



universidad  
de león

**Departamento de Ciencias Biomédicas**

**Área de Fisiología**

---

**MECANISMOS PATOGENICOS  
INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE  
ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHOLICA EN  
UN MODELO NUTRICIONAL DE RATÓN**

---

“PATHOGENIC MECHANISMS INVOLVED IN THE  
DEVELOPMENT OF NON ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS IN A  
NUTRITIONAL MOUSE MODEL”



*Memoria que presenta la Magister Carmen Cecilia Almonacid Urrego para la  
obtención del grado de Doctora por la Universidad de León*

*León, 2013*



## UNIVERSIDAD DE LEÓN

### INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Dres. Dña. M<sup>a</sup> Jesús Tuñón González y Dña. Sonia Sánchez Campos, Directores de la Tesis Doctoral: “Mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica en un modelo nutricional de ratón” realizada por la Doctoranda Dña. Carmen Cecilia Almonacid Urrego, en el Departamento de Ciencias Biomédicas, autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León, a 20 de Enero de 2013.

Los Directores de la Tesis

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

Fdo.: Dra. Sonia Sánchez Campos



## UNIVERSIDAD DE LEÓN

### ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y Norma 7ª de las  
Complementarias de la ULE)

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica en un modelo nutricional de ratón”, dirigida por los Dres. Dña. Mª Jesús Tuñón González y Dña. Sonia Sánchez Campos y presentada por Dña. Carmen Cecilia Almonacid Urrego y cuyo título en inglés es “Pathogenic mechanisms involved in the development of non alcoholic steatohepatitis in a nutritional mouse model”

Lo que firmo para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

VºBº DIRECTOR DPTO.

SECRETARIA DPTO.

Fdo: Dr. Juan José García Vieitez

Fdo: Dra. Pilar Sánchez Collado

*A mis padres*

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,  
y pensar lo que nadie más ha pensado”*

.

*Albert Szent-Gyorgy*

## *Agradecimientos*

Antes de concluir el presente trabajo y comenzar a escribir otros capítulos de mi existencia, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Dios, creador del universo y dueño de mi vida, por haberme dado la fortaleza, la salud, la tolerancia y la perseverancia necesarias para superar los obstáculos que se presentaron en el desarrollo de esta tesis.

Mi familia, por acompañarme de forma incondicional y darme el impulso necesario para no cejar en mi empeño. De ellos es este triunfo y para ellos es todo mi agradecimiento.

Las directivas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, por creer en mí y darme el apoyo necesario para llevar a cabo mis estudios doctorales.

María Jesús y Sonia, mis directoras de tesis, por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Sin ustedes no habría sido posible culminar con éxito este proceso. Ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda.

Todo el personal de apoyo del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de León, en especial a Ludy y Héctor. Su callada y abnegada labor hace posible lo imposible.

Todas aquellas personas que hicieron más amable mi estadía en León y más llevadera la lejanía del terruño y de los seres queridos, especialmente Susana Martínez, José Luis Mauriz, Mar Almar, Pablo Argüello, Serafín de Abajo, Daismilsi Regalado, José Beirão, Mary Flor Pérez, Ana Carrillo, Javier del Ángel y Marco Cabrera. Gracias por demostrarme que la amistad no conoce de razas, credos ni nacionalidades.

**Parte de los resultados recogidos en la presente memoria han dado lugar a las siguientes:**

**Publicaciones:**

Almonacid-Urrego CC, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. Non-alcoholic steatohepatitis: what can we learn from animal models?. *Curr Med Chem.* 2012; 19(9):1389-1404.

**Comunicaciones a congresos:**

Almonacid Urrego Carmen Cecilia, García M Victoria, Tuñón González María Jesús, Sánchez Campos Sonia, Tieppo Juliana. “Efecto del agonista del receptor LXR (GW3965), sobre marcadores de la función hepática y el metabolismo de lípidos y carbohidratos de ratones C57BL/6”. 11 Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología CNB-Colombia. Medellín, noviembre 4-7 de 2011.

MV García-Mediavilla, S Pisonero Baquero, P Casado-Castro, CC Almonacid-Urrego, J Tieppo, JM Culebras, R Jover, J González Gallego, MJ Tuñón, S Sánchez Campos. “Estudio de la Expresión Génica de FABP1 y de factores de transcripción involucrados en su regulación en un modelo *in vivo* de NAFLD en ratones”. XVIII Congreso de SEIQ (Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas). León, 18-19 de octubre de 2012.

Almonacid Urrego Carmen Cecilia. Esteatohepatitis no alcohólica: un factor de riesgo sub valorado en el diagnóstico de hepatopatías crónicas. III Encuentro Internacional de Grupos y Semilleros de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Medellín-Colombia. Mayo 10-13 de 2013.

## Abreviaturas Utilizadas

ABCA1	cassette de unión a ATP superfamilia ATPasa
ABCG1	cassette de unión a ATP subfamilia G miembro 1
ABCG4	cassette de unión a ATP subfamilia G miembro 4
ABCG5	cassette de unión a ATP sub-miembro de la familia G 5
ABCG8	cassette de unión a ATP sub-miembro de la familia G 8
ACC	acetil CoA carboxilasa
ACTH	hormona adrenocorticotropa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	adenosín difosfato
AF-1	factor de activación- 1
AF-2	factor de activación- 2
AGL	ácidos grasos libres
ALP	fosfatasa alcalina
ALT	alanina aminotransferasa
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
aP2	gen promotor de la activación de la proteína de unión a ácidos grasos- 2
apoE	apolipoproteína E
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ASC-2	cointegrador activador de la señal 2
AST	aspartato aminotransferasa
ATP	adenosín trifosfato
AUDC	ácido ursodeoxicólico
	índice para la evaluación de fibrosis que incluye cuatro parámetros:
BAAT	índice de masa corporal, edad, alanina aminotransferasa y triglicéridos
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CCLs	ligandos de quimiocinas CC
CE	colesterol esterasa
CETP	proteína de transferencia de esteres de colesterol
CG1-58	Proteína que promueve la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en

	los gránulos lamelares
c-HDL	colesterol de lipoproteínas de alta densidad
CHOD	colesterol oxidasa
ChREBP	proteína de unión de elementos de respuesta a carbohidratos
CIDEA	gen específico del adipocito semejante al efector A
c-LDL	colesterol de lipoproteínas de baja densidad
CoA	acetil coenzima A
COX-2	ciclooxigenasa 2
CRP	proteína C reactiva
CTGF	factor de crecimiento de tejido conectivo
c-total	colesterol total
c-VLDL	colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad
CYP	citocromo P450
CYP2E1	citocromo P450, familia 2, subfamilia E, polipéptido 1
CYP4A10	citocromo P450 murino, 4, subfamilia A, polipéptido 10
CYP4A14	citocromo P450 de la expresión de ácido graso omega- hidroxilasa
CYP7A1	colesterol 7-alfa-monooxigenasa
CXCLs	ligandos de quimiocinas CXC
DAGT2	diacil glicerol transferasa, isoenzima 2
DBD	dominio de unión al DNA
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
EC <sub>50</sub>	concentración de fármaco que produce el 50% del efecto máximo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGR1	factor de transcripción EGR1. Interactúa a nivel de las células T CD4 y CD8
EHNA	esteatohepatitis no alcohólica
EHNA-CRN	red de investigación clínica en esteatohepatitis no alcohólica
ELF	índice Europeo de fibrosis del hígado
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
EROs	especies reactivas del oxígeno
FAS	ácido graso sintasa
FOS	factor de transcripción FOS
FXR	receptor X farnesoide
GAPDH	gliceraldehido-3 fosfato-deshidrogenasa

GGT	gamma glutamil transpeptidasa
GK	Glicerol quinasa
GLUT	transportador de glucosa
GLUT-1	transportador de glucosa, presente en pequeñas cantidades en todas las células
GLUT-4	transportador de glucosa, controlado por la insulina
G6PDH	glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
GPO	glicerol fosfato oxidasa
GSH	glutación (forma reducida)
GW3965	agonista de los receptores hepáticos LXR
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HepG2	línea celular de carcinoma hepatocelular
HGNA	hígado graso no alcohólico
HK	hexoquinasa
HOMA	modelo de evaluación de la homeostasis, desarrollado para valorar la resistencia a la insulina
IAP-1	inhibidor del activador del plasminógeno-1
ICAM1	molécula intercelular de adhesión 1
IKK	familia de quinasas serina/treonina
I $\kappa$ K $\beta$	inhibidor de la protein kinasa $\beta$
IL-1 $\alpha$	interleucina-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
LBD	dominio hidrofóbico de unión al ligando
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LDLR	receptor de lipoproteínas de baja densidad
LDL-R <sup>-/-</sup> ,	mutante knock out para el receptor de lipoproteínas de baja densidad
LDN	lipogénesis de <i>novo</i>
LISA	ensayo de detección de ligando libre de células
LPL	lipoprotein lipasa
LSH	lipasa sensible a hormonas
LXREs	elementos de respuesta específicos a LXR

LXRs	receptores hepáticos X
MAP	proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCD	deficiencia en metionina y colina
MDH	malato deshidrogenasa
MCP	proteína quimiotáctica de macrófagos
MDA	malonildialdehído
MHE	metabolismo de la matriz extracelular
MRI	resonancia magnética espectroscópica
MTP	proteína microsómica transportadora de triglicéridos
NAD	nicotinamida adenin dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamida adenin dinucleótido reducido
NASH	esteatohepatitis no alcohólica
N-CoR	co-represor del receptor nuclear
NF- $\kappa\beta$	factor nuclear-kappa- $\beta$
nm	nanómetro
NPC1L1	gen asociado con la enfermedad de Niemann-Pick
NS	índice para la evaluación de fibrosis que incluye dos parámetros: colágeno tipo 4 y ácido hialurónico
OAT2	Expresión renal del transportador de aniones orgánicos
ob/ob	gen ob del ratón obeso
ON	óxido nítrico
OPN	osteopontina
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción de la polimerasa en cadena
PIIIP	péptido del procolágeno sérico tipo III
PLIN1	perilipin-1
PLTP	proteína transportadora de fosfolípidos
POD	peroxidasa
PPAR $\alpha$	receptor alfa proliferador de peroxisomas activados.
PPAR $\gamma$	receptor gamma proliferador de peroxisomas activados. Se expresa en tres formas: $\gamma$ 1, $\gamma$ 2 , $\gamma$ 3
PXR	receptor X retinoide
RNH	receptores nucleares heterodiméricos
RT-PCR	PCR en tiempo real
RXR	receptor retinoide X
S3-12	Anticuerpo policlonal de cabra IgG - (S-13)

SAMe	S-adenosil metionina
SAT	síndrome del aceite tóxico
SC	estrato córneo
SCD-1	estearoil- CoA-desaturasa 1
SDS	dodecilsulfato sódico
SELE	Selectina E
SMRT	mediador de los receptores de la hormona tiroidea y retinoides
sPLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A2 secretora
SREBP	proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides
T0901317	receptor hepático ligando - T0901317 de LXR
TAC	tomografía axial computarizada
TEMED	tetrametilendiamina
TGF- $\beta$	factor transformador de crecimiento- $\beta$
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral- $\alpha$
VCAM	molécula de adhesión celular vascular
VHC	virus de la hepatitis C
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
2.1 Concepto de esteatohepatitis no alcohólica.....	6
2.2 Contexto histórico.....	6
2.3 Epidemiología.....	7
2.3.1 Incidencia y prevalencia .....	7
2.3.2 Factores de riesgo asociados.....	9
2.3.2.1 Género .....	10
2.3.2.2 Obesidad.....	11
2.3.2.3 Diabetes .....	12
2.3.2.4 Hiperlipemia .....	13
2.3.2.5 Síndrome metabólico.....	14
2.3.2.6 Pérdida de peso .....	15
2.3.2.7 Tóxicos industriales .....	15
2.3.2.8 Fármacos .....	16
2.3.2.9 Otras entidades asociadas a EHNA.....	16
2.4 Patogenia .....	17
2.4.1 Patogenia de la resistencia a la insulina y de la esteatosis hepática.....	18
2.4.2 Desarrollo de la EHNA y progresión de la misma .....	19
2.4.3 Desarrollo de fibrosis .....	20
2.5 Presentación clínica .....	20
2.5.1 Síntomas .....	20
2.5.2 Parámetros bioquímicos relacionados con EHNA.....	21
2.6 Diagnóstico .....	22
2.6.1 Biopsia hepática .....	23

2.6.2 Graduación y estadificación de la EHNA .....	24
2.6.3 Estudios de imagen .....	26
2.6.4 Pruebas no invasivas .....	27
2.7 Tratamiento .....	29
2.7.1 Tratamiento del sobrepeso y la obesidad .....	29
2.7.2 Medidas farmacológicas .....	31
2.7.3 Trasplante Hepático .....	31
2.8 Modelos animales de EHNA.....	31
2.8.1 Deficiencia en metionina y colina (MCD) como modelo nutricional de EHNA	32
2.9 Receptores hepáticos X (LXRs).....	34
2.9.1 Estructura.....	35
2.9.2 Mecanismo de acción.....	36
2.9.3 Efectos metabólicos .....	37
2.9.3.1 LXRs y metabolismo del colesterol.....	37
2.9.3.2 LXRs y metabolismo de lípidos.....	38
2.9.3.3 LXRs y metabolismo de carbohidratos .....	39
2.9.4 Agonistas de los LXR .....	41
2.9.4.1 Agonistas endógenos .....	41
I HYPERLINK \l "_Toc369640628" 2.9.4.2 Agonistas sintéticos .....	41
2.9.4.3 GW3965.....	43
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 Equipos utilizados .....	48
3.2 Soluciones.....	49
3.3 Diseño experimental.....	50
3.3.1 Animales .....	50
3.3.2 Protocolo de experimentación .....	52
3.4 Métodos analíticos.....	53
3.4.1 Estudios histológicos .....	53

3.4.2 Determinaciones plasmáticas.....	53
3.4.2.1 Proteínas totales.....	54
3.4.2.2 Albúmina .....	54
3.4.2.3 Fosfatasa alcalina (ALP).....	54
3.4.2.4 Alanina aminotransferasa (ALT) .....	55
3.4.2.5 Aspartato aminotransferasa (AST).....	55
3.4.2.6 Bilirrubina directa.....	56
3.4.2.7 Bilirrubina total.....	56
3.4.2.8 Colesterol total.....	57
3.4.2.9 Colesterol HDL .....	57
3.4.2.10 Colesterol LDL.....	58
3.4.2.11 Triglicéridos .....	59
3.4.2.12 Actividad Glucosa Hexoquinasa .....	59
3.4.3 Determinaciones en tejido hepático .....	60
3.4.3.1 Colesterol y triglicéridos hepáticos.....	60
3.4.3.2 Glucógeno hepático.....	60
3.4.4 Estudio de expresión génica en tejido hepático .....	61
3.4.4.1 Extracción de ARN total.....	61
3.4.4.2 Cuantificación del ARN.....	62
3.4.4.3 Reacción de la Transcriptasa Reversa .....	62
3.4.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	63
3.4.4.1 Desnaturalización .....	63
3.4.4.2 Anillamiento de los iniciadores.....	63
3.4.4.4.3 Elongación a partir de los iniciadores .....	64
3.4.4.5 Western Blot.....	66
3.5 Tratamiento estadístico .....	67
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>

4.1 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre los hallazgos histopatológicos hepáticos .....	70
4.1.1 Índice de actividad histológica de la EHNA.....	70
4.1.2 Esteatosis.....	71
4.1.3 Inflamación.....	73
4.1.4 Daño celular hepático.....	75
4.1.5 Fibrosis.....	77
4.2 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre el peso corporal y la relación hepatosomática.....	77
4.3 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre marcadores plasmáticos de daño hepático.....	79
4.4 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre marcadores plasmáticos de la función excretora y de detoxificación hepática.....	83
4.5 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la concentración de lípidos sanguíneos.....	84
4.6 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la concentración de glucosa sanguínea .....	88
4.7 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre diversos parámetros bioquímicos hepáticos.....	89
4.8 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la expresión de genes lipogénicos y de respuesta inflamatoria.....	92
4.8.1 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la expresión de genes de respuesta inflamatoria .....	92
4.8.2 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la expresión de genes lipogénicos .....	97
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>101</b>
5.1 Comprobación de la idoneidad del modelo de EHNA .....	102
5.2 Efecto del agonista GW3965 sobre ratones C57BL/6J sanos.....	106
5.3 Efecto del agonista GW3965 sobre ratones C57BL/6J con dieta MCD afectados de EHNA.....	110
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
6.1 Conclusión primera.....	116

6.2 Conclusión segunda.....	116
6.3 Conclusión tercera.....	116
6.4. Conclusión final.....	116
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Teoría del doble impacto.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Organización estructural de los receptores nucleares.....	35
Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores LXR. ....	37
Figura 4. Acción de los LXR sobre el metabolismo de lípidos y colesterol .....	39
Figura 5. Mecanismos implicados en la acción antidiabética de los LXR.....	40
Figura 6. Agonistas sintéticos de LXR .....	42
Figura 7. Índices de actividad para EHNA.....	71
Figura 8. Imágenes representativas de cortes histológicos correspondientes a los distintos grupos considerados en nuestro estudio.....	73
Figura 9. Imágenes representativas de cortes histológicos correspondientes al grupo EHNA. ....	75
Figura 10. Imágenes representativas de cortes histológicos. Hallazgos relacionados con cambios degenerativos hepatocelulares .....	77
Figura 11. Evolución del peso corporal a lo largo del período de estudio en los distintos grupos experimentales.....	78
Figura 12. Relación hepatosomática.....	79
Figura 13. Actividad aspartato aminotransferasa plasmática .....	80
Figura 14. Actividad alanina aminotransferasa plasmática.....	81
Figura 15. Actividad fosfatasa alcalina plasmática .....	82
Figura 16. Concentración plasmática de albúmina.....	82
Figura 17. Concentración plasmática de bilirrubina total .....	83
Figura 18. Concentración plasmática de bilirrubina directa. ....	84
Figura 19. Concentración plasmática de colesterol total .....	85
Figura 20. Concentración plasmática de colesterol LDL. ....	86
Figura 21. Concentración plasmática de colesterol HDL.....	86

Figura 22. Concentración plasmática de colesterol VLDL .....	87
Figura 23. Concentración plasmática de triglicéridos .....	88
Figura 24. Concentración plasmática de glucosa .....	88
Figura 25. Concentración hepática de colesterol total.....	89
Figura 26. Concentración hepática de triglicéridos.....	90
Figura 27. Concentración hepática de glucógeno .....	91
Figura 28. Concentración hepática de glucosa. ....	91
Figura 29. Expresión génica (ARNm) de <i>CYP2E1</i> en la segunda semana de tratamiento en los diferentes grupos de estudio.....	93
Figura 30. Expresión génica (ARNm) de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio.....	94
Figura 31. Concentración hepática de la proteína <i>TNF-<math>\alpha</math></i> . El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio .....	94
Figura 32. Expresión génica (ARNm) de <i>OPN</i> en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio .....	95
Figura 33. Expresión génica (ARNm) de <i>COX-2</i> en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio.....	96
Figura 34. Concentración hepática de <i>COX-2</i> . El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio .....	96
Figura 35. Expresión génica (ARNm) de <i>iNOS</i> en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio .....	97
Figura 36. Concentración hepática de <i>SREBP-1c</i> . El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio .....	98
Figura 37. Expresión génica (ARNm) de <i>SREBP-1c</i> en los diferentes grupos de estudio .....	99
Figura 38. Concentración hepática de <i>LXR<math>\alpha</math></i> . El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio .....	100
Figura 39. Expresión génica (ARNm) de <i>LXR<math>\alpha</math></i> en los diferentes grupos de estudio.	100

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Factores asociados a EHNA.....	10
Tabla 2. Grado y estadiaje de la EHNA.....	25
Tabla 3. Índices no invasivos de EHNA.....	28
Tabla 4. Índices para la evaluación de fibrosis en hígado graso.....	28
Tabla 5. Características del agonista GW3865.....	43
Tabla 6. Composición de la dieta MCD .....	51
Tabla 7. Descripción de los hallazgos histológicos relacionados con esteatosis en los distintos grupos considerados en nuestro estudio .....	72
Tabla 8. Descripción de los hallazgos histológicos relacionados con inflamación en los distintos grupos considerados en el estudio. ....	74
Tabla 9. Descripción de los hallazgos histológicos relacionados con lesiones celulares en los distintos grupos considerados en el estudio. ....	76

# **1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

El término esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) se utilizó por primera vez en 1980 por Ludwig y cols. para describir un patrón histológico que imita la hepatitis alcohólica, pero que se da en pacientes sin antecedentes de abuso de alcohol (Ludwig y cols., 1980).

Patogénicamente se define como una enfermedad metabólica del hígado que resulta del depósito inicial de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos que excede del 5-10% del peso del órgano, a lo que suelen sumarse posteriormente lesiones degenerativas de los hepatocitos, infiltrado inflamatorio y fibrosis (Fong y cols., 2000, Neuschwander y cols., 2003). Histológicamente se caracteriza por presentar esteatosis macrovesicular acompañada por inflamación lobular, daño hepatocitario y grados variables de fibrosis (Brunt y cols., 2005). Así mismo, se considera la forma más severa de la enfermedad por hígado graso no alcohólico y en la actualidad algunos investigadores han sugerido que puede ser la manifestación hepática del síndrome metabólico (Shifflet y cols., 2009).

En los últimos años la EHNA se ha convertido en la causa más frecuente de enfermedad hepática en los países occidentales en los que afecta aproximadamente al 3% de los adultos y representa, junto con el alcohol y la infección por virus de la hepatitis C, una de las principales causas de cirrosis (Mas y cols., 2009). De igual manera, es responsable de la elevación asintomática de las aminotransferasas séricas en 40-90% de los casos y representa una causa frecuente de pruebas hepáticas anormales en los donantes de sangre (Portincasa y cols., 2005). Todo ello unido a que se encuentra asociada con obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico, ha ocasionado que esté emergiendo como un problema de salud pública, cuya mortalidad proyectada a 10 años puede acercarse a la producida por la enfermedad cardiovascular (Argo y cols., 2009).

Los receptores hepáticos LXR ( $LXR\alpha$  y  $LXR\beta$ ) son factores nucleares transcripcionales que parecen tener actividad antiinflamatoria y jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis del colesterol y la glucosa (Oosterveer y cols., 2010, Morello y cols., 2009, Zhu y cols., 2009). Dentro de sus funciones fisiológicas reconocidas se encuentran: síntesis *de novo* del colesterol, excreción y detoxificación de ácidos biliares o lípidos, homeostasis de la glucosa, desarrollo de la piel y funciones neurológicas (Viennois y cols., 2012). Debido a esto se han propuesto

como blancos terapéuticos potenciales para el manejo de alteraciones en el metabolismo de los lípidos y la glucosa que predisponen a enfermedades como la aterosclerosis y la diabetes tipo 2 (Oosterveer y cols., 2010, Viennois y cols., 2012) y para el tratamiento de desordenes neurológicos (Katz y cols., 2009).

La investigación “in vivo” e “in vitro” con agonistas farmacológicos de los LXR ha contribuido de manera significativa a la comprensión de sus acciones metabólicas. Los compuestos no esteroideos T0901317 y GW3965, no ensayados aún en la EHNA, son dos de los más importantes agonistas de los LXR. Ambos pueden incrementar el transporte reverso del colesterol y mejorar la homeostasis del colesterol en modelos murinos, reducir las lesiones ateroscleróticas en aortas de ratones LDR<sup>-/-</sup> y apoE<sup>-/-</sup>, inducir la expresión de genes como el ABCA1 y el ABCG1 en el intestino y mejorar la tolerancia a la glucosa (Zhu y cols., 2009; Joseph y cols., 2002; Fiévet y Staels, 2009). Sin embargo, la comprobación de que T0901317 induce la síntesis hepática de ácidos grasos y triglicéridos y la existencia de resultados contradictorios con respecto a la acción “in vivo” del GW3965 ha impedido clasificarlos como agonistas selectivos que regulan genes no hepáticos y mejoran el metabolismo del colesterol (Zhu y cols., 2009; Fiévet y Staels, 2009; Wójcicka y cols., 2007; Jamroz-Wiśniewska y cols., 2007). Así mismo, existe controversia sobre su papel en la activación de moléculas pro-inflamatorias y aterogénicas y en la promoción de esteatosis y concomitante daño hepático (Morello y cols., 2009).

Por todo lo anterior, la presente tesis doctoral tiene como objetivo general esclarecer los mecanismos moleculares y celulares implicados en la EHNA mediante la utilización de un modelo animal de dicha patología, con el fin de conocer la secuencia temporal de aparición de los distintos mecanismos patogénicos de la enfermedad y los posibles puntos de actuación terapéutica, e indagar sobre el posible papel terapéutico de la activación de los receptores hepáticos LXR en el tratamiento de la EHNA mediante la administración del agonista sintético GW3965 a dicho modelo animal.

Como objetivos secundarios se plantean los siguientes:

1. Comprobar la idoneidad del modelo nutricional MCD como modelo de EHNA.
2. Examinar el efecto que la activación de los receptores hepáticos LXR por el agonista GW3965 tiene sobre el proceso inflamatorio, los niveles de lípidos

glucosa y glucógeno, la expresión de genes de respuesta inflamatoria, la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y la expresión de genes de factores de respuesta a esteroides, en el modelo nutricional MCD.

3. Evaluar el efecto que tiene la administración del agonista GW3965 a ratones C57BL/6J sanos.

## **2. ANTECEDENTES**

## 2.1 Concepto de esteatohepatitis no alcohólica

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una entidad clínico morfológica caracterizada por hallazgos histológicos en el hígado similares a los observados en la hepatitis alcohólica, pero que afecta a pacientes que no consumen más de 20 gramos por día de alcohol y que no tienen factores de riesgo para esteatosis (Ludwig y cols., 1980; Bellentani y cols., 2009).

Desde un punto de vista patogénico, la EHNA puede definirse como una enfermedad metabólica del hígado que resulta del depósito inicial de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos, que excede del 5-10% del peso del órgano, a lo que suelen sumarse posteriormente lesiones degenerativas de los hepatocitos, infiltrado inflamatorio y fibrosis (Fong y cols., 2000; Neuschwander y cols., 2003). La fibrosis puede progresar hasta el estadio de cirrosis. Así pues, la EHNA es un espectro lesional que, al igual que la hepatopatía alcohólica, va desde una esteatosis simple como forma inicial, seguida por esteatohepatitis con grados progresivos de fibrosis que puede evolucionar hasta una cirrosis con grasa y finalizar en un hepatocarcinoma. (Ludwig y cols., 1980; Pérez-Aguilar y cols., 2004; Oliveira y cols., 2007; Shifflet y cols., 2009; Córdova y cols., 2009a)

## 2.2 Contexto histórico

El espectro de los cambios hepáticos asociados a la EHNA ya se conocía desde hace cuatro décadas. En 1958, Westwater y Fainer la describieron en una pequeña cohorte de pacientes con obesidad (Westwater y cols., 1958). Más tarde, en 1975, fue definida por Peters y colaboradores en un grupo de pacientes obesos sometidos a bypass gástrico (Peters y cols., 1975). Posteriormente, fue descrita en 1979 por Adler y Schaffner (Adler y Shaffner, 1979). Sin embargo, no es hasta 1980 cuando Ludwig y su equipo acuñaron el término de EHNA, basados en dos criterios principales: cambios grasos con hepatitis lobular y ausencia de alcoholismo (Ludwig y cols., 1980). Durante los años siguientes se le aplicaron diferentes términos descriptivos como hepatitis de hígado graso, esteatonecrosis, enfermedad de Laënnec no alcohólica, hepatitis diabética, hepatitis similar a la alcohólica y esteatohepatitis idiopática en niños (Neuschwander y cols., 1996; Brunt y cols., 2002a; Méndez-Sánchez y cols., 2004). En la última década se le ha considerado como la manifestación hepática del síndrome metabólico y se llegó a proponer como término alternativo “esteatohepatitis

metabólica”, si bien esta denominación no fue aceptada unánimamente (Neuschwander y cols., 2003).

## **2.3 Epidemiología**

### **2.3.1 Incidencia y prevalencia**

A pesar de que la EHNA es la afectación hepática más común en los Estados Unidos y probablemente en el mundo, su verdadera incidencia y prevalencia no se conocen completamente debido, en parte, a que el diagnóstico precisa de la realización de una biopsia y a la ausencia de un consenso en los criterios histológicos de esta entidad, situaciones que conllevan a que los informes de incidencia y prevalencia varíen de acuerdo con la población estudiada y los criterios de diagnóstico utilizados (Harrison y cols., 2003a,b; Angulo y cols., 2007; Bellentani y cols., 2009).

La distribución de la EHNA es universal. Los estudios llevados a cabo en los últimos 20-30 años describen que alrededor del 25% de la población adulta tiene una alteración de las enzimas hepáticas, que en la mayoría de los casos se debe a HGNA (Diehl, 2002; Castellano y Pérez, 2003; Martínez y cols., 2005).

Se estima que la prevalencia de enfermedad por hígado graso no alcohólico (HGNA) en los países occidentales se encuentra en el rango del 20-30% con un 90% de morbilidad en individuos obesos (Clark y cols., 2003a,b; Browning y cols., 2004a,b; Bedogni y cols., 2005; Dowman y cols., 2010). Su forma más severa, la EHNA, es menos frecuente, afectando a un 2-3% de la población general con un 37% de morbilidad en población obesa (Machado y cols., 2006; Dowman y cols., 2011).

Estudios poblacionales a gran escala realizados en Europa, han puesto de manifiesto que el 14-20% de la población tiene HGNA, cifra compatible con la que señalan estudios ecográficos y de hepatitis postransfusional (Bellentani y cols., 2000; Diehl, 2002). En el estudio Dionysos desarrollado en Italia sobre nutrición y enfermedad hepática en adultos se encontró, mediante técnicas de ultrasonido, una prevalencia de hígado graso del 25% (15 millones de adultos) asociada con características del síndrome metabólico, y una mayor prevalencia de esteatosis en bebedores crónicos (46%) y obesos (75%) (Bellentani y cols., 1994). Las conclusiones de la 42 reunión anual de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) demuestran que tras la hepatitis C y el alcohol, la EHNA es la enfermedad hepática

más frecuente en España. Se calcula que alrededor de tres a cuatro millones de españoles tienen exceso de grasa en su hígado. De ellos, unos 800.000 padecen esteatohepatitis. Aún así, la prevalencia de hígado graso es menor en España que en otros países ya que la mayoría de su población aún sigue la dieta mediterránea (EASL, 2007).

Estudios realizados en Centro y Suramérica revelan diferentes cifras. La prevalencia de EHNA en la población general mexicana oscila alrededor de 7,1% con un 18,5% en pacientes diabéticos y un 91% en personas con obesidad y sobrepeso (Bernal-Reyes y cols., 2000; Roesch-Dietlen y cols., 2006); para Chile las estadísticas arrojan una prevalencia de HGNA del 22% y del 5-6% de EHNA (Carrasco y cols., 2003; Morales y cols., 2008). Las prevalencias de EHNA para poblaciones obesas de Perú y Brasil son del 44% y 85,1%, respectivamente (Bitencourt y cols., 2007; Tagle y cols., 2008). En Colombia, un estudio realizado en 263 varones jóvenes pertenecientes a la Fuerza Aérea Colombiana demostró una prevalencia del 27% de HGNA (Pérez y Cols., 2011), sin embargo, no existen datos oficiales sobre la prevalencia de EHNA en población colombiana.

