales de esteatosis, inflamación y balonización). Los datos se muestran como las medias  $\pm$  EEM (n=6 ratones por grupo). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ##P <0,01, ###P<0,001 vs MCD.

Como se muestra en la Tabla 3, la dieta MCD provocó una elevación marcada y progresiva de la concentración plasmática de ALT y AST, indicativo de la existencia de daño hepático (ALT, 2S: +959%, 3S: +1.486%, 4S: +2.073%; AST, 2S: +298%, 3S: +462%, 4S: +358%). La suplementación con quercetina provocó una reducción significativa de la concentración plasmática de ALT en la tercera y cuarta semana (3S: -24%, 4S: -20%).



En cuanto a la concentración plasmática de albúmina, marcador de función hepática, en nuestro modelo nutricional de NAFLD no observamos diferencias en su concentración con ninguno de los tratamientos. Por otra parte, la concentración plasmática de glucosa se redujo significativamente en los ratones alimentados con la dieta respecto a los ratones control (2S: -36%; 3S: -54%; 4S: -69%). La suplementación con quercetina mostró una tendencia a la normalización en la cuarta semana (+59%) (Tabla 3).

Debido a que la dieta MCD incide directamente sobre la exportación de lípidos, se evaluó la concentración plasmática de lípidos. Como se muestra en la Tabla 3, la concentración de colesterol total (TC) en los ratones alimentados con dieta MCD, disminuyó significativamente a lo largo de las cuatro semanas respecto al grupo control (2S: -49%; 3S: -64%; 4S: -70%). La suplementación con quercetina no mostró diferencias significativas hasta la cuarta semana (+32% respecto a la dieta MCD). En cuanto a las concentraciones de HDL y LDL, encontramos un comportamiento similar al colesterol total, ambos muestran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo MCD a partir de la segunda semana (HDL, 2S: -64%, 3S: -78%, 4S: -79%; LDL: -49%, 3S: -69%, 4S: -70%). La suplementación con quercetina no mostró diferencias significativas.

Por último, nuestros resultados muestran una disminución gradual y significativa (2S: -49%, 3S: -49%, 4S: -75%) de la concentración de triglicéridos (TG) en los ratones con dieta MCD respecto al grupo control. El tratamiento con quercetina, mostró un aumento significativo, a partir de la tercera semana (3S: +28%, 4S: +95%), respecto al grupo MCD.

**Tabla 3:** Efecto de la dieta MCD y de la quercetina sobre los marcadores bioquímicos en los ratones C57BL/6J.

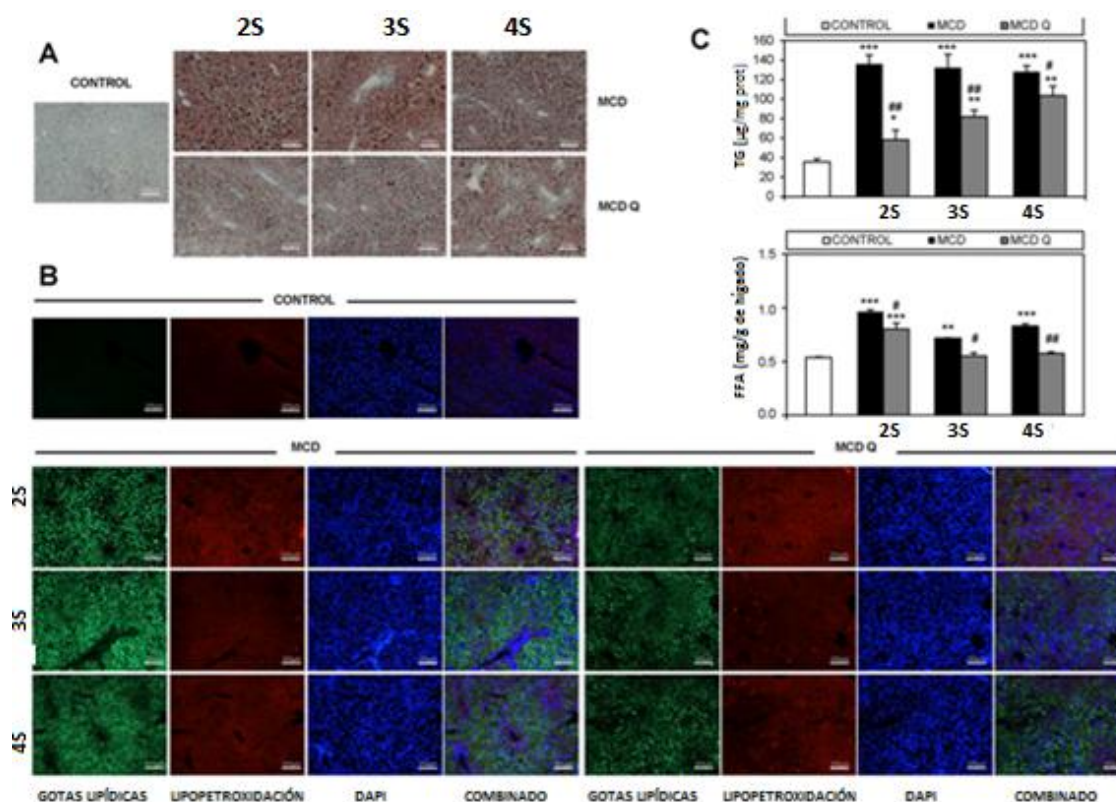
	2S			3S			4S		
	CONTROL	MCD	MCD Q	CONTROL	MCD	MCD Q	CONTROL	MCD	MCD Q
<b>AST (U/l)</b>	101±4	402±9***	437±11***	82±5	461±12***	459±16***	107±8	490±9***	483±8***
<b>ALT (U/l)</b>	37,5±2	397±13***	393±9***	30,2±2	479±15***	362±12***#	30,6±2	665±15***	532±16***#
<b>Albúmina (g/l)</b>	12±2,2	16,4±0,5	16,2±0,7	14,7±0,6	15,8±0,4	15,5±0,7	14,3±1,2	15,1±1,5	12,6±1,1
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	299±12	191±7*	192±7*	322±16	147±17***	144±15***	265±4	83±3***	132±7**#
<b>TC (mg/dl)</b>	76±1,5	38,7±1,4***	36,1±2,74***	85,7±2,2	30,4±3,5***	29,5±2,9***	78,4±5,1	23,7±1,3***	31,3±1,3***
<b>HDL (mg/dl)</b>	37±3,4	13,4±0,5***	13,8±1,6***	41±2,4	9±0,6***	10,3±0,7***	37±2,7	7,6±1,1***	9,3±0,5***
<b>LDL (mg/dl)</b>	4,7±0,3	2,4±0,2**	2,1±0,1**	4,5±0,3	1,4±0,1***	1,5±0,1***	4,7±0,3	1,4±0,2***	1,6±0,1***
<b>TG (mg/dl)</b>	80±1,2	41±1,9**	41±1,7**	80±6,6	40,6±3**	52±3,1**#	75±7,8	18,6±4,1***	36,3±2,1**#

Valores medios ± EEM (n=6 ratones por grupo). \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05 respecto a los MCD.

### **1.14. LA QUERCETINA DISMINUYE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS Y LA LIPOPEROXIDACIÓN ASOCIADA A NAFLD EN EL MODELO MCD DE HÍGADO GRASO**

Una vez establecido que la dieta MCD produce un desarrollo fisiopatológico similar a la enfermedad de NAFLD en humanos, se cuantificó el acúmulo intrahepatocitario de lípidos, así como su distribución. Como se muestra en la Figura 25 A y B, la tinción con *Oil red O* y Bodipy 493/503 (verde) mostró una inducción significativa en el acúmulo intrahepático de lípidos en los ratones alimentados con la dieta MCD en comparación con los ratones del grupo control, incrementándose a medida que progresa la enfermedad. La presencia de gotas lipídicas se concentran predominantemente en la zona 1 (periportal), sobre todo en las primeras semanas, cuando el tamaño de las gotas lipídicas parece ser más grande. La quercetina fue capaz de reducir la esteatosis y parece influir en el tamaño de las gotas lipídicas tal y como se muestra en las imágenes representativas de la cuarta semana (Figura 25B), donde existe un menor número de las mismas pero más grandes en comparación con los ratones alimentados con la dieta MCD sin quercetina. Estos resultados se correlacionaron con la concentración hepática de triglicéridos (TG) y de ácidos grasos libres (FFA) los cuales aumentaron en el grupo MCD (TG, 2S: +285%, 3S: +271%, 4S: +260%; FFA, 2S: +79%, 3S: +33%, 4S: +54%) en comparación con los ratones control, y que fueron reducidos por la quercetina (TG, 2S: -57%, 3S: -38%, 4S: -19%; FFA, 2S: -17%, 3S: -23%, 4S: -30%, vs MCD) (Figura 25C).

Como se muestra en la Figura 25B la peroxidación lipídica, cuantificada con el fluoróforo Bodipy 581/591 C11 (rojo), fue marcadamente más alta en el grupo MCD comparado con el grupo control, dicho aumento fue mayor en las primeras semanas. A diferencia de la esteatosis, la peroxidación lipídica fue característicamente predominante en la región intralobulillar alrededor de la vena central, la quercetina fue también capaz de reducirla, principalmente a la cuarta semana.



**Figura 25:** Efecto de la quercetina en la acumulación hepática de lípidos y la lipoperoxidación en los ratones alimentados con dieta MCD. (A) Imágenes de secciones hepáticas representativa mediante tinción *Oil-red O* (x100). (B) Imágenes representativas de fluorescencia del acúmulo de gotas lipídicas (Bodipy 493/503, verde), y de lipoperoxidación (Bodipy 581/591 C11, rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes fusionadas con la fluorescencia verde, rojo y azul se muestran también. Las fotografías que se muestran son representativas de 6 animales por grupo. (C) Efecto de la dieta MCD y la quercetina en la concentración hepática de triglicéridos y de ácidos grasos libres. Media ± EEM (n=6 ratones por grupo). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P <0,05, ###P <0,01 vs MCD.

### 1.15. LA QUERCETINA REDUCE LA LIPOPEROXIDACIÓN REGULANDO EL ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO Y LOS GENES INFLAMATORIOS EN EL MODELO MCD DE HÍGADO GRASO

Para investigar la contribución de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de la quercetina sobre la reducción de la peroxidación lipídica se estudió el efecto de dicho flavonoide sobre la concentración del ARNm del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , la osteopontina (OPN), el supresor de señalización de citocina (SOCS)3 y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Figura 26).

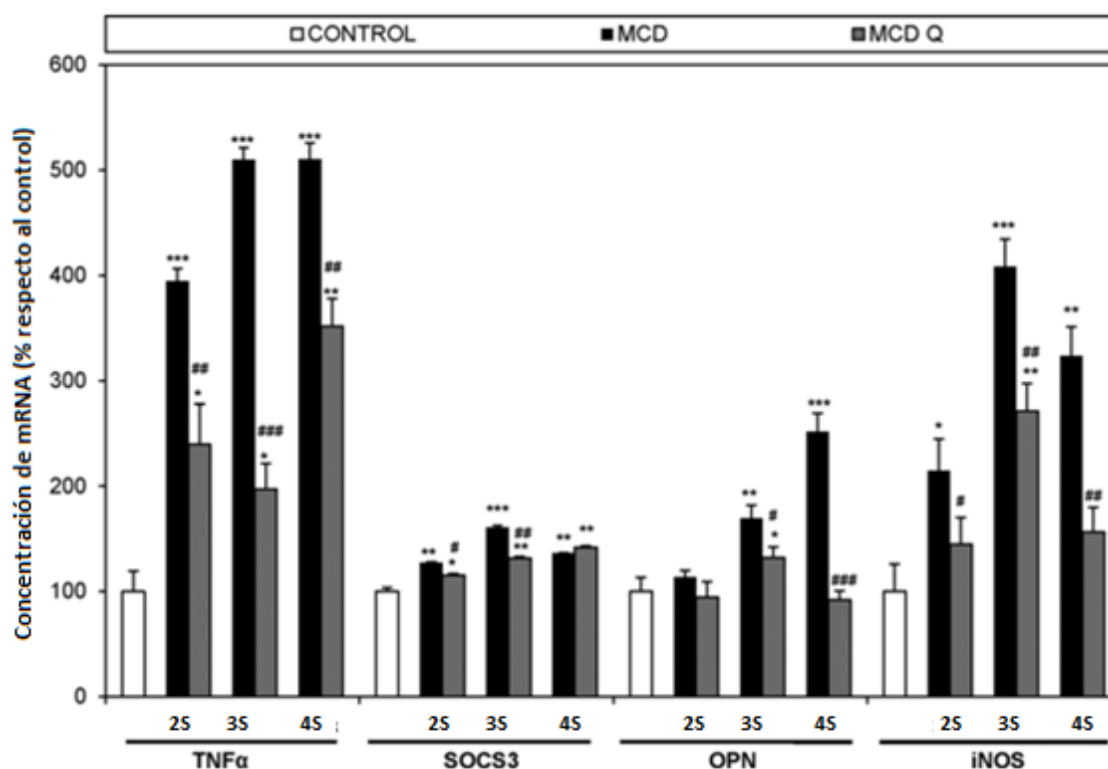
El TNF- $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria que juega un papel importante en el proceso inflamatorio de la enfermedad de NAFLD y es considerado uno de los principales marcadores de la misma. Como se muestra en la Figura 26, los ratones del grupo MCD mostraron una sobreexpresión del gen TNF- $\alpha$  (2S: +295%, 3S: +412%, 4S: +410%). La quercetina, gracias a su capacidad antiinflamatoria fue capaz de disminuir

la expresión TNF- $\alpha$  respecto a los ratones MCD en 39%, 61% y 31% respectivamente para cada semana de estudio.

En lo que respecta a SOCS3, la dieta MCD provocó la sobreexpresión de SOCS3 (2S: +27%, 3S: +61% y 4S: +36% vs control) que fue atenuada por la quercetina en las dos primeras semanas (2S: -9%, 3S: -18% vs MCD) (Figura 26).

La OPN es un marcador de fibrosis debido a su capacidad de activar a las células estrelladas. En nuestro modelo de NAFLD, la dieta MCD provocó la sobreexpresión del gen de OPN a lo largo de las semanas (2S: +13%, 3S: +69%, 4S: +152%). El tratamiento con quercetina fue capaz de disminuir dicho incremento en la tercera y cuarta semana (3S: -22%, 4S: -64%) respecto a los ratones MCD llegando a alcanzar valores control (Figura 26).

La enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es una óxido reductasa responsable de la síntesis de óxido nítrico. Su incremento se ha asociado con la patogénia del modelo MCD. En nuestro estudio, la expresión génica de iNOS aumentó significativamente en los ratones con dieta MCD respecto a los ratones control (2S: +115%, 3S: +308%, 4S: +223%). El tratamiento con quercetina disminuyó significativamente dicha inducción (2S: -33%, 3S: -34%, 4S: -52% vs MCD) (Figura 26).



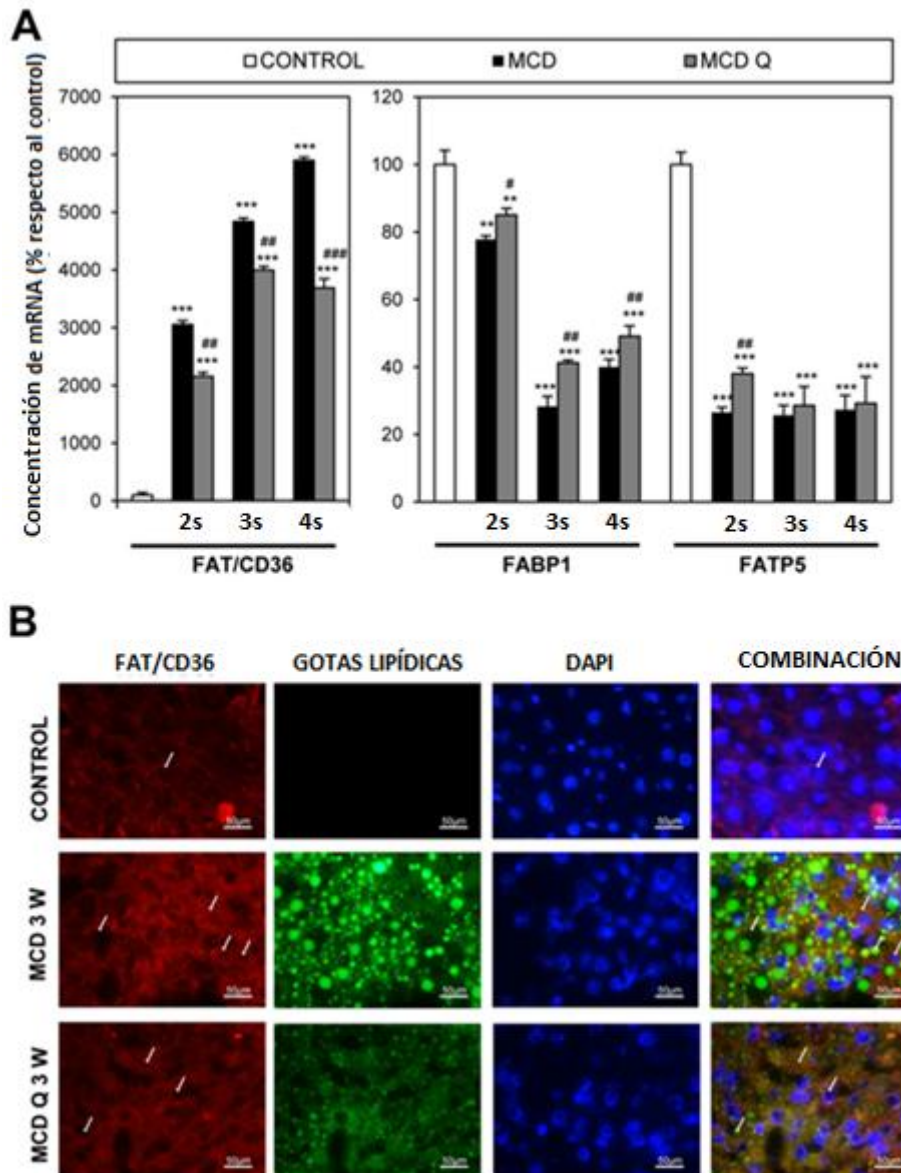
**Figura 26:** Efecto de la quercetina sobre la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo/nitrosativo y la inflamación en ratones alimentados con dieta MCD. Los gráficos de barras muestran la concentración del ARNm de TNF- $\alpha$ , SOCS3, OPN e iNOS determinado por qPCR. Media  $\pm$  EEM (n=6 ratones por grupo). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs MCD.

### 1.16. LA QUERCETINA REDUCE EL ACÚMULO DE LÍPIDOS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL MODELO MCD DE HÍGADO GRASO

Para examinar la contribución de la quercetina sobre la modulación de la expresión génica de genes del metabolismo lipídico sobre la reducción del acúmulo lipídico se evaluó el efecto de la misma sobre la concentración del ARNm de genes relacionados con la lipogénesis *de novo*, el receptor X hepático (LXR) $\alpha$  y la proteína de unión a esteroides (SREBP)-1C, genes relacionados con la captación y el transporte de ácidos grasos (FAT/CD36, FABP1) y la proteína de transporte de ácidos grasos (FATP)5, y los principales factores de transcripción involucrados en su regulación (FOXA1, PPAR $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  y SHP) (Figura 27 y Figura 28).

En los ratones alimentados con la dieta MCD, se observó una ligera inducción temprana en la expresión génica del LXR $\alpha$  y SREBP-1C comparado con los ratones control (LXR $\alpha$ , 2S: +14%; SREBP-1c, 2S: +18%) dicha inducción fue atenuada por la quercetina (LXR $\alpha$ , 2S: -8%; SREBP-1c, 2S: -12% vs MCD).