En los Estados Unidos de América el HGNA es la causa más común de incremento en las enzimas hepáticas asociada con diabetes tipo 2, obesidad e hiperlipidemia (Clark y cols., 2002; Ahmed y cols., 2005; Szcapaniak y cols., 2005; Byrne y cols., 2009). Se estima que cerca del 30% de la población adulta de los Estados Unidos, equivalente a unos 90 millones de habitantes padece HGNA y un 5,7%-17% EHNA, teniendo mayor susceptibilidad a desarrollarla la población de origen hispano (Browning y cols., 2004b; Bernal-Reyes y cols., 2006), los obesos y los obesos mórbidos (Rector y cols., 2008; Shifflet y cols., 2009; Córdova y cols., 2009a)

Se han publicado pocos estudios que evalúan la prevalencia y relevancia de la EHNA en poblaciones del este del Asia. La prevalencia media estimada para HGNA en estas poblaciones, reconocidas por tener alto contenido de grasa visceral es del 5% al 40% (Amarapurkar y cols., 2007; Yang y cols., 2011), con una incidencia anual del 9,1% (Zhou y cols., 2012), pero varía de acuerdo al país. En Japón las prevalencias estimadas para HGNA y EHNA son del 19%-25% y 1-2%, respectivamente (Kojima y cols., 2003; Byrne y cols., 2009; Córdova y cols., 2009a). Curiosamente, en la población japonesa la prevalencia de HGNA se incrementa con el grado de

hiperglicemia (Jimba y cols., 2005). En la población general de la India la prevalencia de hígado graso se encuentra alrededor del 24%, con mayor presentación en hombres jóvenes obesos que presenten resistencia a la insulina (Singh y cols., 2004; Madan y cols., 2006).

El HGNA ocurre tanto en niños como en adultos. Los niños son generalmente diagnosticados alrededor de los 12 años de edad, mientras que los adultos típicamente entre los cuarenta y cincuenta años (Soto y cols., 2005). Se desconoce la prevalencia de HGNA en la población pediátrica, pero algunos datos indican que cerca del 2,6% al 45,5% de los niños padecen HGNA y del 4,3% al 21,2% EHNA (Schwimmer y cols., 2006; Radetti y cols., 2006; Dowman y cols., 2010; Yang y cols., 2012; El-Koofy y cols., 2012). Dentro de los factores relacionados con el desarrollo de HGNA en población pediátrica se han identificado el índice de masa corporal (IMC), la dislipidemia y la resistencia a la insulina (Nobili y cols., 2006; Patton y cols., 2006; Manco y cols., 2008; Tuba y cols., 2008; Feldestein y cols., 2009; El-Koofy y cols., 2012). No se conocen datos exactos sobre el pronóstico de los niños que padecen HGNA. Algunos estudios indican la presencia del estadio cirrótico en niños enfermos (Dam-Larsen y cols., 2004; Eksted y cols., 2006; Adams y cols., 2005b) y otros describen casos de niños afectados con HGNA que han desarrollado cirrosis en la etapa de la juventud (Kinugasa y cols., 1984; Molleston y cols., 2002; Feldestein y cols., 2009).

### **2.3.2 Factores de riesgo asociados**

Se han encontrado varios factores que predisponen el desarrollo de EHNA. En la Tabla 1 se resumen algunos de ellos.

FACTOR	ENTIDAD
<b>Factores nutricionales/metabólicos</b>	Obesidad, diabetes mellitus tipo 2 e hiperglicemia, hiperlipidemia, pérdida acelerada de peso, ayuno, nutrición parenteral total, tratamiento con glucosa intravenosa la semana previa al fallecimiento
<b>Factores gastrointestinales</b>	Bypass yeyunoileal o yeyunocólico, resección extensa de intestino delgado, gastroplastia para obesidad mórbida, derivación biliopancreática, diverticulosis extensa de intestino delgado
<b>Fármacos</b>	Amiodarona, estrógenos sintéticos, tamoxifeno, bloqueantes de los canales de calcio, corticoesteroides, ácido acetilsalicílico, ácido valpróico, ácidos 2-arylpropiónicos, antidepresivos (amineptina y tianeptina), tetraciclinas, agentes antivíricos (zidovudina, zalcitabina, didanosina).
<b>Miscelánea</b>	Lipodistrofia de miembros inferiores, enfermedad de Weber-Christian, abeta e hipobetalipoproteinemia, enfermedad de Wilson, síndrome de Reye, hígado graso del embarazo, síndrome de aceite tóxico.
<b>Idiopática</b>	

**Tabla 1.** Factores asociados a EHNA

### 2.3.2.1 Género

Tradicionalmente se ha asociado la EHNA a mujeres de edad madura, con una edad media de 46-57 años (Reid, 2001; Pérez-Aguilar y cols., 2004; Cave y cols., 2007; Ferrer y cols., 2008; Argo y cols., 2009; Córdova y cols., 2009a). No se conoce la razón de esta mayor frecuencia, aunque se ha especulado que un efecto hormonal o la mayor prevalencia de la obesidad en el sexo femenino podrían estar relacionados.

De hecho, es posible que el papel del sexo en el desarrollo de la esteatosis hepática y de la EHNA haya sido sobrevalorado en muchos estudios y quizá confundido por coexistir con la obesidad. A favor de esta hipótesis se encuentra el hallazgo de que la esteatosis hepática demostrada por tomografía axial computarizada (TAC) es igual de frecuente en ambos sexos y que en estudios de necropsias se ha encontrado igual prevalencia de EHNA entre ambos sexos (Ratziu y cols., 2000; Harrison y cols., 2002; Neuschwander y cols., 2003; Harrison y cols., 2003a; Cave y cols., 2007; Dowman y cols., 2010; Tomiya, 2010).

### **2.3.2.2 Obesidad**

Desde hace muchos años se sabe que la obesidad se acompaña de cambios histológicos hepáticos característicos (Zelman, 1958; Westwater y cols., 1958). Sin embargo, los avances en este campo fueron mínimos hasta 1979 cuando Adler y Schaffner indicaron la presencia de hígado graso, hepatitis y cirrosis semejantes a las observadas en el HGNA, en un grupo de pacientes con sobrepeso que cursaban a menudo con diabetes y anormalidades de los lípidos (Adler y cols., 1979); pero solo es a partir de la publicación del estudio de Ludwig y colaboradores, que se reconocen las lesiones hepáticas típicas de EHNA en pacientes obesos (Ludwig y cols., 1980). En la actualidad se considera un hecho comprobado que la obesidad se asocia con frecuencia a lesiones hepáticas de esteatosis, esteatohepatitis e incluso fibrosis y cirrosis (García-Monzón y cols., 2000; Pérez-Aguilar y cols., 2004; Cave y cols., 2007; Souza y cols 2012). De acuerdo con la mayoría de estudios, entre el 39% y 100% de pacientes con HGNA tienen sobrepeso u obesidad (Pérez-Aguilar y cols., 2004; Cave y cols., 2007; Ferrer y cols., 2008; Tuba y cols., 2008; Akiyama y cols, 2009; Dowman y cols., 2011). Así mismo se ha demostrado que el riesgo de HGNA en pacientes con IMC mayor de 35 kg/m<sup>2</sup> es de 70% al 80%, mientras que el de EHNA es del 15% al 30% (Choudhury y cols., 2004; Aly y cols., 2011; Rabl y cols., 2012). Las biopsias hepáticas detectan esteatosis en más del 75% de obesos mórbidos, demostrando EHNA en un cuarto de estos pacientes y cirrosis en el 3-11% (Pascale y cols., 2010; Dowman y cols., 2011). La obesidad también se correlaciona con la gravedad de la fibrosis en la EHNA, independientemente de la diabetes y la edad (Ratziu y cols., 2000; Rabl y cols., 2012). Se ha indicado que a mayor edad y mayor grado de esteatosis, sobre todo si también existe inflamación intrahepática, hay un mayor riesgo de fibrosis (García-Monzón y cols., 2000).

La distribución de la grasa corporal puede ser importante. Se ha encontrado una correlación significativa entre el grado de esteatosis y la relación cintura/cadera que apunta a la importancia de la grasa visceral como predictora de esteatosis (Pérez-Aguilar y cols., 2004; Rocha y cols., 2005; Ferrer y cols., 2008; Akiyama y cols., 2009; Verrijken y cols., 2010). Los estudios de intervenciones bariátricas han demostrado la relación entre la obesidad y el HGNA y han ayudado a dilucidar el papel preponderante que juega la grasa visceral en la génesis de la EHNA debido a que el espectro de la enfermedad por HGNA comprende la resistencia a la insulina y procesos inflamatorios en los que ella se encuentra implicada. Los adipocitos del omento y los mesentéricos, que son los componentes principales de la grasa visceral, son endocrinológicamente más activos que los subcutáneos y segregan sustancias implicadas en la resistencia a la insulina como el inhibidor del activador del plasminógeno (IAP-1), la adiponectina, la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la resistina y la interleucina 6 (IL-6), entre otras (Bajaj y cols., 2004; Balisteri y cols., 2006; Utschneider y cols., 2006; Córdova y cols., 2009b; Rabl y cols., 2012; Cusi 2012). Así mismo, la obesidad representa una inflamación sistémica crónica de bajo grado, mediada particularmente por macrófagos que inhibe la capacidad del tejido adiposo para controlar los ácidos grasos plasmáticos no esterificados y contribuye a la función endocrina aberrante, con múltiples consecuencias en términos de disfunción metabólica, resistencia a la insulina y riesgo de enfermedad cardiovascular (Rocha y cols., 2005; Sharma y cols., 2007; Cusi 2012).

Los varones delgados raramente presentan fibrosis hepática significativa; así se ha detectado fibrosis o cirrosis en pacientes de menos de 50 años, con un índice de masa corporal menor de 28 kg/m<sup>2</sup> y triglicéridos normales (Ratziu y cols., 2000).

### **2.3.2.3 Diabetes**

La diabetes es la segunda condición asociada con EHNA en orden de frecuencia. Hasta un tercio (34%-75%) de los pacientes con EHNA son diabéticos, tienen hiperglicemias en ayunas (Powell y cols., 1990; McClain y cols., 2004; Brunt, 2004; Browning y cols., 2004b; Svegliati-Baroni y cols., 2006) o se diagnostican como intolerantes a la glucosa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa (Fan y cols., 2005; Moscatiello y cols., 2007; Gronbak y cols., 2008). La asociación es mayor o más fuerte con la diabetes mellitus tipo 2 y con la obesidad (Pérez-Aguilar y cols., 2004; Cordova y cols., 2009a), aunque también se ha descrito en diabéticos

insulinodependientes con pobre control glucémico (Lenaerts y cols., 1990), en diabéticos tipo 2 sin obesidad asociada (Pérez, 2001) y en personas con historia familiar de diabetes mellitus (Loomba y cols., 2012).

Desde que en 1980, Falchuk y colaboradores (Falchuk y cols., 1980) advirtieron que las biopsias hepáticas de pacientes con diabetes tipo 2 y sin abuso de alcohol mostraban una lesión hepática muy similar a la hepatitis alcohólica, diferentes estudios han demostrado que la diabetes se relaciona con elevadas concentraciones de transaminasas que incrementan el riesgo de desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular en la población en general (Marchesini y cols., 2007; Córdova y cols., 2009a). Así mismo, se han correlacionado concentraciones basales significativamente mayores de los parámetros vinculados con resistencia a la insulina (glucosa, triglicéridos, transaminasas e insulina) en pacientes con HGNA, con la coexistencia y gravedad de la esteatosis y con la presencia de fibrosis, especialmente en pacientes con obesidad y diabetes tipo 2 (Adams y cols., 2009; Fraser y cols., 2009; Cusi 2012).

Aunque investigaciones clínicas y estudios epidemiológicos han asociado la EHNA con la diabetes tipo 2 como el factor patogénico fundamental, la relación de causa efecto entre EHNA y diabetes no es concluyente y se ha llegado a indicar que podría ser una condición prediabética (Fan y cols., 2007a,b, 2010; Hsieh y cols., 2011).

#### **2.3.2.4 Hiperlipemia**

La hiperlipemia es otra anormalidad que se ha encontrado en el 20 al 81% de pacientes con EHNA (Clark y cols., 2003b; Browning y cols., 2004b; Córdova y cols., 2009a). La hipertrigliceridemia, la hiperlipidemia mixta y las hiperlipemias 2b y 4 se asocian frecuentemente con infiltración grasa, y la alteración en los lípidos con el grado de esteatosis (Pérez-Aguilar y cols, 2004; Marchesini y cols., 2007). La hipertrigliceridemia y la disminución en los niveles de c-HDL se encuentran presentes en el 64% y el 30-42% de los pacientes con EHNA, respectivamente (Jimba y cols., 2005; Fon Tacer y cols., 2011). La corrección de la anomalía lipídica se asocia a una mejoría de las pruebas hepáticas, situación que reafirma el papel relevante de la hipertrigliceridemia en la patogenia de la EHNA (Cave y cols., 2007). Al igual que la diabetes, la hiperlipemia con frecuencia coexiste con obesidad.

### 2.3.2.5 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico o Síndrome X es una entidad que agrupa cuatro de los principales factores de riesgo para la EHNA: diabetes mellitus tipo 2, hiperlipemia, resistencia a la insulina y obesidad (Adams, y cols., 2005c; Hamaguchi y cols., 2005; Souza y cols. 2012). Las consideraciones fisiopatológicas, las asociaciones clínicas y las pruebas de laboratorio apoyan que la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia tienen un papel central en la patogénesis de las dos entidades. Por lo tanto, en la actualidad se considera a la EHNA como la manifestación hepática del síndrome metabólico (Paschos y cols., 2009; Nakao y cols., 2009; Shifflet y cols., 2009; Sumida y cols., 2011; Souza y cols., 2012). Así mismo, diversos grupos han encontrado que pacientes con síndrome metabólico presentan esteatosis hepática en el 80% de casos, lesiones de esteatohepatitis en el 24%, fibrosis en el 74%, y cirrosis en el 2% (Pinto y cols., 1999; Knobler y cols., 1999; Marchesini y cols., 2007).

Los criterios del Adult Treatment Panel III (ATP III), que son los más aceptados para diagnosticar síndrome metabólico, establecen la necesidad de que concurren al menos tres de las cinco características siguientes: (1) circunferencia de la cintura (obesidad central) mayor de 102 cm en hombres y de 88 cm en mujeres; (2) glucosa en ayuno igual o mayor de 110 mg/dL; (3) triglicéridos igual o mayores de 150 mg/dL, (4) c-HDL menor de 40 mg/dL en hombres y 50 mg/dL en mujeres y (5) tensión arterial igual o mayor de 130/85 mmHg (American Heart Association, 2002). Un gran porcentaje de estas características se encuentran relacionadas con el grado de esteatosis hepática (Hamaguchi y cols., 2005; Córdova y cols., 2009a) y las evidencias demuestran que la intolerancia a la glucosa, la hipertensión y la dislipidemia incrementan el riesgo de esteatosis en pacientes gravemente obesos (Marceau y cols., 1999); si el HGNA y el síndrome metabólico coexisten, la regresión de la enfermedad es menos probable (Hamaguchi y cols., 2005); el contenido de grasa del hígado se incrementa significativamente en sujetos con síndrome metabólico comparados con aquellos sin síndrome metabólico, independientemente de la edad, género o IMC (Kotronen y cols., 2007) y los niveles de ALT se incrementan de manera significativa al aumentar el número de componentes del síndrome metabólico (Kelishadi y cols., 2009).

### **2.3.2.6 Pérdida de peso**

Aunque la pérdida de peso es una de las medidas terapéuticas aconsejables en pacientes con obesidad mórbida, se ha demostrado que en sujetos con un alto grado de infiltración grasa la disminución rápida de peso (ya sea como consecuencia de un ayuno severo o de un tratamiento o cirugía para la obesidad), puede promover inflamación y fibrosis portal, estasis biliar y necrosis focal y por lo tanto generar EHNA (Luychx y cols., 1998; Reid y cols., 2001; Alba y cols., 2003; Blackburn y Mun, 2004). Diversos estudios describen disfunción hepática postquirúrgica en el 40% de los casos de anastomosis yeyunoileal, la mayoría de los cuales se corresponde con esteatosis hepática. También se ha detectado EHNA severa seguida de fallo hepatocelular en un 2-8% de pacientes sometidos a gastroplastia, bypass gástrico y otros tipos de cirugía que conllevan una rápida reducción de peso (Pérez, 2001; Dixon, 2007; Chavez y cols., 2010). En todos los casos se ha comprobado que existe más riesgo de desarrollar EHNA durante los periodos de mayor disminución de peso (Blackburn y cols., 2004; Dixon, 2007). Dentro de los aspectos fisiológicos que puede jugar un papel importante en la aparición de la enfermedad hepática en este tipo de pacientes, se encuentra el subsecuente incremento en la lipólisis durante los 6-12 meses posteriores a la cirugía bariátrica, que conlleva a un mayor transporte de grandes cantidades de ácidos grasos de cadena larga del tejido adiposo visceral por la vía portal, para ser metabolizados en el hígado. Tales cambios pueden precipitar la aparición de esteatohepatitis fulminante o favorecer la progresión de alteraciones histológicas hepáticas (de Freitas y cols., 2008; Rabl y cols., 2012).

### **2.3.2.7 Tóxicos industriales**

También se ha relacionado la EHNA con la exposición a diferentes agentes tóxicos. En España se han indicado casos de EHNA asociados a la intoxicación por aceite de colza adulterado (SAT) que se produjo durante los años ochenta. Así se encontraron lesiones de EHNA en 11 de 124 pacientes afectados por el SAT (9%), y posteriormente se detectó como lesión hepática tardía hasta en el 24% de pacientes (Soliz-Herruzo y cols., 1987; Moreno y cols., 1987; Canga y cols., 1995). Aunque el SAT suele aparecer asociado a otras condiciones de riesgo en pacientes con EHNA, la elevada prevalencia de esta lesión en dicho síndrome sugiere que el aceite tóxico pudiera haber jugado algún papel patogénico.

También se ha descrito una elevada frecuencia de EHNA asintomática como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de gases petroquímicos. Así, se ha indicado que, en un grupo de trabajadores petroquímicos de Bulgaria, se produjo elevación de las enzimas hepáticas, dislipidemia, hepatomegalia y disminución sérica de la actividad de la glutatión sintetasa (GSH) (Michailova y cols., 1998). De igual manera, en un estudio desarrollado en Brasil se encontró que de 1500 trabajadores de una planta petroquímica, 110 mostraban una elevación de enzimas hepáticas 3,56 veces mayor que la población control, independientemente de la presencia de obesidad, tabaquismo, práctica de ejercicio o consumo de alcohol. En 32 de ellos no se encontró ningún diagnóstico etiológico claro, en 20 la biopsia hepática fue compatible con EHNA y 10 mejoraron su bioquímica hepática tras ser trasladados del lugar de trabajo (Barberino y cols., 2005).

Otros compuestos químicos que se han relacionado con la aparición de EHNA son: (1) Compuestos industriales: dicloroetileno, flectol H y safrole; (2) Metales: antimonio, bario, cromatos, fósforo, talio, uranio, cobre y elementos raros de número atómico bajo; (3) Petroquímicos: Hidrazina; (4) Toxinas ambientales: hipoglicinas (Córdova y cols., 2009a).

### **2.3.2.8 Fármacos**

Aunque la frecuencia de esteatohepatitis inducida por fármacos es baja (menos del 2%), cada vez es mayor el número de medicamentos que se van relacionando con la aparición de EHNA. Entre ellos se encuentran fármacos cardiovasculares como la amiodarona y el maleato de perhexilina, bloqueadores de los canales de calcio como la nifedipina y el diltiazem, glucocorticoides a dosis altas, estrógenos sintéticos antifúngicos como el fluconazol y ketoconazol, inhibidores de las proteasas, citostáticos como el tamoxifeno y antimaláricos como la cloroquina (Reid, 2001; Córdova y cols., 2009a; Almonacid y cols., 2012).

### **2.3.2.9 Otras entidades asociadas a EHNA**

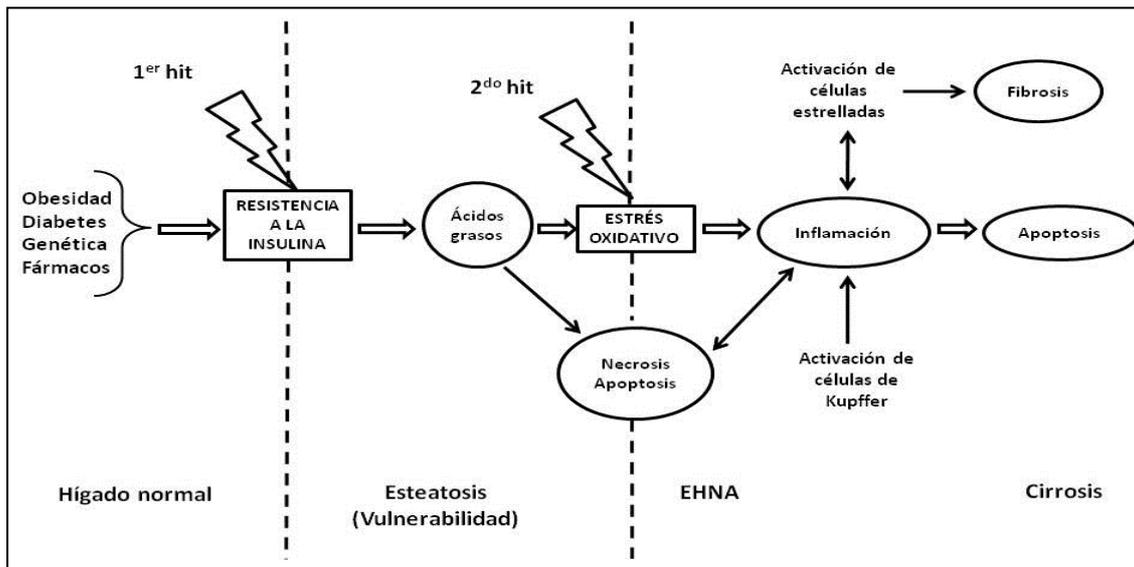
Otras condiciones que pueden asociarse a la aparición de EHNA y de las que se han publicado casos aislados son: diverticulosis yeyunal, enfermedad de Weber-Christian, enfermedad de Wilson, lipodistrofia parcial, hepatoesteatosis familiar, abetalipoproteinemia, hipobetalipoproteinemia, galactosemia, síndrome de Prader-Will,

síndrome de Refsum, síndrome de Shwachmann, enfermedades por acumulación de glucógeno, intolerancia hereditaria a la fructosa, homocistinuria, deficiencia sistémica de carnitina, tirosinemia, y esprue celíaco. Además, en algunas series de enfermos con EHNA se han detectado determinadas características clínicas con una frecuencia mayor a la esperada, como son la hipertensión arterial (33%) y la hiperuricemia (50%) cuyo significado, por el momento, es incierto (Reid AE, 2001, Pérez-Aguilar y cols., 2004; Córdova y cols., 2009a).

## 2.4 Patogenia

Los mecanismos que conducen al desarrollo de una esteatosis hepática y, posteriormente, a la aparición de la EHNA solo se conocen de forma parcial. La teoría del *doble impacto*, de Day y James, es la que goza de más credibilidad en este momento (Figura 1) (Day y cols., 1998). El “primer impacto” lo constituye la resistencia periférica a la insulina, la cual predispone al desarrollo de la esteatosis y el “segundo impacto” una fuente adicional de estrés oxidativo crónico, capaz de superar los mecanismos de defensa celulares y de poner en marcha sistemas moleculares implicados en vías proapoptóticas y proinflamatorias que generan lesión hepatocelular y fibrosis (esteatohepatitis) (Choudhury y cols., 2004a; Medina y cols, 2004; Moreno, 2005; Portincasa y cols., 2005; Dowman y cols., 2010; Carrillo y cols.,2011).

Con posterioridad, se enunció la teoría del multiimpacto, defendida por Diehl que diferencia la génesis subsiguiente de cirrosis (tercer impacto) y, eventualmente, de hepatocarcinoma (cuarto impacto) (Moreno, 2005).



**Figura 1.** Teoría del doble impacto Modificada de “Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis” (Buqué y cols., 2008).

#### 2.4.1 Patogenia de la resistencia a la insulina y de la esteatosis hepática

Desde hace algunos años se reconoce que la resistencia a la insulina provoca múltiples alteraciones metabólicas que conducen a la esteatosis hepática (Leclercq y cols., 2007; Capeau 2008; Farrell y cols., 2012). Dentro de ellas se encuentran las siguientes:

- Inhibe la lipoprotein lipasa de los adipocitos, incrementado el pool de ácidos grasos libres que potencialmente pueden ser captados por el hígado.
- Inhibe la translocación del transportador GLUT-4 a nivel del músculo esquelético, disminuyendo la captación de glucosa por el mismo. Como consecuencia de ello se favorece la hiperglicemia y se ofertan mayores cantidades de glucosa al hepatocito.
- Inhibe la glucogénesis, estimulando a la vez la glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas. Así mismo, disminuye la síntesis de la apolipoproteína B-100, afectando el ensamble de las VLDL y la remoción de triglicéridos y ester de colesterol a través de las mismas.

Como resultado de estas alteraciones se produce un depósito masivo de ácidos grasos libres (AGL) y sus derivados en el hígado (esteatosis), que incrementan la resistencia a la insulina a través de la transcripción del inhibidor de la proteína

quinasa  $\beta$  (I $\kappa$ K $\beta$ ) (Crespo y cols., 2005; Buqué y cols., 2008; Carrillo y cols., 2011), generándose un circuito de retroalimentación positiva. A su vez, la hiperinsulinemia generada por la resistencia a la insulina puede tener efectos nocivos al hígado al generar estrés oxidativo, aumentar la expresión de la proteína lipogénica SREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides) y estimular el desarrollo de tejido conectivo, en presencia de hiperglicemia (Buqué y cols., 2008; Carrillo y cols., 2011).

Otros factores que pueden contribuir al desarrollo de la esteatosis hepática son ambientales tales como la ingesta excesiva de grasas y carbohidratos, genéticos como el caso de los polimorfismos de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTPP) o metabólicos como la hiperleptinemia y el incremento del TNF- $\alpha$  por parte de los adipocitos, que contribuyen a incrementar la resistencia a la insulina (Crespo y cols., 2005).

#### **2.4.2 Desarrollo de la EHNA y progresión de la misma**

En condiciones fisiológicas normales, los AGL captados por el hepatocito son oxidados en la mitocondria, esterificados a triglicéridos y convertidos en fosfolípidos y ésteres de colesterol, para ser secretados como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Dado que en el HGNA existe un exceso de AGL y que tanto la esterificación a triglicéridos como la síntesis de apolipoproteínas son poco eficientes en presencia de resistencia a la insulina, se satura la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y se incrementan la oxidación microsomal y peroxisomal de los ácidos grasos libres. La oxidación microsomal produce una sobreexpresión de los citocromos P450 2E1 y 3A4 que disminuye en un 50% la actividad de la cadena respiratoria, incrementando la relación ADP/ATP. A su vez, el incremento de la oxidación peroxisomal induce la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de productos de peroxidación lipídica. La generación de EROS satura los sistemas antioxidantes fisiológicos, activa las quinasas sensibles al estado redox y produce un incremento de la actividad del I $\kappa$ K $\beta$ , que induce al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Posteriormente, se generan citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-8 y se sintetizan moléculas de adhesión que incrementan la quimiotaxis neutrofílica. A su vez, los productos finales de la peroxidación lipídica, como el 4-hidroxinonanal y el malonildialdehído (MDA), estimulan la síntesis de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Buqué y cols., 2008; Dowman y cols., 2010; Carrillo y Cols., 2011).

### **2.4.3 Desarrollo de fibrosis**

No se conoce la patogenia exacta de la fibrosis en los pacientes con EHNA. Probablemente, la activación de las células estrelladas hepáticas depende de una compleja interacción entre numerosos factores, entre los que se incluyen las EROS, las citocinas y los productos derivados de los hepatocitos lesionados. En cualquier caso, se ha demostrado un claro incremento de citocinas profibrogénicas en los pacientes con EHNA y fibrosis, entre las que destacan el factor de crecimiento transformador (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) (Friedman y cols., 2000; Kaser y cols., 2003; Buqué y cols., 2008; Dowman y cols., 2010).

Una mención especial requiere el papel las adipocinas en la inducción de la inflamación y la fibrosis. Varios trabajos de investigación sugieren que la leptina tiene un papel permisivo en el desarrollo de la fibrosis, observándose recientemente que los pacientes con EHNA tienen mayor grado de fibrosis por sobreexpresión del receptor de la leptina en tejido hepático, al contrario que los sujetos con esteatosis sin fibrosis (Crespo y cols., 2005; Dowman y cols., 2010). Este hecho permitiría explicar la ausencia de correlación entre los niveles de leptina y el grado de fibrosis en los sujetos con EHNA. Sin embargo, no hay una relación estadísticamente significativa entre el grado de fibrosis y los niveles de leptina al descartar factores como edad, género, IMC, diabetes y resistencia a la insulina. De manera opuesta a la leptina, los niveles de adiponectina son significativamente menores en pacientes con HGNA, demostrándose una correlación inversa entre niveles de adiponectina y resistencia a la insulina. Por lo tanto, las concentraciones séricas disminuidas de leptina podrían asociarse con la progresión de la enfermedad. Por último, la resistina, se ha relacionado a la resistencia a la insulina y exacerbación de la respuesta inflamatoria. Se encuentra elevada en pacientes con HGNA, y sus niveles se correlacionan con el grado histológico de esteatohepatitis (Kaser y cols., 2005; Carrillo y cols., 2011).

## **2.5 Presentación clínica**

### **2.5.1 Síntomas**

Como en muchos otros tipos de enfermedad hepática crónica la mayoría de los pacientes con EHNA son asintomáticos en el momento del diagnóstico (Pérez-Aguilar y cols., 2004; Portincasa y cols., 2005; Soto y cols., 2005). Cuando se presentan los síntomas (especialmente en los niños), estos suelen ser inespecíficos, siendo la

astenia el más común. Otros síntomas frecuentes son dolor en el hipocondrio derecho, molestia abdominal y malestar general (Matteoni y cols., 1999; Choudry y cols., 2004b). En niños se puede encontrar también acantosis nigricans (Falck y cols., 2001; McAvoy y cols., 2006).

Se estima que entre el 30 y el 100% de los pacientes tienen obesidad y hasta el 50% cierto grado de hepatomegalia que puede elevarse hasta el 95% si se valora por ultrasonido (Falck y cols., 2001; Choudhury y cols., 2004; Ong y cols., 2005a). Una pequeña proporción experimenta síntomas que indican una enfermedad hepática más severa, pudiendo presentar prurito, anorexia, náuseas e incluso ictericia (Choudhury y cols., 2004; Ong y cols., 2005b). El eritema palmar y las arañas vasculares asociadas con enfermedad hepática crónica se presentan en una proporción pequeña, al igual que la atrofia muscular que puede manifestarse durante la progresión, pero es difícil de valorar por la obesidad (Córdova y cols., 2009b). La ascitis, anasarca, varices hemorrágicas y otros síntomas de encefalopatía hepática no se presentan hasta que la cirrosis se manifiesta y son indicativas de enfermedad descompensada (Soto y cols., 2005; Edmison y cols., 2007).