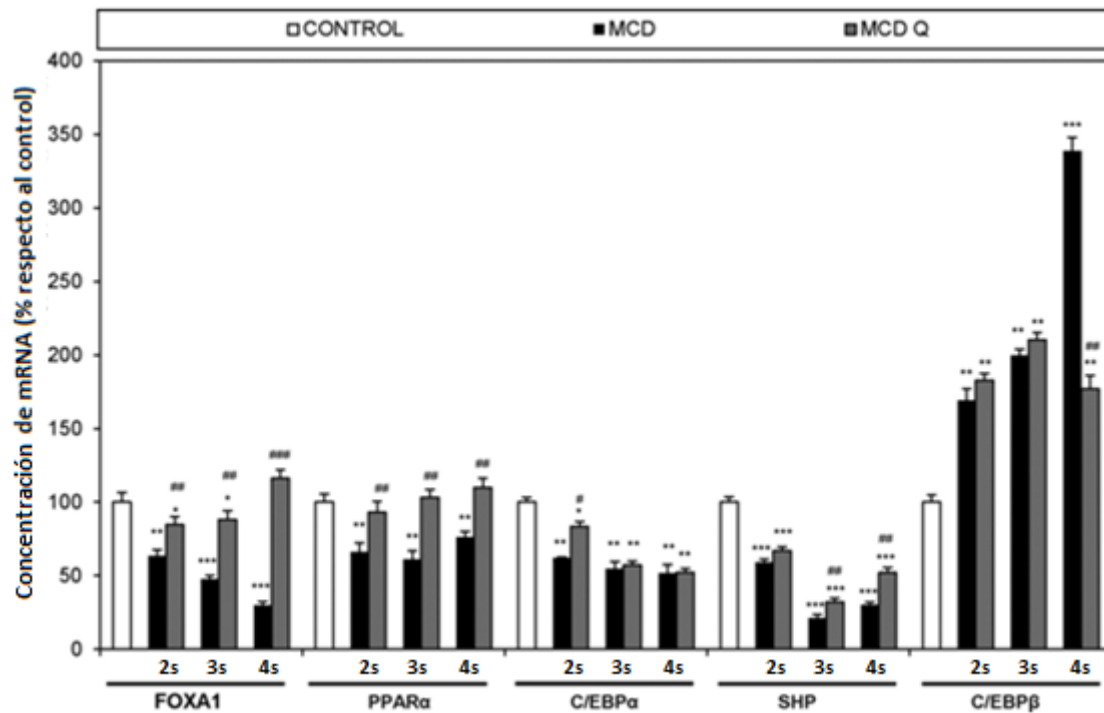
En cuanto a la captación y transporte de ácidos grasos, la dieta MCD provocó la sobreexpresión significativa y progresiva de la expresión de FAT/CD36 (2S: +2.955%, 3S: +4.738%, 4S: +5.800%, vs control) que fue atenuada parcialmente después del tratamiento con quercetina (2S: -29%, 3S: -17%, 4S: -37%, vs MCD) (Figura 27A). Por otra parte, el examen de las imágenes representativas de inmunofluorescencia de la tercera semana reveló una distribución de la proteína FAT/CD36 principalmente en la membrana citoplasmática en el grupo control. La dieta MCD provocó no sólo un aumento en su concentración en la membrana citoplasmática, sino también en el citosol y alrededor del núcleo y de las gotas lipídicas, la suplementación con quercetina fue capaz de reducirlo (Figura 27B). Como se muestra en la Figura 27A, también se encontró una reducción significativa en la expresión de FABP1 y FATP5 en los ratones alimentados con MCD en comparación con los ratones control (FABP1, 2S: -22%, 3S: -72%, 4S: -60%; FATP5, 2S: -73% , 3S: -74%, 4S: -73%) y la quercetina fue capaz de atenuar ligeramente dicha reducción (FABP1, 2S: +9%, 3S: +46%, 4S: +23%; FATP5, 2S: +43% , vs MCD).



**Figura 27:** Efecto de la queretina sobre los genes relacionados con la captación y trasporte de los ácidos grasos en ratones alimentados con dieta MCD. (A) Las barras muestran la concentración de ARNm de FAT/CD36, FABP1 y FATP5 determinada por qPCR. (B) Imágenes representativas de fluorescencia de la inmunolocalización de FAT/CD36 (rojo) y las gotas lipídicas (Bodipy 493/503, verde) en la tercera semana. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes de fluorescencia fusionadas con rojo, verde y azul se muestran también. Las flechas blancas indican la localización de FAT/CD36 en la membrana citoplasmática, citosol y alrededor del núcleo y de las gotas lipídicas. Las fotografías mostradas son representativas de 6 ratones por grupo. Media  $\pm$  EEM (n=6 ratones por grupo). \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs MCD.

En lo que respecta a los factores de transcripción involucrados en la regulación de los genes anteriormente estudiados, en nuestro modelo *in vivo* hemos observado una tendencia a la reducción de su expresión en los ratones alimentados con la dieta MCD comparado con los controles (FOXA1, 2S: -37%, 3S: -52%, 4S: -70%; PPAR $\alpha$ , 2S: -34%, 3S: -39%, 4S: -24%; C/EBP $\alpha$ , 2S: -38%, 3S: -45%, 4S: -48%). Esta tendencia también se observó para la expresión de SHP (2S: -41%, 3S: -79%, 4S: -70%, vs control), a

diferencia de lo observado para C/EBPβ cuya expresión se vio inducida progresivamente (2S: +69%, 3S: +100%, 4S: +238%). Todos estos factores de transcripción mostraron una tendencia a normalizar su expresión en los ratones alimentados con la dieta MCD suplementada con quercetina (FOXA1, 2S: +34%, 3S: +83%, 4S: +289%; PPARα, 2S: +41%, 3S: +69%, 4S: +45%; C/EBPα, 2S: +33%; SHP, 2S: +14%, 3S: +53%, 4S: +73%; C/EBPβ, 4S: -48%, vs MCD), indicando su capacidad reguladora del metabolismo lipídico (Figura 28).



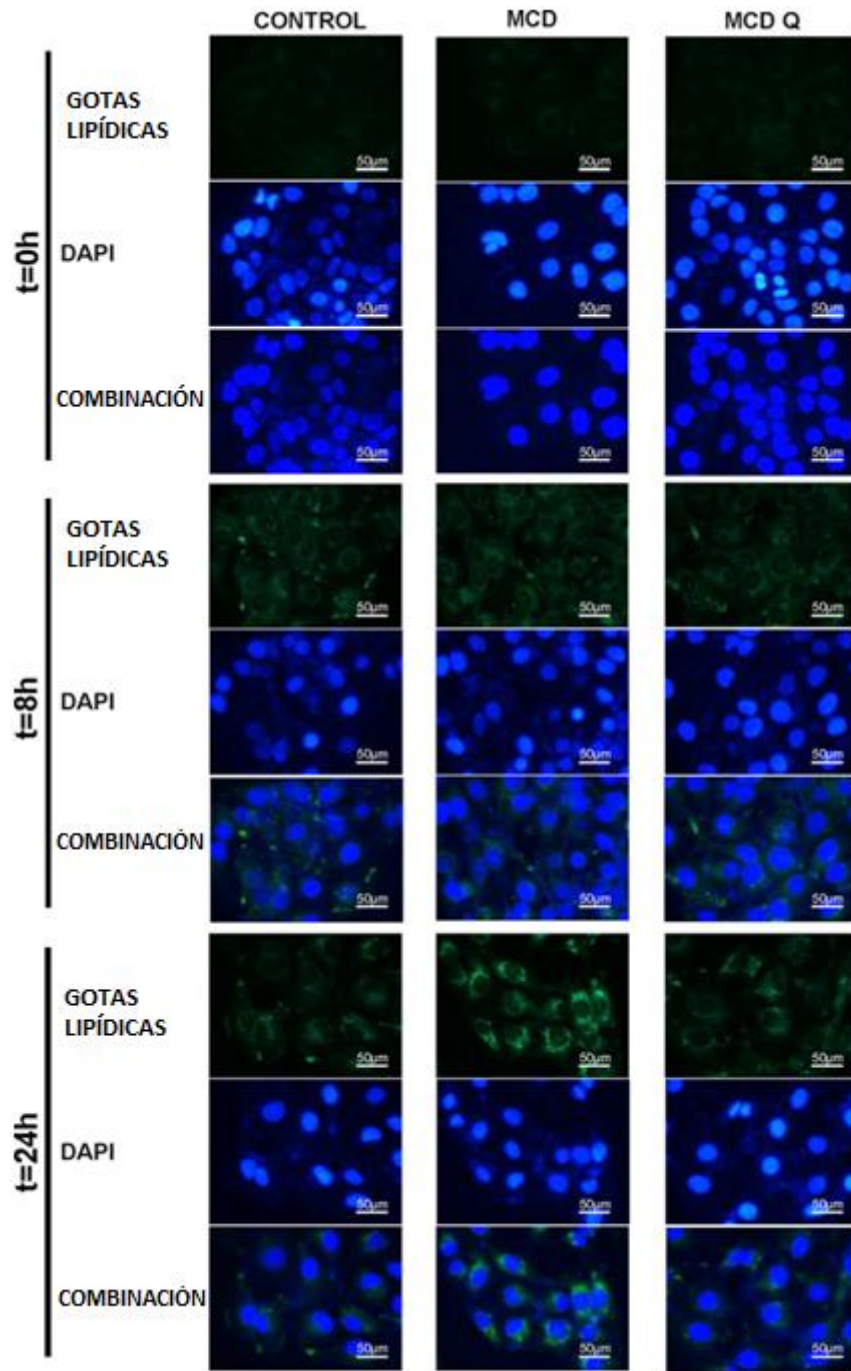
**Figura 28:** Efecto de la quercetina sobre la expresión génica de los genes implicados en la regulación transcripcional del metabolismo lipídico en ratones alimentados con dieta MCD. Las barras muestran la concentración de ARNm de FOXA1, PPARα, C/EBPα, SHP y C/EBPβ determinada mediante qPCR. Media ± EEM (n = 6 ratones por grupo). \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs MCD.

### 1.17. LA QUERCETINA MODULA EL ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO, LA INFLAMACIÓN Y EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL MODELO NUTRICIONAL *IN VITRO* DE NAFLD

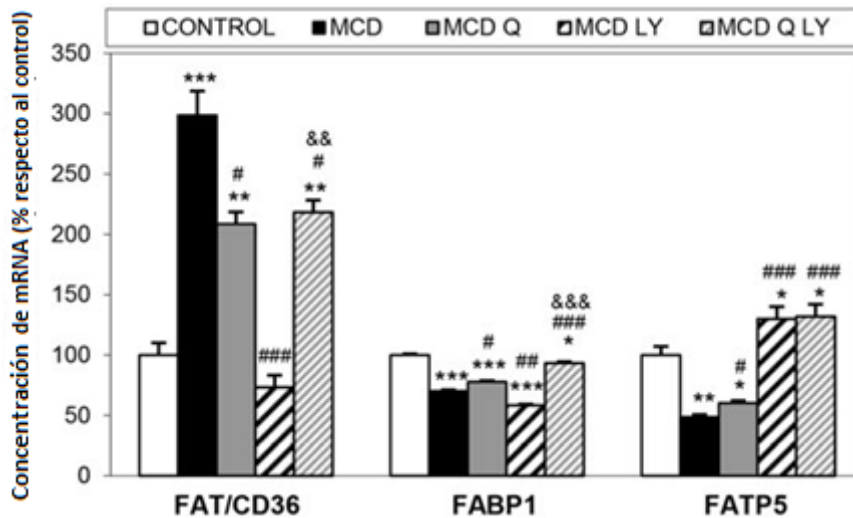
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro modelo *in vivo*, nos propusimos comenzar a investigar los mecanismos implicados en el efecto modulador de la quercetina sobre el desarrollo de NAFLD en nuestro modelo *in vitro*. Para ello las células Huh7 se incubaron con medio MCD suplementado o no con quercetina 10 μM durante 24 horas, analizándose la capacidad antioxidante y antiinflamatoria, así como el efecto de la quercetina sobre el acúmulo de lípidos.



Como se muestra en la Figura 29, el tratamiento de las células Huh7 con el medio MCD provocó un incremento en la captación de ácidos grasos, el cual se vio marcadamente atenuado por la quercetina, correlacionándose con una modulación de la expresión génica de FAT/CD36 (MCD: +199% vs control; MCD Q: -30% vs MCD) (Figura 30). La expresión génica de FABP1 y FATP5 en las células Huh7 tratadas con el medio MCD resultó inhibida en comparación con las células control (FABP1: -30%; FATP5: -51%), recuperándose parcialmente su expresión tras el tratamiento con quercetina (FABP1: +11%; FATP5: +24%) (Figura 30).



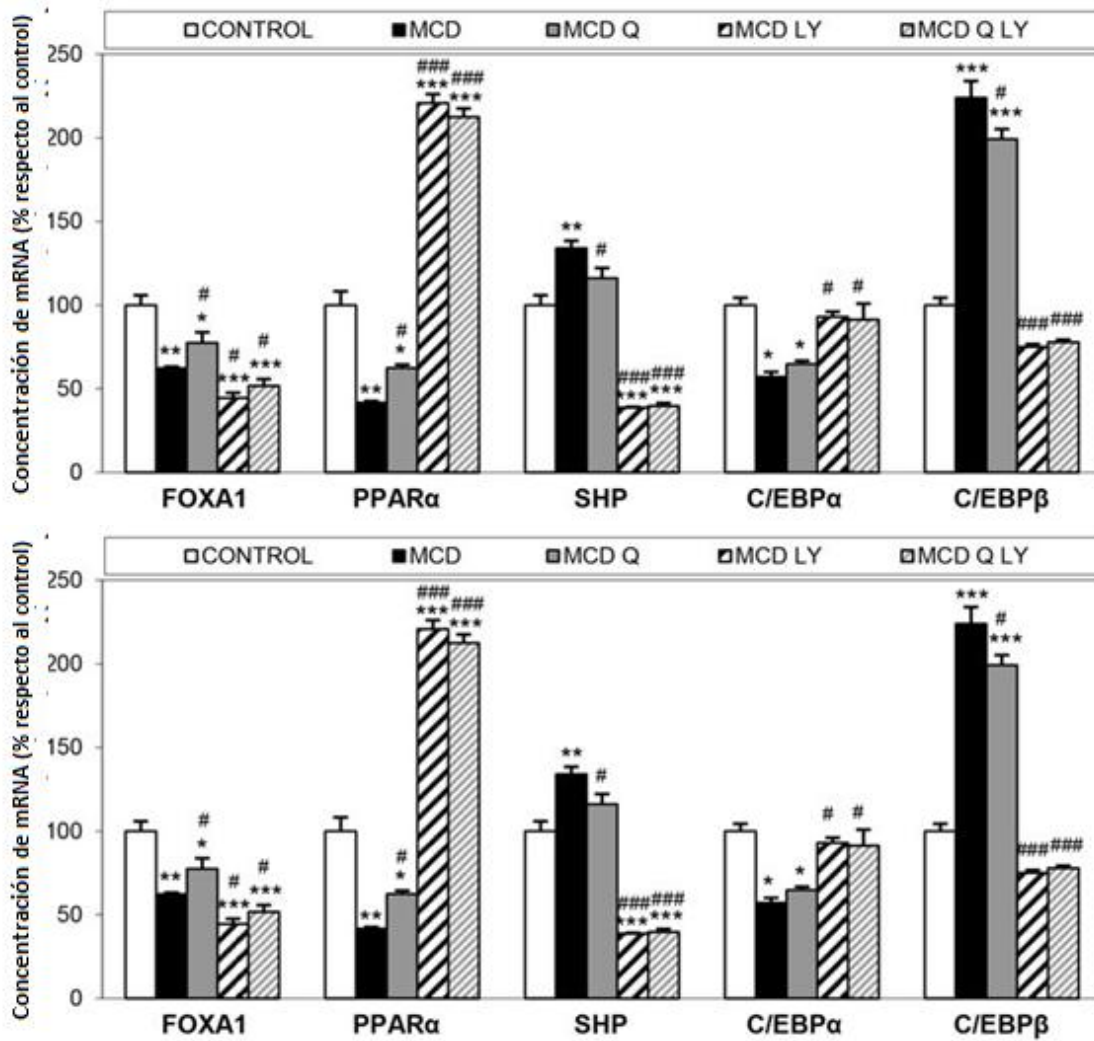
**Figura 29 :** Efecto de la quercetina sobre la captación de ácidos grasos en las células Huh7 tratadas con medio MCD. Imágenes representativas de fluorescencia de la captación de ácidos grasos (Bodipy FL C12, verde) a las 0, 8 y 24 h (x400). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes de fluorescencia fusionadas con verde y azul se muestran también. Imágenes representativas de 6 experimentos independientes.



**Figura 30:** Efecto de la quercetina y/o del inhibidor de PI3K (LY294002) sobre genes relacionados con el metabolismo lipídico en las células tratadas con medio MCD. Las gráficas de barras muestran la concentración de ARNm de FAT/CD36, FABP1 y FATP5 determinada por qPCR. Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs MCD; &&P<0,01, &&&P<0,001 MCD Q LY vs MCD LY.

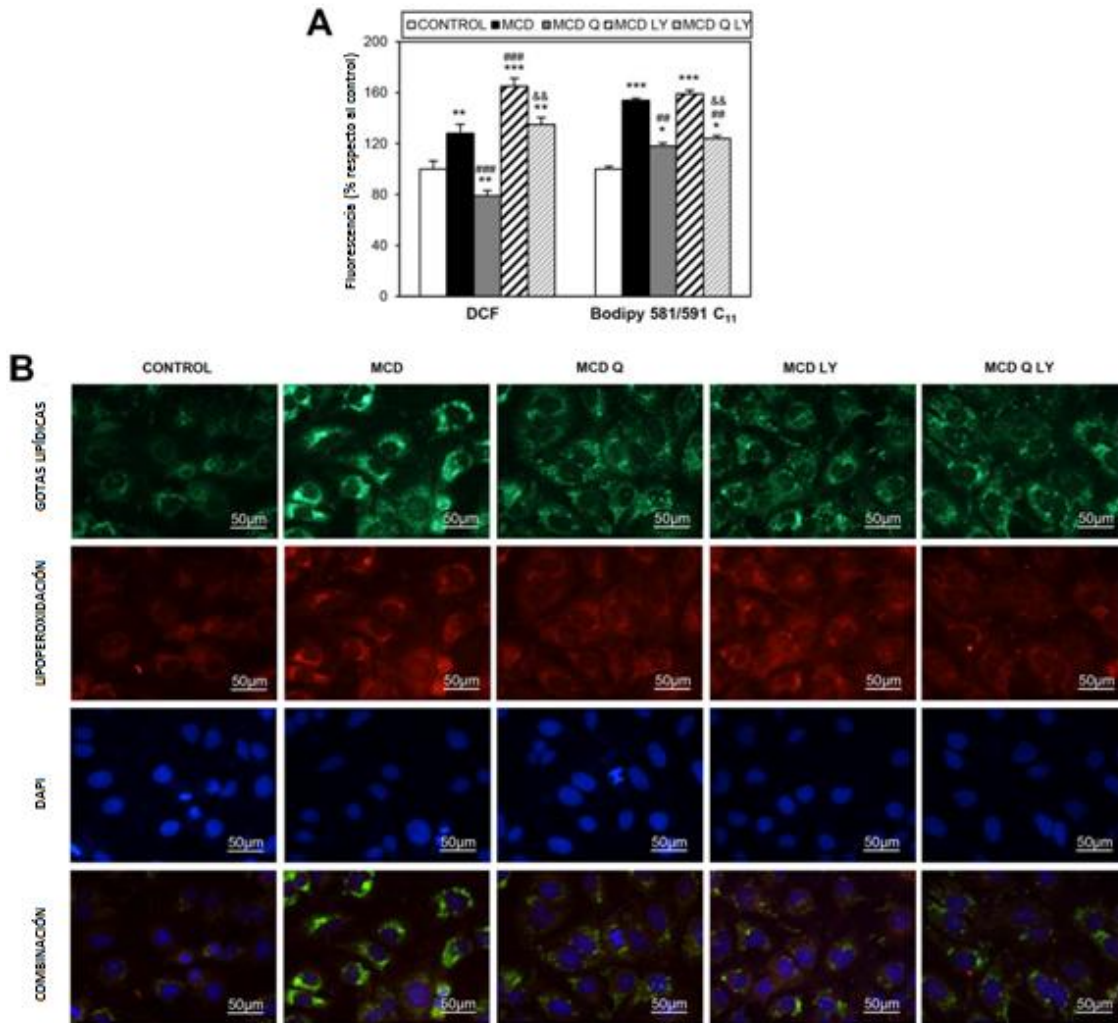
En cuanto a la lipogénesis *de novo*, al igual que lo observado en el modelo *in vivo*, el tratamiento con el medio MCD indujo un aumento significativo de la expresión génica de LXR $\alpha$  y SREBP-1c (LXR $\alpha$ : +35%; SREBP-1c: +102%) que fue revertido por la quercetina, no existiendo diferencias significativas en comparación con las células control en la expresión génica de LXR $\alpha$  (LXR $\alpha$ : -24%, vs MCD).