Existen varios trabajos que sugieren que el hepatocarcinoma puede ser una complicación de esta enfermedad (Leone y cols., 2001; Nair y cols., 2001). En pacientes con cirrosis criptogénica se ha detectado una mayor incidencia de hepatocarcinomas que en cirróticos de etiología bien definida vírica o alcohólica, por lo que el hepatocarcinoma podría ser una complicación tardía relacionada con la EHNA (Yang y cols., 2001). Sin embargo, otros estudios demuestran una asociación entre diabetes y hepatocarcinoma sólo en presencia de virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B o cirrosis alcohólica (El-Serag y cols., 2001), lo que sugiere que la diabetes puede ser tan solo un marcador de hepatopatía avanzada con mayor probabilidad de progresar a hepatocarcinoma.

### **2.5.2 Parámetros bioquímicos relacionados con EHNA**

No existe ningún dato de laboratorio específico de la EHNA. La anomalía más frecuente es la elevación entre 2-5 veces de las transaminasas hepáticas que ocasionalmente llega hasta las 10-15 veces, pero que a menudo permanecen normales (Sanyal, 2000; Harrison y cols., 2002; Soto y cols., 2005; Kim y cols., 2009).

Aunque la mayoría de las veces los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) son más altos que los de la aspartato aminotransferasa (AST), ocasionalmente los niveles de AST pueden ser más elevados, especialmente en el estadio de cirrosis (Soto y cols., 2005). La relación AST/ALT suele ser inferior a uno en el 65-90% de los pacientes con EHNA (Shimomura y cols., 1999; Clark y cols., 2003a; Alba y cols., 2003; Browning y cols., 2004a,b; Byrne y cols., 2009). Sin embargo, la relación mayor de uno sugiere una esteatohepatitis alcohólica o una forma avanzada de EHNA que evoluciona hacia cirrosis (Pérez-Aguilar y cols., 2004; Portincasa y cols., 2005). Con menor frecuencia existe una elevación de la fosfatasa alcalina (ALP) y de la gamma-glutamil-transpeptidasa (GGT). 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 EHNA se detectan niveles anormales del perfil lipídico (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, disminución del colesterol HDL y/o aumento en la concentración de glucosa en suero (Donati y cols., 2004; Diehl, 2004; Portincasa y cols., 2005; Targher y cols., 2007; Córdova y cols., 2009a).

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 niveles hepáticos de hierro son normales (Ratziu y cols., 2000; Angulo, 2002; Harrison y cols., 2004b). Se ha indicado que pacientes con hígado graso y una persistente elevación de los niveles de ferritina presentan un mayor riesgo de desarrollar EHNA, especialmente si están asociados a desórdenes en el metabolismo de los lípidos o la glucosa (Fargion y cols., 2001).

## **2.6 Diagnóstico**

La EHNA siempre debe ser incluida entre las posibilidades diagnósticas de pacientes con hipertransaminasemia crónica sin otra causa identificable de enfermedad hepática crónica, especialmente en presencia de alguna de las condiciones reconocidas como de riesgo (obesidad, diabetes, hiperlipemia). Hacen más probable su diagnóstico la ausencia de síntomas o que éstos sean inespecíficos, la elevación predominante de ALT y la presencia de un hígado brillante en la ecografía

abdominal. Sin embargo, aunque todos estos datos permiten establecer un diagnóstico de sospecha, se requiere una biopsia hepática para establecer un dictame certero y poder evaluar la severidad y el pronóstico de la enfermedad (Pons, 2009).

Se ha propuesto que el diagnóstico de EHNA se fundamente en tres criterios básicos: hallazgos histológicos de esteatohepatitis, evidencia de consumo mínimo de alcohol (inferior a 20 gramos al día) y exclusión de otras causas de enfermedad hepática crónica. (Powell y cols, 1990). Aunque estos criterios tienen validez en la práctica habitual, cada uno tiene sus limitaciones en lo que se refiere a su validez universal.

Dentro de los métodos más utilizados para el diagnóstico de EHNA se encuentran la biopsia hepática, los métodos de imagen y nuevas tecnologías que permiten realizar el diagnóstico no invasivo de la fibrosis y evaluar la evolución de la enfermedad hepática.

### **2.6.1 Biopsia hepática**

La biopsia hepática es el único método que permite un diagnóstico exacto de EHNA. Los hallazgos histológicos del HGNA son similares pero no idénticos a los de la esteatohepatitis alcohólica e incluyen una combinación de (1) esteatosis (hígado graso) de tipo macrovesicular con ubicación preferente en el área 3 del lobulillo; (2) daño hepatocitario (degeneración y necrosis celular) que se manifiesta como balonización hepatocelular, cuerpos acidófilos o apoptóticos y cuerpos hialinos o de mallory; (3) infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares que generalmente se acumulan alrededor de los hepatocitos dañados adyacentes a los sinusoides y (4) grados variables de fibrosis (Pérez-Carreras, 2001; Brunt, 2002b, 2005, 2007, 2011; Portincasa y cols., 2005; Tiniakos y cols., 2010; Obika y cols., 2012).

La severidad y distribución de estas lesiones permite clasificar la EHNA en tres estadios histológicos:

- a. EHNA en fase de esteatosis simple: se caracteriza por depósitos aislados de grasa en el citoplasma de los hepatocitos, de predominio macrovesicular y centrolobulillar.

- b. EHNA en fase de esteatohepatitis: presencia de esteatosis, degeneración hidrópica de los hepatocitos, cuerpos de Mallory, infiltrado de polimorfonucleares, y grados variables de fibrosis.
- c. EHNA en fase de cirrosis esteatohepatítica: se identifica por la presencia de nódulos de regeneración rodeados de bandas de fibrosis, observándose en los nódulos signos esteatohepatíticos tales como esteatosis, cuerpos de Mallory, infiltrado de polimorfonucleares, etc. (Brunt y cols., 2005; Portincasa y cols., 2005; Soto y cols., 2005).

### **2.6.2 Graduación y estadificación de la EHNA**

El estadiaje semicuantitativo más aceptado para la estandarización de las biopsias hepáticas sugestivas de EHNA es el propuesto por Brunt y sus colaboradores en el año 1999 (Brunt y cols., 1999). Este sistema se basa en el concepto de que las lesiones de EHNA son lo suficientemente diferentes de las de hepatitis crónica como para establecer un sistema único de evaluación. En este sistema la esteatosis, la balonización y la inflamación (lobular y portal) valoran el grado de la afectación, y la fibrosis la progresión de la enfermedad. La actividad inflamatoria se clasifica en grados de 0 a 3 y la fibrosis en estadios de 0 a 4. Valores finales  $\leq 2$  se consideran no diagnósticos de EHNA, de 3-4 dudosos y  $\geq 5$  esteatohepatitis definida (Brunt y cols., 1999, 2002a, 2005; Aly y cols., 2011) (Tabla 2). Se han propuesto modificaciones a la clasificación inicial de Brunt, las cuales no están totalmente aprobadas para su utilización a nivel internacional (Brunt y cols., 2005, 2007; Merat y cols., 2010).

ACTIVIDAD INFLAMATORIA				
Grado	Esteatosis	Balonización	Inflamación	
<b>1 Ligera</b>	1-2 (<33%)	Mínima	Lobular: 1-2 Portal: ausente o ligera	
<b>2 Moderada</b>	2-3 (33-66%)	Presente	Lobular: 2 Portal: ligera o moderada	
<b>3 Severa</b>	3 (≥66%)	Marcada	Lobular: 3 Portal: ligera o moderada	
FIBROSIS				
Estadio	Fibrosis perisinusoidal	Fibrosis portal	Enlaces de fibrosis	Cirrosis
<b>0</b>	0	0	0	0
<b>1</b>	Focal o extensa	0	0	0
<b>2</b>	Focal o extensa	Focal o extensa	0	0
<b>3</b>	Fibrosis en puentes	Fibrosis en puentes	+	0
<b>4</b>	+/- en zona 3, incorporada en septos	Tracto portal o incorporada en septos	Extensa	+

**Tabla 2.** Grado y estadiaje de la EHNA. Modificada de Brunt y cols., 1999.

Aunque la biopsia hepática está indicada en los pacientes con sospecha de EHNA y presencia de factores de riesgo asociados, existe controversia sobre su aplicación. Entre los argumentos en contra se encuentran los siguientes: se trata de un método invasivo, en ocasiones doloroso, con un riesgo de complicaciones de aproximadamente el 0,5%; tiene un no desdeñable error de muestra y en el 35% de los casos una sola biopsia no es capaz de descartar la existencia de fibrosis; la presencia de un alto índice de la enfermedad hace imposible la realización de la biopsia a todos los pacientes y en muchos pacientes la enfermedad no tiene un carácter progresivo por lo que la biopsia no estaría justificada; no determina un tratamiento específico ya que aún no se dispone de él, e implica riesgos para el paciente que se minimizan con el empleo de la ecografía como guía de la biopsia hepática (Alba y cols., 2003; Moy y cols., 2005; Pons, 2009; Obika y cols., 2012).

### 2.6.3 Estudios de imagen

Dentro de las técnicas de imagen usadas para el diagnóstico de EHNA se encuentran la ecografía abdominal, la TAC, la resonancia magnética espectroscópica (MRI) y la elastografía de transición (ET).

En la ecografía la esteatosis se presenta como un aumento difuso de la ecogenicidad, con ecos finos y brillantes, escasos vasos intrahepáticos y atenuación posterior del sonido. La sensibilidad de la ecografía se incrementa de manera paralela al incremento en el grado de infiltración grasa, sin embargo, no puede proporcionar una clasificación exacta del contenido hepático de grasa, su sensibilidad se reduce en obesidad mórbida y su reproducibilidad depende en gran manera del operador (McCullough, 2002; Castera, 2008; Browning y cols., 2009; Obika y cols 2012).

La TAC es la técnica más utilizada para detectar y caracterizar la esteatosis hepática ya que permite hacer una valoración semicuantitativa de la grasa intrahepática. En una TAC la infiltración grasa en el hígado produce una baja densidad en el parénquima hepático. La esteatosis es difusa en la mayoría de los casos de EHNA, pero puede ser focal (Soto y col., 2005). La TAC supera a la ecografía en la valoración de pacientes obesos y cuando existe abundante gas intestinal. No obstante, debido a sus desventajas (elevado coste y exposición a radiación) no es una técnica de uso habitual en atención primaria (Moy y cols., 2005; Castera, 2008; Browning y cols., 2009; Obika y cols., 2012).

La MRI es la técnica no invasiva más útil para cuantificar el contenido de triglicéridos hepáticos. Utiliza la diferencia en frecuencias de resonancia del agua y el lípido para diferenciar los tejidos que contienen únicamente agua de aquellos que contienen agua y lípidos (Castera, 2008). Varios estudios demuestran una buena correlación entre la cuantificación del contenido de grasa hepática por MRI y la biopsia hepática. Por desgracia es una técnica costosa que no se utiliza en la práctica habitual (Soto y cols., 2005; Castera, 2008; Browning y cols., 2009).

La ET o “elastografía por pulso unidimensional” mide la rigidez o elasticidad de un tejido a través de la utilización de un pulso mecánico de vibración y una onda de ultrasonidos. Primero se emite el pulso mecánico que produce una onda elástica que se transmite a través del tejido. La onda de ultrasonidos que sigue a la onda mecánica mide la velocidad de propagación de la onda elástica en el interior del tejido. La

velocidad de propagación de la onda elástica es proporcional a la rigidez del tejido (cuanto más duro sea el tejido más rápido se propagará la onda). El resultado se expresa en unidades de kilopascal (kPa) (Carrión, 2009).

El método comercializado que utiliza la ET para medir la rigidez del hígado, que es proporcional al grado de fibrosis hepática, se denomina Fibroscan (FS). El FS es fiable para el diagnóstico de cirrosis hepática (Estadio 4 de Fibrosis o F4) y de fibrosis significativa (Estadio de fibrosis 2 o superior, F2), pero sus valores pueden variar según las características del paciente y la etiología de la enfermedad. Así mismo, permite evitar la biopsia hepática en el 90% de los pacientes con cirrosis y hasta en el 70% de los pacientes con fibrosis significativa cuando se combina con otros métodos no invasivos (Carrión, 2009).

#### **2.6.4 Pruebas no invasivas**

En los últimos años se han realizado muchos trabajos que investigan la utilidad de pruebas alternativas a la biopsia que se puedan repetir periódicamente y que permitan conocer el estadio de la fibrosis y la evolución de las enfermedades hepáticas.

Dentro de las pruebas clínico-biológicas propuestas para diferenciar la esteatosis simple de la EHNA se encuentran el test de "NASH", el índice de "Palekar" y el índice de "Shimeda". En ellos se combinan la edad, el IMC, la relación AST/ALT y el ácido hialurónico o la adiponectina, los valores séricos del colágeno tipo 4 y el índice HOMA (Tabla 3) (Pons, 2009).

MARCADOR	PARÁMETROS EVALUADOS
<b>Tet de Nash</b>	Edad, género, IMC, triglicéridos, colesterol, $\alpha 2$ microglobulina, GGT, AST, ALT, haptoglobina, apoproteína A1, bilirrubina total.
<b>Índice Palekar</b>	Edad $\geq 50$ años, género femenino, AST $\geq 45$ UI/L, relación AST/ALT $\geq 0,8$ , IMC $\geq 30$ kg/m <sup>2</sup> , ácido hialurónico $\geq 55$ $\mu$ g/L
<b>Índice Shimeda</b>	Nivel de adiponectina sérica, HOMA-IR; colágeno sérico tipo 4

**Tabla 3.** Índices no invasivos de EHNA. Tomado de “Non-invasive diagnosis of steatosis and fibrosis” (Castera, 2008).

Otros marcadores biológicos evalúan el grado de fibrosis en pacientes con hígado graso. De ellos unos son indirectos debido a que reflejan la alteración hepática pero no están relacionados directamente con el metabolismo de la matriz extracelular (MEC), y otros expresan directamente los cambios que se producen en la MEC. La mayoría de los índices de fibrosis se basan en modelos matemáticos que combinan marcadores serológicos, directos, indirectos y datos clínicos (Pons, 2009; Obika y cols., 2012). En la tabla 4 se resumen los métodos predictivos de fibrosis que más se han utilizado en el análisis de series de pacientes con enfermedad de HGA.

MÉTODO	PARÁMETROS EVALUADOS
<b>BAAT</b>	Edad, IMC, triglicéridos, ALT,
<b>NAFLD</b>	Edad, hiperglicemia, IMC, recuento plaquetario, albúmina, relación AST/ALT
<b>European liver fibrosis score (ELF)</b>	Edad, ácido hialurónico, péptido PIIIP del colágeno, inhibidor tisular de la metaloproteínasa I
<b>Fibrometer</b>	Edad, peso, recuento de plaquetas, ferritina, glucosa, AST, ALT
<b>Fibrotest</b>	$\alpha 2$ macroglobulina, GGT, apolipoproteína A1, haptoglobina, bilirrubina total, edad, género
<b>NS</b>	Colágeno tipo 4, ácido hialurónico

**Tabla 4.** Índices para la evaluación de fibrosis en hígado graso. Tomado de “Non-invasive diagnosis of steatosis and fibrosis” (Castera, 2008).

La mayor dificultad a la hora de elegir técnicas no invasivas para el diagnóstico de EHNA radica en que la mayoría de los estudios se han realizado en poblaciones pequeñas con sistemas heterogéneos de graduación para la fibrosis y utilización de diversos puntos de corte para los ensayos, situaciones que dificultan la comparación de los métodos. Debido a esto es necesario realizar muchos más estudios antes de poder llegar a una conclusión definitiva (Castera 2008; Pons 2009).

## **2.7 Tratamiento**

A pesar de los notables avances en el conocimiento de la EHNA, no existe un tratamiento definido para la misma.

En la actualidad el tratamiento involucra diferentes aspectos entre los que se encuentran: (1) aplicación de medidas generales como evitar el consumo de bebidas alcohólicas o el uso de fármacos potencialmente hepatotóxicos; (2) tratamiento adecuado de las enfermedades asociadas como sobrepeso, obesidad, diabetes, hiperlipemia, hipertensión y/o hiperuricemia; (3) tratamiento etiológico basado en el conocimiento actual de la patogenia de la enfermedad; (4) trasplante hepático (McClain y cols., 2004; Carrillo y cols., 2011).

El tipo de tratamiento y la agresividad del mismo dependen de la severidad de la lesión hepática y de las condiciones comórbidas asociadas. Por ejemplo, pacientes con cirrosis descompensada pueden requerir trasplante hepático para prevenir la muerte, mientras que pacientes con simple esteatosis pueden precisar únicamente modificaciones en su estilo de vida debido a que tienen un bajo riesgo de progresión.

A continuación se revisa de manera breve las medidas terapéuticas más utilizadas.

### **2.7.1 Tratamiento del sobrepeso y la obesidad**

Diversos estudios asocian la disminución de peso con mejoría en la bioquímica hepática y en los cambios necroinflamatorios y fibróticos propios de la esteatohepatitis (Huang y cols., 2005; Petersen y cols., 2005; Suzuki y cols., 2005). Además, se ha demostrado que la reducción gradual de peso disminuye los niveles circulantes de insulina y mejora la calidad de vida (Peterson y cols., 2005). Sin embargo, se deben

evitar las reducciones rápidas ya que se movilizan grandes cantidades de ácidos grasos que empeoran más la esteatosis hepática. Por lo tanto, se considera adecuado perder de manera progresiva entre un 5% y 10% de peso al mes, con una proporción de 500 g a 1,5 Kg por semana (Comar y Sterling, 2006, Di mauro y cols., 2009). La pérdida de peso se puede alcanzar con dieta, ejercicio o cirugía.

Dentro de las recomendaciones dietarias se encuentran disminuir la ingesta de dietas ricas en grasa saturada, colesterol y fructosa e incrementar el consumo de fibra; vitaminas E y C; aceites de oliva, canola y alazor; ácidos grasos poli-insaturados como los omega 3 y proteína de soya (Soto y cols., 2005; Capanni y cols., 2006; Larter y cols., 2008<sup>a</sup>; Ouyang y cols., 2008, Torre-Villavalzo y cols., 2008; Omagari y cols., 2010). Los programas combinados de dieta y ejercicio aeróbico moderado han logrado una disminución importante de las concentraciones de aminotransferasas en sujetos con EHNA, pero por desgracia, no en el grado de fibrosis hepática (Sasaki y cols., 2003; Hickman y cols., 2004; Suzuki y cols., 2005).

El tratamiento farmacológico se considera indicado en los pacientes con un IMC>30, o >27 si hay comorbilidad asociada (Ramesh y Sanyal, 2005). Los fármacos con los que se han obtenido mejores resultados en pacientes con EHNA son el *orlistat*, la *sibutramina* y la *simvastatina* (Hatzitolios y cols., 2004; Assy y cols., 2007; Harrison y cols., 2009; Abel y cols., 2009).

Una alternativa para la pérdida de peso con tratamiento médico es el tratamiento quirúrgico. Diversas investigaciones demuestran que la cirugía de la obesidad puede llevar a la mejoría de la EHNA (Luycks y cols., 1998b; Sjostrom y cols., 2004; Liu y cols., 2007; Furuya y cols., 2007). A pesar de estas evidencias, las limitaciones de los estudios clínicos desarrollados hasta el momento impiden dar una conclusión imparcial y definitiva sobre los beneficios y desventajas de la cirugía bariátrica en el tratamiento de la EHNA (Chavez-Tapia y cols., 2010).

### **2.7.2 Medidas farmacológicas**

Dentro de los fármacos ensayados para el tratamiento de la EHNA se encuentran aquellos que incrementan la sensibilidad a la insulina como las tiazolidindionas, la metformina y los inhibidores de las serina/treonina quinasas (IKK) (Bugianesi y cols., 2005; Buckingham y cols., 2005; Belfort y cols., 2006; Lutchman y cols., 2007; Younossi, 2008; Yki-Järvinen, 2009; Shyangdan y cols., 2011), agentes hipolipemiantes como gemfibrozilo, clofibrato, bezafibrato, probucol, y atorvastatina (Merat y cols., 2003; Nagasawa y cols., 2006; Tokushige y cols., 2007; Matafome y cols., 2009; Nakamuta y cols., 2010), fármacos hepatoprotectores y antioxidantes como el ácido ursodeoxicólico (AUDC), la vitamina E, la betaína y la similarina (Hasegawa y cols., 2001; Lindor y cols., 2004; Comar y cols., 2006; Abdelmalek y cols., 2006; Balmer y cols., 2009; Lavine y cols., 2010; Carrillo y cols. 2011), inhibidores del receptor de la angiotensina II (Yokohama y cols., 2006; Wei y cols., 2008; Yoshiji y cols., 2009), antibióticos como el metronidazol y la neomicina (Gustot y cols., 2006; Younossi, 2008) y agentes probióticos (Lirussi y cols., 2007; Cani y Delzene., 2009; Gratz y cols., 2010).

### **2.7.3 Trasplante Hepático**

Está indicado en casos en que la EHNA ha evolucionado a cirrosis con hipertensión portal e insuficiencia hepática. Aunque la evolución del trasplante suele ser buena, la EHNA puede recidivar tras el trasplante. Las causas de esta recurrencia se desconocen aunque probablemente son múltiples, incluyendo la hipertrigliceridemia, la obesidad, la diabetes y la terapia corticoidea. La utilización de un hígado con elevada esteatosis suele ser una contraindicación para el trasplante debido a la alta incidencia de rechazo agudo (García-Monzón, 2001; Selzner y cols., 2001; Saab y cols, 2005; Dumotier y cols., 2010; Ong y Younossi, 2010; Carrillo y cols., 2011).

## **2.8 Modelos animales de EHNA**

La literatura refleja diferentes modelos de animales que exhiben evidencias histológicas de esteatosis y EHNA. Sin embargo, pocos desarrollan la totalidad de cambios correspondientes al fenotipo de la enfermedad en humanos. Los principales enfoques de EHNA a través de modelos animales pueden dividirse en 2 grandes grupos: aquellos que tienen un fenotipo adquirido para EHNA (modelos nutricionales y

modelos farmacológicos) y aquellos originados por una mutación genética espontánea o adquirida (modelos genéticos) (Anstee y cols., 2006; Almonacid y cols., 2012). Debido a que en la presente investigación se indujo EHNA mediante la administración de una dieta deficiente en metionina y colina (MCD) a ratones C57BL/6J, a continuación se revisará brevemente este modelo nutricional.

### **2.8.1 Deficiencia en metionina y colina (MCD) como modelo nutricional de EHNA**

Este es el clásico modelo nutricional de EHNA. La dieta MCD contiene sacarosa y grasa en proporciones de 40% y 10% respectivamente, pero carece de metionina y colina, dos compuestos esenciales para la  $\beta$  oxidación y la producción de lipoproteínas de baja densidad (VLDL) a nivel hepático (Anstee y cols., 2006). 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, pero la relación peso del hígado/peso corporal no se incrementa (Kirsch y cols., 2006; Hebbard y cols., 2011).

La dieta MCD induce rápidamente esteatohepatitis en roedores. Los análisis histológicos muestran que estos animales 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 polimorfos nucleares neutrófilos (Kirsch y cols., 2006; Hebbard y cols., 2011).

El contexto metabólico para el modelo MCD se caracteriza por el incremento en los niveles séricos de ALT y ALP, con una paralela reducción en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol (Gyamfi y cols., 2008; Fisher y cols., 2009; Hebbard y cols., 2011). Este último hallazgo es contrario a lo observado en individuos obesos y con sobrepeso diagnosticados con HGNA (Bhat y cols., 2012; Sun y cols., 2012). Otras de las características de este modelo son el incremento en la lipoperoxidación hepática que se observa aproximadamente a las 3 semanas, como consecuencia de la sobre-estimulación de los citocromos P450 (CYP) 2E1, CYP4A10 y CYP4A14, y la disminución de las concentraciones basales de glucosa, con incremento en la sensibilidad sistémica a la insulina. En este modelo no se observa resistencia periférica a la insulina, debido probablemente, a la reducción en el peso

corporal asociada con la dieta (Collins y cols., 2004; 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 EHNA. 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 los niveles sericos de ALT y el estrés oxidativo se presenta tempranamente (2ª 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 EHNA humana (Kirsch y cols., 2006; London y cols., 2007).

Los principales mecanismos patológicos indicados para este modelo son: (1) disfunción de la síntesis de la fosfatidilcolina, que conlleva a la disminución en el ensamblaje y secreción de las VLDL, y por lo tanto, a la reducción en el aclaramiento de los triglicéridos (Anstee y cols., 2006; Fan y cols., 2010); (2) incremento en la inflamación hepática debido al incremento en la producción de moléculas proinflamatorias y profibróticas tales como la IL-6, el TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  y moléculas de adhesión como, la molécula intercelular de adhesión (ICAM)-1, la molécula de adhesión vascular (VCAM)-1, y la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP)-1 (Ip y cols., 2004; Yu y cols., 2006); (3) incremento en el potencial de estrés oxidativo. La dieta MCD induce la producción de EROS y reduce los niveles de antioxidantes hepáticos como el glutatión (GSH) y la S-adenosil metionina (SAME) (Oz y cols., 2006; Baumgardner y cols., 2008); (4) activación del 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., 2005; Sundaresan y cols., 2011); y (5) recientes estudios han demostrado que este modelo causa una significativa reducción en los niveles 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).

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 EHNA, no replica la totalidad de la patogénesis de la misma en humanos. En contraste con el HGNA, los animales alimentados con la dieta MCD son caquéticos, tienen bajos niveles de triglicéridos plasmáticos, reducen la relación peso del hígado/peso corporal, exhiben niveles de ALT mucho mayores que los que se han observado en pacientes con EHNA 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, los niveles de insulina, leptina y glucosa son reducidos, la adiponectina sérica no está disminuida y los animales tienen sensibilidad periférica a la insulina (Nagasawa y cols., 2006; Larter y Yeh, 2008b; Hebbard y cols., 2011; Sundaresan y cols., 2011).

## 2.9 Receptores hepáticos X (LXRs)

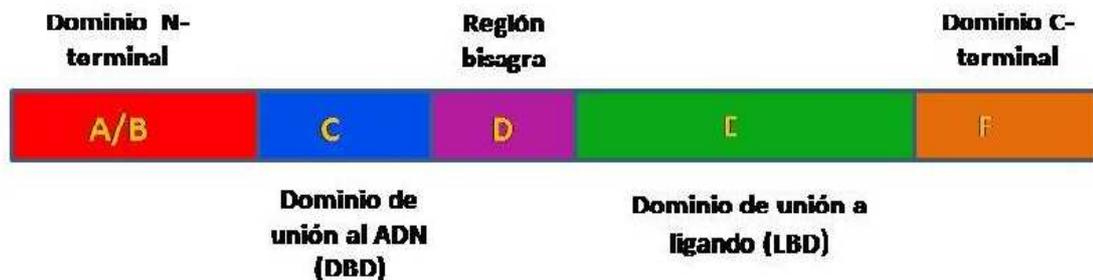
Los receptores hepáticos X (LXRs) pertenecen a una gran familia de receptores nucleares que se unen a la región reguladora de genes de destino, estimulando su transcripción (Wójcicka y cols., 2007; Oosterver y cols., 2010). Fueron identificados en 1994 por Apfel y colaboradores a partir del screening de una biblioteca de cDNA de hígado de rata (Apfel y cols., 1994), e inicialmente fueron clasificados como “receptores huérfanos” debido a que para la mayoría de ellos no existía claridad en cuanto a sus ligandos endógenos, genes diana ni funciones fisiológicas (Chawla y cols., 2001). Sin embargo, en los siguientes años varios ligandos fisiológicos han “adoptado” estos receptores (Baranowski, 2008). También se les conoce como “receptores nucleares heterodiméricos (RNH)”, debido a que funcionan predominantemente como heterodímeros del receptor retinoide X (RXR) (Cortés y cols., 2005).

En los mamíferos, el receptor LXR existe como dos isoformas funcionales: LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ . LXR $\alpha$  se expresa mayoritariamente en el hígado y en menor medida en el intestino, tejido adiposo, riñón, bazo, glándulas adrenales y macrófagos. Por el contrario, LXR $\beta$  se expresa en casi todos los tejidos del organismo. Pese a su similitud, se piensa que ambas isoformas estarían involucradas en procesos biológicos distintos, aunque posiblemente relacionados (Wójcicka y cols., 2007; Beltowski 2008; Baranowski, 2008; Viennois y cols., 2012).

### 2.9.1 Estructura

Como miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, los LXR<sub>s</sub> están conformados por 4 dominios (Figura 2):

1. Extremo N-terminal (dominio A/B). Contiene un activador de función- ligando independiente (AF-1) que puede estimular la transcripción en ausencia de un ligando.
2. Dominio de unión al ADN (DBD). En presencia de átomos de zinc forma unas proyecciones en forma de dedos que permiten la unión a secuencias específicas del ADN.
3. Región bisagra. Es una región estructural que muestra una gran flexibilidad, y conecta a los dominios DBD y LBD. Permite el reclutamiento de co-represores en ausencia de ligandos.
4. Dominio hidrofóbico de unión al ligando (LBD). Se requiere para la unión del ligando y la dimerización del receptor. Es capaz de unir coactivadores y represores y funciona como dominio activación 2 (AF2), que estimula la transcripción en respuesta a la unión del ligando.
5. Extremo C-terminal (Wójcicka y cols., 2007; Viennois y cols., 2012).



**Figura 2.** Organización estructural de los receptores nucleares.

En ratones, las isoformas LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  están altamente conservadas, compartiendo entre el 76 y el 78% de secuencias de aminoácidos homólogas en sus regiones DBD y LBD, respectivamente. Las isoformas LXRs de humanos y murinos presentan también una alta homología en sus regiones DBD (95%) y LBD (97%), característica esta que facilita la investigación en este tipo de modelos (Lee y cols., 2008).

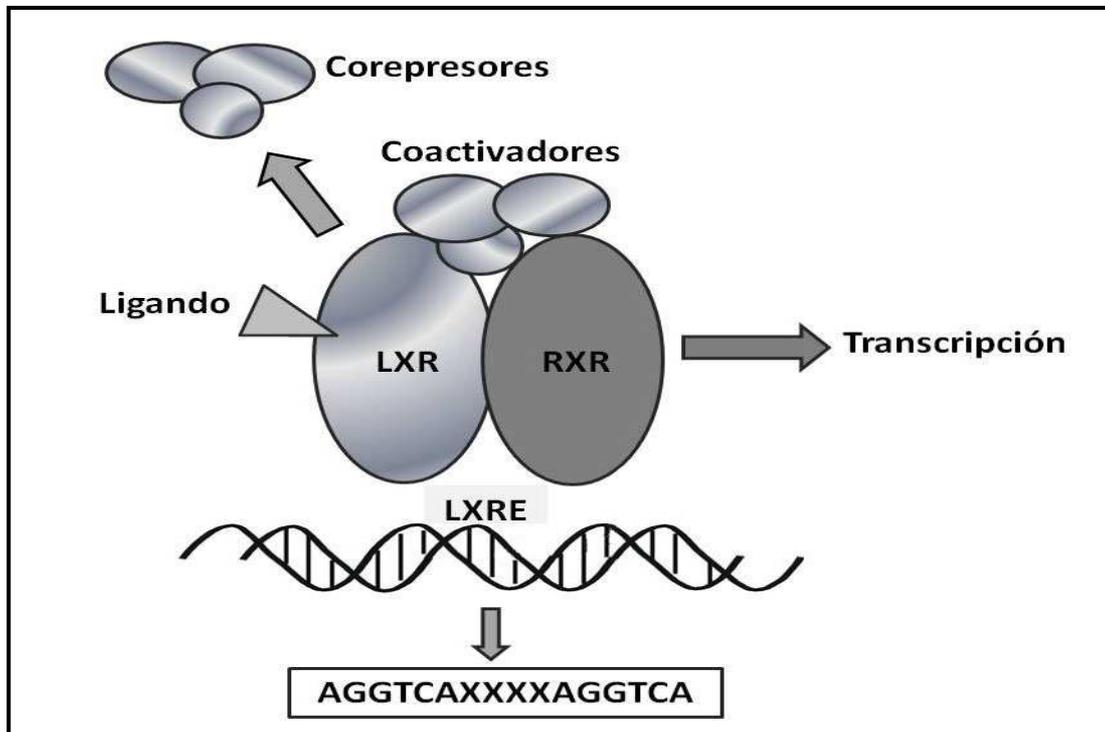
### 2.9.2 Mecanismo de acción

En la Figura 3 se resume el mecanismo de acción de los receptores LXR, quienes requieren la presencia de coactivadores y co-represores para regular la expresión génica. Como paso previo a la unión a sus elementos de respuesta, los receptores LXRs forman heterodímeros obligados con el receptor X retinoide (RXR). En esta conformación el LXR $\alpha$  funciona como un factor activador del AMPc, mientras que el LXR $\beta$  parece ser inversamente afectado por el cAMP (Viennois y cols., 2012). Este heterodímero (LXR/RXR), es activado por un agonista de LXR (oxiesteroles) o un agonista del ácido 9-cis-retinoico. Los oxiesteroles, los derivados oxigenados del colesterol, tales como 22 (R)-hidroxicolesterol, 24 (S)-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol, y ácido colestenoico, son los ligandos naturales para LXR (Wójcicka y cols., 2007; Beltowski, 2008).

Una vez activo, el complejo LXR/RXR se une a elementos de respuesta (LXREs) en las regiones promotoras de los genes diana. Los LXREs están constituidos por dos secuencias de hexanucleótidos (AGGTCA) separadas por 4 o 1 nucleótidos (DR-4 o DR1). En ausencia de ligando, el heterodímero interactúa con varios cofactores, entre los que se encuentran el co-represor del receptor nuclear (N-CoR) y el receptor SMRT (mediador de los receptores de la hormona tiroidea y retinoides), que bloquean la transcripción al unirse con la histona deacetilasa a través de la interacción con proteínas tales como la MAP quinasa que a su vez interactúa con la proteína 3A (Viennois y cols., 2012). Otros represores de la actividad de los LXRs son la proteína heterodimérica pequeña (SHP), quien puede interactuar con sus dos isoformas en ausencia o presencia de ligando y el factor  $\alpha$  semejante al efector A (CIDEA) que reprime a los LXRs en células 3T3-L1 (Laurencikiene y Rydén, 2012).

Cuando el ligando se une al heterodímero, se producen cambios conformacionales que inducen la liberación de los co-represores, el acople de

activadores específicos tales como el cointegrador activador de la señal 2 (ASC-2) sobre el dominio AF-2 y la interacción con la histona acetiltransferasa, que conducen a la transcripción de los genes diana (Julve, 2003; Wójcicka y cols., 2007; Baranowski, 2008; Viennois y cols., 2012).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los receptores LXR. Modificada de “Biological role of liver X receptors” (Baranowski, 2008).

### 2.9.3 Efectos metabólicos

Los receptores LXR desempeñan un papel importante en el metabolismo de colesterol, lípidos y carbohidratos.

#### 2.9.3.1 LXR y metabolismo del colesterol

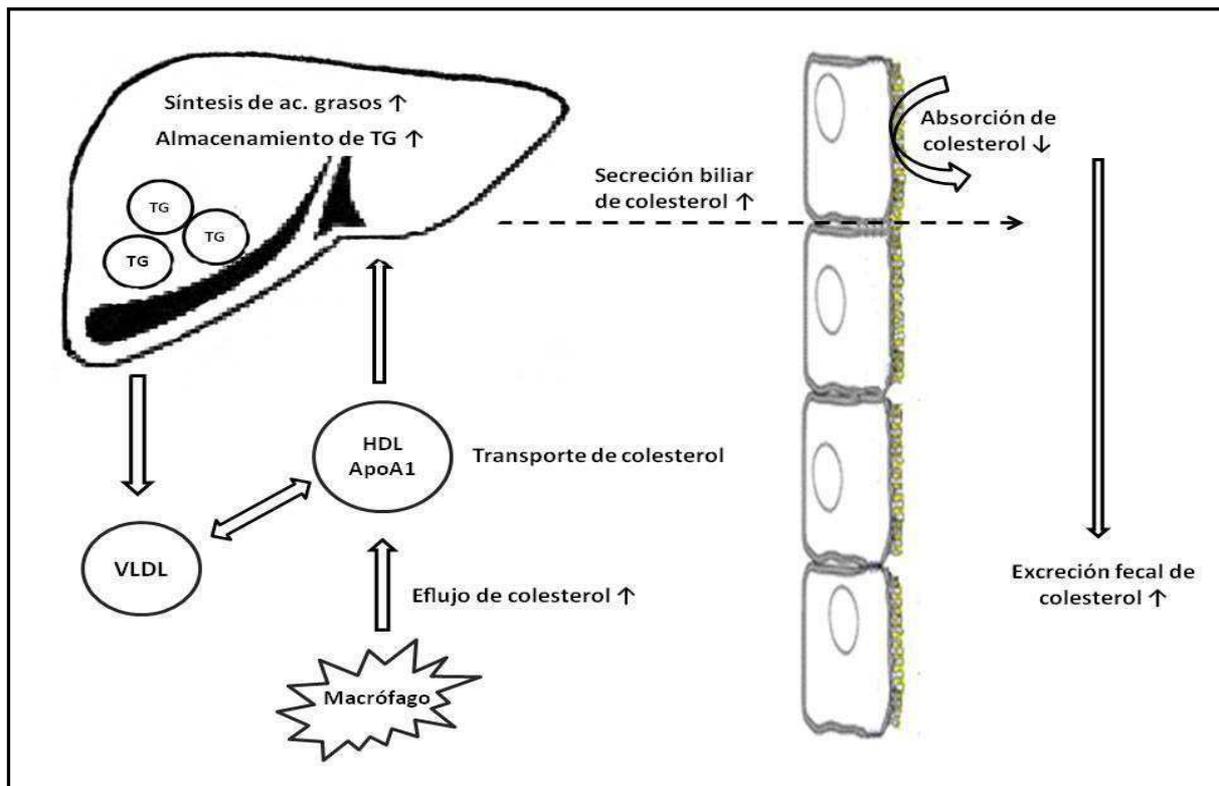
Los receptores LXR funcionan como sensores del exceso de colesterol que, con el fin de proteger las células de una sobrecarga del mismo, desencadenan varios mecanismos fisiológicos de adaptación. Dentro de ellos se encuentran: (1) regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de HDL. Su activación resulta en mayor expresión de los genes ABCA1 y ABCG1/ABCG4, facilitando la salida de colesterol hacia las partículas de HDL. Los transportadores ABCA1 y ABCG1 son abundantes en los macrófagos, pero también se expresan en otro tipo de células como

hepatocitos, enterocitos, adipocitos y células del músculo esquelético (Cortés y cols., 2005; Wójcicka y cols., 2007; Beltowski, 2008; Viennois y cols., 2012); (2) incrementan la expresión de apolipoproteína E, un componente de las HDL que facilita el eflujo de colesterol celular, y estimulan la apoA-I en la membrana basolateral de los enterocitos, mejorando la formación de las HDL intestinales (Cortés y cols., 2005; Beltowski, 2008); (3) incrementan los niveles plasmáticos de la enzima de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), que cataliza el movimiento de colesterol desde las HDL hacia otras lipoproteínas. Estos procesos en conjunto se denominan transporte reverso del colesterol; (4) inducen la conversión de colesterol en ácidos biliares vía estimulación del gen que codifica la 7-alfa-hidroxilasa (CYP7A1), así como la excreción biliar del colesterol como resultado de una mayor expresión de los transportadores ABCG5 y ABCG8 en la membrana canalicular del hepatocito; (5) aumentan la expresión de los transportadores ABCG5 y ABCG8 en la superficie apical del enterocito y disminuyen la de la proteína NPC1L1, aminorando la absorción intestinal de esteroides. Como resultado de las acciones 4 y 5 se excreta una mayor cantidad de esteroides en las heces y se obtiene un balance negativo del colesterol en el organismo; (6) disminuyen la expresión de genes hepáticos de enzimas involucradas en el metabolismo del colesterol como hidroximetilglutaril-CoA-sintetasa, farnesil difosfato sintetasa y escualeno sintetasa, reduciendo en consecuencia la síntesis de colesterol. Sin embargo, la estimulación del eflujo de colesterol por los LXRs puede causar una estimulación compensatoria de su síntesis en ciertos tipos de células (Figura 4) (Cortés y cols., 2005; Wójcicka y cols., 2007; Beltowski, 2008; Oosterveer y cols., 2010).

### 2.9.3.2 LXRs y metabolismo de lípidos

A pesar de los efectos antiateroscleróticos que los LXRs manifiestan al disminuir las concentraciones séricas de colesterol total e incrementar las de cHDL, diversos estudios corroboran que inducen hipertrigliceridemia, por una aparente mayor lipogénesis hepática. Dentro de los mecanismos implicados en los efectos lipogénicos de los LXRs se encuentran los siguientes: (1) activan la síntesis de la enzima uridina fosforilasa y de su producto la  $\beta$ -alanina, que sirve como precursor para la síntesis de ácidos grasos; (2) regulan de forma directa la actividad de varias enzimas lipogénicas que incluyen acetil CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintetasa (FAS) y esteroil-CoA-desaturasa 1 (SCD-1); (3) estimulan la transcripción de los factores lipogénicos SREBP-1c y ChREBP. Este último promueve la conversión del exceso de glucosa a

lípidos; (4) incrementan la expresión del gen de la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP), que media el transporte de fosfolípidos de las VLDL a las HDL; (5) reducen los receptores hepáticos R1 de adiponectina, hormona que disminuye la lipogénesis hepática y previene la estosis a ese nivel; (6) inducen la expresión del gen que codifica la lipoprotein lipasa (LPL), enzima que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos y es esencial para el metabolismo de las lipoproteínas ricas en ellos (Figura 4) (Wójcicka y cols., 2007; Korach-André y cols., 2011; Oosterver y cols., 2011).

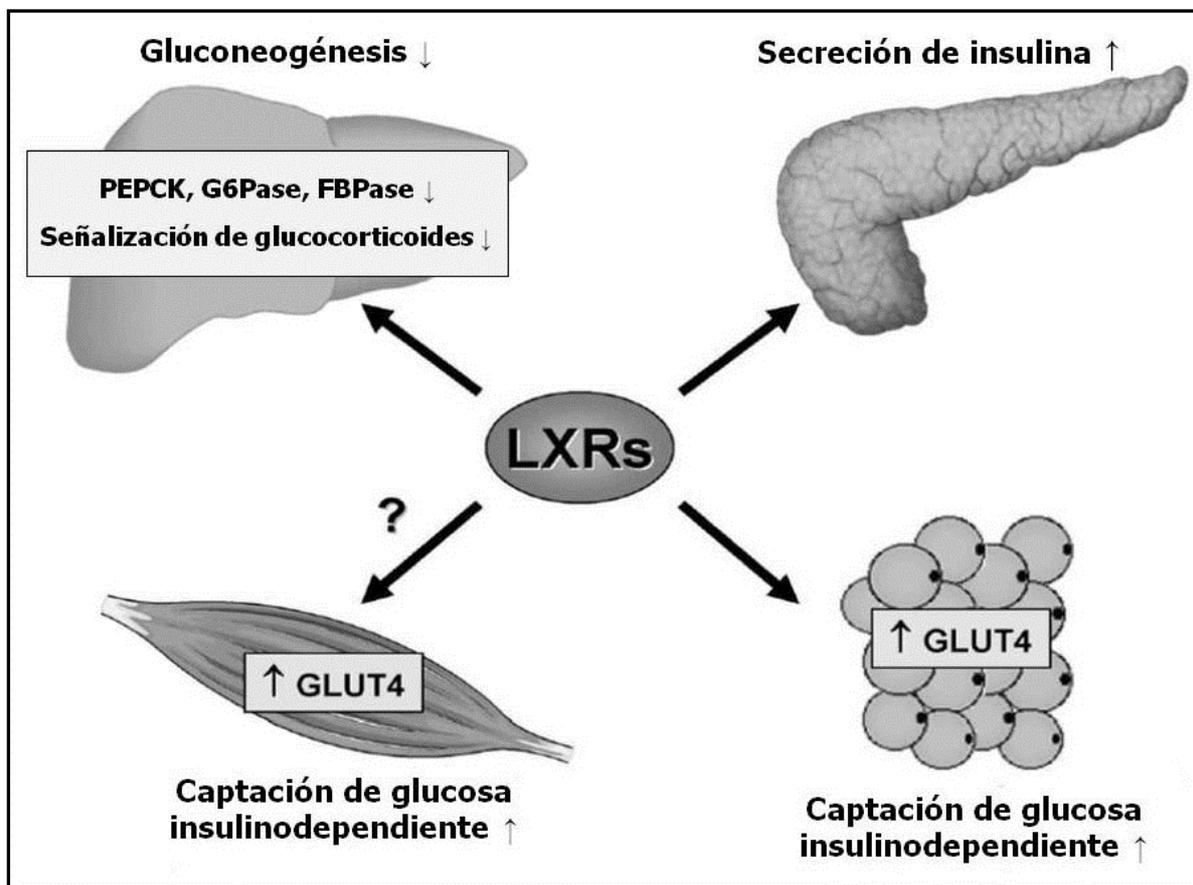


**Figura 4.** Acción de los LXR sobre el metabolismo de lípidos y colesterol. Modificada de "The liver X receptor: Control of cellular homeostasis and beyond implications for drug desing" (Oosterver y cols., 2010).

### 2.9.3.3 LXR y metabolismo de carbohidratos

Dentro de las acciones que tienen los receptores LXR en el metabolismo de los carbohidratos se encuentran las siguientes (Figura 5): (1) reducen las concentraciones plasmáticas de glucosa e incrementan la sensibilidad a la insulina en diferentes modelos animales de diabetes y resistencia a la insulina (Cao y cols., 2003; Grefhorst y cols., 2005; Loeffler y cols., 2007; Zhao y cols., 2012a); (2) reducen la expresión de varias enzimas involucradas en la gluconeogénesis hepática y en la liberación de la glucosa a partir del hígado. Entre ellas se encuentran la piruvato

carboxilasa, la fosfoenol piruvato carboxiquinasa, la fructosa-1,6-bifosfato y la glucosa-6-fosfatasa (Stulnig y cols., 2002; Cao y cols., 2003; Laffitte y cols., 2003a; Grempler y cols., 2005); (3) incrementan la captación de glucosa por los adipocitos, mediante la estimulación de la expresión basal de los transportadores GLUT-1 y GLUT-4 (Dalen y cols., 2003; Steffensen y cols., 2004; Griesel y cols., 2010; Oosterver y cols., 2010). Así mismo incrementan la síntesis de glucógeno en los adipocitos (Steffensen y cols., 2004) (4) a nivel de diferentes tejidos inhiben enzimas glicolíticas como la 6-fosfofructo-2-quinasa y 6-fosfofructo-1-quinasa (Steffensen y cols., 2004), e incrementan la expresión y actividad de la piruvato deshidrogenasa quinasa 4, un regulador negativo de la glucólisis (Steffensen y cols., 2004; Baranowski 2008; Oosterver y cols., 2010).



**Figura 5.** Mecanismos implicados en la acción antidiabética de los LXR. Modificada de "Biological role of liver X receptors" (Baranowski, 2008).

## 2.9.4 Agonistas de los LXR

### 2.9.4.1 Agonistas endógenos

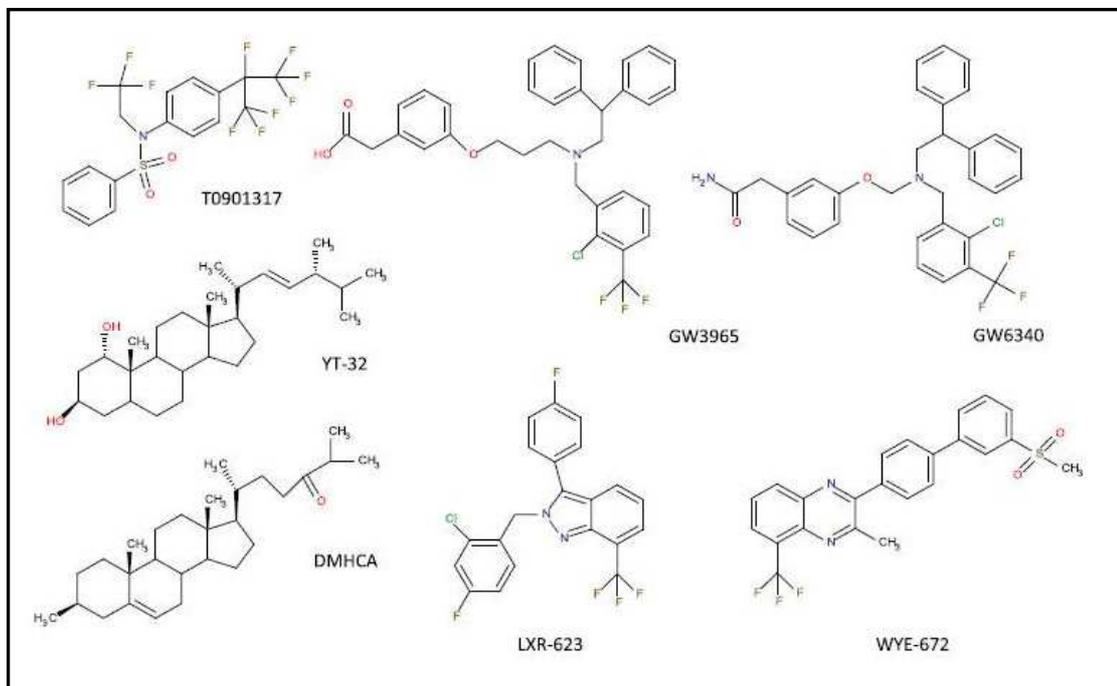
Los receptores LXRs pueden ser activados por oxisteroles intermediarios de la síntesis de colesterol o de hormonas esteroideas, o por hidroxisteroles formados a partir del colesterol por la enzima esteroide hidroxilasa; muchos de ellos son isoformas del citocromo P450. A este grupo pertenecen el 24(S)-hidroxicolesterol (cerebro), 22(R)-hidroxicolesterol (tejidos esteroideos), 24(S)-25-epoxicolesterol (hígado), 27-hidroxicolesterol (plasma y macrófagos), 20(S)hidroxicolesterol y 17  $\alpha$ -hidroxicolesterol (Beltowski, 2008; Viennois y cols., 2012). Diversos estudios muestran que la posición específica de la monooxidación de la cadena lateral del esteroide es un requisito para la afinidad por el sustrato y la activación de los LXRs. Esta capacidad de enlace y activación puede mejorarse mediante el uso de 24-oxoligandos que actúan como aceptores de hidrógeno en la cadena lateral. Además, la introducción de un oxígeno en el anillo B del esteroide resulta en un ligando con selectividad de LXR $\alpha$  (Chen y cols., 2007; Fradera y cols., 2010). Azúcares como la D-gluosa y D-glucosa-6-fosfato también han demostrado ser ligandos fisiológicos de las dos isoformas de los LXRs (Zhu y cols., 2009).

Los esteroides de origen vegetal pueden actuar como ligandos endógenos de los LXRs. Las células de las plantas no sintetizan colesterol, pero sí otros esteroides con estructuras químicas similares tales como sitoesterol, sigmasterol, estigmasterol, campesterol, brasicasterol y ergosterol. Estas moléculas son pobremente absorbidas en el intestino e inhiben la absorción del colesterol al desplazarlo de las micelas biliares (Patel y cols. 2006). Yang y colaboradores demostraron que el estigmasterol es un potente ligando de los LXRs (Yang y cols., 2004). Así mismo, Plat y cols, observaron que tanto el sitoesterol como el campesterol estimulan LXRs en cultivos de células intestinales (Plat y cols., 2005).

### 2.9.4.2 Agonistas sintéticos

El descubrimiento del potencial hipocolesterolémico de los LXRs a finales de los noventa, motivó a muchas compañías farmacológicas a desarrollar ligandos de estos receptores (Figura 6). Dentro de los más utilizados en investigación se encuentran los compuestos T0901317 y GW3965, que activan las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de estos receptores. Sin embargo, GW3965 tiene más afinidad para LXR $\beta$ , sin

manifestarse diferencias suficientes para distinguir entre las dos isoformas en estudios experimentales (Beltowski, 2008), y T0901317 no es completamente selectivo para LXR ya que es capaz de activar PXR o FXR en altas concentraciones (Shenoy y cols., 2004; Mitro y cols., 2007).



**Figura 6.** Agonistas sintéticos de LXRs. Tomado de "Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? (Viennois y cols., 2012).

La investigación en modelos animales y celulares ha permitido establecer funciones de los receptores LXRs como actividad antiinflamatoria, regulación de la respuesta inmune específica e inespecífica, regulación de la contracción uterina, funciones neurológicas y reducción de las lesiones ateroscleróticas (Jamroz-Wiśniewska y cols., 2007; Reschly y cols., 2008), que han conducido a que sus agonistas sean considerados como potenciales agentes terapéuticos para diversas patologías. Dentro de ellas se encuentran las siguientes: afecciones de la piel como fotoenvejecimiento (Chang y cols., 2008) y dermatitis atópica (Hatano y cols., 2010), artritis reumatoide (Park y cols., 2010), aterosclerosis (Zhu y cols., 2009; Lo Sasso y cols., 2010; Giannarelli y cols., 2012), cáncer de colon (Uno y cols., 2009; Chuu, 2011), cáncer de mama (Gong y cols., 2007; Vedin y cols., 2009), cáncer de ovario (Rough y cols., 2010), cáncer de próstata (Fukuchi y cols., 2004; Pommier y cols., 2010), diabetes (Cao y cols., 2003; Kase y cols., 2005; Oosterver y cols., 2010; Ketterer y cols., 2011), dislipidemias (Miao y cols., 2004; Brunham y cols., 2006;

Quinet y cols., 2006), enfermedad de Alzheimer (Fitz y cols., 2010; Leoni y cols., 2011).

Debido a que en esta investigación se estudió el efecto del agonista GW3965 en ratones afectados de EHNA, a continuación se presenta una breve revisión sobre él.

#### 2.9.4.3 GW3965

El clorhidrato del ácido 3-[3-N-(2-cloro-3-trifluorometilbenzil)-2,2difeniletil)amino]propiloxy]fenil acético, más conocido como GW3965 (Figura 6), es un derivado de una amina terciaria identificado por GlaxoSmithKline a partir del screening de compuestos de alto rendimiento, mediante un ensayo de detección de ligando libre de células (LISA) (Collins y cols., 2002). Algunas de sus características relevantes se presentan en la Tabla 5.

<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>33</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub> ClF <sub>3</sub> .HCl
<b>Peso molecular</b>	618,51 gramos
<b>Solubilidad a 25°C</b>	DMSO ≥ 124 mg/mL
	Agua < 1 mg/mL
	Etanol ≥ 7 mg/mL
<b>EC<sub>50</sub></b>	260 nM
<b>XLogP3-AA</b>	5,9
<b>Enlaces donadores de H<sup>+</sup></b>	1
<b>Enlaces aceptores de H<sup>+</sup></b>	7
<b>Superficie polar topológica</b>	49,8

**Tabla 5.** Características del agonista GW3865.

Estudios en modelos animales y celulares señalan que el GW3965 desempeña un papel importante en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. La administración de 0,7 mg/kg de GW3965 a ratones wild type por un periodo de 9 días, incrementó la expresión de ABCA1 y de otros genes diana de los LXRs en el intestino de los ratones, sin cambios en la expresión hepática de los mismos. Como resultado se elevaron significativamente los niveles plasmáticos de cHDL, sin cambio en las concentraciones de triglicéridos. Un similar incremento de cHDL se observó en ratones con carencia del gen ABCA1 hepático (Brunham y cols., 2006) y en células HepG2 de hepatoma

humano (Di y cols., 2012). Por el contrario, el tratamiento con GW3965 no incrementó las concentraciones de cHDL en hamsters y monos cangrejeros (*Mono cynomolgus*). En ambas especies se produjo un desfavorable incremento en las concentraciones de cLDL (Groot y cols., 2005).

En adipocitos humanos, el agonista GW3965 incrementa la lipólisis basal y afecta la expresión y funcionalidad de varias de sus proteínas reguladoras. En un estudio realizado por Stenson y cols., los resultados demostraron que el tratamiento con GW3965 disminuye la expresión de las proteínas lipolíticas LSH, PLIN1, CIDEA y CG1-58, no afecta la expresión de PPAR $\gamma$  y sus genes diana aP2, ACS y S3-12 incrementa la expresión de los transportadores de colesterol ABCG1 y ABCA1 y eleva las concentraciones de glicerol en los cultivos celulares. A pesar de que este incremento es dosis dependiente, a dosis alta de GW3965 (>1  $\mu$ M) se observan efectos tóxicos (Stenson y cols., 2011). De igual manera, en hepatocitos humanos el GW3965 inhibe el mRNA y la expresión de las interleuquinas IL-1 $\beta$  e IL-6. Esta acción es mediada en parte, por la inhibición del aclaramiento del correpressor nuclear 1 (NCoR), promotor que previene la activación del mecanismo de activación/represión de la transcripción. De esta forma mantiene el gen de la proteína C reactiva (CRP por sus siglas en inglés) en un estado reprimido (Blaschke y cols., 2006).

La administración de GW3965 a ratones obesos ob/ob por un período de 10 días, disminuyó las concentraciones plasmáticas de glucosa sin afectar la producción de glucosa hepática, incrementó los niveles de mRNA de GLUT4 en el adipocito y mejoró notablemente la sensibilidad a la insulina, a pesar de la marcada esteatosis (Grefhorst y cols., 2005). Así mismo, en un modelo dietario de obesidad y resistencia a la insulina, ratones C57BL/6 tratados con GW3965 mejoraron la tolerancia a la glucosa. Los análisis de expresión génica en estos animales mostraron inhibición de la gluconeogénesis hepática con represión de los genes para las enzimas fosfoenol piruvato carboxiquinasa y glucosa-6-fosfatasa, e incremento en la expresión de glucoquinasa que promueve la utilización de la glucosa a nivel hepático (Laffitte y cols., 2003a). Nader y cols., estudiaron los efectos de la administración de GW3965 a roedores, después de realizarles la prueba de supresión de ACTH con dexametasona. En ratas Sprague-Dawley la activación de LXRs con GW3965, atenuó el incremento en los niveles de glucosa post supresión con dexametasona. Por el contrario, en ratas,

ratones y células HepG2 se indujo la expresión de la glucosa-6-fosfatasa hepática (Nader y cols., 2012).

Tomando como base las características y actividad de GW3965, se ha contemplado su utilización en el tratamiento de diversas patologías. Sironi y cols., demostraron que la activación de los LXRs con una simple dosis de GW3965 bloquea la isquemia cerebral en un modelo de rata, dos horas después de haberla inducido (Sironi y cols. 2008). En otro estudio se observó que mejora las lesiones posteriores a oclusión isquémica cerebral en ratas. Esta neuroprotección está correlacionada con una disminución de los factores proinflamatorios en el cerebro (Morales y Arrese, 2008). Así mismo, se ha probado que la terapia con GW3965 reduce significativamente la incidencia de artritis, atenua la severidad clínica e histológica en artritis inducida por colágeno, aminora la producción de mediadores inflamatorios en articulaciones, reduce los niveles sericos de citoquinas proinflamatorias (Park y cols., 2010), disminuye el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en arterias de ratones apoE<sup>-/-</sup> y LDL-R<sup>-/-</sup>, sin incremento concomitante en los triglicéridos plasmáticos (Joseph y cols., 2002a; Yan y cols., 2010), reduce la hipertensión arterial al disminuir la expresión del receptor de angiotensina II (Leick y cols., 2007), estimula la secreción y expresión de insulina por los islotes pancreáticos (Ogihara y cols., 2010), y en ellos mismos, reduce la expresión del mRNA y los niveles de citoquinas proinflamatorias (Scholz y cols., 2009). También se ha comprobado que su aplicación tópica acelera la acidificación del estrato córneo (SC) de ratas neonatales, a través del incremento de la actividad de la fosfolipasa A2 secretora (sPLA<sub>2</sub>), y corrige las anomalías en la permeabilidad, integridad y cohesión del SC. Por lo tanto, podría utilizarse en la prevención y/o tratamiento de desordenes cutáneos que se presentan durante el periodo neonatal (Fluhr y cols., 2005).

Otro campo de investigación en el que se está incursionando es en la utilidad de los agonistas de los LXRs en terapias para enfermedades de origen viral como la hepatitis C (VHC). Aunque los mecanismos precisos que regulan la entrada de VHC en las células hepáticas son todavía desconocidos, el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) ha demostrado ser esencial para la entrada de estas partículas virales. En un estudio reciente se trataron células infectadas con VHC con el agonista GW3965. Los resultados mostraron inhibición de la replicación viral, dosis

dependiente, a través de la regulación de la expresión de la proteína degradadora de LDR que desencadena la ubiquitinación y degradación de LDR (Zeng y cols., 2012).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 Equipos utilizados

Los medios instrumentales utilizados en el presente estudio son los siguientes:

- Aparato de transferencia: BioRad Transblot SD
- Autoanalizador: Cobas Integra 400 de Roche diagnostics
- Autoclave: Raypa, modelo Sterilmatic
- Balanzas de precisión: Sartorius R200D, Sartorius 2842
- Baños termostátizados: Selecta 135925, Selecta Unitronic 320 OR, Selecta CE95
- Campana de flujo laminar vertical: Indelab modelo IDL-48V
- Centrífugas: Eppendorf Centrifuge 5415C, Beckman XL-100 K Ultracentrifuge, Rotor
- Cubetas de electroforesis vertical: BioRad Miniprotean II cell, BioRad Protean II xi cells
- Espectrofotómetros: Milton Roy Spectronic 1201, Hitachi U-2000, Nano Drop ND 1000 Spectrophotometer
- Fuentes de alimentación: Savant instruments modelo 1216 MP, BioRad modelo HV 1000
- Homogeneizador: Kinemática AG Polytron
- Jaulas metabólicas: Tecniplast Gabia, 3701
- Lector de placas ELISA: Titertek modelo Multiscan Plus MK II
- Material de cirugía: agujas, bisturís, pinzas, tijeras, etc.