En lo que respecta a los factores transcripción involucrados en la regulación de dichos genes (Figura 31), el tratamiento con el medio MCD provocó la inhibición de la expresión génica de FOXA1, PPAR $\alpha$ , y C/EBP $\alpha$  (FOXA1: -38%; PPAR $\alpha$ : -58%; C/EBP $\alpha$ : -43%, vs células control), que fue parcialmente revertida tras el tratamiento con quercetina (FOXA1: +24%; PPAR $\alpha$ : +50%, vs MCD). Por el contrario, los genes SHP y C/EBP $\beta$  se sobreexpresaron en las células tratadas con medio MCD (SHP: +34%; C/EBP $\beta$ : +124%), siendo la quercetina capaz de reducir ligeramente dicha sobreexpresión (SHP: -13%; C/EBP $\beta$ : -11%, vs a MCD).



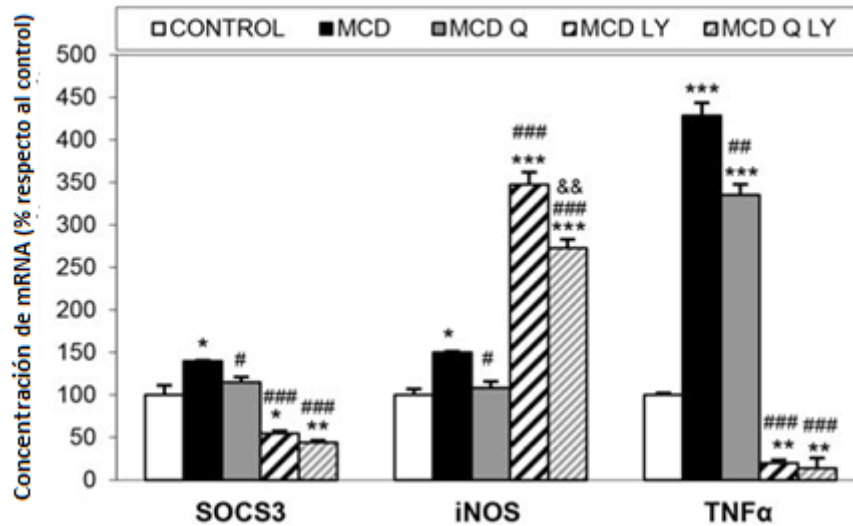
**Figura 31:** Efecto de la quercetina y/o de la inhibición de PI3K mediante el inhibidor LY294002 sobre la expresión de factores de transcripción involucrados en la regulación del metabolismo lipídico en las células tratadas con medio MCD. Las gráficas de barras muestran la concentración de ARNm de FOXA, PPAR $\alpha$ , SHP, C/EBP $\alpha$  y C/EBP  $\beta$  determinada por qPCR. Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ###P<0,001 vs MCD.

Como se muestra en la figura 32B, la tinción de las células con los fluoróforos Bodipy 493/503 y Bodipy 581/591 C11 reveló un aumento del acúmulo de lípidos citoplasmáticos y de la peroxidación lipídica, respectivamente, inducidos por el medio MCD, los cuales fueron revertidos tras el tratamiento con quercetina. La inducción de la lipoperoxidación, así como la inducción de la producción de ROS/RNS, se confirmaron además por citometría de flujo en las células tratadas con MCD (Bodipy 581/591 C11: +54%; DCF: +28%, vs control), siendo la quercetina capaz de inhibir parcialmente estos marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo (Bodipy 581/591 C11: -23%; DCF: -38%, frente a las células tratadas con medio MCD) (Figura 32A).



**Figura 32:** Efecto de la quercetina y/o de la inhibición de PI3K mediante el inhibidor LY294002 sobre el estrés oxidativo/nitrosativo en las células tratadas con medio MCD. Producción de ROS/RNS y de peroxidación lipídica expresada como intensidad de fluorescencia DCF y Bodipy 581/591 C11, respectivamente, normalizada con las células control (100%). Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs CONTROL; ### $P < 0,01$ , #### $P < 0,001$  vs MCD; && $P < 0,01$  MCD Q LY vs MCD LY. (E) Imágenes representativas de fluorescencia correspondientes a la formación de lipoperoxidación (Bodipy 581/591 C11, rojo) y de gotas lipídicas (Bodipy 493/503, verdes) (x400). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran también las imágenes fusionadas con la fluorescencia roja, verde y azul. Imágenes representativas de 6 experimentos independientes.

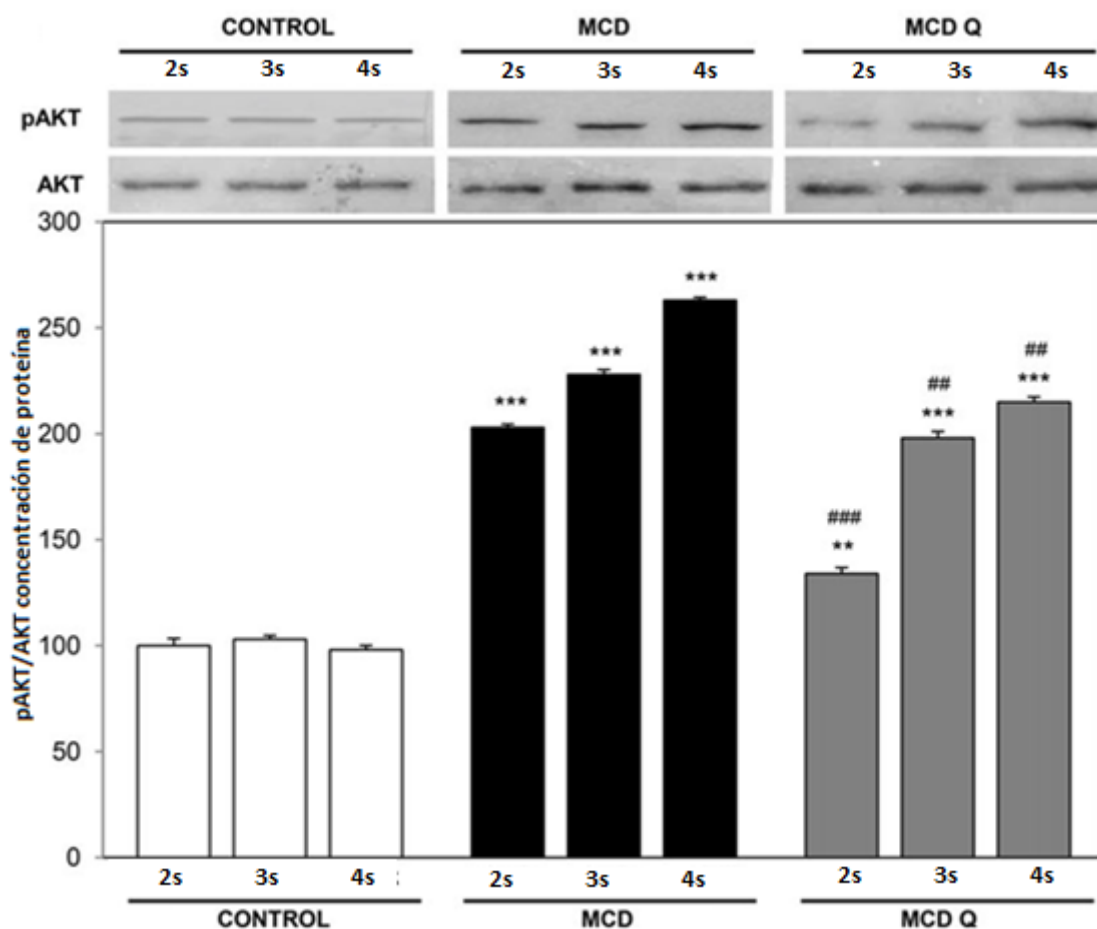
Como cabría esperar, el medio MCD indujo la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo/nitrosativo (SOCS3: +40%; iNOS: +50%; TNF- $\alpha$ : +328%). La quercetina fue capaz de revertir dicha inducción (SOCS3: -18%; iNOS: -28%; TNF- $\alpha$ : -22% vs MCD) (Figura 33).



**Figura 33:** Efecto de la quercetina y/o del inhibidor de PI3K (LY294002) sobre la inflamación en las células tratadas con medio MCD. Las gráficas de barras muestran la concentración de ARNm de SOCS3, iNOS y TNF- $\alpha$  determinada por qPCR. Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs MCD; &&P<0,01, MCD Q LY vs MCD LY.

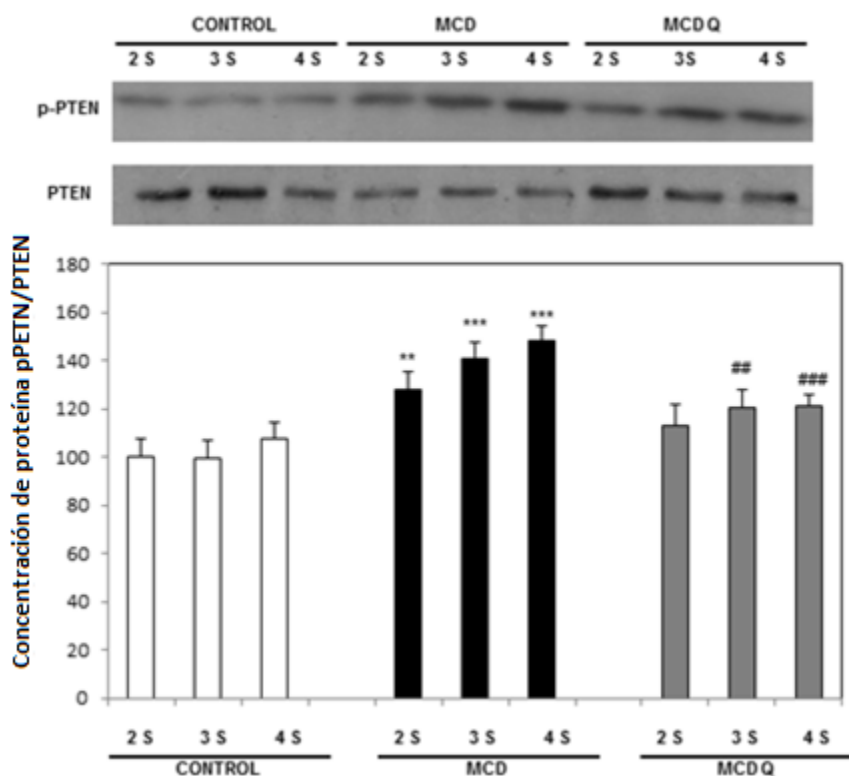
### 1.18. LA QUERCETINA EJERCE SU EFECTO MODULADOR EN UN MECANISMO MEDIADO POR LA REGULACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT/PTEN Y NF- $\kappa$ B, INHIBIENDO LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA Y EL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Con el fin de investigar el papel de la vía de señalización PI3K/AKT/PTEN en la patogénesis de la NAFLD y el efecto de la quercetina sobre dicha vía, se evaluó su activación a través de la cuantificación de la concentración de pAKT en los ratones alimentados con la dieta MCD, suplementada o no con quercetina. La dieta MCD causó un progresivo aumento de la fosforilación de AKT (2S: +103%, 3S: +128%, 4S: +163%, vs control) y la quercetina fue capaz de atenuar dicho aumento, sobre todo en la segunda semana de tratamiento (2S: -34%, 3S: -13%, 4S: -18%, vs ratones MCD) (Figura 34).



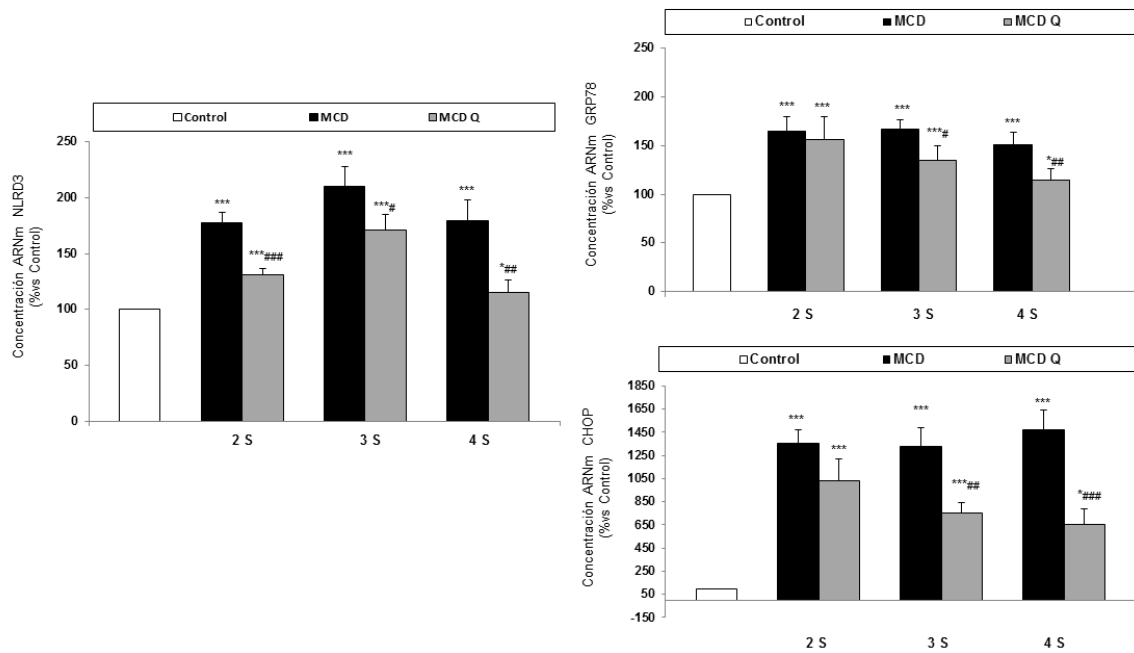
**Figura 34:** Efecto de la quercetina en la activación de la vía PI3K/AKT en el modelo *in vivo* de NAFLD. Western blots representativos de pAKT (Ser 473) y AKT en los hígados de los ratones control y alimentados con la dieta MCD y MCD Q. El análisis densitométrico de las bandas específicas se expresa como porcentaje respecto al control (100%). Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs CONTROL; ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  vs a MCD.

Además, como puede observarse en la Figura 35, la inducción de la activación de la vía del PI3K/AKT se acompañó de la inhibición de PTEN, observándose una mayor fosforilación del mismo (pPTEN/PTEN, 2S: +28%, 3S: +41%, 4S: +49%, vs control). El tratamiento con quercetina fue capaz de modular la vía de señalización PI3K/AKT/PTEN mediante la reducción de la degradación de PTEN (pPTEN/PTEN, 2S: -11%, 3S: -14%, 4S: -18%, vs MCD).

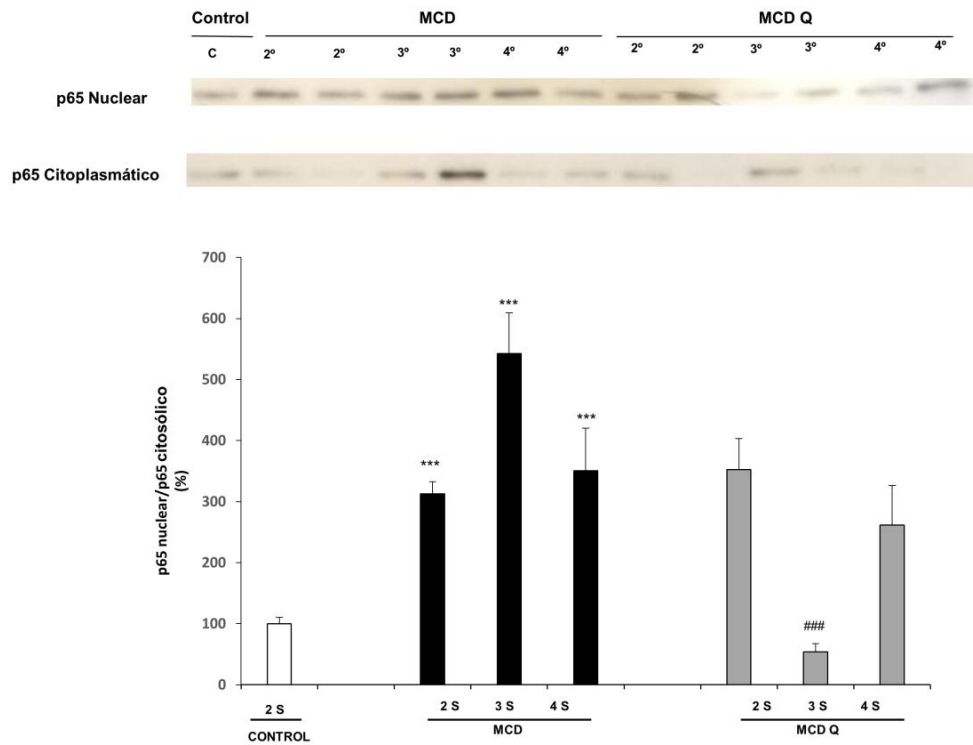


**Figura 35:** Efecto de la quercetina sobre la vía de señalización PI3K/AKT/PTEN en el modelo *in vivo* de NAFLD. Western blots representativos de pPTEN y PTEN en los hígados de los ratones control y alimentados con la dieta MCD y MCD Q. El análisis densitométrico de las bandas específicas se expresa como porcentaje respecto al control (100%). Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs CONTROL; ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  vs MCD.

Profundizando en el estudio de los mecanismos patogénicos involucrados en la evolución de NAFLD a esteatohepatitis y hepatocarcinoma, en nuestro modelo *in vivo*, la dieta MCD provocó la activación del inflammasoma, incrementándose la expresión del receptor tipo NOD NLRP3 (2S: +78%, 3S: +109%, 4S: +79%, vs control) (Figura 36), asociada a la alteración del eje intestino-hígado y a la existencia de estrés de retículo endoplásmico, al inducirse GRP78 y CHOP (GRP78, 2S: +65%, 3S: +67%, 4S: +51%; CHOP, 2S: +1.252%, 3S: +1.225%, 4S: +1.371%, respectivamente, Figura 36). Dado el papel que desempeña en la activación de las repuestas anteriormente descritas, estudiamos el efecto de la dieta MCD sobre la translocación nuclear de p65 del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, observándose una marcada inducción como consecuencia de dicha dieta (2S: +213%, 3S: +443%, 4S: +251%, vs control, Figura 37). La suplementación con quercetina fue capaz de inhibir significativamente la activación del inflammasoma (2S: -26%, 3S: -18%, 4S: -36%), el estrés de retículo (GRP78, 2S: -5%, 3S: -19%, 4S: -25%; CHOP, 2S: -24%, 3S: -43%, 4S: -55%), así como la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la tercera semana de administración de la dieta suplementada con el flavonol (3S: -90%, vs MCD).



**Figura 36:** Efecto de la quercetina sobre la expresión de genes relacionados con la activación del inflammasoma y el estrés de retículo endoplásmico en el modelo *in vivo* de NAFLD. Las gráficas de barras muestran la concentración de ARNm de NLRD3, GRP78 y CHOP determinada por qPCR. Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 vs CONTROL; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs MCD.

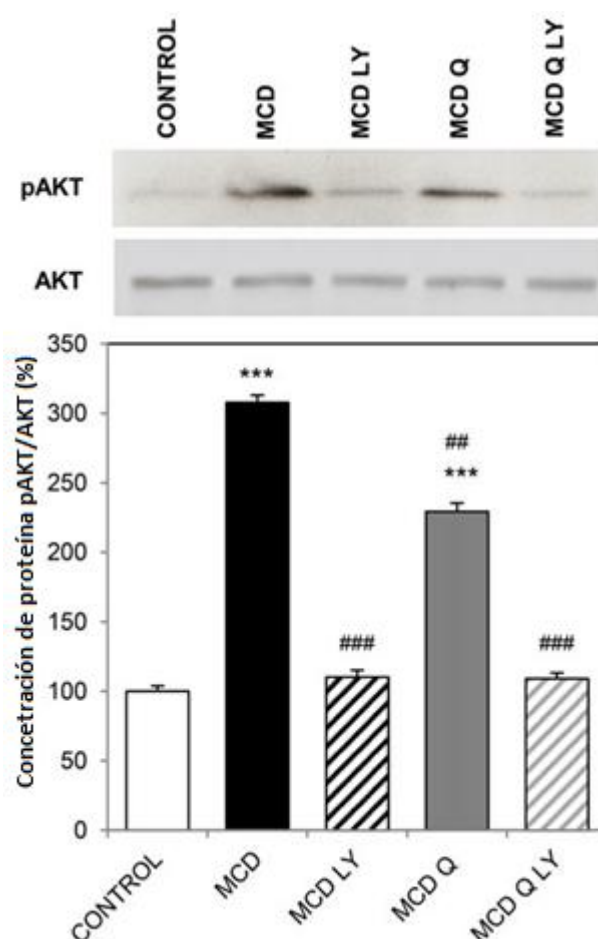


**Figura 37:** Efecto de la quercetina sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el modelo *in vivo* de NAFLD. Western blots representativos de p65 nuclear y citosólico en los hígados de los ratones control y alimentados con la dieta MCD y MCD Q. El análisis densitométrico de las bandas específicas se



expresa como porcentaje respecto al control (100%). Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*\*\* $P < 0,001$  vs CONTROL; ### $P < 0,001$  vs MCD.

Una vez comprobada la activación de las vías de señalización PI3K/AKT y NF- $\kappa$ B, así como la inducción de la respuesta del inflammasoma y el desarrollo de estrés de retículo endoplásmico derivado de la administración de la dieta MCD y el efecto inhibitor de la quercetina, se evaluó también la activación de AKT en las células Huh7 tratadas con MCD y el efecto de la inhibición de PI3K con el inhibidor LY294002 y/o la quercetina en la expresión de los genes relacionados con el estrés oxidativo/nitrosativo, la inflamación y el metabolismo lipídico. Como se muestra en la Figura 38, la vía de señalización PI3K/AKT se activó en las células tratadas con el medio MCD (pAKT/AKT: +208%, vs células control) y resultó inhibida por el LY294002 y la quercetina (MCD LY: -64%; MCD Q: -25%; MCD Q LY: -65%, vs células tratadas con MCD) (Figura 38).



**Figura 38:** Efecto de la quercetina en la activación de la vía PI3K/AKT en el modelo *in vitro* de NAFLD. Western blots representativos de pAKT (Ser 473) y AKT en las células Huh7 incubadas con medio MCD o MCD Q solo o combinado con el inhibidor de PI3K (LY294002). El análisis densitométrico de las bandas específicas se expresa como porcentaje respecto al control (100%). Media  $\pm$  EEM de seis experimentos independientes. \*\*\* $P < 0,001$  vs CONTROL; # $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  vs a MCD.

Como se muestra en las imágenes de microscopía de fluorescencia de la Figura 32B, la inhibición de PI3K/AKT induce una reducción en el acúmulo de gotas lipídicas

mientras que la lipoperoxidación parecía estar disminuida sólo por el tratamiento con quercetina, como se confirmó mediante citometría de flujo (Figura 32A).

Además, la mayoría de los genes estudiados se encontraron inducidos por la activación de la vía PI3K/AKT, tal y como lo demuestra la reducción de su expresión derivada del tratamiento con LY294002 (FAT/CD36: -75%; FABP1: -17%; SOCS3: -61%; TNF- $\alpha$ : -95 %; FOXA1: -29%; SHP: -71%; C/EBP $\beta$ : -67%, frente a las células tratadas con MCD). Sin embargo, iNOS, FATP5, PPAR $\alpha$  y C/EBP $\alpha$  parecían estar inhibidos por esta vía, como indica su inducción tras el tratamiento con el LY294002 (iNOS: +132%; FATP5: +168%; PPAR $\alpha$ : +430%; C/EBP $\alpha$ : +63%, frente a las células tratadas con MCD). El tratamiento con quercetina no causó alteraciones significativas en la expresión génica de la mayoría de los genes estudiados cuando la vía PI3K/AKT fue inhibida por el LY294002. Sólo la expresión génica de iNOS, FABP1 y FAT/CD36 mostró diferencias significativas cuando se combinó el LY294002 con la quercetina en comparación con el tratamiento con LY294002 solo (iNOS: -22%; FABP1: +60%; FAT/CD36: +198%, frente a las células MCD LY) (Figura 30 y Figura 31).



## DISCUSIÓN



El aumento de la epidemia de obesidad, sobre todo en los países más desarrollados, produce un aumento del síndrome metabólico y por tanto de la prevalencia de NAFLD al tratarse de la afectación hepática de éste. Los tratamientos actuales presentan una baja eficacia y seguridad, llegando en muchas ocasiones al trasplante hepático (Musso y cols., 2010). Con la finalidad de comprender mejor los mecanismos a través de los cuales se desarrolla y proponer nuevas dianas terapéuticas, en el presente estudio valoramos la relación entre el acumulo lipídico, la inflamación, el estrés oxidativo y el metabolismo lipídico hepáticos y las principales rutas de señalización celular. Asimismo, proponemos la utilización del flavonoide quercetina como un potencial tratamiento de la enfermedad, gracias a su actividad antioxidante, antiinflamatoria y posible moduladora del metabolismo lipídico.

El presente estudio está orientado al esclarecimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y evolución de la esteatohepatitis no alcohólica mediante la utilización del modelo nutricional de dicha enfermedad basado en la deficiencia en metionina y colina (MCD), tanto *in vitro* como *in vivo*. La deficiencia en metionina y colina está muy bien documentada como modelo de NASH. Diversos estudios demuestran que ratones C57BL/6 alimentados con la dieta MCD disminuyen significativamente su peso corporal (hasta un 40% en diez semanas), debido probablemente a un incremento de la tasa metabólica (Shen y cols., 2007; Henkel y cols., 2012; Takahashi y cols., 2012; Greene y cols., 2014 Kim y cols., 2016). De manera análoga, en nuestro estudio los ratones alimentados con la dieta MCD disminuyeron progresivamente de peso, y observó una disminución significativa en la relación hepatosomática respecto a los ratones control (Shen y cols., 2007; Liu y cols., 2014; Ji y cols., 2015). En nuestro estudio el tratamiento con quercetina no se asoció a diferencias significativas ni en el peso ni en la relación entre el peso del hígado y el peso corporal en comparación con los ratones MCD (Shen y cols., 2007; Ji y cols., 2015). La administración de agentes con capacidad antioxidante en ratones C57BL/6 alimentados con la dieta MCD ha demostrado que puede producir variación en el peso corporal y hepático respecto a los grupos alimentados con dieta MCD, efecto mediado por la variación de la tasa metabólica (Liu y cols., 2014; Kim y cols., 2016).

La utilización de dieta MCD en ratones C57BL/6, provoca un rápido desarrollo de esteatohepatitis, mostrando características histológicas muy similares a las que presentan los pacientes de NAFLD (Shen y cols., 2007; Ji y cols., 2015). Diversos estudios en dicho modelo experimental muestran hallazgos histológicos caracterizados por la presencia de una fuerte esteatosis predominante en la zona 1, una marcada inflamación intralobular y un estado de estrés oxidativo, mostrando una alteración de los parámetros bioquímicos (Shen y cols., 2007; Hebbard y George 2011; Ji y cols., 2015;). Dichos ratones desarrollan inflamación hepática después de 3 días, esteatosis macrovesicular severa en la zona pericentral en una o dos semanas, necroinflamación después de 2 semanas y balonización a las 3 semanas, seguida por fibrosis pericelular y

pericentral. El infiltrado hepático inflamatorio incluye linfocitos y polimorfonucleares neutrófilos (Hebbard y George, 2011; Takahashi y cols., 2012). De forma análoga, en nuestro estudio los ratones alimentados con la dieta MCD desarrollaron una fuerte esteatosis y moderada inflamación desde la segunda semana. Ambos hallazgos histológicos hepáticos fueron aumentando hasta la cuarta semana con presencia de balonización desde la tercera semana, de manera que en la cuarta semana eran diagnosticados de NASH, demostrando que la dieta MCD es un modelo muy efectivo a la hora de desarrollar la enfermedad. Como era de esperar, los ratones control no mostraron ningún síntoma de esteatosis, inflamación ni balonización durante el ensayo. Se ha comprobado que el tratamiento con antioxidantes mejora la histología hepática en modelos de NAFLD (Greene y cols., 2014; Liu y cols., 2014; Ji y cols., 2015; Kim y cols., 2016). En nuestro estudio, el tratamiento con el antioxidante quercetina produce una mejora en los hallazgos histológicos, observándose una tendencia a la normalización de los mismos.

En cuanto al modelo *in vitro* basado en la utilización de medio MCD, dicho medio es capaz de producir una acumulación de ácidos grasos y producir una respuesta inflamatoria típica a diferencia del uso de medios con alto contenido en ácidos grasos libres que solo reproducen el acúmulo lipídico (Ji y cols., 2015).

Con respecto a los marcadores plasmáticos de daño hepático, el modelo MCD se caracteriza por el incremento de la actividad de las enzimas transaminasas, mientras que no se muestran alteraciones en marcadores de función hepática como es la concentración de albúmina (Takahashi y cols., 2012). En nuestro estudio el desarrollo de NASH en los animales alimentados con la dieta MCD se acompañó por un incremento en las actividades AST y ALT, sin modificación de las concentraciones plasmáticas de albúmina, corroborando los resultados previamente descritos. Por otra parte, en los ratones que recibieron dieta MCD suplementada con quercetina se observó la existencia de diferencias significativas respecto al grupo MCD en cuanto a la presencia de ALT en el plasma, como indicativo del efecto protector de la quercetina sobre el desarrollo del daño hepático asociado a NAFLD, confirmando los hallazgos descritos previamente (Shen y cols., 2007; Liu y cols., 2014; Kim y cols., 2016).

Desde hace algunos años se conocen los efectos que tiene la privación de metionina y colina sobre el metabolismo de los lípidos. Estudios llevados a cabo en humanos y animales han evidenciado la presencia de bajas concentraciones de apolipoproteína B100 (componente integral de las VLDL), de fosfatidil colina (precursor de las VLDL), y de la proteína transportadora de triglicéridos (MTP) en pacientes con NASH (Hebbard y George, 2011). La disminución de la concentración de las VLDL lleva consigo asimismo el descenso de las concentraciones plasmáticas de c-HDL y c-LDL. Este hallazgo se corrobora en estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que la lipólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos aporta las proteínas, fosfolípidos y colesterol

necesarios para el ensamble de las HDL originando cambios en la composición de las mismas, y que las lipoproteínas de baja densidad se originan a partir del catabolismo de las VLDL circulantes (Anstee y Goldin 2006; Fujita y cols., 2009; Fon Tacer y Rozman 2011; Freitas y cols., 2016). De acuerdo con lo descrito, en nuestros ratones alimentados con la dieta MCD disminuyeron las concentraciones plasmáticas de TC, HDL, LDL y TG (Greene y cols., 2014). Por otra parte, nuestros resultados indicaron la existencia de una disminución de la concentración plasmática de glucosa en los ratones alimentados con la dieta MCD, coincidiendo con los resultados mostrados en estudios previos que indican la existencia de una hipoglucemia debido a la resistencia a la insulina (Marcolin y cols., 2011; Greene y cols., 2014). En nuestro estudio, el tratamiento con el flavonoide quercetina no mejoró dicha hipoglucemia.

La deficiencia en metionina y colina compromete el ensamblaje y secreción de las VLDL y conlleva a la disminución del procesamiento de los triglicéridos acompañado de la reducción de la concentración plasmática de colesterol y de su posterior acumulación en el hígado. En nuestro modelo *in vivo* con dieta MCD se observó un aumento de las concentraciones de FFA y TG hepáticos, contribuyendo a la liberación de VLDL. Además, los FFA aumentan el estrés de retículo, lo que favorece la degradación de ApoB100 (Ota y cols., 2008), mientras que los TG impiden la degradación de la proteína, aunque la poca cantidad que se forma de la Apo B100 debido a la dieta y que en NAFLD no se sobreexpresa produce una disminución de la proteína, que se encuentra sobresaturada para liberar los ácidos grasos acumulados en el hepatocito y que producen la esteatosis (Choi y Diehl, 2008). La quercetina fue capaz de reducir el número y tamaño de las vesículas lipídicas de los hepatocitos, dando lugar a una disminución de los FFA y TG, lo que supone la disminución de la peroxidación y del estrés de retículo endoplásmico, al igual que ya se ha descrito en modelos nutricionales de NAFLD en ratones C57B/6J sometidos a tratamientos experimentales con antioxidantes (Panchal y cols., 2012; Jung 2013; Ji y cols., 2015; Kim y cols., 2016).

Se ha documentado una desregulación del metabolismo lipídico tanto a nivel de síntesis *de novo*, que en el hígado normal supone el 5% de acúmulo de lípidos del hepatocito y llegando hasta un 26% durante el desarrollo de la enfermedad (Donnelly y cols., 2005), como en la captación de los ácidos grasos por dichos hepatocitos (Miquilena-Colina y cols., 2011; Ameer y cols., 2014;). La proteína FAT/CD36 se encuentra inducida en trastornos metabólicos que cursan con obesidad (Silverstein y Febbraio, 2009). La sobreexpresión de FAT/CD36 se debe a que interviene en el transporte y translocación de los ácidos grasos, principalmente de los de cadena larga (Sheedfar y cols., 2014) y esto aumenta la resistencia a la insulina tal y como se describió mediante ratones *knockout* (Hajri y cols., 2002). En nuestro modelo *in vivo* se observó que en los ratones control FAT/CD36 se localizó principalmente en torno a la membrana citoplasmática, mientras que en los ratones MCD dicha proteína se



encontró sobreexpresada, lo que se acompañó de una localización no sólo en torno a la membrana citoplasmática sino que presentaba asimismo una distribución citosólica alrededor de las vesículas lipídicas y de la región perinuclear en torno al retículo endoplásmico, como se ha descrito previamente (Su y Abumrad, 2009), posiblemente asociada a una mayor eficacia en su función como translocasa de ácidos grasos, tal y como se ha sugerido con anterioridad (Bechmann y cols., 2009; Jung y cols., 2013; Wang y cols., 2014) En cuanto a la distribución de FAT/CD36, se ha comprobado que tanto en pacientes con esteatosis simple como en ratones sometidos a dieta rica en grasa la distribución de FAT/CD36 se modifica según evoluciona temporalmente y progresa en gravedad la enfermedad, de manera que la proteína tendría una distribución principalmente en torno a la membrana citoplasmática y en la primera etapa también citosólica y a medida que avanza la enfermedad la distribución vuelve a centrarse principalmente en la membrana citoplasmática indicando que en nuestro estudio la enfermedad se encuentra en progreso (Miquilena-Colina y cols., 2011; Sheedfar y cols., 2014).

El aumento de la expresión de FAT/CD36 en nuestro modelo puede deberse a la inducción de sus reguladores transcripcionales como LXR (Goodwin y cols., 2003), C/EBP $\beta$  (Qiao y cols., 2008), PXR y PPAR $\gamma$ , inducidos en dietas MCD y rica en grasa, debido a un aumento intrahepatocitario de los ácidos grasos, como se demuestra en el presente estudio (Fon Tacer y Rozman 2011; Yu y cols., 2013). Asimismo, FAT/CD36 puede encontrarse inducida por citocinas como por ejemplo TNF- $\alpha$ , cuya expresión está aumentada en nuestros modelos de MCD (Memon y cols., 1998). La inducción de la vía PI3K/AKT descrita en nuestro modelo de NAFLD produce un aumento de la expresión proteica de CD36 a través de la fosforilación de mTOR, la cual favorece su traducción sin producir un aumento de la expresión génica, como ya se ha descrito (Brown, y Goldstein 2010; Wang y cols., 2014). Por otra parte, la quercetina disminuyó la expresión de FAT/CD36 en ambos modelos y del mismo modo que se ha demostrado en otros flavonoides como la epigenina o la luteolina en tratamientos *in vitro* (Bumke-Vogt y cols., 2014), la quercetina disminuye la acumulación de lípidos reprimiendo la translocación a la membrana plasmática de FAT/CD36 al regular la vía PI3K/AKT (Luiken y cols., 2002).

Por otra parte, en nuestro estudio encontramos una disminución progresiva de FATP5, al igual que se ha visto en el desarrollo de NAFLD en pacientes, aunque hay evidencias de que el silenciamiento de FATP5 tiene un efecto protector en el desarrollo de NAFLD en modelos dietéticos (Doege y cols., 2008). Además, se ha descrito previamente la disminución de la expresión de FABP1 tanto en modelos *in vivo* como en pacientes (Guzmán y cols., 2013), de manera similar a lo observado en el presente estudio, lo que puede ser debido a la inhibición de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\alpha$  como consecuencia de la dieta MCD, siendo ambos coactivadores transcripcionales importantes de la proteína FABP1 (Mandard y cols., 2004; Guzmán y cols., 2013). El

tratamiento con quercetina aumentó la expresión de FATP5 y FABP1 e inhibió la expresión de FAT/CD36 en los ratones alimentados con dieta MCD, tal y como se ha demostrado previamente en modelos experimentales basados en dieta rica en grasa (Jung y cols., 2013).