- Material de laboratorio de carácter general: agitadores de tubos, arcones congeladores, dispensadores automáticos, pipetas, micropipetas automáticas, ordenadores etc;
- pHmetros: Crison 2001
- Termociclador: Eppendorf modelo Mastercycler personal
- PCR cuantitativa a tiempo real: StepOne Plus (Applied Biosystems)

### 3.2 Soluciones

Las principales soluciones utilizadas en la realización de este estudio, y que se describen en los apartados correspondientes, son las siguientes:

- Ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 10%: se tomaron 100 mL del ácido perclórico y se llevaron a 1 L con agua milliQ
- $\alpha$ -amiloglucosidasa 10 U/mL en tampón acetato sódico 0,4 M pH 4,8: se obtuvo añadiendo 10 unidades de  $\alpha$ -amiloglucosidasa por cada mL de tampón acetato sódico 0,4 M pH 4,8
- Carbonato potásico ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) 5 M: se pesaron 691,05 g del carbonato potásico y se llevaron a 1 L con agua milliQ
- Carboximetil celulosa 0,05%: Se pesaron 0,25 g de carboximetil celulosa y se llevaron a 500 mL con agua milliQ
- Desoxicolato al 1%: para preparar esta solución se pesó un gramo de desoxicolato y se enrasó a 100 mL con agua milliQ
- Heparina: se preparó diluyendo 1:100 la heparina de 5.000 U al 5% con solución salina fisiológica al 0,9% hasta una concentración final de 0,05%
- Solución salina fisiológica: se preparó disolviendo NaCl en agua destilada a una concentración final de 154 mmol/L

- Tampón acetato sódico 0,4 M pH 4,8: se tomaron 32,816 mL de acetato sódico comercial y se enrasaron hasta un litro con agua milliQ. El pH se ajustó con ácido acético 0,2 M.

### **3.3 Diseño experimental**

#### **3.3.1 Animales**

Para la realización de este proyecto se utilizaron 160 ratones machos C57BL/6J, de 7 semanas de edad, suministrados por Harlan Sprague Dawley Inc. La elección de dicha cepa se debe a que los animales son capaces de desarrollar características histopatológicas muy parecidas a las que se presentan en la EHNA en humanos, cuando son alimentados con una dieta deficiente en los aminoácidos metionina y colina (Koppe y cols., 2004; Leclercq y cols., 2007b; Yu y cols., 2007).

Debido a esto, los animales se alimentaron con una dieta deficiente en metionina y colina (dieta MCD No 960439, ICN Biomedicals), cuya composición se refleja en la Tabla 6, y como grupo control se utilizaron animales alimentados con una dieta control (No. 960441, ICN Biomedicals). La composición de la dieta control es la misma de la MCD excepto por la adición de 2 g/kg de cloruro de colina y 3 g/kg de DL-metionina a expensas de la sacarosa. Todos los ratones se mantuvieron en una habitación con temperatura y humedad controladas dotada de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 horas/12 horas) constante, dentro del edificio del Animalario de la Universidad de León, y durante todo el periodo de experimentación tuvieron libre acceso al agua y a la comida.

<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>G</b>
<b>Sacarosa</b>	455,3
<b>Almidón de maíz</b>	200,0
<b>Aceite de maíz</b>	100,0
<b>Celulosa molida</b>	30,0
<b>Mezcla mineral 76 AIN</b>	35,0
<b>Fosfato dicálcico</b>	3,0
<b>L-Alanina</b>	3,5
<b>Clorhidrato de L-Arginina</b>	12,1
<b>L-Asparagina monohidratada</b>	6,0
<b>Ácido L-Aspártico</b>	3,5
<b>L-Cistina</b>	3,5
<b>Ácido L-Glutámico</b>	40,0
<b>Glicina</b>	23,3
<b>Clorhidrato de L-Histidina</b>	4,5
<b>L-Isoleucina</b>	8,2
<b>L-Leucina</b>	11,1
<b>Clorhidrato de L-Lisina</b>	18,0
<b>L-Fenilalanina</b>	7,5
<b>L-Prolina</b>	3,5
<b>L-Serina</b>	3,5
<b>L-Treonina</b>	8,2
<b>L-Triptofano</b>	1,8
<b>L-Tirosina</b>	5,0
<b>L-Valina</b>	8,2
<b>Acetato de D-L alfa tocoferol (250 u/g)</b>	0,484
<b>Vitamina A palmitato (250 u/g)</b>	0,0792
<b>Vitamina D3 (400 u/g)</b>	0,0055
<b>Etoxiquina</b>	0,02

**Tabla 6.** Composición de la dieta MCD

### 3.3.2 Protocolo de experimentación

En el modelo experimental de EHNA escogido se quiso comprobar la posible utilidad terapéutica de la utilización de un agonista del LXR, el GW3965 (Collins y cols., 2002), donado por el laboratorio Glaxo Smith Kline (España). Dicho compuesto se administró diariamente a la misma hora, por vía intragástrica, vehiculizado en metilcelulosa al 0,05% (20 mg/kg de peso/200  $\mu$ l por animal) durante un periodo de 5 semanas. Los animales que no recibieron GW3965 se manipularon de forma similar, administrándoles el mismo volumen de metilcelulosa al 0,05% vía intragástrica.

Al inicio del estudio todos los animales fueron alimentados durante una semana con la dieta control. Los ratones que superaron este periodo de aclimatación y cuarentena se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (40 ratones por grupo) que fueron tratados durante cinco semanas de acuerdo con el siguiente esquema:

- Grupo control: animales alimentados con la dieta control más el vehículo (0,05% de carboximetilcelulosa).
- Grupo control más agonista: animales alimentados con la dieta MCD más la administración intragástrica de GW3965 (20 mg/Kg/día).
- Grupo EHNA: animales alimentados con la dieta MCD más el vehículo.
- Grupo EHNA más agonista: animales alimentados con la dieta MCD más GW3965 (20 mg/kg/día).

Al final de cada semana de experimentación, 5 ratones por grupo fueron anestesiados con isoflurano, previo ayuno de 12 horas, procediéndose a la extracción de los hígados y a la recogida de las muestras de sangre en tubos heparinizados, mediante punción cardíaca. Una alícuota de sangre se centrifugó para la obtención de plasma y la otra se conservó completa en "ARN later" para la cuantificación de ARN. Los hígados se dividieron en 3 fracciones: una se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la determinación de los parámetros bioquímicos (colesterol, triglicéridos y glucógeno) y para análisis de biología molecular, otra se preservó en "ARN Later" para la posterior

cuantificación de ARN y la última se fijó en formol tamponado al 10% para los estudios histopatológicos.

En todo momento se siguieron las especificaciones de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (publicación NIH nº 80-23, USA, revisión de 1985) y se respetó 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).

### **3.4 Métodos analíticos**

#### **3.4.1 Estudios histológicos**

Las muestras de hígado se fijaron mediante inmersión en formol tamponado al 10% durante 24h. Transcurrido este tiempo, las muestras se deshidrataron en alcohol isopropílico de graduación creciente, se aclararon con xilol y se incluyeron en parafina a 60°C, obteniéndose bloques que se cortaron con microtomo. Los cortes histológicos se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina para evaluar las alteraciones histopatológicas y con tricómico de Masson para determinar la ausencia o presencia de fibrosis y su respectiva graduación.

Las biopsias fueron evaluadas de acuerdo al score para EHNA estandarizado por Brunt y sus colaboradores en el año 1999 (Brunt y cols, 1999) y seguido por la “Red de investigación clínica en esteatohepatitis no alcohólica (EHNA-CRN)”.

#### **3.4.2 Determinaciones plasmáticas**

Las muestras sanguíneas se centrifugaron el mismo día de la recogida (4°C, 4.000 g, 15 min) y los plasmas obtenidos se procesaron inmediatamente en el autoanalizador Cobas Integra 400 de Roche diagnostics, mediante técnicas colorimétricas y cinéticas distribuidas para este equipo por Roche Diagnostics GmbH. Los parámetros valorados en cada uno de ellos fueron: proteínas totales, albúmina, fosfatasa alcalina (ALP), alanina amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), bilirrubina directa, bilirrubina total, colesterol total (c-total), colesterol HDL (c- HDL), colesterol LDL (c-LDL), triglicéridos y glucosa. Las VLDL-colesterol (c-VLDL)

se determinaron matemáticamente a partir de la concentración de triglicéridos dividiendo éstos entre 5 (Friedewald y cols., 1972).

Los principios de los métodos bioquímicos utilizados se describen en los siguientes apartados:

#### 3.4.2.1 Proteínas totales

El cobre divalente reacciona en una solución alcalina con las uniones peptídicas de las proteínas formando el color púrpura característico del complejo biuret. El tartrato sódico potásico impide la precipitación de hidróxido de cobre, mientras que el yoduro potásico inhibe la autorreducción del cobre.



La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de la proteína. Se determinó midiendo el aumento de la absorbancia a 552 nm.

#### 3.4.2.2 Albúmina

La albúmina a un pH de 4,3 es suficientemente catiónica para fijarse al colorante aniónico verde de bromocresol (BCG) y formar un complejo de color azul-verde.



La intensidad del color azul-verde es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra. Se determinó midiendo el incremento de la absorbancia a 629 nm.

#### 3.4.2.3 Fosfatasa alcalina (ALP)

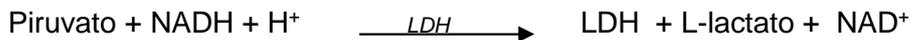
En presencia de iones de magnesio y de cinc, el p-nitrofenilfosfato es desdoblado en fosfato y p-nitrofenol por la acción de las fosfatasas.



El p-nitrofenol liberado es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ALP. Se determinó midiendo el incremento de la absorbancia a 409 nm

#### 3.4.2.4 Alanina aminotransferasa (ALT)

La ALT cataliza la reacción entre la L-alanina y el 2-oxoglutarato. El piruvato formado se reduce por NADH en una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) para formar L-lactato y NAD<sup>+</sup>.



La velocidad de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la ALT. Se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm.

#### 3.4.2.5 Aspartato aminotransferasa (AST)

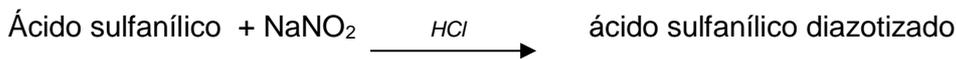
La AST de la muestra cataliza la transferencia de un grupo amino entre L-aspartato y 2-oxoglutarato para obtener oxaloacetato y L-glutamato. A continuación y en presencia de la malato deshidrogenasa (MDH), el oxaloacetato reacciona con NADH para formar NAD<sup>+</sup>.



La velocidad de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la AST. Se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm.

### 3.4.2.6 Bilirrubina directa

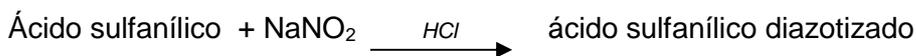
La bilirrubina conjugada (bilirrubina directa) reacciona directamente con el ácido sulfanílico diazotizado en un tampón ácido para formar azobilirrubina de color rojo.



Ya que la absorbancia máxima de la azobilirrubina depende del pH, se emplea un sistema amortiguador de ácido oxálico/ácido sulfanílico para mantener el pH de la reacción. El ensayo es específico para la bilirrubina directa en suero y plasma. La intensidad del color es proporcional a la concentración de bilirrubina directa de la muestra y se determinó monitorizando el aumento de la absorbancia a 552 nm.

### 3.4.2.7 Bilirrubina total

La concentración de la bilirrubina total se determina empleando agentes tensoactivos para solubilizar la bilirrubina no conjugada (bilirrubina indirecta) y desnaturalizar su portador de albúmina. La bilirrubina conjugada y sin conjugar de la muestra reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado para formar una azobilirrubina de color rojo.



Ya que la absorbancia máxima de la azobilirrubina depende del pH, se emplea un sistema amortiguador de ácido oxálico/ácido sulfanílico para mantener el pH de la reacción. El ensayo es específico para la bilirrubina directa en suero y plasma. La intensidad del color es proporcional a la concentración de bilirrubina total de la muestra y se determinó monitorizando el aumento de la absorbancia a 552 nm.

### 3.4.2.8 Colesterol total

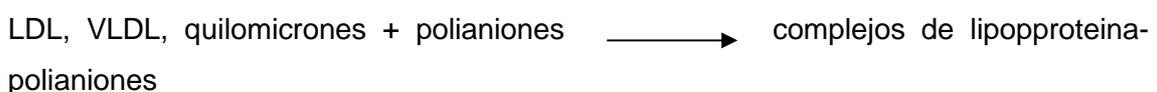
Bajo la acción de la enzima colesteroesterasa (CE), los ésteres del colesterol se desdoblan a colesterol libre y ácidos grasos. A continuación, la enzima colesteroxidasa (CHOD) cataliza la oxidación del colesterol para formar colest-4-ene-3-ona y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En presencia de la peroxidasa (POD), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado produce el acoplamiento oxidativo del fenol y la 4-amino antipirina (4-AAP) para formar un colorante rojo de quinoneimina.



La intensidad cromática del colorante formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol. Se determinó midiendo el aumento de la absorbancia a 512 nm.

### 3.4.2.9 Colesterol HDL

El test directo de colesterol (HDL-Cholesterol Direct) se basa en la adsorción de polianiones sintéticos en la superficie de las lipoproteínas. Esto hace que las LDL, VLDL y los quilomicrones se transformen a una forma resistente a los detergentes, no siendo este el caso de las HDL. La acción combinada de los polianiones y el detergente solo solubiliza el colesterol de las HDL, excluyendo las LDL, VLDL y los quilomicrones. La acción enzimática consecutiva de la CE y la CHOD cataliza la oxidación del colesterol en solución. En presencia de la POD, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado reacciona con N,N-bis (4-sulfobotil)-m-toluidina (DSBmT) y la 4-aminoantipirina (4-AAP) produciendo un colorante rojo de quinoneimina.



HDL + detergente  $\longrightarrow$  complejos micelares

Complejos micelares  $\xrightarrow{CE/CHOD}$  colesterol oxidado + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminoantipirina + DSBmT  $\xrightarrow{POD}$  quinoneimina

La intensidad cromática del colorante rojo de quinoneimina formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol HDL. Se determinó midiendo el aumento de la absorbancia a 552 nm.

### 3.4.2.10 Colesterol LDL

Las HDL, VLDL y los quilomicrones son hidrolizados específicamente con el detergente 1. El colesterol liberado de estas lipoproteínas reacciona inmediatamente por la acción enzimática de las enzimas colesteroleserasa (CE) y la colesteroxidasa (CHOD) generando peróxido de hidrógeno. Éste es consumido por una peroxidasa (POD) en presencia de la 4-aminoantipirina y se genera un producto incoloro. Durante el primer paso, las partículas de LDL permanecen intactas. La reacción del colesterol LDL se inicia al añadir el detergente 2, junto a la N, N-bis(4-sulfobutil)-mtoluidina (DSBmT) como agente conjugante. El segundo detergente libera el colesterol de las partículas de LDL, las cuales se someten a la reacción enzimática con el agente conjugante para producir un compuesto cromático.

#### *Primer paso*

HDL, VLDL, quilomicrones + detergente 1  $\longrightarrow$  colesterol liberado

Colesterol  $\xrightarrow{CE/CHOD}$  colesterol oxidado + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminoantipirina  $\xrightarrow{POD}$  producto incoloro

#### *Segundo paso*

LDL + detergente 2  $\longrightarrow$  colesterol liberado



La intensidad cromática del colorante rojo de quinoneimina formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol LDL. Se determinó midiendo el aumento de la absorbancia a 552 nm

### 3.4.2.11 Triglicéridos

Los triglicéridos se hidrolizan por la acción de la enzima lipoprotein lipasa (LPL) a ácidos grasos y glicerol. El glicerol resultante se fosforiliza a glicerol-3-fosfato por el ATP en una reacción catalizada por la enzima glicerol cinasa (GK). La oxidación del glicerol-3-fosfato se cataliza por la enzima glicerol-fosfato-oxidasa (GPO) para formar fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

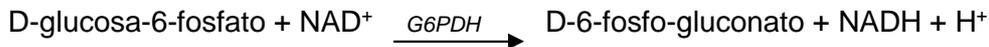
En presencia de actividad enzimática peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno lleva a cabo el acoplamiento oxidativo de 4-clorofenol y 4-aminofenazona y forma un colorante rojo de quinoneimina que se mide a 512 nm. El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra.



### 3.4.2.12 Actividad Glucosa Hexoquinasa

La enzima hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa mediante el ATP para formar glucosa-6-fosfato y ADP. La reacción continúa con el empleo de una

segunda enzima, la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), que cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato a NAD<sup>+</sup> para formar NADH.



La concentración del NADH formado es directamente proporcional a la concentración de glucosa. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm.

### 3.4.3 Determinaciones en tejido hepático

#### 3.4.3.1 Colesterol y triglicéridos hepáticos

Para la determinación del contenido de colesterol y triglicéridos se utilizó el método descrito por Miao y colaboradores en el 2004. Se homogenizaron 50 mg de hígado en 300  $\mu\text{l}$  de solución salina fisiológica al 0,9%. Los homogeneizados se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del ensayo cuando fueron cuidadosamente descongelados a  $37^{\circ}\text{C}$  y llevados hasta un volumen final de 850  $\mu\text{l}$  con solución salina al 0,9%. A continuación se prepararon dos tubos por muestra (uno para la valoración de colesterol y el otro para triglicéridos), conteniendo cada uno 100  $\mu\text{l}$  del respectivo homogeneizado y 100  $\mu\text{l}$  de desoxicolato al 1%. Las disoluciones se incubaron 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y se llevaron al autoanalizador Cobas Integra 400 donde se llevaron a cabo las respectivas determinaciones mediante técnicas colorimétricas distribuidas para este equipo por Roche Diagnostics GmbH.

#### 3.4.3.2 Glucógeno hepático

Los contenidos de glucosa y glucógeno hepáticos se determinaron mediante el método descrito por Keppler y Decker en 1974 que se basa en la utilización de la enzima  $\alpha$ -amiloglucosidasa para degradar los enlaces de la molécula de glucógeno y liberar las moléculas de glucosa. Como paso preliminar se homogeneizaron en frío 50-100 mg de tejido en 10 volúmenes de  $\text{HClO}_4$ , se centrifugaron a 6.000g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para obtener el sobrenadante, y se ajustó el pH a 5,0 mediante la adición de

diluciones de  $\text{HClO}_4$  al 10% y de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en concentración 5 M. A continuación se tomaron dos alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ , a una de las cuales se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de tampón acetato sódico 0,4 M pH 4,8 y a la otra 100  $\mu\text{l}$  de una solución de que contenía 10 U/mL de  $\alpha$ -amiloglucosidasa en el mismo tampón. Las dos alícuotas se incubaron durante 2 horas a 50°C, al cabo de las cuales se paró la reacción mediante la adición de 250  $\mu\text{l}$  de HCl al 10%. La concentración de glucosa en cada alícuota se cuantificó en el autoanalizador Cobas Integra 400 de Roche Diagnostics mediante la técnica de la glucosa hexoquinasa. La cantidad de glucógeno se calculó como la diferencia en la concentración de glucosa entre las muestras incubadas con la enzima respecto a las que no incubadas, normalizadas por el peso de tejido. La glucosa libre se calculó a partir de la alícuota sin tratar con  $\alpha$ -amiloglucosidasa.

### **3.4.4 Estudio de expresión génica en tejido hepático**

#### **3.4.4.1 Extracción de ARN total**

Para la extracción del ARN a partir del tejido hepático se utilizó el método comercial “TRI reagent solution” de la casa comercial Applied Biosystem. El reactivo combina fenol y tiocianato de guanidina en una solución monofásica que permite inhibir rápidamente la actividad ARNasa. Las muestras biológicas se homogeneizaron o lisaron en *TRI reagent solution* y el homogeneizado se separó en dos fases (acuosa y orgánica) mediante adición de cloroformo y su posterior centrifugación. El ARN recuperado de la fase acuosa se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol y se recogió en agua con DEPC.

En este trabajo se partió de aproximadamente 50 mg de hígado que se homogeneizaron en frío en 1 mL de *TRI reagent solution*. El homogeneizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Este paso permite eliminar la fracción de grasa. A continuación se recogió el sobrenadante con 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo (Sigma-Aldrich), se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recogió la fase acuosa con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol (Sigma-Aldrich). En el siguiente paso se incubó esta fase durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 8 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió con 1

mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C. En el último paso se retiró el etanol y el ARN se resuspendió en 100 µl de agua con DEPC.

La pureza del ARN se estimó espectrofotométricamente, midiendo la muestra a 260 y 280 nm de longitud de onda, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza} = A_{280}/A_{260}$$

Siendo  $A_{260}$  la absorbancia a 260 nm y  $A_{280}$  la absorbancia a 280 nm de longitud de onda.

#### 3.4.4.2 Cuantificación del ARN

Una vez extraído, el ARN total se cuantificó por medición de la absorbancia de 1,5 µl de la muestra a 260 nm en el espectrofotómetro Nano Drop (ND 1000). La concentración promedio obtenida fue de 6-10 µg por mg de tejido.

#### 3.4.4.3 Reacción de la Transcriptasa Reversa

Para la reacción de la transcriptasa reversa se utilizó el sistema RETROscript (First Strand Síntesis Kit), kit de síntesis de primera cadena para RT-PCR (Ambion), basado en la capacidad de la transcriptasa reversa para sintetizar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de una secuencia molde de ARN. Para ello, se utilizaron cantidades idénticas de ARN total de cada uno de los grupos experimentales, realizándose en paralelo un control negativo.

Como paso inicial, y con el fin de desnaturalizar las posibles estructuras secundarias del ARN y facilitar el anillamiento de los iniciadores, se incubaron 2 µg de ARN a 85°C durante 5 minutos, añadiéndose a continuación los siguientes reactivos:

- 4 µL de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 2,5 mM
- 2 µL de iniciadores de la primera cadena (mezcla de nucleótidos), 50 mM
- 2 µL de tampón RT-PCR 10x Tris HCl 100 mM; KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; pH 8,3

- 1  $\mu$ L de inhibidor placentario de ARNasas (10 U)
- 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa M-MLV 100 U

La mezcla de reacción se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 20  $\mu$ L, manteniéndose a temperatura ambiente durante 15 minutos e incubándose posteriormente a 42°C durante 90 minutos. Finalmente, y con objeto de inactivar la enzima, se incubó a 92°C durante 10 minutos.

Con el ADNc obtenido se procedió al paso de amplificación, o bien se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### **3.4.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó mediante el procedimiento descrito por Mullis y Faloona (1987) y por Saiki y cols. (1988), basado en el proceso natural de replicación del ADN con amplificación cíclica, en el cual partiendo de una molécula de ADN diana, es posible amplificar una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores diseñados al efecto.

El método consta de tres etapas: desnaturalización, anillamiento y elongación, efectuadas de forma sucesiva en unas condiciones controladas de temperatura y tiempo:

##### **3.4.4.1 Desnaturalización**

Las cadenas del ADN diana se separan mediante su incubación a una temperatura superior a 70°C. Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente para permitir el anillamiento de los iniciadores.

##### **3.4.4.2 Anillamiento de los iniciadores**

Los iniciadores utilizados consisten en un par de oligonucleótidos sintéticos (sentido y antisentido) capaces de unirse a secuencias específicas del ADN que

limitan físicamente con la región que se pretende amplificar. Cada uno de los iniciadores es una réplica de las cadenas de ADN y su diseño es tal que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de ADN diana. La unión de los iniciadores a la cadena de ADN diana en el momento de la disminución de la temperatura se ve favorecida frente a la renaturalización de la doble cadena de ADN, debido a que la concentración de los dos oligonucleótidos es mucho más elevada. La temperatura óptima para el anillamiento debe ser estimada de forma empírica y viene determinada por la composición de nucleótidos de los dos iniciadores.

#### 3.4.4.4.3 Elongación a partir de los iniciadores

El resultado del proceso es la formación de cadenas de ADN copiadas de las moléculas diana.

En el presente estudio, para la estimación de la concentración de ARNm, se utilizó como metodología la PCR cuantitativa a tiempo real. En ella, al contrario de lo que ocurre en una PCR convencional, se puede cuantificar la cantidad de producto amplificado en cada ciclo de PCR. Está basada en la detección y cuantificación de la fluorescencia emitida durante la fase exponencial.

Una de las técnicas utilizadas para la cuantificación a tiempo real es el uso de sondas hidrolizables (sondas Taqman), basada en la capacidad de la ADN polimerasa para hidrolizar la sonda unida específicamente a una secuencia diana, debido a su actividad 5' nucleasa. Dicha sonda posee en su extremo 5' un fluoróforo de alta energía (*reporter*) y en el extremo 3' un fluoróforo de baja energía (*quencher*), siendo la distancia entre ambos fluoróforos baja cuando la sonda está intacta, de tal forma que la fluorescencia emitida por el *reporter* es suprimida por la del *quencher*.

Brevemente, después de la retrotranscripción del ARN, se produce la unión de los tres oligonucleótidos, los dos iniciadores y la sonda, a la secuencia específica de ADN. Los dos iniciadores delimitan los extremos de la secuencia a amplificar, uniéndose la sonda a una secuencia específica en el interior de la zona delimitada por ambos iniciadores en la fase de anillamiento/elongación de la PCR. La sonda permanece unida a dicha secuencia mientras que la polimerasa va amplificando la secuencia desde los iniciadores hasta que llega a la sonda y la actividad 5'

exonucleasa de la enzima desplaza e hidroliza a la misma, provocando la liberación del *reporter*. Así, al aumentar la distancia entre el *quencher* y el *reporter*, la fluorescencia del *reporter* aumenta, disminuyendo la del *quencher*. El incremento de dicha señal es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado.

En el presente trabajo se siguió la metodología que se enuncia a continuación:

En una placa de 96 pocillos se preparó un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  de la siguiente mezcla de reacción:

- 1,25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de iniciadores/sonda (20x) (Applied Biosystems)
- 10,25  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (Ambion)
- 1  $\mu\text{L}$  de ADNc
- 12,5  $\mu\text{L}$  de Taqman Universal PCR master mix (2x) (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)

Las condiciones del termociclador fueron:

1. Etapa inicial de 10 minutos a 95°C
2. Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C
3. Etapa de anillamiento/elongación de 1 minuto a 60°C

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 50 ciclos. Como patrón interno para normalizar la señal entre las diferentes muestras se amplificó un fragmento específico del gen GAPDH (Applied Biosystems) de cada una de ellas. 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 (Applied Biosystem). Los cambios relativos en la expresión génica se determinaron mediante el cálculo del  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

#### 3.4.4.5 Western Blot

La cuantificación de la concentración de proteínas específicas mediante Western blot se realizó siguiendo el protocolo de Laemmli (1970).

Las muestras de tejido fueron previamente homogeneizadas con un homogeneizador manual o *potter*. Se tomó 1 mg de tejido por mL de tampón de lisis (NaCl 140 mM; EDTA 15 mM; glicerol 10%; Tris 20 mM; pH 8,0), suplementado con la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA-free; Roche, Penzberg, Germany), y se determinó la concentración de proteínas totales presentes en él.

A continuación se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido correspondiente a una determinada concentración de proteína variable según la determinación a realizar, se le añadió solución de ebullición (Tris/HCl 2 M; glicerol 60%; SDS 10%; pironina 0,5%), se incubó durante 2 minutos a 100°C y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (9%) y en tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 0,2 M; SDS 3,5 mM; pH 8,8).

Para la realización del gel de separación se preparó la siguiente mezcla:

- 3 mL de mezcla de acrilamida/bisacrilamida (Sigma-Aldrich)
- 4,75 mL de tampón Tris/HCl 0,75 M; pH 8,8
- 0,5 mL de SDS 2%
- 0,43 mL de persulfato amónico 1%
- 0,3 mL de TEMED 1%
- 1 mL de agua milliQ

Las proteínas separadas mediante la electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para permitir su exposición a los anticuerpos. Para la realización de dicha transferencia, el gel una vez extraído, se equilibró en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 0,2 M; metanol 20%). La transferencia se realizó a 13 V durante 20 minutos (Trans-blot SD; BioRad, Hércules, CA, USA). Para comprobar

que la transferencia se hubiera realizado con éxito se sumergió la membrana de nitrocelulosa en una solución de rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales. Posteriormente, la membrana se lavó en agitación con PBS (NaCl 0,14 M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM;  $\text{NaHPO}_4$  8 mM; KCl 2,7 mM) 1x y se sometió a la solución de bloqueo (5% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween 0,05%) durante 30 minutos a 37°C.

Una vez bloqueada la membrana ésta se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico para la proteína objeto de estudio. Transcurrido dicho periodo, se lavó seis veces con PBS-Tween (0,05%), se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente unido a peroxidasa HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) y se lavó cinco veces con PBS-Tween al 0,05% y una vez con PBS 1x.

La detección de la proteína (revelado), se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Para ello la membrana se expuso durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente, se introdujo en una *cassette* junto con una película (Hyperfilm ECL Amersham) durante aproximadamente 5 minutos. Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando un software comercial Zeiss Ks.300 de Imaging System (versión 2.02).

Como paso final, y con el fin de normalizar la concentración de proteína de las distintas muestras que fueron sometidas a electroforesis, se procedió a la exposición de las membranas de nitrocelulosa a un anticuerpo primario anti- $\alpha$  actina (Sigma-Aldrich) y a su anticuerpo secundario correspondiente, detectándose dicha proteína a 42 kDa.

### 3.5 Tratamiento estadístico

El análisis descriptivo se inició con la prueba de normalidad, Shapiro-Wilk, para evaluar la distribución de cada variable. Las variables que presentaron una distribución normal se describen según su promedio y desviación estándar y aquellas que no, con la mediana y el rango.

Para los análisis de comparación de los valores de las pruebas sanguíneas, del peso corporal y relación hepatosomática a través de las semanas, primero se verificaron los requisitos de normalidad (test de Shapiro Wilk) y homogeneidad de las

varianzas (test de Levene); cuando se cumplieron los dos requisitos o el de la homogeneidad de las varianzas se utilizó ANOVA y, en caso contrario el test de Kruskal-Wallis.

Los grupos de comparación utilizados fueron los siguientes:

1. Grupo EHNA: animales alimentados con la dieta MCD vs animales alimentados con la dieta control.
2. Grupo control + agonista: animales alimentados con la dieta MCD más la administración intragástrica de GW3965 vs animales alimentados con la dieta control más el vehículo
3. Grupo EHNA + agonista: animales alimentados con la dieta MCD más GW3965 vs animales alimentados con la dieta MCD más el vehículo.

Las diferencias de los valores hepáticos con el grupo control, por semana, se establecieron mediante la prueba de "t-Student" para la distribución normal o la prueba de Mann-Whitney para la comparación de las medianas.