En lo relativo a la modulación transcripcional del metabolismo lipídico en nuestros modelos de NAFLD, encontramos que C/EBP $\beta$  se encuentra inducido como consecuencia de la alimentación con dieta deficiente en colina y metionina, corroborando resultados previos en modelos experimentales de la enfermedad en ratones (Zhang y cols., 2014). Por otra parte, su expresión génica puede disminuir mediante el uso de compuestos con capacidad antioxidante (Shen y cols., 2007), de manera similar a lo descrito en el presente estudio como consecuencia de la suplementación de la dieta MCD con quercetina. C/EBP $\beta$  actúa como regulador de la expresión génica de FAT/CD36 (Qiao y cols., 2008; Choi y cols., 2017) y su inhibición modula el metabolismo lipídico, mostrando una disminución de la esteatosis al reducir la cantidad de TG que se acumulan en el hepatocito (Millward y cols., 2007; Rahman y cols., 2007). Se ha comprobado que en ratones *knockout* C/EBP $\beta$  alimentados con dieta MCD tiene un efecto protector contra el NAFLD, por lo tanto la inducción de C/EBP $\beta$  en nuestros modelos de NAFLD justifica parcialmente que también FAT/CD36 se encuentre sobreexpresada y su repercusión en la exacerbación de la esteatosis hepática (Rahman y cols., 2007). En este sentido, el efecto de la quercetina sobre dichos genes participa en el papel protector que desempeña en el desarrollo de NAFLD.

La ausencia de PPAR $\alpha$  produce un acúmulo lipídico y junto a C/EBP $\beta$  son responsables de la sobreexpresión de iNOS, relacionada con la activación de la vía de señalización del factor NF- $\kappa$ B y la aparición de estrés oxidativo, así como de la activación de las células estrelladas observados en NAFLD (Millward y cols., 2007; Zhang y cols., 2006). Está descrito que la modulación de PPAR $\alpha$  mediante el uso de agonistas disminuye la peroxidación lipídica, evita la activación de las células promotoras de la fibrosis y disminuye la esteatosis (Ip y cols., 2004), efecto que la quercetina es capaz de regular aumentando su expresión, de acuerdo a lo que muestran nuestros resultados (Millward y cols., 2007). PPAR $\alpha$  actúa como regulador transcripcional de FATP5 y de FABP1 (Mandard y cols., 2004).

Del mismo modo, FOXA1 se encuentra inhibido en NAFLD, posiblemente mediante un mecanismo mediado por la vía de señalización celular de PKC (Moya y cols., 2012) y junto a la baja expresión de PPAR $\alpha$ , produciendo, tal y como se observa en nuestro estudio, una disminución de la expresión de FABP1 y FATP5, ya que ambos intervienen en su transcripción (Guzmán y cols., 2013; Motojima y cols., 1998).

El receptor huérfano SHP se asocia a un aumento de los lípidos neutros al actuar conjuntamente con otros reguladores transcripcionales, aumentando la esteatosis y la

secreción de ácidos biliares (Huang y cols., 2007). Está descrito que los FFA pueden reprimir la activación de SHP (Bechmann y cols., 2013), mientras que el acumulo de VLDL aumenta los oxisteroles que inducen la expresión de SHP para transformarlos en ácidos biliares (Lu y cols., 2000; Chanda y cols., 2009; Yang y cols., 2013). En nuestro estudio, SHP se encuentra sobreexpresado en estadios iniciales de la enfermedad, tendiendo a disminuir su expresión según avanza la misma. Así, en el modelo *in vitro* se observa la existencia de una sobreexpresión de SHP, mientras que en el modelo *in vivo*, con un desarrollo prolongado en el tiempo, se puede observar la tendencia a la inhibición de dicho gen, previamente descrita (Chanda y cols., 2009). Por otra parte, SHP aumenta con la quercetina, participando en el mecanismo mediante el cual el flavonol desarrolla su función protectora frente a NAFLD. SHP es un fuerte represor de la actividad de C/EBP $\alpha$  (Park y cols., 2007; Benet y cols., 2015), por lo que el aumento de SHP en el inicio del desarrollo de NAFLD tiene un papel protector al modular la función de C/EBP $\alpha$  evitando el acúmulo lipídico (Flodby y cols., 1996). Sin embargo, CEBP/ $\alpha$  es a su vez un represor de la expresión de SHP (Benet y cols., 2015), lo que puede explicar, al menos en parte, los resultados observados en nuestros modelos experimentales. Se ha comprobado que la inhibición de SHP en ratones disminuye la activación de FAT/CD36, lo que indica que actúa como coactivador junto con PPAR $\alpha$  y SREBP-1c, ayudando a proteger frente al desarrollo de (Huang y cols., 2007; Trauner, 2007). No obstante, la expresión de FAT/CD36 se mantiene incrementada durante la duración del estudio, por lo que su sobreexpresión no parece depender exclusivamente de SHP, sino derivarse de la actuación conjunta del mismo con otros receptores nucleares.

Por otra parte, se ha descrito la activación de la vía de PI3K/AKT en cultivos celulares tratados con medio MCD (Sahai y cols., 2006), en ratones alimentados con dieta MCD (Matsuda y cols., 2013) y en pacientes con NAFLD (Xu y cols., 2011). Dichos hallazgos han sido corroborados en el presente estudio, observándose en nuestro modelo *in vivo* la activación de la vía de PI3K/AKT. Por ello, y con el fin de intentar establecer el papel que desempeña dicha vía en el desarrollo de NAFLD, se procedió a la inhibición de dicha vía en nuestro modelo *in vitro*, mediante la utilización de LY294002 como inhibidor de la fosforilación de AKT. La administración del inhibidor LY294002 al medio MCD bloquea la activación de la vía PI3K/AKT descrita como consecuencia de la dieta deficiente en metionina y colina, mientras que la acción protectora de la quercetina no modifica la actividad del inhibidor.

El flavonoide quercetina, gracias a su actividad antioxidante, es capaz de disminuir el estrés oxidativo y la lipoperoxidación en las células Huh7 de manera independiente de la vía PI3K/AKT. Los resultados obtenidos en los que la inhibición de dicha vía en presencia del inhibidor LY294002 aumenta el estrés oxidativo y no parece tener impacto en la lipoperoxidación. Se ha demostrado que el aumento de especies reactivas acompañado de la lipoperoxidación son capaces de aumentar la degradación

del inhibidor de la vía PTEN, de manera que en nuestro modelo encontramos menos proteína citoplasmática, mostrando un aumento de la tasa pPTEN/PTEN, lo que indica que su capacidad para inhibir la vía PI3K/AKT está disminuida, justificando que la encontramos aumentada en nuestro modelo MCD (Zhang y cols., 2016).

En la expresión de los genes inflamatorios, en nuestro estudio se observa que la activación de la vía PI3K/AKT se asocia a la sobreexpresión de SOCS3 y TNF- $\alpha$ , siendo la quercetina capaz de inhibir la inducción de ambos genes. Se ha demostrado que la inhibición con LY294002 produce una fuerte disminución de la expresión TNF- $\alpha$  (Kim y cols., 2013) y de SOCS3 (Duvnjak y cols., 2007), tal y como se describe en nuestro estudio. La vía PI3K/AKT aumenta a través de mTOR la expresión de NF- $\kappa$ B (Matsuda y cols., 2013), que a su vez induce multitud de citocinas como es la TNF- $\alpha$  y la IL-6 (Duvnjak y cols., 2007), esta última actuando a su vez como promotora de SOCS3 y SOCS1. Tanto TNF- $\alpha$  como SOCS3 intervienen de manera directa en la aparición de resistencia a la insulina (Cai y cols., 2005; Tilg y cols., 2006). De acuerdo a nuestros resultados, ambos genes están regulados por la vía PI3K/AKT, siendo la acción de la quercetina sobre su expresión dependiente de dicha vía. Por otra parte, la expresión de iNOS está aumentada como consecuencia de la deficiencia en metionina y colina, y la completa inhibición de la vía PI3K aumenta enormemente el estrés oxidativo y también la expresión de dicho gen. La quercetina fue capaz de inhibir la expresión de iNOS, incluso en el medio suplementado con LY294002, debido a su potencial como agente antiinflamatorio (Middleton y cols., 2000; García-Mediavilla y cols., 2007; J González-Gallego y cols., 2007; Lima-Cabello y cols., 2011) y demostrando tener al menos parte de esa actividad de manera independiente de la vía PI3K/AKT.

Al igual que en nuestros ratones con dieta MCD se ha comprobado que en NAFLD aumenta la relación p65 nuclear/citoplasmático implica una activación de la vía del NF- $\kappa$ B (Matsuda y cols., 2013; Michelotti y cols., 2013). La desregulación de la vía de señalización celular dependiente del NF- $\kappa$ B está involucrada asimismo en la activación del inflammasoma, aumentando la expresión de múltiples procitocinas inflamatorias (Szabo y Csak, 2012; Szabo y Petrasek, 2015). En nuestros resultados observamos una inducción significativa de la expresión génica de NLRP3 en ratones alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina respecto a los ratones alimentados con una dieta control. Dichos hallazgos se asocian con el desarrollo de la inflamación en NAFLD debido a la capacidad de aumentar la caspasa-1 que convierte las procitocinas procedentes de la vía de NF- $\kappa$ B en citocinas inflamatorias (Szabo y Petrasek, 2015). La administración de quercetina a nuestros ratones con dieta MCD, ha demostrado ser capaz de reducir la sobreexpresión de NLRP3. El aumento del estrés oxidativo juega un papel fundamental en el desarrollo de NAFLD, aumentando la expresión de NF- $\kappa$ B, entre otros mecanismos de acción (Dandekar y cols., 2015). En nuestro modelo *in vivo* con dieta MCD hemos podido constatar la inducción de genes relacionados con el estrés de retículo endoplásmico como son GRP78 y CHOP respecto al grupo control, tal

y como reflejan otros estudios (Machado y cols., 2015). La suplementación con quercetina a los ratones MCD reduce la desregulación de los genes involucrados en el desarrollo de estrés de retículo, lo que puede ser relevante en la progresión de la enfermedad desde la simple esteatosis a esteatohepatitis, como se ha sugerido previamente (Castro-López y cols., 2014).

En nuestro estudio, la suplementación de quercetina a las células tratadas con medio MCD se acompañó de la disminución de la expresión de SHP y de FAT/CD36. La utilización del inhibidor vía PI3K/AKT ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la expresión de FAT/CD36, de la misma manera que se demostró en el tratamiento de macrófagos con LY294002 (Rios y cols., 2012). Se ha documentado que la quercetina puede inducir Sirtuina1 y el factor nuclear 2 relacionados con el desarrollo de NAFLD, pero independientemente de la vía PI3K/AKT (Panchal y cols., 2012; Ying y cols., 2013) y del mismo modo la quercetina es capaz de aumentar la expresión de FAT/CD36 incluso en presencia de LY294002, indicando que la modulación de su expresión por parte de la quercetina se realiza también por vías alternativas a la vía PI3K/AKT. En cambio la modulación de SHP por la quercetina depende directamente de su capacidad de modular la vía PI3K/AKT, ya que la adición de quercetina al medio MCD asociado a LY294002 no modificó la expresión de SHP respecto al medio MCD con inhibidor.

Por el contrario, FABP1 y FOXA1 se encuentran inhibidos en presencia de LY294002 a pesar de que en la activación de la vía de PI3K/AKT se encontraban también reprimidos, lo que indica que ambos son reprimidos por otra vía que se contrapone a la vía de PI3K/AKT. Del mismo modo, en nuestros ratones SHP se inhibe a partir de la segunda semana de tratamiento mediante un posible mecanismo similar. Por otra parte, FATP5, PPAR $\alpha$  y CEBP/ $\alpha$  se sobreexpresaron en la inhibición de la vía PI3K/AKT de acuerdo a la represión de estos genes cuando la vía esta activada. En cuanto a C/EBP $\alpha$ , de acuerdo a nuestro estudio, se ha demostrado que es reprimido por la activación de PI3K/AKT (Datta y cols., 2007; Zhang y cols., 2008). Asimismo, la activación de la vía causa un fuerte aumento de iNOS, como se demostró en macrófagos (Kim y cols., 2013).

El efecto modulador de la quercetina en el desarrollo de la esteatosis producida por HCV no depende solo de su capacidad antioxidante, sino que depende de cómo esta capacidad interviene inactivando la vía de PI3K/AKT (Kim y cols., 2013). Por eso el efecto modulador de la quercetina a través de dicha vía queda anulado al añadir el inhibidor químico de esta, sin capacidad para modular la expresión de SOCS3, TNF- $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , PPAR $\alpha$  y C/EBP $\beta$ , como se muestra en nuestro trabajo. El tratamiento de adipocitos con el flavonoide baicalin es capaz de reprimir la expresión de C/EBP $\beta$  al disminuir la cantidad de AKT fosforilado (Kim y cols., 2013). Por otra parte, la expresión génica de FABP1, FOXA1 e iNOS es regulada por la quercetina a través de otras vías,

debido a que puede modificar la expresión de estos genes durante la inhibición de la vía con LY294002.

En resumen, la quercetina ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de NAFLD al ser capaz de modular el estrés oxidativo, la inflamación y el metabolismo lipídico tanto en el modelo *in vivo* como en el modelo *in vitro*. El efecto de la quercetina se deriva, al menos en parte, de su capacidad de inactivar la vía PI3K/AKT, aunque se ha demostrado que actúa a través de múltiples vías metabólicas. Estos resultados demuestran que la quercetina tiene capacidad para ser utilizada de manera terapéutica en la prevención y tratamiento complementario de NAFLD.



## **CONCLUSIONES**



**Conclusión primera**

El modelo *in vivo* de hígado graso no alcohólico (NAFLD) basado en la administración de una dieta deficiente en metionina y colina (MCD) se caracterizó por la presentación de una alteración hepática progresiva en el tiempo, compatible con el desarrollo de esteatosis y su evolución a esteatohepatitis, tal y como se deriva de los hallazgos histológicos y bioquímicos plasmáticos y hepáticos. Por ello, junto con el modelo *in vitro* de hígado graso no alcohólico constituyen un marco adecuado para el estudio de los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de NAFLD.

**Conclusión segunda**

En nuestros modelos experimentales de NAFLD, el acúmulo intrahepatocitario de lípidos se acompañó de la existencia de estrés oxidativo y nitrosativo y lipotoxicidad, resultando inducida la respuesta inflamatoria y alterándose la regulación de los principales genes involucrados en la lipogénesis *de novo* y en la captación y transporte de ácidos grasos en los hepatocitos.

**Conclusión tercera**

La suplementación con quercetina redujo el índice de actividad de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, disminuyendo el daño y el acúmulo lipídico en los hepatocitos, fundamentalmente mediante la reducción del depósito de triglicéridos y ácidos grasos libres, limitando el estrés oxidativo/nitrosativo, la peroxidación lipídica y la respuesta inflamatoria, efecto mediado por la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y moduladora del metabolismo lipídico mostrada por el flavonoide en nuestros modelos MCD de NAFLD.

**Conclusión cuarta**

El modelo nutricional *in vivo* de NAFLD basado en una dieta deficiente en metionina y colina produce una activación de las vías de señalización celular dependientes del factor nuclear NF- $\kappa$ B y de PI3K/AKT/PTEN implicadas en la patogénesis de NAFLD, provocando el desarrollo de estrés de retículo endoplásmico y la activación y ensamblaje del inflammasoma.

**Conclusión quinta**

La capacidad de la quercetina de revertir la desregulación de los genes involucrados en el desarrollo de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación y la alteración del metabolismo lipídico observado en nuestros modelos de hígado graso no alcohólico parece deberse, al menos en parte, al bloqueo de la activación de la vía de señalización celular PI3K/AKT derivada del tratamiento con la dieta o el medio MCD, tal como indican los resultados obtenidos tras la inhibición de dicha vía con LY294002 en nuestro modelo *in vitro*.

**Conclusión sexta**

En el modelo experimental *in vivo*, la quercetina demostró tener un efecto modulador sobre la vía proinflamatoria del NF- $\kappa$ B, siendo capaz de reducir su activación y bloqueando así la sobreexpresión de genes relacionados con el inicio de la respuesta inflamatoria derivada de la activación del inflamasoma y el desencadenamiento de estrés de retículo endoplásmico.

#### **Conclusión séptima**

En nuestro modelo *in vivo* de NAFLD con dieta MCD, la quercetina tiene un efecto modulador sobre la vía PI3K/AKT/PTEN, al reducir la fosforilación de PTEN. Dicha capacidad del flavonol de bloquear la fosforilación de PTEN, contrastado supresor tumoral, apoya la utilidad terapéutica de la quercetina en el tratamiento de NAFLD y en la prevención de su evolución a hepatocarcinoma.

#### **Conclusión general**

Los resultados obtenidos en nuestros modelos experimentales indican que la quercetina podría ser utilizada como tratamiento en la enfermedad de hígado graso no alcohólico, no solo por su capacidad antioxidante e antiinflamatoria sino por su efecto modulador de la lipogénesis y de las vías de señalización celular involucradas en el desarrollo de la enfermedad.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ables, G. P. (2012) "Update on ppar $\alpha$  and nonalcoholic Fatty liver disease.", *PPAR research*, 2012, p. 912351. doi:10.1155/2012/912351.
- Alkhoury, N., Dixon, L. J. y Feldstein, A. E. (2009) "Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal.", *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 3(4), pp. 445-51. doi:10.1586/egh.09.32.
- Almonacid-Urrego, C., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J. y González-Gallego, J. (2012) "Non-Alcoholic Steatohepatitis: What Can We Learn from Animal Models?", *Current Medicinal Chemistry*, 19(9), pp. 1389-1404. doi:10.2174/092986712799462586.
- Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. y Zaidi, N. (2014) "De novo lipogenesis in health and disease", *Metabolism*, 63(7), pp. 895-902. doi:10.1016/j.metabol.2014.04.003.
- Anderson, N. y Borlak, J. (2008) "Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis.", *Pharmacological reviews*, 60(3), pp. 311-57. doi:10.1124/pr.108.00001.
- Annoni, G., Weiner, F. R. y Zern, M. A. (1992) "Increased transforming growth factor-beta 1 gene expression in human liver disease.", *Journal of hepatology*, 14(2-3), pp. 259-64.
- Anstee, Q. M. y Goldin, R. D. (2006) "Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research.", *International journal of experimental pathology*. Wiley-Blackwell, 87(1), pp. 1-16. doi:10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x.
- Arun, J., Clements, R. H., Lazenby, A. J., Leeth, R. R. y Abrams, G. A. (2006) "The prevalence of nonalcoholic steatohepatitis is greater in morbidly obese men compared to women.", *Obesity surgery*, 16(10), pp. 1351-8. doi:10.1381/096089206778663715.
- Assy, N., Kaita, K., Mymin, D., Levy, C., Rosser, B. y Minuk, G. (2000) "Fatty Infiltration of Liver in Hyperlipidemic Patients", *Digestive Diseases and Sciences*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 45(10), pp. 1929-1934. doi:10.1023/A:1005661516165.
- Astapova, O. y Leff, T. (2012) "Adiponectin and PPAR $\gamma$ : cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism.", *Vitamins and hormones*, 90, pp. 143-62. doi:10.1016/B978-0-12-398313-8.00006-3.
- Auguet, T., Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Martinez, S., Porras, J. A. y cols. (2014) "Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease.", *International journal of molecular sciences*, 15(12), pp. 22173-87. doi:10.3390/ijms151222173.
- Azad, M. B., Chen, Y. y Gibson, S. B. (2009) "Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment", *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), pp. 777-790. doi:10.1089/ars.2008.2270.
- Bacon, B. R., Farahvash, M. J., Janney, C. G. y Neuschwander-Tetri, B. A. (1994) "Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity.", *Gastroenterology*, 107(4), pp. 1103-9.
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K. y cols. (2009) "Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression", *The Journal of Immunology*,

183(2), pp. 787-791. doi:10.4049/jimmunol.0901363.

Bechmann, L. P., Gieseler, R. K., Sowa, J-P., Kahraman, A., Erhard, J. y cols. (2009) "Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis", *Liver International*, 30(6), pp. 850-859. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02248.x.

Bechmann, L. P., Kocabayoglu, P., Sowa, J-P., Sydor, S., Best, J. y cols. (2013) "Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis", *Hepatology*. John Wiley and Sons Inc., 57(4), pp. 1394-1406. doi:10.1002/hep.26225.

Bełtowski, J. (2008) "Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia.", *Cardiovascular therapeutics*, 26(4), pp. 297-316. doi:10.1111/j.1755-5922.2008.00062.x.

Benet, M., Guzman, C., Pisonero-Vaquero, S., Garcia-Mediavilla, M. V., Sanchez-Campos, S. y cols. (2015) "Repression of the Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner by Steatotic Drugs and in Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease", *Molecular Pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 87(4), pp. 582-594. doi:10.1124/mol.114.096313.

Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., Aragonès, G. y Auguet, T. (2015) "[Role of metabolic lipases and lipotoxicity in the development of non-alcoholic steatosis and non-alcoholic steatohepatitis].", *Clínica e investigación en arteriosclerosis : publicación oficial de la Sociedad Española de Arteriosclerosis*, 28(1), pp. 47-61. doi:10.1016/j.arteri.2015.03.003.

Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A. y Auguet, T. (2014) "Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease.", *Clinical and experimental gastroenterology*, 7, pp. 221-39. doi:10.2147/CEG.S62831.

Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L. P., Samson-Bouma, M. y Wetterau, J. R. (2000) "The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia.", *Annual review of nutrition*, 20, pp. 663-97. doi:10.1146/annurev.nutr.20.1.663.

Bhat, G., Baba, C. S., Pandey, A., Kumari, N. y Choudhuri, G. (2012) "Life style modification improves insulin resistance and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease.", *World journal of hepatology*. Baishideng Publishing Group Inc, 4(7), pp. 209-17. doi:10.4254/wjh.v4.i7.209.

Bissell, D. M., Roulot, D. y George, J. (2001) "Transforming growth factor beta and the liver.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(5), pp. 859-67. doi:10.1053/jhep.2001.28457.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G. y Gluud, C. (2007) "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis.", *JAMA*, 297(8), pp. 842-57. doi:10.1001/jama.297.8.842.

Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D-C. y Roudot-Thoraval, F. (2013) "The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data.", *Journal of hepatology*, 58(3), pp. 593-608. doi:10.1016/j.jhep.2012.12.005.

Boots, A. W., Haenen, G. R. y Bast, A. (2008) "Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical", *European Journal of Pharmacology*, 585(2), pp. 325-337. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.008.

Boulias, K., Katrakili, N., Bamberg, K., Underhill, P., Greenfield, A. y Talianidis, I. (2005) "Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP.", *The EMBO*

*journal*, 24(14), pp. 2624-33. doi:10.1038/sj.emboj.7600728.

Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.", *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248-54

Brea, A. y Puzo, J. (2013) "Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk.", *International journal of cardiology*, 167(4), pp. 1109-17. doi:10.1016/j.ijcard.2012.09.085.

Brown, D. I. y Griendling, K. K. (2015) "Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system.", *Circulation research*, 116(3), pp. 531-49. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303584.

Bruning, A. (2013) "Inhibition of mTOR Signaling by Quercetin in Cancer Treatment and Prevention", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(7), pp. 1025-1031. doi:10.2174/18715206113139990114.

Brunt, E. M. y Tiniakos, D. G. (2010) "Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease.", *World journal of gastroenterology*, 16(42), pp. 5286-96.

Bumke-Vogt, C., Osterhoff, M. A., Borchert, A., Guzman-Perez, V., Sarem, Z. y cols. (2014) "The Flavones Apigenin and Luteolin Induce FOXO1 Translocation but Inhibit Gluconeogenic and Lipogenic Gene Expression in Human Cells", *PLoS ONE*. Editado por J. Eckel, 9(8), p. e104321. doi:10.1371/journal.pone.0104321.

Buzzetti, E., Pinzani, M. and Tsochatzis, E. A. (2016) "The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)", *Metabolism*, 65, pp. 1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012.

Byrne, C. D. y Targher, G. (2015) "NAFLD: A multisystem disease.", *Journal of hepatology*, 62(1S), pp. S47-S64. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.012.

Caballería, J. y Rodés, J. (2003) "Non-alcoholic steatohepatitis.", *Medicina clínica*, 120(17), pp. 670-5.

Caballería, L., Pera, G., Rodríguez, L., Auladell, M. A., Bernad, J. y cols. (2012) "Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease in a Spanish population: influence of the diagnostic criteria used.", *European journal of gastroenterology & hepatology*, 24(9), pp. 1007-11. doi:10.1097/MEG.0b013e328355b87f.

Caldwell, S. (2017) "NASH Therapy: omega 3 supplementation, vitamin E, insulin sensitizers and statin drugs", *Clinical and Molecular Hepatology*, 23(2), pp. 103-108. doi:10.3350/cmh.2017.0103.

Cantley, L. C., Fruman, D. A., Meyers, R. E., Cantley, L. C., Lawlor, M. A. y cols. (2002) "The phosphoinositide 3-kinase pathway.", *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 296(5573), pp. 1655-7. doi:10.1126/science.296.5573.1655.

Castro-López, Mdel M., López-Vilariño, J. M. y González-Rodríguez, M. V. (2014) "Analytical determination of flavonoids aimed to analysis of natural samples and active packaging applications.", *Food chemistry*, 150, pp. 119-27. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.156.

Cayrol, C. y Girard, J-P. (2009) "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(22), pp. 9021-6. doi:10.1073/pnas.0812690106.

- Cha, J-Y. y Repa, J. J. (2007) "The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR.", *The Journal of biological chemistry*, 282(1), pp. 743-51. doi:10.1074/jbc.M605023200.
- Chalasanani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M. y cols. (2012) "The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association", *Hepatology*, 55(7), pp. 1592-609. doi:10.1053/j.gastro.2012.04.001.
- Chanda, D., Lee, C. H., Kim, Y-H., Noh, J-R., Kim, D-K. y cols. (2009) "Fenofibrate differentially regulates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase-dependent induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner", *Hepatology*, 50(3), pp. 880-892. doi:10.1002/hep.23049.
- Chavez, J. A., Knotts, T. A., Wang, L-P., Li, G., Dobrowsky, R. T. y cols. (2003) "A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(12), pp. 10297-10303. doi:10.1074/jbc.M212307200.
- Chavez, J. A. y Summers, S. A. (2012) "A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance", *Cell Metabolism*, 15(5), pp. 585-594. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.002.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L. y Brown, M. S. (2004) "Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), pp. 11245-50. doi:10.1073/pnas.0404297101.
- Chitturi, S., Farrell, G., Frost, L., Kriketos, A., Lin, R., Fung, C., Liddle, C., Samarasinghe, D. y George, J. (2002) "Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity?", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(2), pp. 403-9. doi:10.1053/jhep.2002.34738.
- Choi, S. H. y Ginsberg, H. N. (2011) "Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance.", *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. NIH Public Access, 22(9), pp. 353-63. doi:10.1016/j.tem.2011.04.007.
- Choi, S. S. y Diehl, A. M. (2008) "Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease.", *Current opinion in lipidology*, 19(3), pp. 295-300. doi:10.1097/MOL.0b013e32822ff5e55.
- Choi, Y-J., Lee, K-Y., Jung, S-H., Kim, H. S., Shim, G. y cols. (2017) "Activation of AMPK by berberine induces hepatic lipid accumulation by upregulation of fatty acid translocase CD36 in mice", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 316, pp. 74-82. doi:10.1016/j.taap.2016.12.019.
- Chow, L. M., Baker, S. J. (2006) "PTEN function in normal and neoplastic growth.", *Cancer letters*. Elsevier, 241(2), pp. 184-96. doi:10.1016/j.canlet.2005.11.042.
- Cortez-Pinto, H., Camilo, M. E., Baptista, A., De Oliveira, A. G. y De Moura, M. C. (1999) "Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome?", *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 18(6), pp. 353-8. doi:10.1054/clnu.1999.0047.
- Crespo, I., García-Mediavilla, M. V., Almar, M., González, P., Tuñón, M. J. y cols. (2008) "Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang



Liver cells", *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), pp. 1555-1569. doi:10.1016/j.fct.2007.12.014.

Crespo, I., García-Mediavilla, M. V., Gutiérrez, B., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J. y González-Gallego, J. (2008) "A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells", *British Journal of Nutrition*, 100(5), p. 968. doi:10.1017/S0007114508966083.

Crespo, J., Cayón, A., Fernández-Gil, P., Hernández-Guerra, M., Mayorga, M., Domínguez-Díez, A., Fernández-Escalante, J. C. y Pons-Romero, F. (2001) "Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 34(6), pp. 1158-63. doi:10.1053/jhep.2001.29628.

Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., DeAngelis, R. A., Ciliberto, G., Furth, E. E. y cols. (1996) "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice.", *Science (New York, N.Y.)*, 274(5291), pp. 1379-83.

D'Andrea, G. (2015) "Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?", *Fitoterapia*, 106, pp. 256-271. doi:10.1016/j.fitote.2015.09.018.

Dandekar, A., Mendez, R. y Zhang, K. (2015) "Cross Talk Between ER Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Health and Disease.", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1292, pp. 205-14. doi:10.1007/978-1-4939-2522-3\_15.

Datta, J., Majumder, S., Kutay, H., Motiwala, T., Frankel, W. y cols. (2007) "Metallothionein Expression Is Suppressed in Primary Human Hepatocellular Carcinomas and Is Mediated through Inactivation of CCAAT/Enhancer Binding Protein by Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Cascade", *Cancer Research*, 67(6), pp. 2736-2746. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4433.

Day, C. P. y James, O. F. (1998) "Steatohepatitis: a tale of two «hits»?", *Gastroenterology*, 114(4), pp. 842-5.

Dentin, R., Girard, J. y Postic, C. (2005) "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*, 87(1), pp. 81-86. doi:10.1016/j.biochi.2004.11.008.

Diehl, A. M. (1999) "Nonalcoholic steatohepatitis.", *Seminars in liver disease*, 19(2), pp. 221-9. doi:10.1055/s-2007-1007111.

Dinarello, C. A. (2011) "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases", *Blood*, 117(14).

Dionisio, N., Garcia-Mediavilla, M. V., Sanchez-Campos, S., Majano, P. L., Benedicto, I. y cols. (2009) "Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes", *Journal of Hepatology*, 50(5), pp. 872-882. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.026.

Divine, J. K., McCaul, S. P. y Simon, T. C. (2003) "HNF-1alpha and endodermal transcription factors cooperatively activate Fabp1: MODY3 mutations abrogate cooperativity.", *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 285(1), pp. G62-72. doi:10.1152/ajpgi.00074.2003.

Dixit, V. y Mak, T. W. (2002) "NF-??B signaling: Many roads lead to Madrid", *Cell*, pp. 615-619.

doi:10.1016/S0092-8674(02)01166-2.

Doege, H., Grimm, D., Falcon, A., Tsang, B., Storm, T. A. y cols. (2008) "Silencing of Hepatic Fatty Acid Transporter Protein 5 in Vivo Reverses Diet-induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Improves Hyperglycemia". *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 283(32). doi:10.1074/jbc.M803510200.

Donati, G., Stagni, B., Piscaglia, F., Venturoli, N., Morselli-Labate, A. M. y cols. (2004) "Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance.", *Gut*, 53(7), pp. 1020-3.

Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D. y Parks, E. J. (2005) "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease.", *The Journal of clinical investigation*, 115(5), pp. 1343-51. doi:10.1172/JCI23621.

Downes, C. P., Perera, N., Ross, S. y Leslie, N. R. (2007) "Substrate specificity and acute regulation of the tumour suppressor phosphatase, PTEN.", *Biochemical Society symposium*, (74), pp. 69-80. doi:10.1042/BSS0740069.

Duvnjak, M., Lerotić, I., Barsić, N., Tomasić, V., Virović Jukić, L. y Velagić, V. (2007) "Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease.", *World journal of gastroenterology*, 13(34), pp. 4539-50.

Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Magkos, F., Korenblat, K. M., Patterson, B. W. y cols. (2008) "Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease.", *Gastroenterology*. Elsevier, 134(2), pp. 424-31. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.038.

Falck-Ytter, Y., Younossi, Z. M., Marchesini, G. y McCullough, A. J. (2001) "Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes.", *Seminars in liver disease*, 21(1), pp. 17-26.

Fargion, S., Mattioli, M., Fracanzani, A. L., Sampietro, M., Tavazzi, D. y cols. (2001) "Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis.", *The American journal of gastroenterology*, 96(8), pp. 2448-55. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.04052.x.

Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Canbay, A., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F. y cols. (2004) "Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(1), pp. 185-94. doi:10.1002/hep.20283.

Ferré, P. y Foufelle, F. (2010) "Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c.", *Diabetes, obesity & metabolism*, 12 Suppl 2, pp. 83-92. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x.

Finucane, M. M., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Danaei, G., Lin, J. K. y cols. (2011) "National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants.", *Lancet (London, England)*, 377(9765), pp. 557-67. doi:10.1016/S0140-6736(10)62037-5.

Fisher, C. D., Lickteig, A. J., Augustine, L. M., Oude Elferink, R. P. J., Besselsen, D. G. y cols. (2009) "Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats.", *European journal of pharmacology*. NIH Public

Access, 613(1-3), pp. 119-27. doi:10.1016/j.ejphar.2009.04.002.

Flodby, P., Barlow, C., Kylefjord, H., Ahrlund-Richter, L. y Xanthopoulos, K. G. (1996) "Increased Hepatic Cell Proliferation and Lung Abnormalities in Mice Deficient in CCAAT/Enhancer Binding Protein ", *Journal of Biological Chemistry*, 271(40), pp. 24753-24760. doi:10.1074/jbc.271.40.24753.

Fon Tacer, K. y Rozman, D. (2011) "Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation.", *Journal of lipids*. Hindawi Publishing Corporation, 2011, p. 783976. doi:10.1155/2011/783976.

Fox, J. T., Sakamuru, S., Huang, R., Teneva, N., Simmons, S. O. y cols. (2012) "High-throughput genotoxicity assay identifies antioxidants as inducers of DNA damage response and cell death.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), pp. 5423-8. doi:10.1073/pnas.1114278109.

Freitas, I., Boncompagni, E., Tarantola, E., Gruppi, C., Bertone, V. y cols. (2016) "In Situ Evaluation of Oxidative Stress in Rat Fatty Liver Induced by a Methionine- and Choline-Deficient Diet", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation, 2016, pp. 1-14. doi:10.1155/2016/9307064.

Friedman, J. R. y Kaestner, K. H. (2006) "The Foxa family of transcription factors in development and metabolism.", *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 63(19-20), pp. 2317-28. doi:10.1007/s00018-006-6095-6.

Fujita, K., Nozaki, Y., Wada, K., Yoneda, M., Fujimoto, Y. y cols. (2009) "Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis", *Hepatology*, 50(3), pp. 772-780. doi:10.1002/hep.23094.

Gaggini, M., Morelli, M., Buzzigoli, E., DeFronzo, R., Bugianesi, E. y Gastaldelli, A. (2013) "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Its Connection with Insulin Resistance, Dyslipidemia, Atherosclerosis and Coronary Heart Disease", *Nutrients*, 5(5), pp. 1544-1560. doi:10.3390/nu5051544.

García-Mediavilla, M-V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S. y cols. (2007) "The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells", *European Journal of Pharmacology*, 557(2-3), pp. 221-229. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.014.

García-Ruiz, C., Colell, A. y Morales, A. (1995) "Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochon", *Molecular pharmacology*, 48(5), pp. 825-34.

Gastaldelli, A., Cusi, K., Pettiti, M., Hardies, J., Miyazaki, Y. y cols. (2007) "Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects.", *Gastroenterology*, 133(2), pp. 496-506. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.068.

Goldwasser, J., Cohen, P. Y., Yang, E., Balaguer, P., Yarmush, M. L. y Nahmias, Y. (2010) "Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: Role of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$ ", *PLoS ONE*, 5(8), p. e12399. doi:10.1371/journal.pone.0012399.

González-Gallego, J., García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S. y Tuñón, M. J. (2010) "Fruit

polyphenols, immunity and inflammation", *British Journal of Nutrition*, 104(S3), pp. S15-S27. doi:10.1017/S0007114510003910.

González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. y Tuñón, M. J. (2007) "Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids.", *Nutrición hospitalaria*, 22(3), pp. 287-93.

Goodwin, B., Watson, M. A., Kim, H., Miao, J., Kemper, J. K. y Kliewer, S. A. (2003) "Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha.", *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. Endocrine Society, 17(3), pp. 386-94. doi:10.1210/me.2002-0246.

Görlach, A., Dimova, E. Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P. y cols. (2015) "Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved?", *Redox biology*. Elsevier, 6, pp. 372-85. doi:10.1016/j.redox.2015.08.016.

Greene, M. W., Burrington, C. M., Lynch, D. T., Davenport, S. K., Johnson, A. K. y cols. (2014) "Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis.", *PLoS one*. Public Library of Science, 9(1), p. e85848. doi:10.1371/journal.pone.0085848.

Guzmán, C., Benet, M., Pisonero-Vaquero, S., Moya, M., García-Mediavilla, M. V. y cols. (2013) "The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPAR $\alpha$ ; and repressed by C/EBP $\alpha$ : Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease.", *Biochimica et biophysica acta*, 1831(4), pp. 803-18. doi:10.1016/j.bbali.2012.12.014.

Gyamfi, M. A., Damjanov, I., French, S. y Wan, Y.-J. Y. (2008) "The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury", *Biochemical Pharmacology*, 75(4), pp. 981-995. doi:10.1016/j.bcp.2007.09.030.

Hajduch, E., Turban, S., Le Liepvre, X., Le Lay, S., Lipina, C. y cols. (2008) "Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide.", *The Biochemical journal*. Portland Press Limited, 410(2), pp. 369-79. doi:10.1042/BJ20070936.

Hajri, T., Han, X. X., Bonen, A. y Abumrad, N. A. (2002) "Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice.", *The Journal of clinical investigation*, 109(10), pp. 1381-9. doi:10.1172/JCI14596.

Han, M. A. T., Saouaf, R., Ayoub, W., Todo, T., Mena, E. y Nouredin, M. (2017) "Magnetic resonance imaging and transient elastography in the management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)", *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 10(4), pp. 379-390. doi:10.1080/17512433.2017.1299573.

Hardy, S., El-Assaad, W., Przybytkowski, E., Joly, E., Prentki, M. y Langelier, Y. (2003) "Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin.", *The Journal of biological chemistry*, 278(34), pp. 31861-70. doi:10.1074/jbc.M300190200.

Harrison, S. A., Torgerson, S., Hayashi, P., Ward, J. y Schenker, S. (2003) "Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis.", *The American journal of gastroenterology*, 98(11), pp. 2485-90. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.08699.x.

Hebbard, L. y George, J. (2011) "Animal models of nonalcoholic fatty liver disease.", *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 8(1), pp. 35-44. doi:10.1038/nrgastro.2010.191.