Los promedios de cada marcador por semana se compararon entre sí con la prueba de ANOVA paramétrica ajustada por Bonferroni, para el valor de p.

Para la expresión de los resultados correspondientes a la expresión génica en tejido hepático se calculó el valor de la media y el error estándar de la media (E.E.M.). El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test de análisis de varianza (ANOVA) y en aquellos grupos donde aparecieron diferencias significativas se realizó, posteriormente, el test de Newman-Keuls.

El programa estadístico utilizado fue el SPSS versión 17 y se consideró significativa una diferencia con un valor  $p \leq 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre los hallazgos histopatológicos hepáticos**

Con el fin de evaluar el comportamiento del modelo nutricional de EHNA, y la acción del agonista GW3965 sobre el mismo, se realizó el análisis de los hallazgos histopatológicos característicos de esteatosis y esteatohepatitis en biopsias hepáticas correspondientes a las segunda y cuarta semanas de tratamiento de los diferentes grupos de estudio. La elección de dichos periodos se basó en los resultados obtenidos en los parámetros bioquímicos cuantificados en sangre e hígado y que se indican posteriormente.

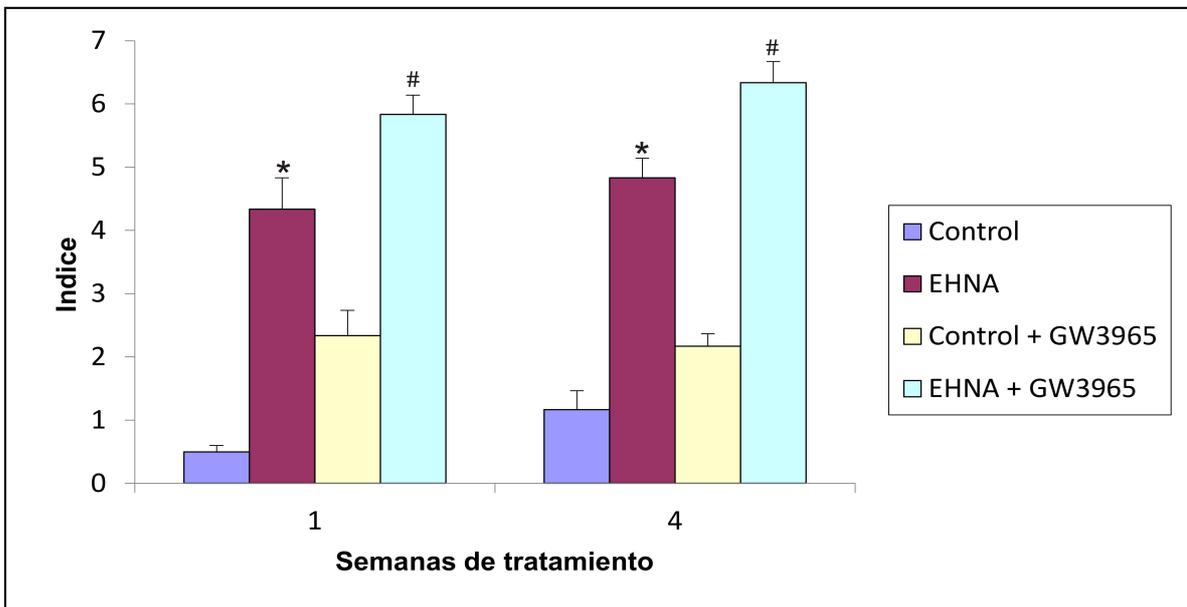
##### **4.1.1 Índice de actividad histológica de la EHNA**

Una vez examinados los cortes de tejido con hematoxilina/eosina y tricrómico de Masson, se procedió a calcular el índice de actividad de EHNA para cada grupo, a partir de los criterios propuestos por Brunt y colaboradores en el año 1999 (Brunt y cols., 1999), que incluyen específicamente aquellas características de lesión activa que son potencialmente reversibles en un futuro próximo. El índice se obtiene a partir del sumatorio de los scores de esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y balonización (0-2), extendiéndose así:  $\leq 2$  (no diagnóstico de EHNA), 3-4 (diagnóstico dudoso de EHNA) y  $\geq 5$  (EHNA probable o definida). La fibrosis es menos reversible, por esta razón no se incluye dentro del cálculo del índice (Brunt, 2007).

El análisis del índice de actividad reveló que, como era de esperar, ninguno de los animales control desarrolló la enfermedad durante la segunda y cuarta semanas de estudio ( $0,5 \pm 0,5$  y  $1,1 \pm 0,6$ , respectivamente). Sin embargo, el tratamiento de animales control con el agonista GW3965 causó un incremento del índice de enfermedad de EHNA que se mantuvo en las dos semanas (2ª semana:  $2,3 \pm 1,1$ ; 4ª semana:  $2,2 \pm 1,0$ ) sin llegar a ser diagnósticos de EHNA. En el grupo que recibió la dieta MCD (grupo EHNA), los índices de actividad fueron superiores a los mostrados por aquellos animales que no la recibieron (2ª semana:  $4,3 \pm 0,8$ ; 4ª semana  $4,8 \pm 0,6$ ).

En los animales de este mismo grupo que recibieron el agonista GW3965 (grupo EHNA + GW3965), los índices demostraron que todos ellos habían

desarrollado la enfermedad en la segunda semana de tratamiento ( $5,8 \pm 0,43$ ) y que está se agudizó en la cuarta semana ( $6,3 \pm 0,40$ ).



**Figura 7.** Índices de actividad para EHNA. Valores medios  $\pm$  EEM; n=6 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control; #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

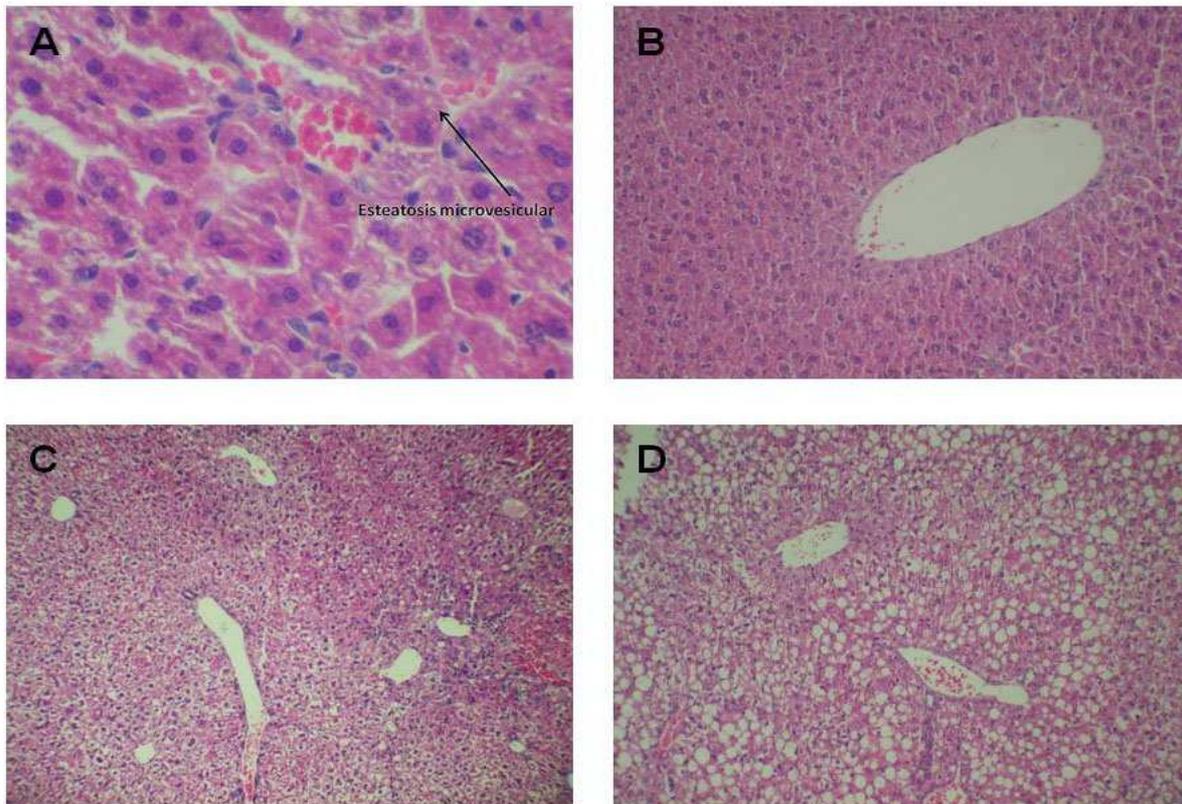
#### 4.1.2 Esteatosis

Para la evaluación de la esteatosis se utilizó el sistema descrito por Brunt y sus colaboradores en el año 1999 (Brunt y cols., 1999). Los resultados obtenidos en nuestro estudio aparecen recogidos en la Tabla 7 y en la Figura 8.

	CONTROL n=6/grupo		CONTROL+GW3965 n=6/grupo		EHNA n=6/grupo		EHNA+GW3965 n=6/grupo	
Semanas	2	4	2	4	2	4	2	4
<b>Grado n (%)</b>								
<b>0</b>	5(87)	5(87)	4(67)	4(67)	2(33)			
<b>1</b>	1(13)	1(13)	2(33)	2(33)				
<b>2</b>						2(33)		
<b>3</b>					4(67)	4(67)	6(100)	6(100)
<b>Localización n (%)</b>								
<b>Zona 3</b>	1(17)			1(16,66)	1(16,6)			
<b>Zona 1</b>			2(33,33)	1(16,66)				
<b>Azonal</b>								
<b>Paracinar</b>	2(33)	3(50)	2(33,33)	3(50)	4(66,8)	6(100)	6(100)	6(100)
<b>Ausente</b>	3(50)	3(50)	2(33,33)	1(16,66)	1(16,6)			
<b>Esteatosis microvacuolar n (%)</b>								
<b>Ausente</b>	3(50)	4(67)	1(17)	2(33)	2(33)		1(17)	4(67)
<b>Presente</b>	3(50)	2(33)	5(83)	4(67)	4(67)	6(100)	5(83)	2(33)
<b>Esteatosis macrovacuolar n (%)</b>								
<b>Ausente</b>	5(83)	6(100)	6(100)	3(50)	4(67)	1(17)		1(17)
<b>Presente</b>	1(17)			3(50)	2(33)	5(83)	6(100)	5(83)

**Tabla 7.** Descripción de los hallazgos histológicos relacionados con esteatosis en los distintos grupos considerados en nuestro estudio

En el grupo EHNA, la esteatosis panacinar se presentó desde la segunda semana de tratamiento (67%) y evolucionó a través del tiempo de estudio afectando al 100% de los animales en la cuarta semana. En este grupo, la esteatosis micro y macrovacuolar se evidenció en el 67% de biopsias de la segunda semana y el 83% de la cuarta semana. La administración del agonista aceleró el desarrollo de esteatosis en los animales afectados de EHNA, observándose así que ya desde la segunda semana de tratamiento la totalidad de los individuos de este grupo desarrollaron esteatosis severa grado 3 de distribución panacinar, con predominio de esteatosis macrovacuolar (Figura 8).



**Figura 8.** Imágenes representativas de cortes histológicos correspondientes a los distintos grupos considerados en nuestro estudio. Tinción de hematoxilina/eosina para esteatosis. (A) Esteatosis microvesicular perteneciente al grupo control. (B) Hígado de arquitectura conservada del grupo control al que se le suministró GW3965. (C) Moderada esteatosis macrovacuolar presente en el Grupo EHNA. (D) Marcada esteatosis macrovacuolar con disposición lobulillar observada en el Grupo EHNA tratado con GW3965.

#### 4.1.3 Inflamación

La esteatosis sin inflamación o la esteatosis con inflamación ligera pero sin balonización se consideran formas no progresivas de EHNA. Así mismo, tanto la inflamación lobular como la inflamación portal se pueden encontrar en la EHNA. En el presente trabajo se siguieron los criterios de Brunt y sus colaboradores para el análisis de la inflamación (Brunt y cols., 1999).

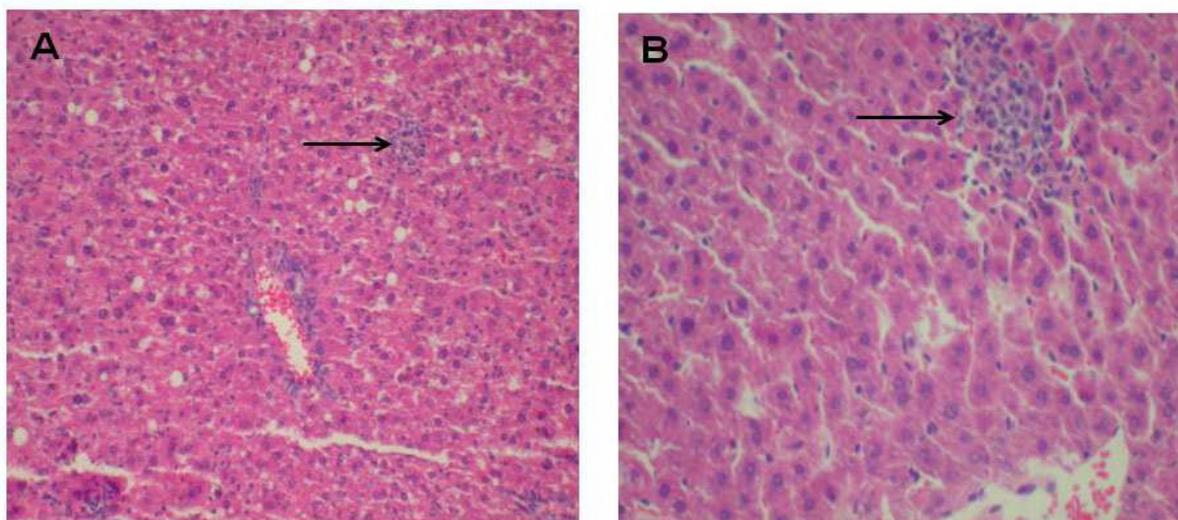
En el 83% de las biopsias pertenecientes a los grupos control y control + GW3965 no se observaron focos de inflamación lobulillar o portal en la segunda semana de tratamiento. En la cuarta semana estos porcentajes disminuyeron al 67% en el grupo control y se incrementaron hasta el 100% en el grupo control + GW3965. En ninguno de los casos se observó la presencia de microgranulomas. Los resultados se recogen en la Tabla 8.

	CONTROL n=6/grupo		CONTROL+GW3965 n=6/grupo		EHNA n=6/grupo		EHNA+GW3965 n=6/grupo	
Semanas	2	4	2	4	2	4	2	4
<b>Grado n (%)</b>								
<b>0</b>	5(83%)	4(67%)	5(83%)	6(100%)	4(67%)	5(83%)	2(33%)	1(17%)
<b>1</b>	1(17%)	2(33%)	1(17%)	0	2(33%)	1(17%)	3(50%)	2(33%)
<b>2</b>							1(17%)	3(50%)
<b>3</b>								
<b>Microgranulomas n (%)</b>								
<b>Ausente</b>	5(83)	4(67)	5(83)	6(100)	4(67)	4(67)	2(33)	1(17)
<b>Presente</b>	1(17)	2(33)	1(17)		2(33)	2(33)	4(67)	5(83)
<b>Lipogranulomas n (%)</b>								
<b>Ausente</b>	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	5(83)	5(83)	5(83)	0
<b>Presente</b>	0	0	0	0	1(17)	1(17)	1(17)	6(100)
<b>Inflamación portal n (%)</b>								
<b>Ninguna o mínima</b>	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)
<b>&gt;A la anterior</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 8.** Descripción de los hallazgos histológicos relacionados con inflamación en los distintos grupos considerados en el estudio.

Los animales pertenecientes al grupo EHNA presentaron moderada inflamación lobulillar en la segunda semana (33%) que se modificó a leve en la cuarta semana (17%) (Figura 9). En dicho grupo, se observó la presencia de microgranulomas (33%) y lipogranulomas (16%) en las dos semanas consideradas en nuestro estudio.

El 50% de las biopsias pertenecientes al grupo EHNA + GW3965 presentó moderada inflamación lobulillar en la segunda semana de tratamiento, que progresó a severa en la cuarta semana. Del 50% restante, un 33% presentó moderada inflamación lobulillar a lo largo de las cuatro semanas y en el 17% no se apreciaron focos de inflamación lobulillar ni portal en ningún momento del estudio.



**Figura 9.** Imágenes representativas de cortes histológicos correspondientes al grupo EHNA. Hallazgos relacionados con el proceso inflamatorio. (A) Inflamación lobulillar focal aguda (B) Células inflamatorias agudas PMN.

Los microgranulomas y lipogranulomas estuvieron presentes en los dos periodos considerados en el estudio siendo más abundantes en la cuarta semana (83% y 100%, respectivamente) que en la segunda semana (67% y 17%, respectivamente). En ninguno de los casos se observó inflamación portal.

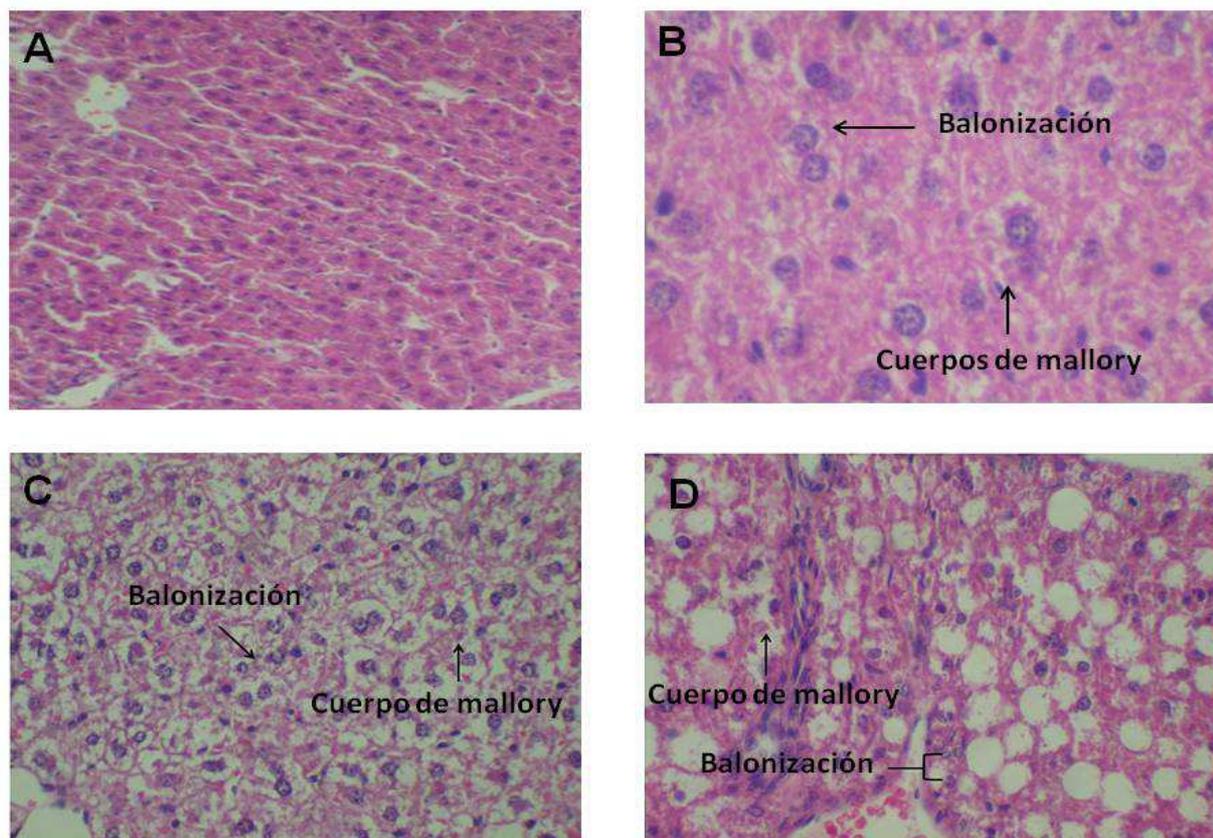
#### 4.1.4 Daño celular hepático

Como cabía esperar, en nuestro estudio no se observaron lesiones celulares características de EHNA en el hígado de ninguno de los animales control. Sin embargo, la administración del agonista a este grupo originó balonización hepatocitaria en el 50% de los individuos, que evolucionó de mínima en la segunda semana, a marcada en la cuarta semana. En ninguno de los casos se observó presencia de macrófagos pigmentados (Tabla 9).

	CONTROL		CONTROL+ GW3965		EHNA		EHNA+GW3965	
	n=6/grupo		n=6/grupo		n=6/grupo		n=6/grupo	
Semanas	2	4	2	4	2	4	2	4
<b>Balonización n(%)</b>								
<b>Ninguna</b>	6(100)	6(100)	2(33)	2(33)	0	0	0	0
<b>Pocas</b>	0	0	3(50)	1(17)	0	0	0	0
<b>Muchas</b>	0	0	1(17)	3(50)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)
<b>Cuerpos acidófilos n(%)</b>								
<b>Ninguno-raros</b>	6(100)	6(100)	5(83)	4(67)	1(17)	2(33)	1(17)	4(67)
<b>Varios</b>	0	0	1(17)	2(33)	5(83)	4(67)	5(83)	2(33)
<b>Macrófagos pigmentados n(%)</b>								
<b>Ninguno-raros</b>	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)	6(100)
<b>Varios</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 9.** Descripción de los hallazgos histológicos relacionados con lesiones celulares en los distintos grupos considerados en el estudio.

En el grupo EHNA se observó una marcada balonización hepatocitaria en la totalidad de las biopsias, con presencia de cuerpos acidófilos en el 83% de las muestras de la segunda semana y en el 67% de las de la cuarta semana, y cuerpos de Mallory en el 33% de animales de la segunda semana. Al administrar el agonista al grupo EHNA se observó que todos los ratones presentaron marcada balonización con afectación de numerosas células en la segunda y cuarta semanas de tratamiento. Los cuerpos acidófilos estuvieron presentes en el 83% de los casos de la segunda semana y el 33% de la cuarta semana. En algunas biopsias se encontró necrosis focal lobar y en ningún caso se observaron macrófagos pigmentados (Tabla 8 y Figura 10).



**Figura 10.** Imágenes representativas de cortes histológicos. Hallazgos relacionados con cambios degenerativos hepatocelulares. (A) Hígado de arquitectura conservada sin daño hepatocelular, perteneciente al grupo control. En las imágenes (B) Grupo control al que se le suministró GW3965, (C) Grupo EHNA y (D) Grupo EHNA tratado con GW3965, se observan hígados de arquitectura conservada con balonización marcada de los hepatocitos y presencia de cuerpos de mallory.

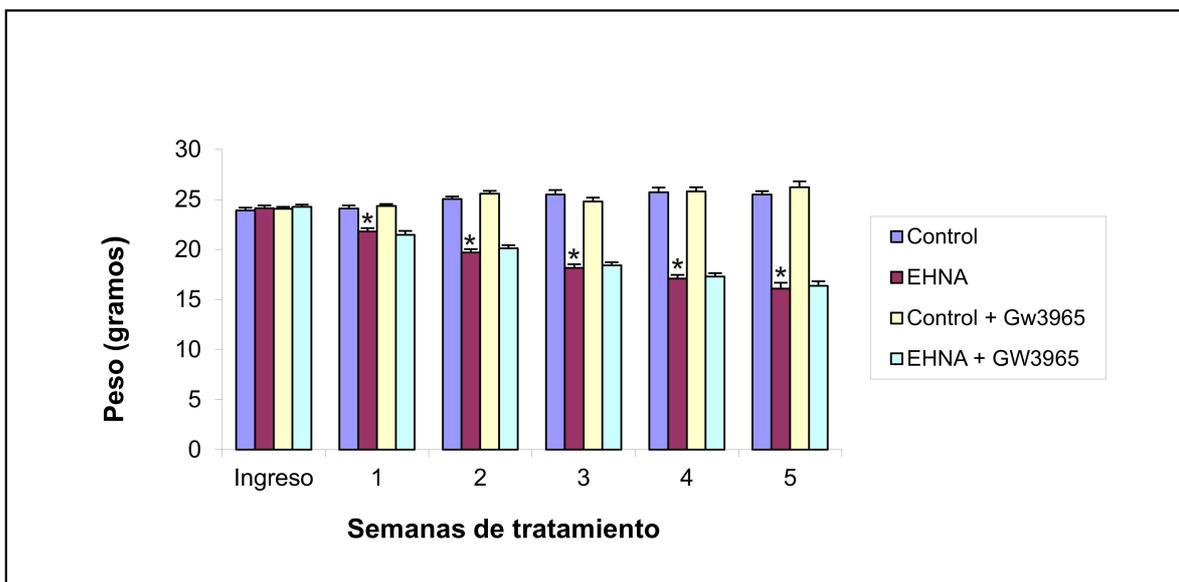
#### 4.1.5 Fibrosis

La coloración de tricrómico de Masson no demostró fibrosis en ninguna de las muestras estudiadas y para ninguno de los grupos considerados en el estudio.

#### 4.2 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre el peso corporal y la relación hepatosomática

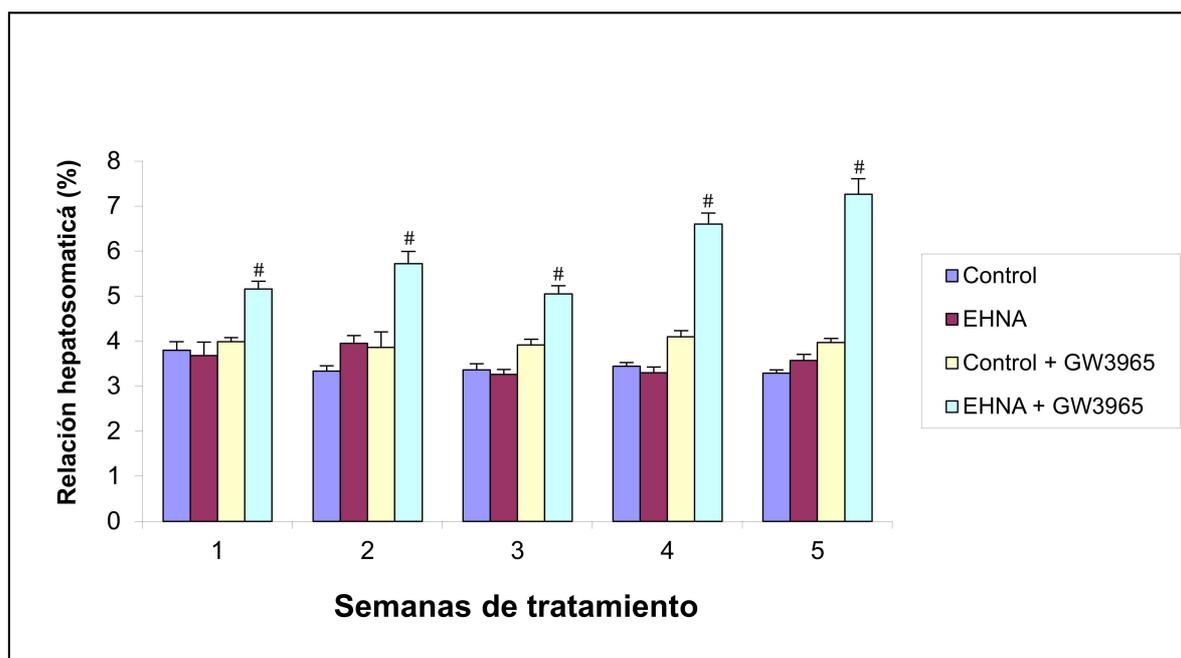
Tal y como queda reflejado en la Figura 11, se observó una disminución significativa del peso corporal desde el comienzo del estudio en los ratones del grupo EHNA, siendo dicha disminución progresiva a lo largo del tiempo considerado en el estudio (1ª semana: -9,6%; 2ª semana: -18,3%; 3ª semana: -24,6%; 4ª semana:

--29,1%; 5<sup>a</sup> semana: -33,1%). El tratamiento con GW3965 no modificó el peso corporal en los ratones control ni revirtió el efecto de la dieta MCD sobre dicho parámetro.



**Figura 11.** Evolución del peso corporal a lo largo del período de estudio en los distintos grupos experimentales. Valores medios  $\pm$  EEM; n=5 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control.

Respecto a la relación hepatosomática (Figura 12), no se observó modificación significativa en dicha relación en el grupo EHNA respecto al grupo control, si bien el tratamiento con GW3965 a ratones sometidos a la dieta MCD incrementó de manera progresiva la relación hepatosomática a lo largo del periodo de estudio (EHNA + GW3965 vs EHNA; 1<sup>a</sup> semana: +40%; 2<sup>a</sup> semana: +44,8%; 3<sup>a</sup> semana: +54%; 4<sup>a</sup> semana: +99%; 5<sup>a</sup> semana: +103%). En los animales sanos a los que se les administró el agonista, se observó un incremento progresivo y no significativo de la relación (control + GW3965 vs control; 1<sup>a</sup> semana: +0,19%; 2<sup>a</sup> semana: +15%; 3<sup>a</sup> semana: +16%; 4<sup>a</sup> semana: +18%; 5<sup>a</sup> semana: +20%)



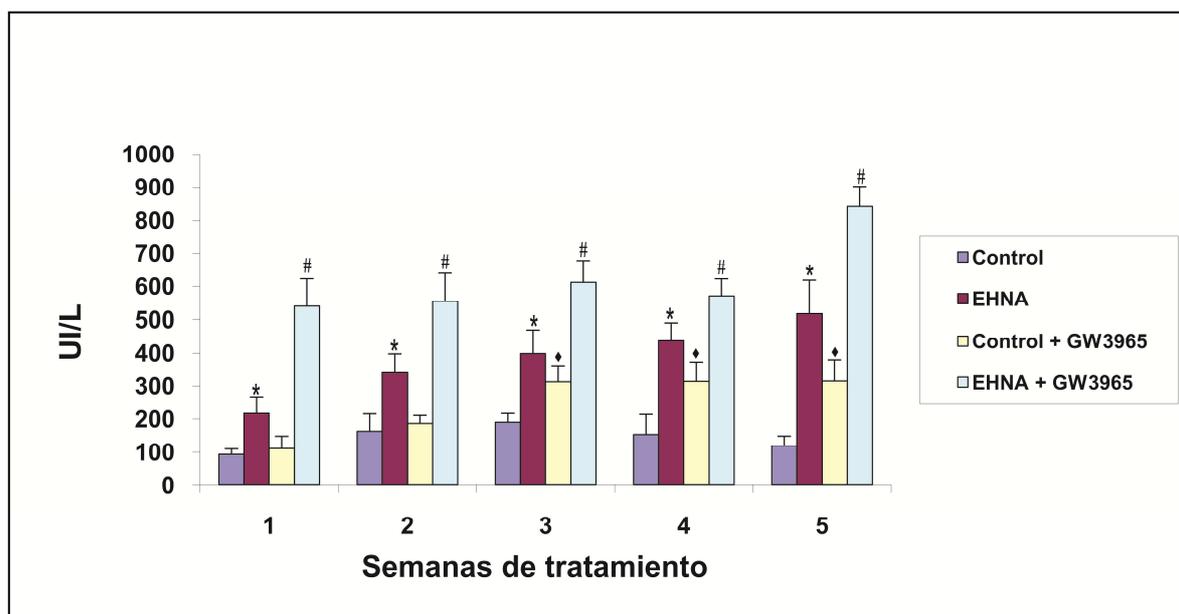
**Figura 12.** Relación hepatosomática. Valores medios  $\pm$  EEM;  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a Control; # $p<0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

#### 4.3 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre marcadores plasmáticos de daño hepático

Dentro de los marcadores de enfermedad hepática o hepatobiliar se encuentran diferentes enzimas que, a nivel general, pueden clasificarse en dos grandes grupos: el primero de ellos incluye a las enzimas aminotransferasas, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) que son indicadoras de daño celular hepático, y el segundo a las enzimas fosfatasa alcalina (ALP) y gamma glutamiltranspeptidasa (GGT) que indican obstrucción del sistema biliar, ya sea intrahepática o extrahepática. Debido a ello en el presente trabajo se estimó la integridad citosólica y la función hepatobiliar, a partir de la valoración de las concentraciones de AST, ALT y ALP, en los diferentes grupos de estudio.