- Henkel, A. S., Dewey, A. M., Anderson, K. A., Olivares, S. y Green, R. M. (2012) "Reducing endoplasmic reticulum stress does not improve steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet.", *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. American Physiological Society, 303(1), pp. G54-9. doi:10.1152/ajpgi.00052.2012.
- Hernaiz, R., Lazo, M., Bonekamp, S., Kamel, I., Brancati, F. L. y cols. (2011) "Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(3), pp. 1082-90. doi:10.1002/hep.24452.
- Higuchi, N., Kato, M., Shundo, Y., Tajiri, H., Tanaka, M. y cols. (2008) "Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease.", *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 38(11), pp. 1122-9. doi:10.1111/j.1872-034X.2008.00382.x.
- Hihi, A. K., Michalik, L. y Wahli, W. (2002) "PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives.", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59(5), pp. 790-8.
- Holland, W. L., Bikman, B. T., Wang, L-P., Yuguang, G., Sargent, K. M. y cols. (2011) "Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice", *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 121(5), pp. 1858-1870. doi:10.1172/JCI43378.
- Hoofnagle, J. H., Van Natta, M. L., Kleiner, D. E., Clark, J. M., Kowdley, K. V. y cols. (2013) "Vitamin E and changes in serum alanine aminotransferase levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis.", *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 38(2), pp. 134-43. doi:10.1111/apt.12352.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. y Spiegelman, B. M. (1993) "Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance.", *Science (New York, N.Y.)*, 259(5091), pp. 87-91.
- Hu, C-M., Cao, Q., Lv, X-W., Cheng, W-M., Li, R. y Li, J. (2012) "Protective effects of total flavonoids from *Litsea coreana* on alcoholic fatty liver in rats associated with down-regulation adipose differentiation-related protein expression.", *The American journal of Chinese medicine*, 40(3), pp. 599-610. doi:10.1142/S0192415X12500450.
- Huang, J., Iqbal, J., Saha, P. K., Liu, J., Chan, L., Hussain, M. M., Moore, D. D. y Wang, L. (2007) "Molecular characterization of the role of orphan receptor small heterodimer partner in development of fatty liver", *Hepatology*, 46(1), pp. 147-157. doi:10.1002/hep.21632.
- Ip, E., Farrell, G., Hall, P., Robertson, G. y Leclercq, I. (2004) "Administration of the potent PPAR $\alpha$  agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(5), pp. 1286-96. doi:10.1002/hep.20170.
- Ji, G., Wang, Y., Deng, Y., Li, X. y Jiang, Z. (2015) "Resveratrol ameliorates hepatic steatosis and inflammation in methionine/choline-deficient diet-induced steatohepatitis through regulating autophagy.", *Lipids in health and disease*. BioMed Central, 14, p. 134. doi:10.1186/s12944-015-0139-6.
- Ji, G., Yang, Q., Hao, J., Guo, L., Chen, X., y cols. (2011) "Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms", *International Immunopharmacology*, 11(6), pp. 762-768. doi:10.1016/j.intimp.2011.01.036.
- Jomezadeh, V., Mohammadpour, A. H., Rajabi, O., Tavassoli, A. y Maddah, G. (2012) "Evaluation of curcumin effects on post-operative peritoneal adhesion in rats.", *Iranian journal*

*of basic medical sciences*. Mashhad University of Medical Sciences, 15(6), pp. 1162-7.

Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. y Tontonoz, P. (2003) "Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors.", *Nature medicine*, 9(2), pp. 213-9. doi:10.1038/nm820.

Joven, J., Espinel, E., Rull, A., Aragonès, G., Rodríguez-Gallego, E. y cols. (2012) "Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(7), pp. 894-899. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.020.

Jung, C. H., Cho, I., Ahn, J., Jeon, T.-I. y Ha, T.-Y. (2013) "Quercetin Reduces High-Fat Diet-Induced Fat Accumulation in the Liver by Regulating Lipid Metabolism Genes", *Phytotherapy research : PTR*, 27(1), pp. 139-43. doi:10.1002/ptr.4687.

Kaidashev, I. P. (2012) "[NF- $\kappa$ B activation as a molecular basis of pathological process by metabolic syndrome].", *Fiziolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)*, 58(1), pp. 93-101.

Kamagate, A. y Dong, H. H. (2008) "FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production.", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(20), pp. 3162-70. doi:10.4161/cc.7.20.6882.

Kasturiratne, A., Weerasinghe, S., Dassanayake, A. S., Rajindrajith, S., de Silva, A. P. y cols. (2013) "Influence of non-alcoholic fatty liver disease on the development of diabetes mellitus.", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28(1), pp. 142-7. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07264.x.

Kawabata, K., Sugiyama, Y., Sakano, T. y Ohigashi, H. (2013) "Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substance(s) by Bifidobacterium adolescentis: prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin.", *BioFactors (Oxford, England)*, 39(4), pp. 422-9. doi:10.1002/biof.1081.

Kawano, Y. y Cohen, D. E. (2013) "Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease.", *Journal of gastroenterology*, 48(4), pp. 434-41. doi:10.1007/s00535-013-0758-5.

Kim, H. S., Park, E. J., Park, S. W., Kim, H. J. y Chang, K. C. (2013) "A tetrahydroisoquinoline alkaloid THI-28 reduces LPS-induced HMGB1 and diminishes organ injury in septic mice through p38 and PI3K/Nrf2/HO-1 signals", *International Immunopharmacology*, 17(3), pp. 684-692. doi:10.1016/j.intimp.2013.08.016.

Kim, S.-B., Kang, O.-H., Lee, Y.-S., Han, S.-H., Ahn, Y.-S. y cols. (2016) "Hepatoprotective Effect and Synergism of Bisdemethoycurcumin against MCD Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice.", *PloS one*. Public Library of Science, 11(2), p. e0147745. doi:10.1371/journal.pone.0147745.

Kim, S.-M., Jang, H., Son, Y., Lee, S.-A., Bae, S.-S. y cols. (2013) "27-Hydroxycholesterol induces production of tumor necrosis factor- $\alpha$  from macrophages", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(2), pp. 454-459. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.021.

Kirsch, R., Clarkson, V., Verdonk, R. C., Marais, A. D., Shephard, E. G. y cols. (2006) "Rodent nutritional model of steatohepatitis: effects of endotoxin (lipopolysaccharide) and tumor necrosis factor alpha deficiency.", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(1 Pt 1), pp. 174-82. doi:10.1111/j.1440-1746.2005.04220.x.

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J. y cols. (2005) "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.", 41(6).

doi:10.1002/hep.20701.

Koo, S.-H. (2013) "Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis.", *Clinical and molecular hepatology*, 19(3), pp. 210-5. doi:10.3350/cmh.2013.19.3.210.

Kowdley, K. V, Belt, P., Wilson, L. A., Yeh, M. M., Neuschwander-Tetri, B. A. y cols. (2012) "Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(1), pp. 77-85. doi:10.1002/hep.24706.

Kumar, S. y Pandey, A. K. (2013) "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview.", *TheScientificWorldJournal*. Hindawi Publishing Corporation, 2013, p. 162750. doi:10.1155/2013/162750.

Lamson, D. W. y Brignall, M. S. (2000) "Antioxidants and cancer, part 3: quercetin.", *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 5(3), pp. 196-208.

Laplante, M. y Sabatini, D. M. (2010) "mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), pp. 3281-2. doi:10.1073/pnas.1000323107.

Lau, J. K. C., Zhang, X. y Yu, J. (2017) "Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances", *The Journal of Pathology*, 241(1), pp. 36-44. doi:10.1002/path.4829.

Lazo, M., Hernaez, R., Eberhardt, M. S., Bonekamp, S., Kamel, I. y cols. (2013) "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994.", *American journal of epidemiology*, 178(1), pp. 38-45. doi:10.1093/aje/kws448.

Leclercq, I. A., Farrell, G. C., Schriemer, R. y Robertson, G. R. (2002) "Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury.", *Journal of hepatology*, 37(2), pp. 206-13.

Leslie, N. R., Bennett, D., Lindsay, Y. E., Stewart, H., Gray, A. y Downes, C. P. (2003) "Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN.", *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 22(20), pp. 5501-10. doi:10.1093/emboj/cdg513.

Leslie, N. R. y Downes, C. P. (2002) "PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling", *Cellular Signalling*, 14(4), pp. 285-295. doi:10.1016/S0898-6568(01)00234-0.

Li, A. G., Piluso, L. G., Cai, X., Wei, G., Sellers, W. R. y cols. (2006) "Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN.", *Molecular cell*. Elsevier, 23(4), pp. 575-87. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.028.

Li, S., Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (2010) "Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), pp. 3441-6. doi:10.1073/pnas.0914798107.

Li, X., Monks, B., Ge, Q. y Birnbaum, M. J. (2007) "Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 $\alpha$  transcription coactivator", *Nature*, 447(7147), pp. 1012-1016. doi:10.1038/nature05861.

Li, Z., Berk, M., McIntyre, T. M., Gores, G. J. y Feldstein, A. E. (2008) "The lysosomal-

- mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(5), pp. 1495-503. doi:10.1002/hep.22183.
- Li, Z., Yang, Y., Ming, M. y Liu, B. (2011) "Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer.", *Biochemical and biophysical research communications*, 414(1), pp. 5-8. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.046.
- Liang, G., Yang, J., Horton, J. D., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. y Brown, M. S. (2002) "Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c.", *The Journal of biological chemistry*, 277(11), pp. 9520-8. doi:10.1074/jbc.M111421200.
- Lima-Cabello, E., García-Mediavilla, M. V., Miquilena-Colina, M. E., Vargas-Castrillón, J., Lozano-Rodríguez, T. y cols. (2011) "Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C.", *Clinical science (London, England : 1979)*, 120(6), pp. 239-50. doi:10.1042/CS20100387.
- Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B. M., Andersson, U., Scarpulla, R. C. y cols. (2005) "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators", *Cell Metabolism*. Elsevier, 1(6), pp. 361-370. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.004.
- Liu, J., Han, L., Zhu, L. y Yu, Y. (2016) "Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats.", *Lipids in health and disease*, 15(1), p. 27. doi:10.1186/s12944-016-0194-7.
- Liu, S., Croniger, C., Arizmendi, C., Harada-Shiba, M., Ren, J. y cols. (1999) "Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene.", *The Journal of clinical investigation*, 103(2), pp. 207-13. doi:10.1172/JCI4243.
- Liu, Y., Han, X., Bian, Z., Peng, Y., You, Z. y cols. (2012) "Activation of liver X receptors attenuates endotoxin-induced liver injury in mice with nonalcoholic fatty liver disease.", *Digestive diseases and sciences*, 57(2), pp. 390-8. doi:10.1007/s10620-011-1902-9.
- Liu, Y., Song, H., Wang, L., Xu, H., Shu, X. y cols. (2014) "Hepatoprotective and antioxidant activities of extracts from *Salvia-Nelumbinis naturalis* against nonalcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet in mice.", *Journal of translational medicine*. BioMed Central, 12, p. 315. doi:10.1186/s12967-014-0315-x.
- London, R. M., George, J., Sanyal, A. J., Brunt, E. M., Ratzliff, V. y cols. (2007) "Pathogenesis of NASH: animal models.", *Clinics in liver disease*. Elsevier, 11(1), p. 55-74, viii. doi:10.1016/j.cld.2007.02.010.
- López-Oliva Muñoz, M. E. y Muñoz Martínez, E. (2014) "SREBP-1c, ChREBP y LXR: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico", *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, ISSN 0034-0618, ISSN-e 1697-4271, N<sup>o</sup>. 1, 2014, págs. 14-48. Real Academia Nacional de Farmacia, (1), pp. 14-48.
- Lu, T. T., Makishima, M., Repa, J. J., Schoonjans, K., Kerr, T. A. y cols. (2000) "Molecular Basis for Feedback Regulation of Bile Acid Synthesis by Nuclear Receptors", *Molecular Cell*. Elsevier, 6(3), pp. 507-515. doi:10.1016/S1097-2765(00)00050-2.
- Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. y Oh, B. J. (1980) "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.", *Mayo Clinic proceedings*, 55(7), pp. 434-8.



- Luiken, J. J., Koonen, D. P., Willems, J., Zorzano, A., Becker, C., Fischer, Y., Tandon, N. N., Van Der Vusse, G. J., Bonen, A. y Glatz, J. F. C. (2002) "Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36.", *Diabetes*, doi:10.2337/5110, pp. 3113-9.
- Machado, M. V. y Cortez-Pinto, H. (2014) "Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know.", *World journal of gastroenterology*, 20(36), pp. 12956-80. doi:10.3748/wjg.v20.i36.12956.
- Machado, M. V., Michelotti, G. A., Xie, G., de Almeida, T. P., Boursier, J. (2015) "Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease", *Plos One*, 10(5), p. e0127991. doi:10.1371/journal.pone.0127991.
- Mandard, S., Müller, M. y Kersten, S. (2004) "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes.", *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61(4), pp. 393-416. doi:10.1007/s00018-003-3216-3.
- Marcolin, E., San-Miguel, B., Vallejo, D., Tieppo, J., Marroni, N. y cols. (2012) "Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis.", *The Journal of nutrition*. American Society for Nutrition, 142(10), pp. 1821-8. doi:10.3945/jn.112.165274.
- Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J. y cols. (2006) "Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis.", *Cell metabolism*. Elsevier, 4(3), pp. 185-98. doi:10.1016/j.cmet.2006.07.006.
- Mårin, P., Andersson, B., Ottosson, M., Olbe, L., Chowdhury, B. y cols. (1992) "The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men.", *Metabolism: clinical and experimental*, 41(11), pp. 1242-8.
- Masterjohn, C. y Bruno, R. S. (2012) "Therapeutic potential of green tea in nonalcoholic fatty liver disease.", *Nutrition reviews*, 70(1), pp. 41-56. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00440.x.
- Mataki, C., Magnier, B. C., Houten, S. M., Annicotte, J.-S., Argmann, C. y cols. (2007) "Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1.", *Molecular and cellular biology*, 27(23), pp. 8330-9. doi:10.1128/MCB.00852-07.
- Matsuda, S., Kobayashi, M. y Kitagishi, Y. (2013) "Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.", *ISRN endocrinology*, 2013, p. 472432. doi:10.1155/2013/472432.
- McCullough, A. J., Falck-Ytter, Y., Younossi, Z. M., Marchesini, G., McCullough, A. J. y cols. (2004) "The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease", *Clinics in Liver Disease*. Elsevier, 8(3), pp. 521-533. doi:10.1016/j.cld.2004.04.004.
- Memon, R. A., Feingold, K. R., Moser, A. H., Fuller, J. y Grunfeld, C. (1998) "Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines.", *The American journal of physiology*, 274(2 Pt 1), pp. E210-7.
- Michelotti, G. a, Machado, M. V y Diehl, A. M. (2013) "NAFLD, NASH and liver cancer.", *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 10(11), pp. 656-65. doi:10.1038/nrgastro.2013.183.
- Middleton, E., Kandaswami, C. y Theoharides, T. C. (2000) "The Effects of Plant Flavonoids on

Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer", *Pharmacological Reviews*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 52(4), pp. 673-751.

Mikolasevic, I., Orlic, L., Franjic, N., Hauser, G., Stimac, D. y Milic, S. (2016) "Transient elastography (FibroScan®) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand?", *World journal of gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 22(32), pp. 7236-51. doi:10.3748/wjg.v22.i32.7236.

Miles, J. M. y Nelson, R. H. (2007) "Contribution of triglyceride-rich lipoproteins to plasma free fatty acids.", *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York, 39(10), pp. 726-9. doi:10.1055/s-2007-990273.

Milić, S., Lulić, D. y Štimac, D. (2014) "Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations.", *World journal of gastroenterology*, 20(28), pp. 9330-7. doi:10.3748/wjg.v20.i28.9330.

Miller, E. R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J. y Guallar, E. (2005) "Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality.", *Annals of internal medicine*. Centre for Reviews and Dissemination (UK), 142(1), pp. 37-46.

Millward, C. A., Heaney, J. D., Sinasac, D. S., Chu, E. C., Bederman, I. R. y cols. (2007) "Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity.", *Diabetes*. NIH Public Access, 56(1), pp. 161-7. doi:10.2337/db06-0310.

Miquilena-Colina, M. E., Lima-Cabello, E., Sanchez-Campos, S., Garcia-Mediavilla, M. V., Fernandez-Bermejo, M. y cols. (2011) "Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C", *Gut*, 60(10), pp. 1394-1402. doi:10.1136/gut.2010.222844.

Mofrad, P., Contos, M. J., Haque, M., Sargeant, C., Fisher, R. A. y cols. (2003) "Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values", *Hepatology*. W.B. Saunders, 37(6), pp. 1286-1292. doi:10.1053/jhep.2003.50229.

Monetti, M., Levin, M. C., Watt, M. J., Sajan, M. P., Marmor, S. y cols. (2007) "Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver.", *Cell metabolism*, 6(1), pp. 69-78. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.005.

Motojima, K., Passilly, P., Peters, J. M., Gonzalez, F. J. y Latruffe, N. (1998) "Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner.", *The Journal of biological chemistry*, 273(27), pp. 16710-4.

Moya, M., Benet, M., Guzmán, C., Tolosa, L., García-Monzón, C., Pareja, E. y cols. (2012) "Foxa1 Reduces Lipid Accumulation in Human Hepatocytes and Is Down-Regulated in Nonalcoholic Fatty Liver", *PLoS ONE*. Editado por V. Saks. Public Library of Science, 7(1), p. e30014. doi:10.1371/journal.pone.0030014.

Musso, G., Gambino, R., Cassader, M. y Pagano, G. (2010) "A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease", *Hepatology*, 52(1), pp. 79-104. doi:10.1002/hep.23623.

- Nakanishi, A., Wada, Y., Kitagishi, Y. y Matsuda, S. (2014) "Link between PI3K/AKT/PTEN Pathway and NOX Protein in Diseases.", *Aging and disease*. JKL International LLC, 5(3), pp. 203-11. doi:10.14336/AD.2014.0500203.
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2010) "Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(2), pp. 774-88. doi:10.1002/hep.23719.
- Newberry, E. P., Xie, Y., Kennedy, S., Han, X., Buhman, K. K., Luo, J. y cols. (2003) "Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene.", *The Journal of biological chemistry*, 278(51), pp. 51664-72. doi:10.1074/jbc.M309377200.
- Nishigori, H., Tomura, H., Tonooka, N., Kanamori, M., Yamada, S. y cols. (2001) "Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japanese subjects.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), pp. 575-80. doi:10.1073/pnas.021544398.
- Nishizawa, H., Yamagata, K., Shimomura, I., Takahashi, M., Kuriyama, H. y cols. (2002) "Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation.", *The Journal of biological chemistry*, 277(2), pp. 1586-92. doi:10.1074/jbc.M104301200.
- Ogawa, D., Stone, J. F., Takata, Y., Blaschke, F., Chu, V. H. y cols. (2005) "Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways.", *Circulation research*, 96(7), pp. e59-67. doi:10.1161/01.RES.0000163630.86796.17.
- Ota, T., Gayet, C. y Ginsberg, H. N. (2008) "Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents.", *The Journal of clinical investigation*, 118(1), pp. 316-32. doi:10.1172/JCI32752.
- Ou, D-L., Lee, B.-S., Lin, L-I., Liou, J-Y., Liao, S.-C. y cols. (2014) "Vertical blockade of the IGFR-PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of hepatocellular carcinoma: the role of survivin.", *Molecular cancer*, 13, p. 2. doi:10.1186/1476-4598-13-2.
- Oz, H. S., Im, H.-J., Chen, T. S., de Villiers, W. J. S. y McClain, C. J. (2006) "Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model.", *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 20(1), pp. 39-47. doi:10.1002/jbt.20109.
- Panchal, S. K., Poudyal, H. y Brown, L. (2012) "Quercetin Ameliorates Cardiovascular, Hepatic, and Metabolic Changes in Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats", *Journal of Nutrition*, 142(6), pp. 1026-1032. doi:10.3945/jn.111.157263.
- Park, H-H., Lee, S., Son, H-Y., Park, S-B., Kim, M-S. y cols. (2008) "Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells.", *Archives of pharmacal research*, 31(10), pp. 1303-11. doi:10.1007/s12272-001-2110-5.
- Park, M. J., Kong, H. J., Kim, H. Y. H., Kim, H. Y. H., Kim, J. H. y Cheong, J. H. (2007) "Transcriptional repression of the gluconeogenic gene PEPCK by the orphan nuclear receptor SHP through inhibitory interaction with C/EBPalpha.", *The Biochemical journal*, 402(3), pp. 567-74. doi:10.1042/BJ20061549.
- de la Peña, A., Leclercq, I. A., Williams, J., Farrell, G. C., Sanyal, A. J. y cols. (2007) "NADPH oxidase is not an essential mediator of oxidative stress or liver injury in murine MCD diet-

- induced steatohepatitis", *Journal of Hepatology*. Elsevier, 46(2), pp. 304-313. doi:10.1016/j.jhep.2006.08.025.
- Peyrou, M., Bourgoin, L. y Foti, M. (2010) "PTEN in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease/Non-Alcoholic Steatohepatitis and Cancer", *Digestive Diseases*. Karger Publishers, 28(1), pp. 236-246. doi:10.1159/000282095.
- Piñol, V., Bessa, X., Bruguera, M. y Rodés, J. (2000) "[Steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. A comparative analysis].", *Gastroenterología y hepatología*, 23(2), pp. 57-61.
- Pisonero-Vaquero, S., González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. y García-Mediavilla, M. V. (2015) "Flavonoids and Related Compounds in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Therapy.", *Current medicinal chemistry*, 22(25), pp. 2991-3012.
- Polyzos, S. A., Kountouras, J. y Mantzoros, C. S. (2015) "Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review.", *Metabolism: clinical and experimental*, 64(1), pp. 60-78. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.012.
- Portincasa, P., Grattagliano, I., Palmieri, V. O. y Palasciano, G. (2005) "Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management", *Clinical Biochemistry*, 38(3), pp. 203-217. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.10.014.
- Postic, C. y Girard, J. (2008) "Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice.", *The Journal of clinical investigation*, 118(3), pp. 829-38. doi:10.1172/JCI34275.
- Prashanth, M., Ganesh, H. K., Vimal, M. V., John, M., Bandgar, T. y cols. (2009) "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus", *Journal of Association of Physicians of India*, 57(3), pp. 205-210.
- Promrat, K., Kleiner, D. E., Niemeier, H. M., Jackvony, E., Kearns, M. y cols. (2010) "Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(1), pp. 121-9. doi:10.1002/hep.23276.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C. y cols. (2003) "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction", *Nature*, 423(6939), pp. 550-555. doi:10.1038/nature01667.
- Qiao, L., Zou, C., Shao, P., Schaack, J., Johnson, P. F. y Shao, J. (2008) "Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancer-binding protein alpha.", *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 283(14), pp. 8788-95. doi:10.1074/jbc.M800055200.
- Rahman, S. M., Schroeder-Gloeckler, J. M., Janssen, R. C., Jiang, H., Qadri, I. y cols. (2007) "CCAAT/enhancing binding protein  $\beta$  deletion in mice attenuates inflammation, endoplasmic reticulum stress, and lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis", *Hepatology*, 45(5), pp. 1108-1117. doi:10.1002/hep.21614.
- Ramji, D. P. y Foka, P. (2002) "CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation.", *The Biochemical journal*, 365(Pt 3), pp. 561-75. doi:10.1042/BJ20020508.
- Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S. y cols. (2009) "Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes.", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(5), pp. 830-40. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x.

- Rios, F. J. O., Koga, M. M., Ferracini, M., Jancar, S. y Goto, H. (2012) "Co-Stimulation of PAFR and CD36 Is Required for oxLDL-Induced Human Macrophages Activation", *PLoS ONE*. Editado por M. Pesce. Public Library of Science, 7(5), p. e36632. doi:10.1371/journal.pone.0036632.
- Roman, S., Ojeda-Granados, C., Ramos-Lopez, O. y Panduro, A. (2015) "Genome-based nutrition: an intervention strategy for the prevention and treatment of obesity and nonalcoholic steatohepatitis.", *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(12), pp. 3449-3461. doi:10.3748/wjg.v21.i12.3449.
- Ross, S. E., Erickson, R. L., Hemati, N. y MacDougald, O. A. (1999) "Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase.", *Molecular and cellular biology*, 19(12), pp. 8433-41.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S. y White, M. F. (2002) "SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2.", *The Journal of biological chemistry*, 277(44), pp. 42394-8. doi:10.1074/jbc.C200444200.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J. Y. y cols. (2008) "A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance.", *Science (New York, N.Y.)*, 322(5907), pp. 1539-43. doi:10.1126/science.1160794.
- Sahai, A., Pan, X., Paul, R., Malladi, P., Kohli, R. y Whittington, P. F. (2006) "Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and osteopontin in steatosis and aminotransferase release by hepatocytes treated with methionine-choline-deficient medium", *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(1), pp. G55-G62. doi:10.1152/ajpgi.00360.2005.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C. y Masella, R. (2007) "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation.", *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 43(4), pp. 394-405.
- Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M. y cols. (2010) "Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis.", *The New England journal of medicine*, 362(18). doi:10.1056/NEJMoa0907929.
- Satapathy, S., Kuwajima, V., Nadelson, J., Atiq, O. y Sanyal, A. (2015) "Drug-induced fatty liver disease: An overview of pathogenesis and management", *Annals of Hepatology*, 14(6), pp. 789-806. doi:10.5604/16652681.1171749.
- Savage, D. B., Choi, C. S., Samuel, V. T., Liu, Z.-X., Zhang, D. y cols. (2006) "Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2.", *The Journal of clinical investigation*, 116(3), pp. 817-24. doi:10.1172/JCI27300.
- Schäffler, A., Schölmerich, J. y Büchler, C. (2005) "Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease.", *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, 2(6), pp. 273-80. doi:10.1038/ncpgasthep0186.
- Schmidt, H. H., Stocker, R., Vollbracht, C., Paulsen, G., Riley, D. y cols. (2015) "Antioxidants in Translational Medicine.", *Antioxidants & redox signaling*, 23(14), pp. 1130-43. doi:10.1089/ars.2015.6393.
- Schwenzer, N. F., Springer, F., Schraml, C., Stefan, N., Machann, J. y cols. (2009) "Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance", *Journal of Hepatology*. Elsevier, 51(3), pp. 433-445. doi:10.1016/j.jhep.2009.05.023.

- Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G. y cols. (2003) "Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes.", *The Journal of biological chemistry*, 278(16), pp. 13740-6. doi:10.1074/jbc.M210689200.
- Sharif, M., Alov, P., Vitcheva, V., Pajeva, I. y Tsakovska, I. (2014) "Modes-of-Action Related to Repeated Dose Toxicity: Tissue-Specific Biological Roles of PPAR  $\gamma$  Ligand-Dependent Dysregulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease.", *PPAR research*, 2014, p. 432647. doi:10.1155/2014/432647.
- Shaw, R. J. (2008) "mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal.", *Trends in biochemical sciences*. NIH Public Access, 33(12), pp. 565-8. doi:10.1016/j.tibs.2008.09.005.
- Sheedfar, F., Sung, M. M., Aparicio-Vergara, M., Kloosterhuis, N. J., Miquilena-Colina, M. E. y cols. (2014) "Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease.", *Aging. Impact Journals*, LLC, 6(4), pp. 281-95. doi:10.18632/aging.100652.
- Shen, B., Yu, J., Wang, S., Chu, E. S., Wong, V. W. y cols. (2007) "Phyllanthus urinaria ameliorates the severity of nutritional steatohepatitis both in vitro and in vivo", *Hepatology*, 47(2), p. 473-483 Shen, Bo et 2007. "Phyllanthus Urinaria. doi:10.1002/hep.22039.
- Shen, S.-C., Lee, W.-R., Lin, H.-Y., Huang, H.-C., Ko, C.-H. y cols. (2002) "In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production", *European Journal of Pharmacology*, 446(1), pp. 187-194. doi:10.1016/S0014-2999(02)01792-2.
- Shimada, M., Kawahara, H., Ozaki, K., Fukura, M., Yano, H. y cols. (2007) "Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis.", *The American journal of gastroenterology*, 102(9), pp. 1931-8. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01322.x.
- Shimano, H. (2001) "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes", *Progress in Lipid Research*, 40(6), pp. 439-452. doi:10.1016/S0163-7827(01)00010-8.
- Silva, M. M., Santos, M. R., Caroço, G., Rocha, R., Justino, G. y Mira, L. (2002) "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination.", *Free radical research*, 36(11), pp. 1219-27.
- Silverstein, R. L. y Febbraio, M. (2009) "CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior.", *Science signaling*, 2(72), p. re3. doi:10.1126/scisignal.272re3.
- Sorbi, D., Boynton, J. y Lindor, K. D. (1999) "The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease.", *The American journal of gastroenterology*, 94(4), pp. 1018-22. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01006.x.
- Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S. C. y Bergheim, I. (2009) "Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(4), pp. 1094-104. doi:10.1002/hep.23122.
- Sreekumar, R., Rosado, B., Rasmussen, D. y Charlton, M. (2003) "Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(1),

pp. 244-51. doi:10.1053/jhep.2003.50290.

Su, X. y Abumrad, N. A. (2009) "Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction", *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(2), pp. 72-77. doi:10.1016/j.tem.2008.11.001.

Sundaresan, S., Vijayagopal, P., Mills, N., Imrhan, V., Prasad, C., Ludwig, J. y cols. (2011) "A mouse model for nonalcoholic steatohepatitis.", *The Journal of nutritional biochemistry*. Elsevier, 22(10), pp. 979-84. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.08.011.

Sung, K.-C., Jeong, W.-S., Wild, S. H. y Byrne, C. D. (2012) "Combined influence of insulin resistance, overweight/obesity, and fatty liver as risk factors for type 2 diabetes.", *Diabetes care*, 35(4), pp. 717-22. doi:10.2337/dc11-1853.

Sung, K.-C., Wild, S. H. y Byrne, C. D. (2013) "Resolution of fatty liver and risk of incident diabetes.", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(9), pp. 3637-43. doi:10.1210/jc.2013-1519.

Szabo, G. y Csak, T. (2012a) "Inflammasomes in liver diseases", *Journal of Hepatology*, pp. 642-654. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.035.

Szabo, G. y Csak, T. (2012b) "Inflammasomes in liver diseases Inflammasomes and their signal transduction pathways", *Journal of Hepatology*, 57, pp. 642-654. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.035.

Szabo, G. y Petrasek, J. (2015) "Inflammasome activation and function in liver disease.", *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(7), pp. 387-400. doi:10.1038/nrgastro.2015.94.

Takahashi, Y., Soejima, Y. y Fukusato, T. (2012) "Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis", *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), p. 2300. doi:10.3748/wjg.v18.i19.2300.

Tanoli, T., Yue, P., Yablonskiy, D. y Schonfeld, G. (2004) "Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity.", *Journal of lipid research*, 45(5), pp. 941-7. doi:10.1194/jlr.M300508-JLR200.

Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A. y Tiengo, A. (2009) "Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease", *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, pp. 291-302. doi:10.1016/j.numecd.2008.12.015.

Tilg, H. (2010) "The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease.", *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, 28(1), pp. 179-85. doi:10.1159/000282083.

Tilg, H. y Diehl, A. M. (2000) "Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.", *The New England journal of medicine*, 343(20), pp. 1467-76. doi:10.1056/NEJM200011163432007.

Tilg, H. y Hotamisligil, G. S. (2006) "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Cytokine-Adipokine Interplay and Regulation of Insulin Resistance", *Gastroenterology*, 131(3), pp. 934-945. doi:10.1053/j.gastro.2006.05.054.

Tilg, H. y Hotamisligil, G. S. (2006) "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Cytokine-Adipokine Interplay and Regulation of Insulin Resistance", *Gastroenterology*. Elsevier, 131(3), pp. 934-945. doi:10.1053/j.gastro.2006.05.054.

Tilg, H. y Moschen, A. R. (2010) "Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease:

the multiple parallel hits hypothesis.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(5), pp. 1836-46. doi:10.1002/hep.24001.

Towle, H. C., Kaytor, E. N. y Shih, H. M. (1997) "Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate.", *Annual review of nutrition*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 17, pp. 405-33. doi:10.1146/annurev.nutr.17.1.405.

Trauner, M. (2007) "A little orphan runs to fat: The orphan receptor small heterodimer partner as a key player in the regulation of hepatic lipid metabolism", *Hepatology*, 46(1), pp. 1-5. doi:10.1002/hep.21801.

Tuñón, M. J., García-Mediavilla, M. V, Sánchez-Campos, S. y González-Gallego, J. (2009) "Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways.", *Current drug metabolism*, 10(3), pp. 256-71.

Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. y Hotamisligil, G. S. (1997) "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function.", *Nature*, 389(6651), pp. 610-4. doi:10.1038/39335.

Vargas, A. J. y Burd, R. (2010) "Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management.", *Nutrition reviews*, 68(7), pp. 418-28. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x.

Vasudevan, K. M., Gurumurthy, S. y Rangnekar, V. M. (2004) "Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis.", *Molecular and cellular biology*, 24(3), pp. 1007-21.

Vercelino, R., Crespo, I., de Souza, G. F. P., Cuevas, M. J., de Oliveira, M. G. y cols. (2010) "S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats", *Journal of Molecular Medicine*. Springer-Verlag, 88(4), pp. 401-411. doi:10.1007/s00109-009-0577-6.

Vidyashankar, S., Sandeep Varma, R. y Patki, P. S. (2013) "Quercetin ameliorate insulin resistance and up-regulates cellular antioxidants during oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells.", *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27(2), pp. 945-53. doi:10.1016/j.tiv.2013.01.014.

Viennois, E., Mouzat, K., Dufour, J., Morel, L., Lobaccaro, J.-M. y Baron, S. (2012) "Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health?", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2), pp. 129-141. doi:10.1016/j.mce.2011.08.036.

Vinciguerra, M., Veyrat-Durebex, C., Moukil, M. A., Rubbia-Brandt, L., Rohner-Jeanrenaud, F. y cols. (2008) "PTEN down-regulation by unsaturated fatty acids triggers hepatic steatosis via an NF-kappaBp65/mTOR-dependent mechanism.", *Gastroenterology*. Elsevier, 134(1), pp. 268-80. doi:10.1053/j.gastro.2007.10.010.

Wan, X., Xu, C., Yu, C. y Li, Y. (2016) "Role of NLRP3 Inflammasome in the Progression of NAFLD to NASH", *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. doi:10.1155/2016/6489012.

Wang, C., Hu, L., Zhao, L., Yang, P., Moorhead, J. F. y cols. (2014) "Inflammatory Stress Increases Hepatic CD36 Translational Efficiency via Activation of the mTOR Signalling Pathway", *PLoS ONE*. Editado por S. C. Sookoian. Public Library of Science, 9(7), p. e103071. doi:10.1371/journal.pone.0103071.

Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F. y Pagliassotti, M. J. (2006) "Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells.",



*American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 291(2), pp. E275-81. doi:10.1152/ajpendo.00644.2005.

Westerbacka, J., Kolak, M., Kiviluoto, T., Arkkila, P., Sirén, J. y cols. (2007) "Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects.", *Diabetes*, 56(11), pp. 2759-65. doi:10.2337/db07-0156.

Williamson, R. M., Price, J. F., Glancy, S., Perry, E., Nee, L. D., y cols. (2011) "Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study.", *Diabetes care*, 34(5), pp. 1139-44. doi:10.2337/dc10-2229.

Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K. y Beltowski, J. (2007) "Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism.", *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 61, pp. 736-59.

Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B. y Tilg, H. (2004) "Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes.", *Biochemical and biophysical research communications*, 323(2), pp. 630-5. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.145.

Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J. M. y Stoffel, M. (2004) "Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes.", *Nature*, 432(7020), pp. 1027-32. doi:10.1038/nature03047.

Wolfrum, C., Besser, D., Luca, E. y Stoffel, M. (2003) "Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), pp. 11624-9. doi:10.1073/pnas.1931483100.

Wolfrum, C. y Stoffel, M. (2006) "Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion.", *Cell metabolism*. Elsevier, 3(2), pp. 99-110. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.001.

Wu, Y., Zhou, H., Wu, K., Lee, S., Li, R. y Liu, X. (2014) "PTEN phosphorylation and nuclear export mediate free fatty acid-induced oxidative stress.", *Antioxidants & redox signaling*, 20(9), pp. 1382-95. doi:10.1089/ars.2013.5498.

Xu, D., Huang, X-D., Yuan, J-P., Wu, J., Fan, Y. y cols. (2011) "Impaired Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by Leptin is a Novel Mechanism of Hepatic Leptin Resistance in NAFLD", *Hepatogastroenterology*, 58(110-111), pp. 1703-7. doi:10.5754/hge11005.

Yam, J. W. P., Wong, C. M. y Ng, I. O-L. (2010) "Molecular and functional genetics of hepatocellular carcinoma.", *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 2, pp. 117-34.

Yang, C-S., Yuk, J- M., Kim, J.J., Hwang, J. H., Lee, C.H. y cols. (2013) "Small heterodimer partner-targeting therapy inhibits systemic inflammatory responses through mitochondrial uncoupling protein 2.", *PLoS one*. Public Library of Science, 8(5), p. e63435. doi:10.1371/journal.pone.0063435.

Ying, H-Z., Liu, Y-H., Yu, B., Wang, Z-Y., Zang, J-N. y Yu, C-H. (2013) "Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils", *Food and Chemical Toxicology*, 52, pp. 53-60. doi:10.1016/j.fct.2012.10.030.

Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S. y cols. (2013)

"Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome.", *Nature*, 499(7456), pp. 97-101. doi:10.1038/nature12347.

Younossi, Z. M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y. y cols. (2011) "Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008", *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(6), p. 524-530.e1. doi:10.1016/j.cgh.2011.03.020.

Yu, J., Shen, J., Sun, T. T., Zhang, X. y Wong, N. (2013) "Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma", *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier Ltd, 23(6 PB), pp. 483-491. doi:10.1016/j.semcancer.2013.07.003.

Yuk, J. M., Jin, H. S. y Jo, E. K. (2016) "Small Heterodimer Partner and Innate Immune Regulation.", *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 31(1), pp. 17-24. doi:10.3803/EnM.2016.31.1.17.

Zeng, L., Tang, W. J., Yin, J. J. y Zhou, B. J. (2014) "Signal transductions and nonalcoholic fatty liver: a mini-review.", *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(7), pp. 1624-31.

Zhang, D., Xie, L., Jia, G., Cai, S., Ji, B. y cols. (2011) "Comparative study on antioxidant capacity of flavonoids and their inhibitory effects on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(9), pp. 4548-4558. doi:10.1016/j.ejmech.2011.07.031.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D. y cols.. (2016) "ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling.", *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, p. 4350965. doi:10.1155/2016/4350965.

Zhang, J., Wilkinson, J. E., Gonit, M., Keck, R., Selman, S. y Ratnam, M. (2008) "Expression and sub-cellular localization of the CCAAT/enhancer binding protein alpha in relation to postnatal development and malignancy of the prostate.", *The Prostate*. NIH Public Access, 68(11), pp. 1206-14. doi:10.1002/pros.20779.

Zhang, W., Wu, N., Li, Z., Wang, L., Jin, J. y Zha, X.-L. (2006) "PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via upregulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404.", *Cancer biology & therapy*, 5(8), pp. 1008-14.

Zhang, X., Shen, J., Man, K., Chu, E. S., Yau, T. O., Sung, J. C. y cols. (2014) "CXCL10 plays a key role as an inflammatory mediator and a non-invasive biomarker of non-alcoholic steatohepatitis", *Journal of Hepatology*, 61(6), pp. 1365-1375. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.006.

Zhang, Y., Hagedorn, C. H. y Wang, L. (2011) "Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer.", *Biochimica et biophysica acta*, 1812(8), pp. 893-908. doi:10.1016/j.bbadis.2010.10.006.