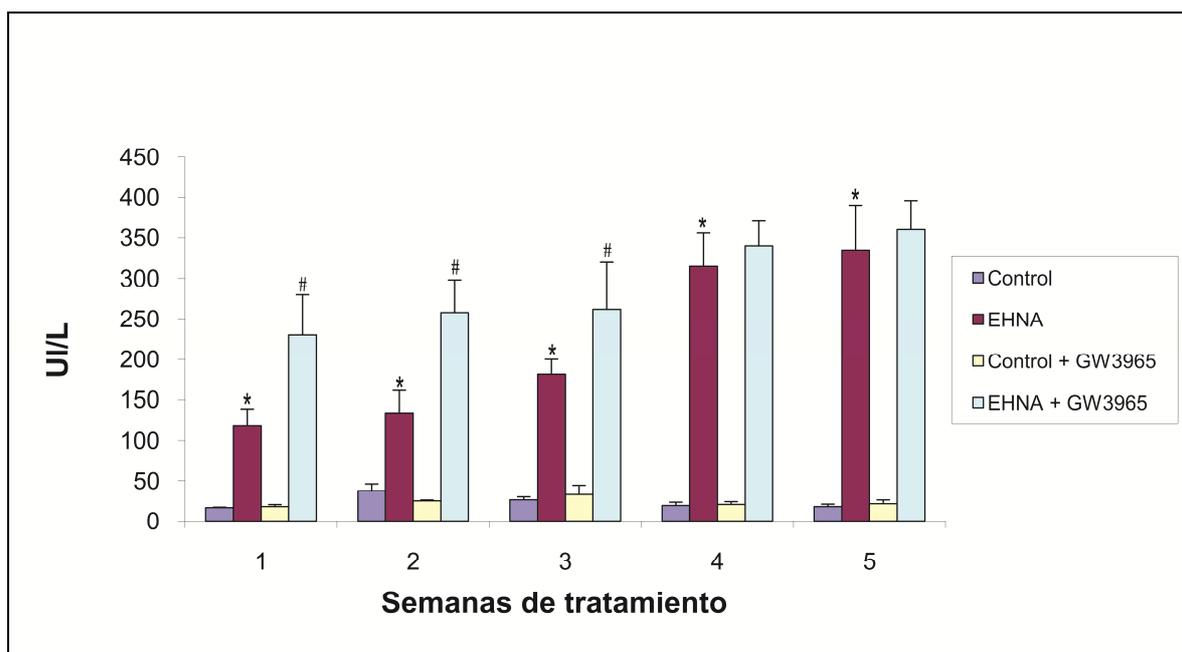
Los resultados de la presente investigación demuestran un incremento significativo de la actividad plasmática de AST en todas las semanas de estudio, en los ratones alimentados con la dieta MCD respecto a los ratones control (1<sup>a</sup> semana: +135%; 2<sup>a</sup> semana: +109%; 3<sup>a</sup> semana: +110%; 4<sup>a</sup> semana: +185%; 5<sup>a</sup> semana: +334%). El tratamiento con el agonista incrementó significativamente la actividad de AST en los animales control, a partir de la tercera semana de tratamiento

(control+GW3965 vs control; 3ª semana: +65%; 4ª semana: +105%; 5ª semana: +166%). En los ratones afectados de EHNA que recibieron el agonista, este incremento se hizo evidente durante todo el periodo de estudio (EHNA+GW3965 vs EHNA; 1ª semana: +148%; 2ª semana: +61%; 3ª semana: +53%; 4ª semana: +30%; 5ª semana: +62%) (Figura 13).



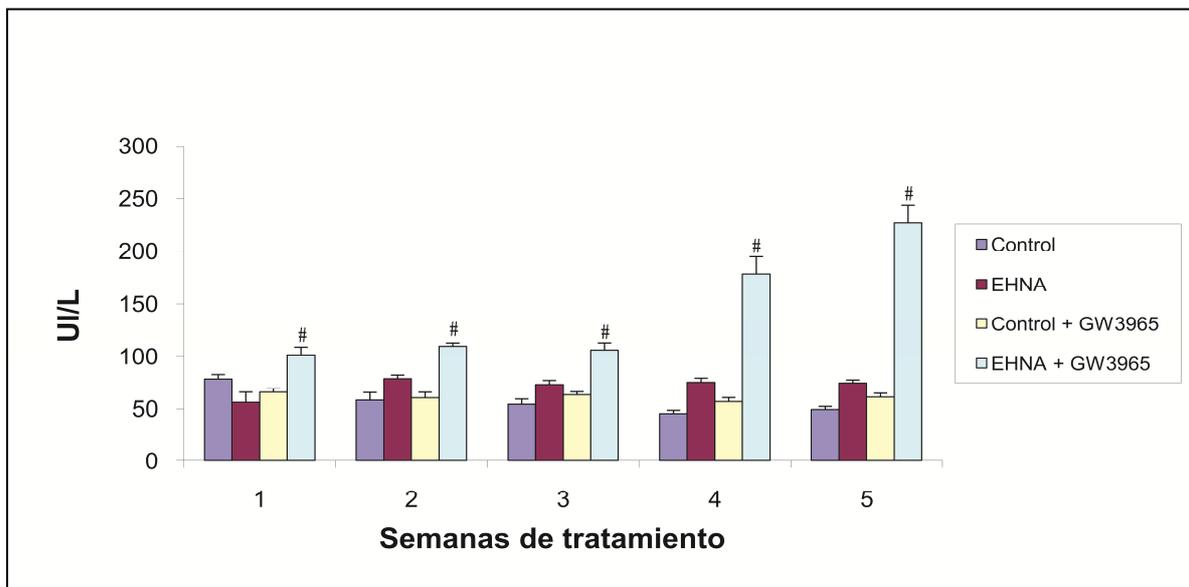
**Figura 13.** Actividad aspartato aminotransferasa plasmática. Valores medios  $\pm$  EEM; n=5 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control; #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA. ♦ p<0,005 control+GW3965 respecto a control.

La actividad de la ALT se incrementó de forma significativa en los animales del grupo EHNA con respecto al grupo control, desde la primera semana de estudio (1ª semana: +631%; 2ª semana: +259%; 3ª semana: +596%; 4ª semana: +1650%; 5ª semana: +1864%). El tratamiento con GW3965 no modificó la actividad ALT en los ratones control y la incrementó en los ratones del grupo EHNA en todas las semanas de seguimiento (EHNA + GW3965 vs EHNA; 1ª semana: +96%; 2ª semana: +93%; 3ª semana: +44%) (Figura 14).



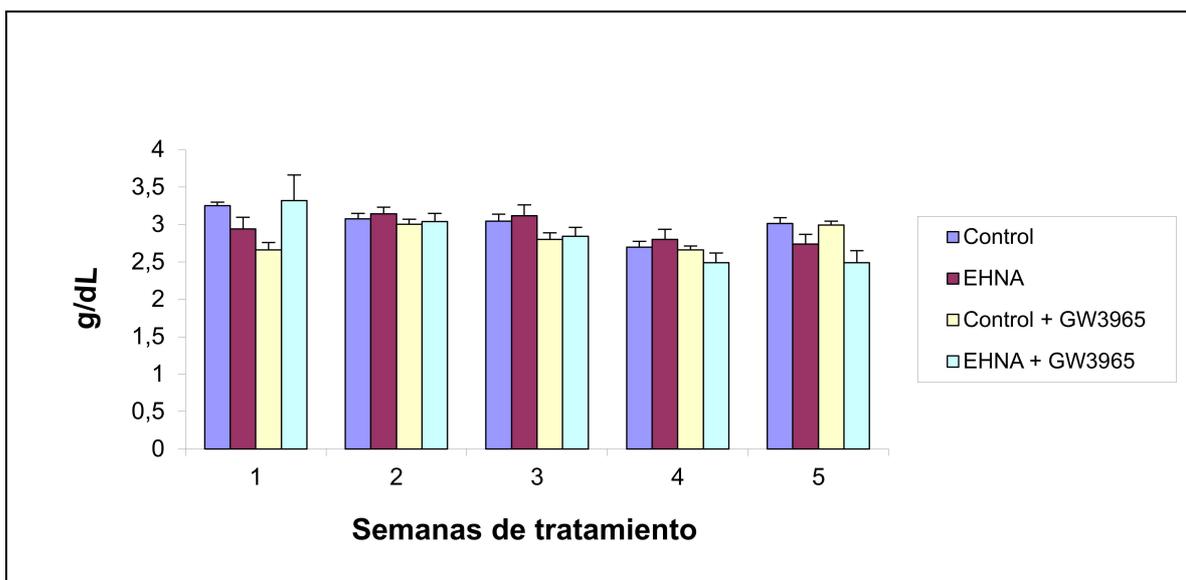
**Figura 14.** Actividad alanina aminotransferasa plasmática. Valores medios  $\pm$  EEM;  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a Control; # $p<0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

Nuestros resultados mostraron un incremento no significativo en la actividad de la ALP en el grupo EHNA a partir de la segunda semana de seguimiento (EHNA vs control; 2<sup>a</sup> semana: +35%; 3<sup>a</sup> semana: +34%; 4<sup>a</sup> semana: +66%; 5<sup>a</sup> semana: +51%). La administración del agonista no modificó la actividad de la enzima en los ratones control, si bien la incrementó significativamente en los animales del grupo EHNA ( $p=0,009$ ), en todas las semanas de tratamiento (EHNA + GW3965 vs EHNA; 1<sup>a</sup> semana: +80%; 2<sup>a</sup> semana: 39%; 3<sup>a</sup> semana: +45%; 4<sup>a</sup> semana: +138%; 5<sup>a</sup> semana +205%) (Figura 15).



**Figura 15.** Actividad fosfatasa alcalina plasmática. Valores medios  $\pm$  EEM; n=5 por grupo. #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

La albúmina es una proteína sintetizada de manera exclusiva por el hígado, por lo que es utilizada como índice de función hepática. Debido a su prolongada vida media (3 semanas), su concentración puede estar dentro de los rangos normales en casos de enfermedad hepática aguda y disminuir en enfermedad hepática crónica. En nuestro estudio, la concentración de albúmina plasmática no se modificó en ninguno de los grupos experimentales con o sin tratamiento con el agonista (Figura 16).

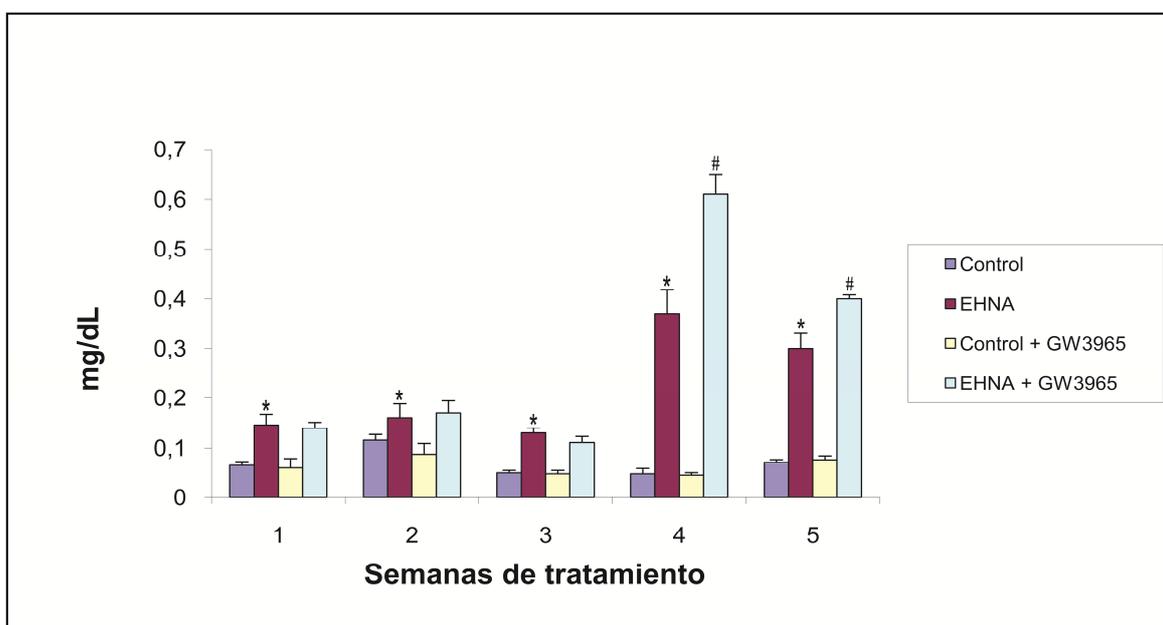


**Figura 16.** Concentración plasmática de albúmina. Valores medios  $\pm$  EEM; n=5 por grupo.

#### 4.4 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre marcadores plasmáticos de la función excretora y de detoxificación hepática

Una de las funciones desempeñadas por el hígado es la detoxificación y excreción de productos tóxicos endógenos y exógenos. La bilirrubina, producto final del catabolismo de la hemoglobina, es conjugada a nivel hepático y eliminada a través de los conductos hepatobiliares. Debido a ello se utiliza como marcador de procesos colestásicos.

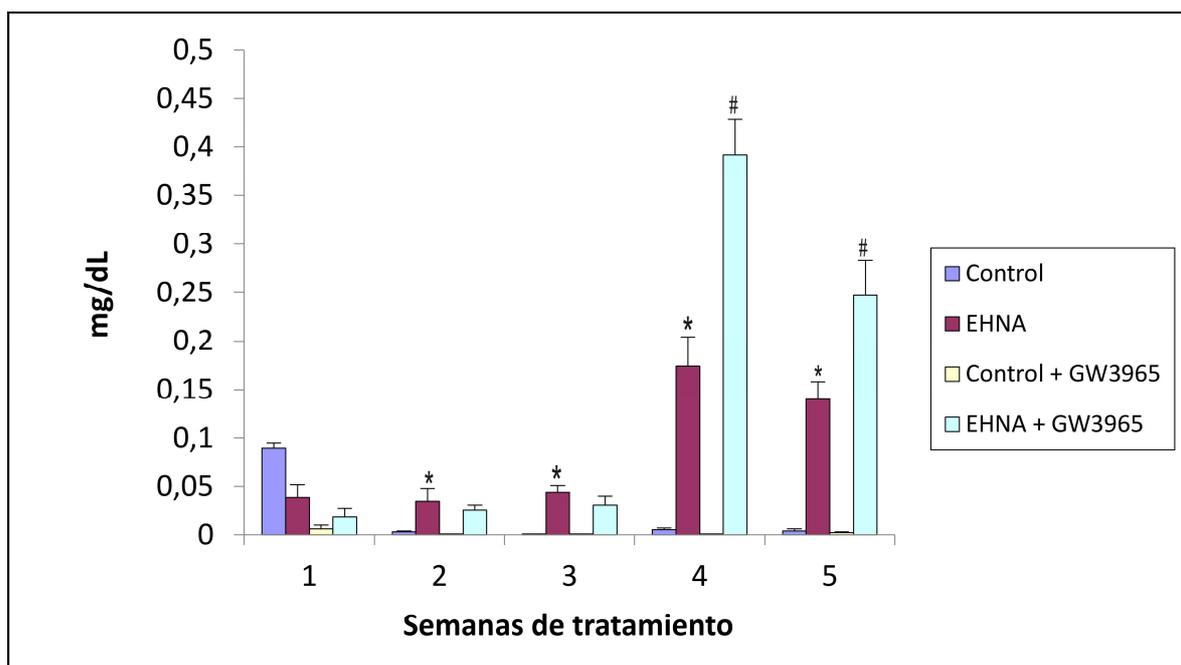
Como puede observarse en la Figura 17, en los ratones del grupo EHNA se incrementó la concentración plasmática de bilirrubina total con respecto a los ratones control desde la primera semana de estudio ( $p=0,013$ ). Este incremento fue más marcado en la cuarta y quinta semanas de seguimiento (EHNA + GW3965 vs EHNA; 4ª semana: +670%; 5ª semana: +316%). La administración del agonista GW3965 no modificó significativamente la concentración de bilirrubina total en el grupo control. Sin embargo, en los ratones del grupo de EHNA tratado con el agonista los valores de bilirrubina total se incrementaron significativamente en la última fase del tratamiento (EHNA + GW3965 vs EHNA; 4ª semana: +64%; 5ª semana: +33%).



**Figura 17.** Concentración plasmática de bilirrubina total. Valores medios  $\pm$  EEM;  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a Control. # $p<0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA

De forma similar a lo indicado con relación a la bilirrubina total, los ratones pertenecientes al grupo EHNA mostraron, a partir de la segunda semana, una

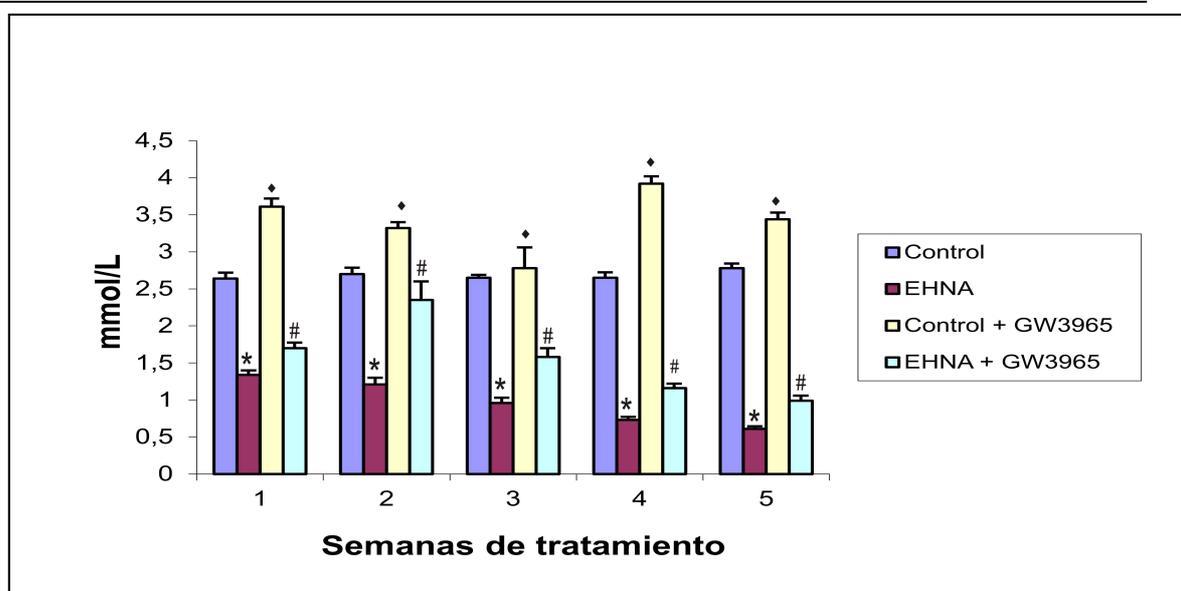
elevación muy marcada y significativa de la concentración plasmática de bilirrubina directa respecto a los ratones control (2ª semana: +1066%; 3ª semana: +4300%; 4ª semana: +3380%; 5ª semana: +3400%). El tratamiento con GW3965 no modificó la concentración de bilirrubina directa en los animales control. Por el contrario, en los ratones del grupo de EHNA dicho tratamiento originó un incremento significativo en las dos últimas semanas de estudio (EHNA + GW3965 vs EHNA; 4ª semana: +125%; 5ª semana: +76%) (Figura 18).



**Figura 18.** Concentración plasmática de bilirrubina directa. Valores medios  $\pm$  EEM; n=5 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

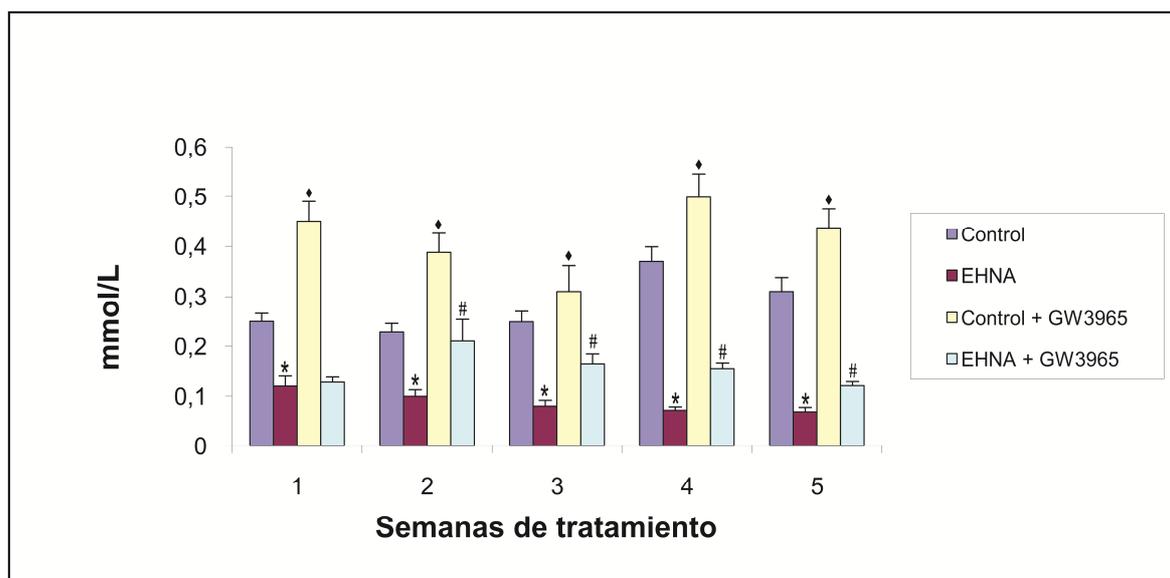
#### 4.5 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la concentración de lípidos sanguíneos

Como puede observarse en la Figura 19, en los ratones del grupo de EHNA se constató una disminución significativa de la concentración plasmática de colesterol, que se mantuvo a lo largo del estudio (EHNA vs Control; 1ª semana: -49,2%; 2ª semana: -55%; 3ª semana: -63%; 4ª semana: -72%; 5ª semana: -78%). La administración del agonista incrementó significativamente los niveles plasmáticos de colesterol total, en todas las semanas de estudio en los ratones control (control + GW3965 vs control: 1ª semana: +36%; 2ª semana: +22%; 3ª semana: +4,9%; 4ª semana: +47,9%, 5ª semana: +23%) y en los del grupo de EHNA (EHNA + GW3965 vs EHNA; 1ª semana: +26%; 2ª semana: +94%; 3ª semana: +64%; 4ª semana: +58%; 5ª semana: +62%).



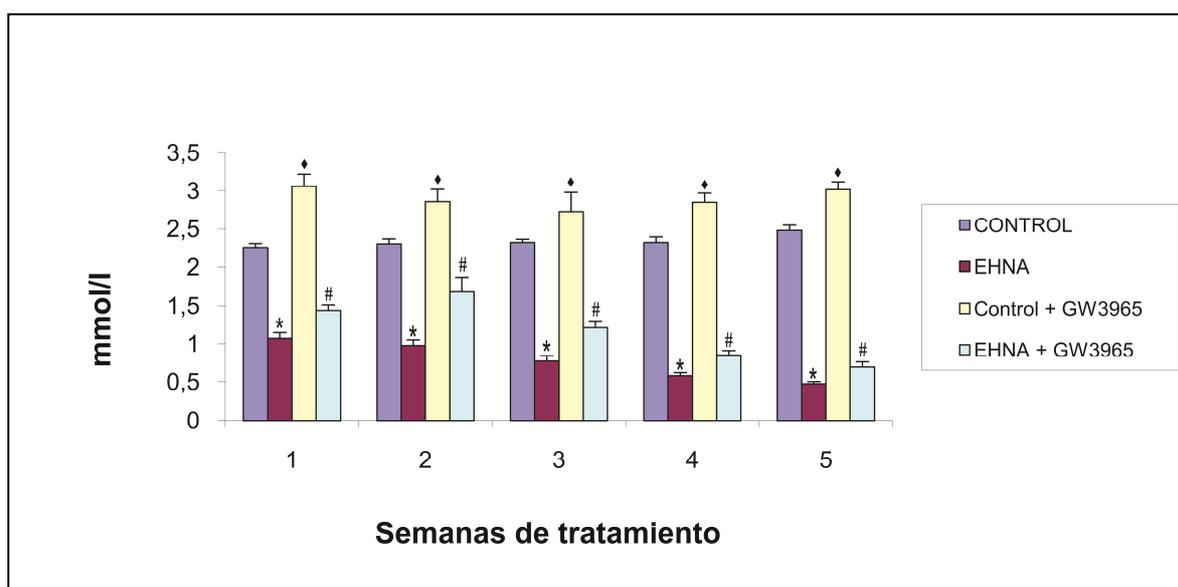
**Figura 19.** Concentración plasmática de colesterol total. Valores medios  $\pm$  EEM;  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a Control; # $p<0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA; ♦ $p<0,005$  control+GW3965 respecto a control.

Nuestros resultados muestran que en los ratones del grupo EHNA se inhibió significativamente la concentración de colesterol LDL (c-LDL) con respecto al grupo control, durante todas las semanas de estudio (1ª semana: -52%; 2ª semana: -56%; 3ª semana: -68%; 4ª semana: -81%; 5ª semana: -78%). La administración del agonista produjo un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de c-LDL en los ratones control y en los ratones del grupo de EHNA, que se manifestó en todas las semanas de tratamiento (control + GW3965 vs control; 1ª semana: +79%; 2ª semana: +68%; 3ª semana: +24%; 4ª semana: +34%; 5ª semana: +41%), (EHNA + GW3965 vs EHNA; 2ª semana: +110%; 3ª semana: +106%; 4ª semana: +122%) (Figura 20).



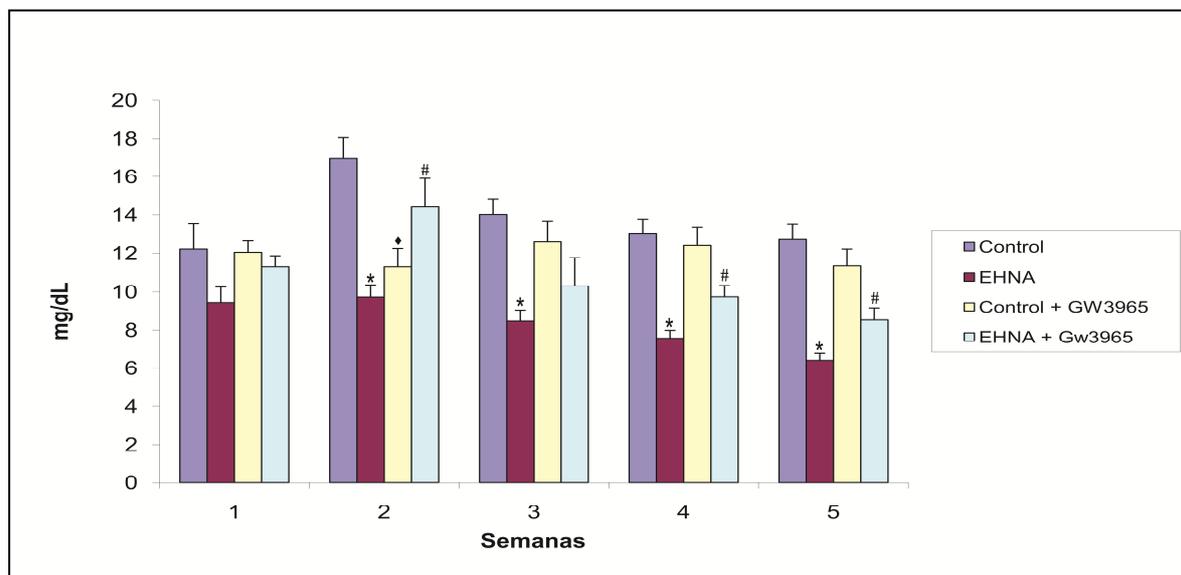
**Figura 20.** Concentración plasmática de colesterol LDL. Valores medios  $\pm$  EEM;  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a Control. # $p<0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA; ♦ $p<0,005$  control+GW3965 respecto a control.

A través de todo el estudio, los ratones del grupo EHNA mostraron una disminución significativa y progresiva en la concentración de c-HDL con respecto al grupo control (1ª semana: -52%; 2ª semana: -57%; 3ª semana: -66%; 4ª semana: -75%; 5ª semana: -81%). El tratamiento con el agonista incrementó significativamente, desde la primera semana de estudio, los niveles de c-HDL en el grupo control (control + GW3965 vs control; 1ª semana: +35%; 2ª semana: +24%; 3ª semana: +18%; 4ª semana: +22%; 5ª semana: +21%), y en los animales del grupo EHNA a los que se les administró el agonista (EHNA + GW3965 vs EHNA; 1ª semana: +34%; 2ª semana: +72%; 3ª semana: +56%; 4ª semana: +46%; 5ª semana: +46%) (Figura 21).



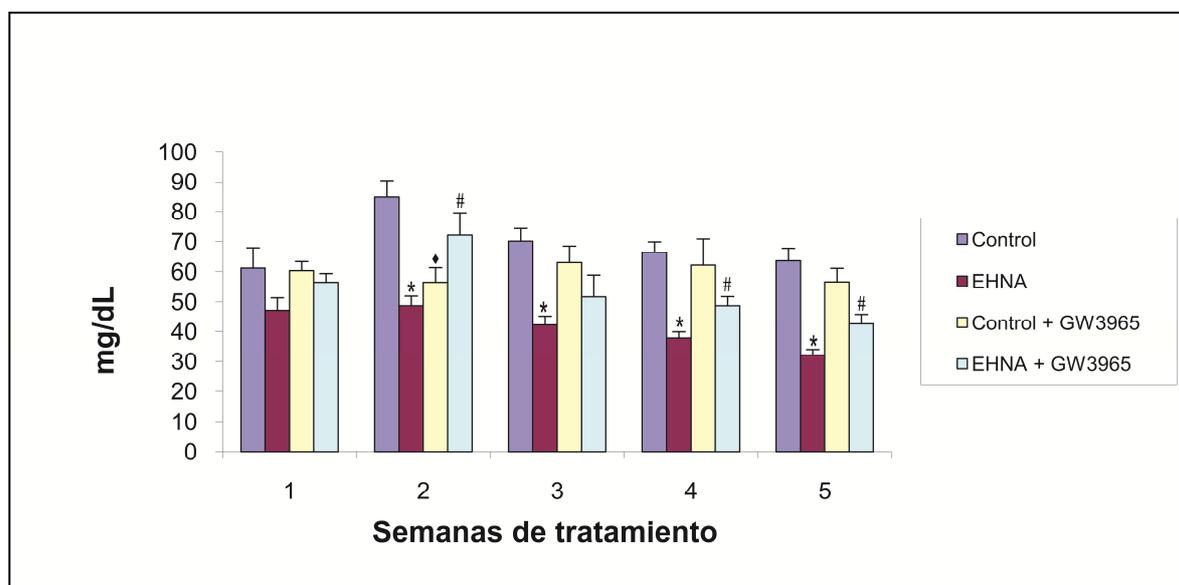
**Figura 21.** Concentración plasmática de colesterol HDL. Valores medios  $\pm$  EEM; n=5 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control; # $p < 0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA; ♦ $p < 0,005$  control+GW3965 respecto a control

Los ratones pertenecientes al grupo de EHNA disminuyeron de forma significativa la concentración de c-VLDL con respecto a los ratones control, a partir de la segunda semana de estudio (2ª semana: -42%; 3ª semana: -39%; 4ª semana: -33%; 5ª semana: -49%). El tratamiento con el agonista incrementó significativamente la concentración del c-VLDL en los ratones del grupo de EHNA en las semanas 2, 4 y 5 (EHNA + GW3965 vs EHNA; 2ª semana: +48%; 4ª semana: +29%; 5ª semana: +32%) y la disminuyó en los animales del grupo control en la segunda semana de seguimiento (control + GW3965 vs control; 2ª semana: -33,3%) (Figura 22).



**Figura 22.** Concentración plasmática de colesterol VLDL. Valores medios  $\pm$  EEM  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a Control; # $p<0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA; ♦ $p<0,005$  control+GW3965 respecto a control.

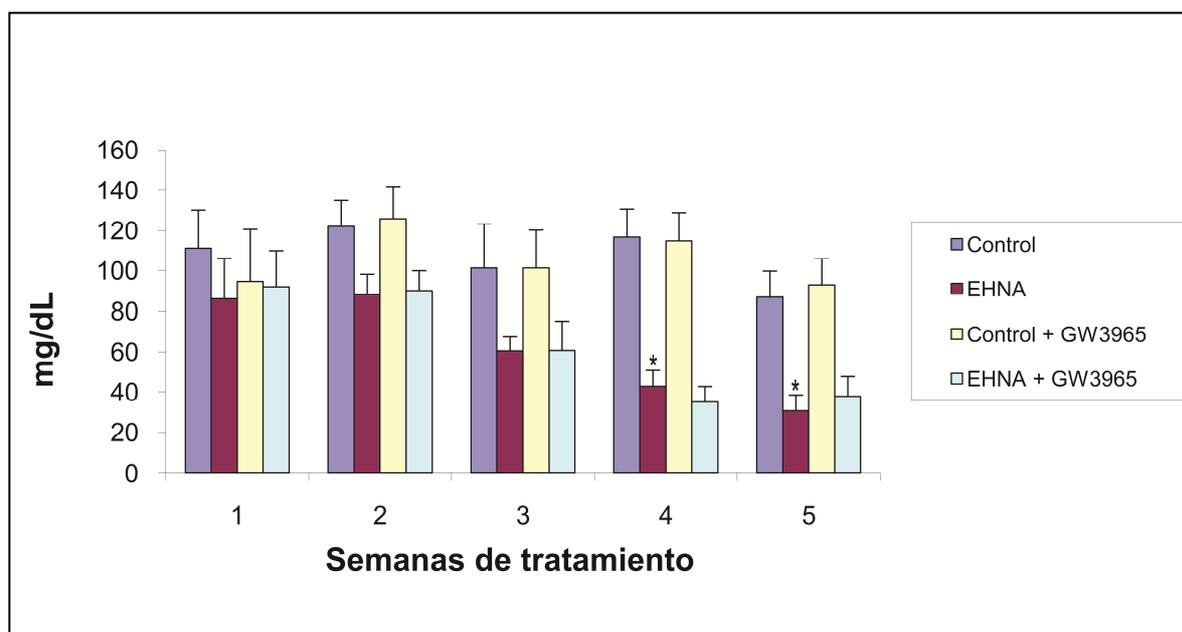
Siguiendo el comportamiento observado para el c-VLDL, nuestros resultados demuestran una disminución significativa de la concentración de triglicéridos en los ratones del grupo EHNA con respecto al grupo control, a partir de la segunda semana de estudio (2ª semana: -42,6%; 3ª semana: -39,8%, 4ª semana: -42,8%; 5ª semana: -49,5%). Así mismo, el tratamiento con el agonista incrementó significativamente la concentración de triglicéridos en el grupo EHNA en las semanas 2, 4 y 5 de experimentación (EHNA + GW3965; 1ª semana: +197%, 2ª semana: +48%, 3ª semana: +22%, 4ª semana: +28%; 5ª semana +32%) y la disminuyó en el grupo control en la segunda semana del estudio (2ª semana: -33%) (Figura 23).



**Figura 23.** Concentración plasmática de triglicéridos. Valores medios  $\pm$  EEM;  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a Control; # $p<0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA; ♦  $p<0,005$  control+GW3965 respecto a control.

#### 4.6 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la concentración de glucosa sanguínea

Con respecto al comportamiento de la glucosa, se observó una disminución de sus niveles, en los ratones del grupo de EHNA con respecto al grupo control (1<sup>a</sup> semana: -22,2%; 2<sup>a</sup> semana: -27%; 3<sup>a</sup> semana: -40%; 4<sup>a</sup> semana: -63%; 5<sup>a</sup> semana: -64%). La administración del agonista no modificó la concentración de glucosa en ninguno de los grupos de estudio (Figura 24).

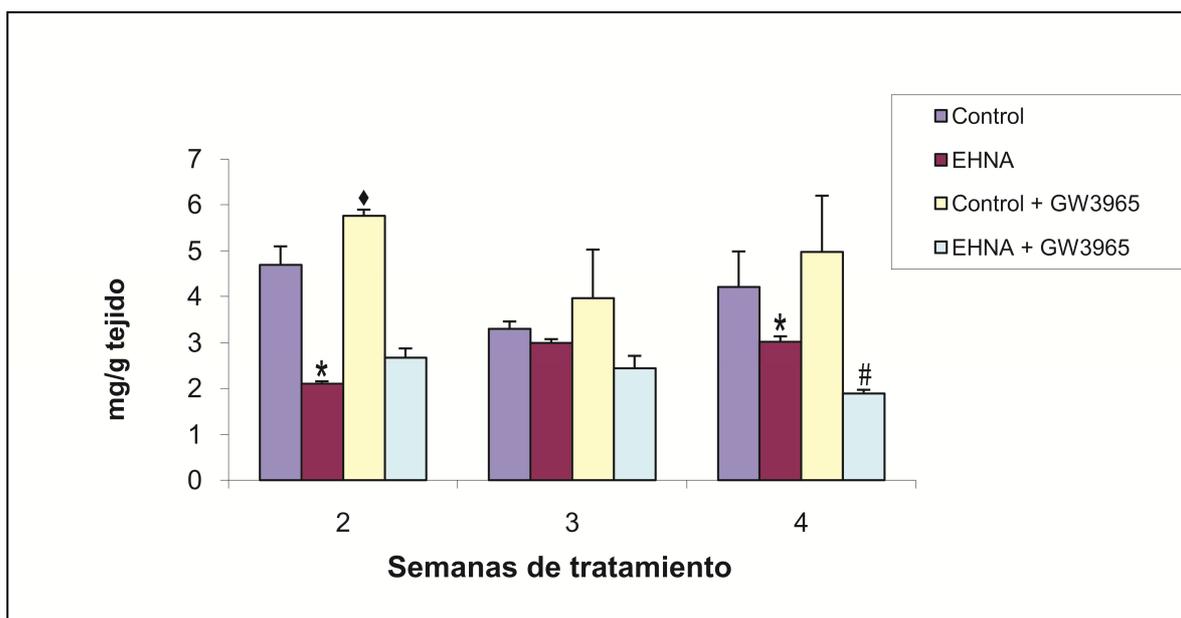


**Figura 24.** Concentración plasmática de glucosa. Valores medios  $\pm$  EEM;  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  EHNA respecto a control

#### 4.7 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre diversos parámetros bioquímicos hepáticos

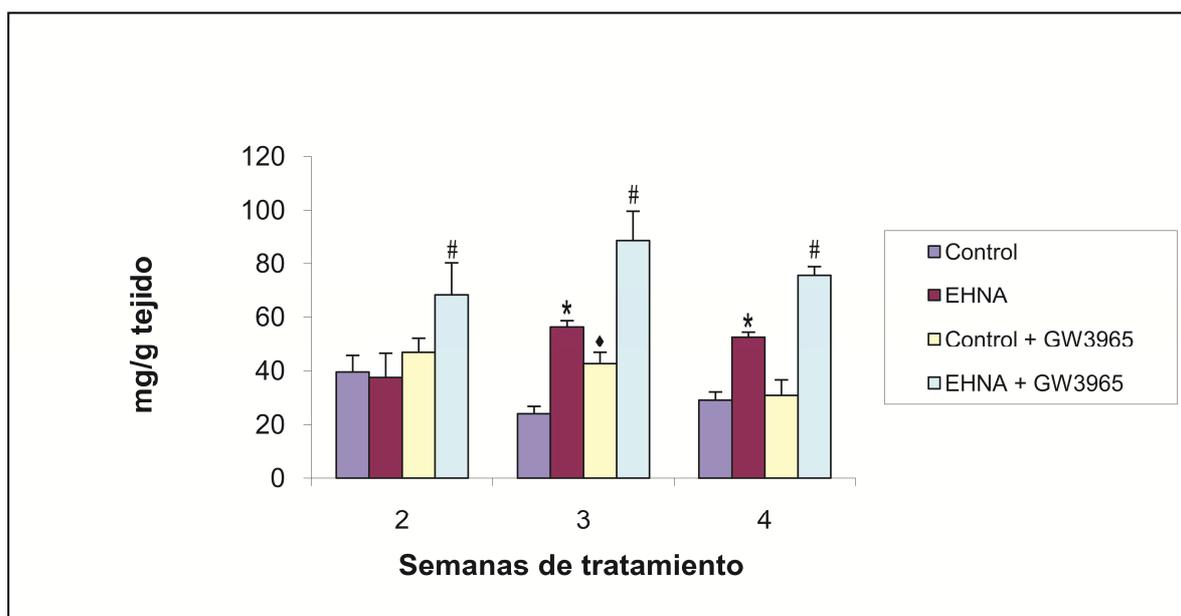
Las determinaciones de parámetros bioquímicos en tejido hepático se realizaron en muestras correspondientes a la segunda, tercera y cuarta semanas de tratamiento de los diferentes grupos de estudio. La elección de dichos periodos se basó en los resultados obtenidos en los parámetros bioquímicos sanguíneos.

Nuestros resultados mostraron disminución significativa en la concentración de colesterol total en los animales del grupo EHNA con respecto a los del grupo control (2ª semana: -55%; 4ª semana: -28%). La administración del agonista GW3965 incrementó la concentración de colesterol hepático en los ratones del grupo control (control + GW3965 vs control; 2ª semana: +22%; 3ª semana: +20%; 4ª semana: +16%) y la disminuyó en los del grupo EHNA a partir de la tercera semana de tratamiento (EHNA + GW3965 vs EHNA; 3ª semana: -19%; 4ª semana: -37%) (Figura 25).



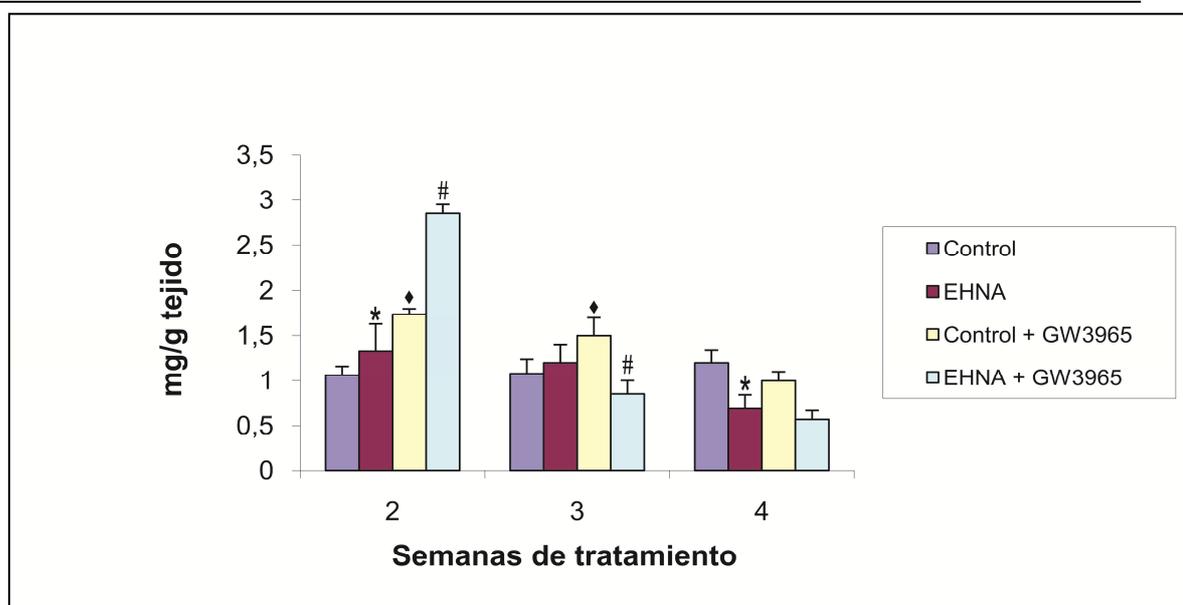
**Figura 25.** Concentración hepática de colesterol total. Valores medios  $\pm$  EEM; n=6 por grupo. \*p<0,05 respecto a Control; #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA; ♦p<0,05 Control+GW3965 respecto a Control.

Respecto a la concentración hepática de triglicéridos, se observó una inducción significativa en los ratones del grupo EHNA respecto a los controles, a partir de la tercera semana de seguimiento (3ª semana: +134%; 4ª semana: +79%). El tratamiento con el agonista aumentó de manera significativa la concentración de triglicéridos en los animales control (control + GW3965 vs control; 3ª semana: +77%) y en los EHNA (EHNA + GW3965 vs EHNA; 2ª semana: +80%; 3ª semana: +57%; 4ª semana: +43%) (Figura 26).



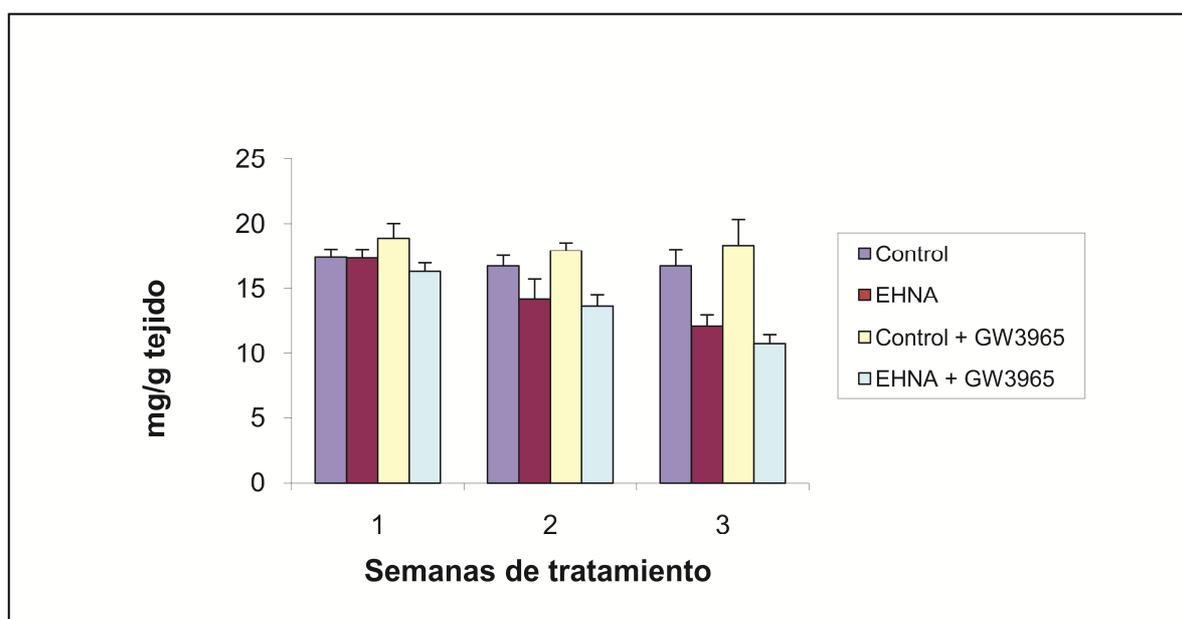
**Figura 26.** Concentración hepática de triglicéridos. Valores medios  $\pm$  EEM; n=6 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control. # $p < 0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA; † $p < 0,05$  Control+GW3965 respecto a Control.

Como se observa en la Figura 27, en los ratones que recibieron la dieta MCD, y en los sanos tratados con el agonista, se observó un descenso en los depósitos de glucógeno hepático en la cuarta semana de estudio (EHNA vs control; 4ª semana: -42%), (control + GW3965 vs control; 4ª semana: -16%). En los ratones con EHNA establecida a los que se les administró el agonista, se observó un descenso significativo de estos depósitos a partir de la tercera semana de estudio (EHNA + GW3965 vs EHNA; 3ª semana: -52%; 4ª semana: -17,39%).



**Figura 27.** Concentración hepática de glucógeno. Valores medios  $\pm$ EEM; n=6 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control. # $p < 0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA; † $p < 0,05$  Control+GW3965 respecto a Control.

Al analizar el comportamiento de la glucosa hepática, y como se observa en la Figura 28, en los grupos EHNA con y sin tratamiento con el agonista se observó una disminución no significativa en los niveles de glucosa durante todo el periodo de estudio (EHNA vs control; 2ª semana: -0,3%; 3ª semana: -15,6%; 4ª semana: -27%), (EHNA + GW3965 vs EHNA; 2ª semana: -5,8%; 3ª semana: -3,6%; 4ª semana: -10,6%). En los ratones sanos la administración del agonista incremento de forma no significativa las concentraciones de glucosa a nivel hepático (control + GW3965 vs control; 2ª semana: +8,5%; 3ª semana: +7,1%; 4ª semana: +9,4%).



**Figura 28.** Concentración hepática de glucosa. Valores medios  $\pm$  EEM; n=6 por grupo.

#### **4.8 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la expresión de genes lipogénicos y de respuesta inflamatoria**

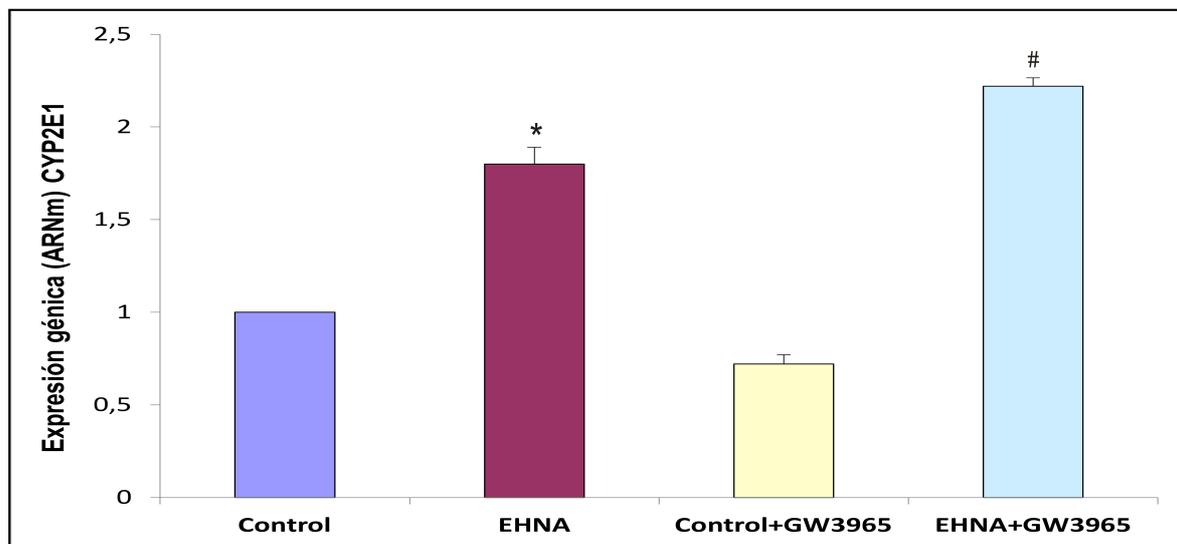
Las evidencias existentes en base a estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que la EHNA es un desorden inflamatorio en el que se activan vías de señalización que conducen a la liberación de moléculas pro-inflamatorias que median la inmunidad innata, y que cursa con alteraciones metabólicas que incrementan la expresión de genes lipogénicos. De igual manera, en los últimos años se ha comprobado que los agonistas sintéticos de los LXRs reducen los niveles de mediadores inflamatorios y regulan la respuesta inmune específica e inespecífica. Sin embargo, existe controversia sobre su capacidad para modular la lipogénesis hepática. Debido a ello, en el presente trabajo se consideró valorar el efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la expresión de los genes de respuesta inflamatoria CYP2E1, TNF- $\alpha$ , OPN, iNOS y COX-2 y de los genes lipogénicos LXR $\alpha$  y SREBP-1c.

El estudio de los principales genes de respuesta inflamatoria se realizó en muestras de tejido hepático correspondientes a la segunda semana de tratamiento de los diferentes grupos de estudio. La elección de dicho periodo se basó en investigaciones previas realizadas *in vivo*, que demuestran que la mayor expresión de dichos genes en la EHNA se presenta entre los días 3 y 12 de la enfermedad (Ogawa y cols., 2005; Quinet y cols., 2006; Yu y cols., 2006). Adicionalmente, en el caso de los genes lipogénicos se incluyó la cuarta semana de estudio, tomando como base estudios previos que indican que su expresión en diferentes modelos animales de EHNA es dependiente del tiempo de evolución de la enfermedad, siendo más relevante en los estadios tempranos de la patología que en los crónicos (Joseph y cols., 2002b; Ai y cols., 2011; Park y cols., 2011).

##### **4.8.1 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la expresión de genes de respuesta inflamatoria**

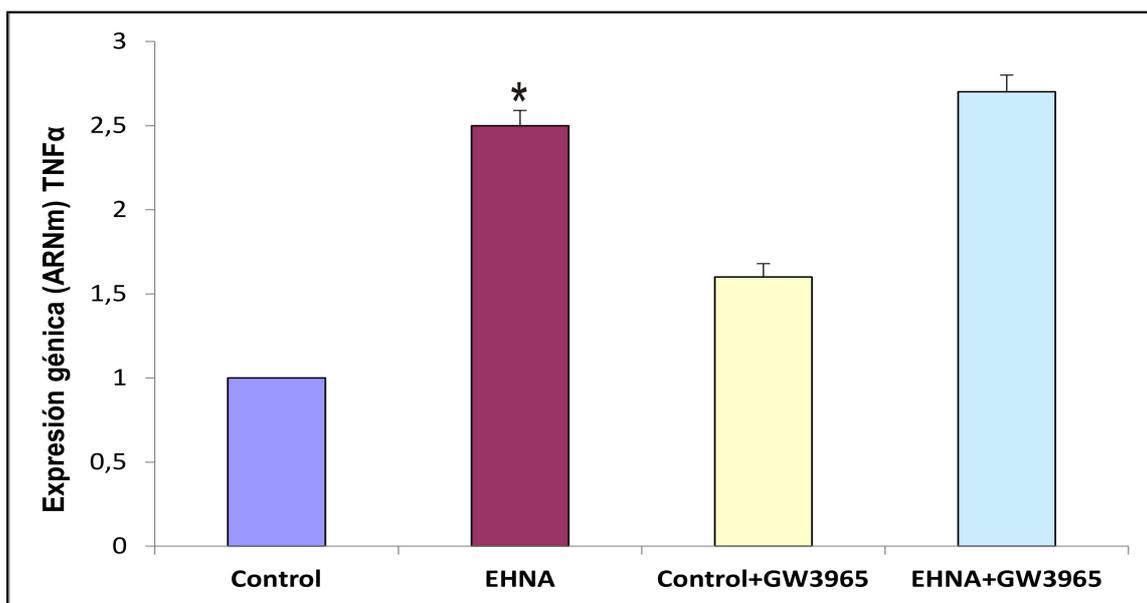
Uno de los mecanismos reconocidos en la patogenia de la EHNA es la sobreexpresión de los citocromos P450 (CYPs por sus siglas en inglés), y en particular de las subfamilias CYP2E1 y CYP4A. Nuestro modelo se comportó de acuerdo con este hallazgo, ya que se observó una mayor expresión del gen *CYP2E1* en los animales que recibieron la dieta MCD, con respecto al grupo control (+80%). Además,

la administración del agonista GW3965 incrementó la expresión de CYP2E1 en aquellos animales que estaban afectados de EHNA (+23%) (Figura 29).

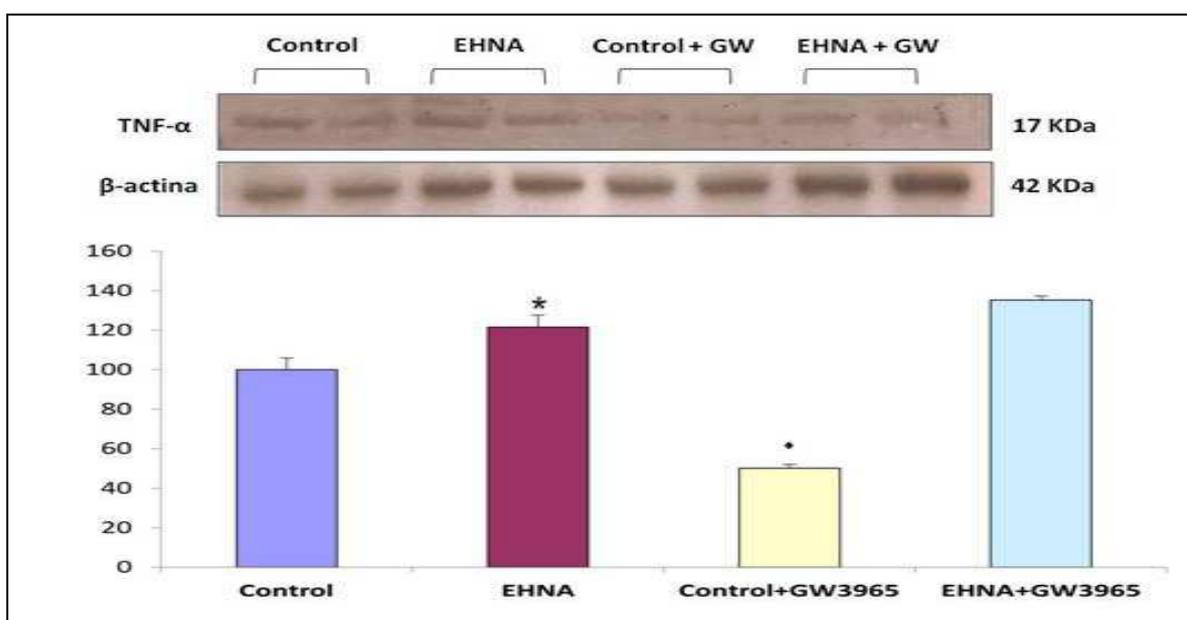


**Figura 29.** Expresión génica (ARNm) de *CYP2E1* en la segunda semana de tratamiento en los diferentes grupos de estudio. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control. # $p < 0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

Dentro de las características reconocidas de la etiopatogenia de la EHNA se encuentra el incremento de la expresión y de las concentraciones plasmáticas y hepáticas de las citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $TNF-\alpha$  y la osteopontina (OPN). Esta última se ha relacionado con la progresión hacia la fibrosis del HGNA (Syn y cols., 2012). En este estudio se constató el incremento significativo de la expresión génica (ARNm) de la citoquina  $TNF-\alpha$  en el modelo MCD (+150%, respecto a animales control) (Figura 30). Así mismo, se demostró un incremento de la concentración hepática de proteína  $TNF-\alpha$  en los animales afectados de EHNA (+22%, respecto a animales control) (Figura 31). El tratamiento con GW3965 redujo la expresión de  $TNF-\alpha$  en el grupo control respecto al no tratado, si bien dicha reducción solo se observó a nivel de proteína (-50%). En el caso del grupo EHNA tratado con el agonista se observó una ligera inducción de dicha proteína hepática el grupo EHNA, si bien no fue significativa (+11%) (Figura 31).

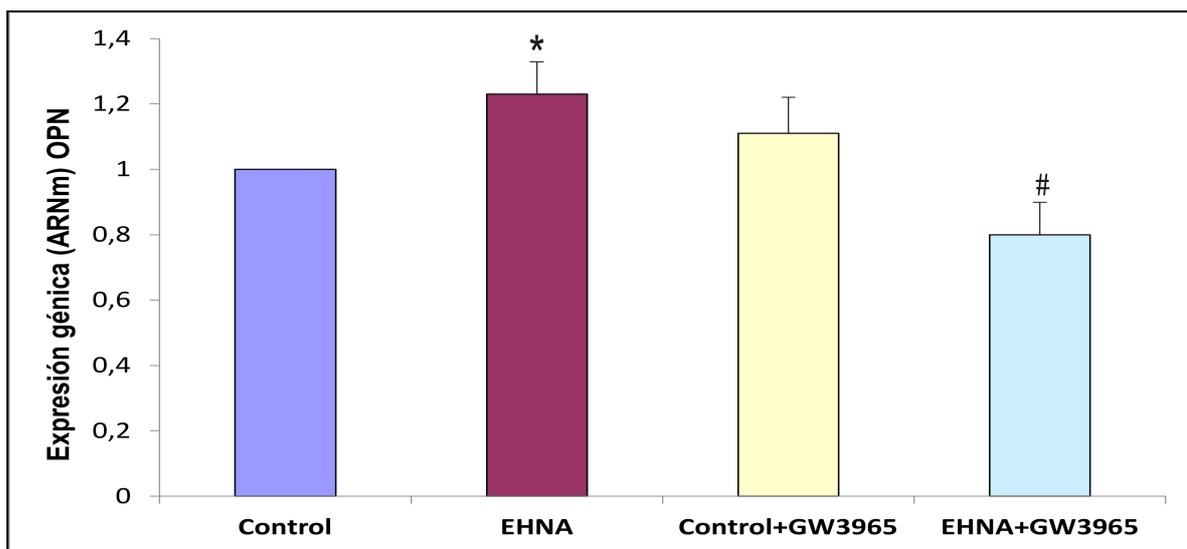


**Figura 30.** Expresión génica (ARNm) de *TNF- $\alpha$*  en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control.



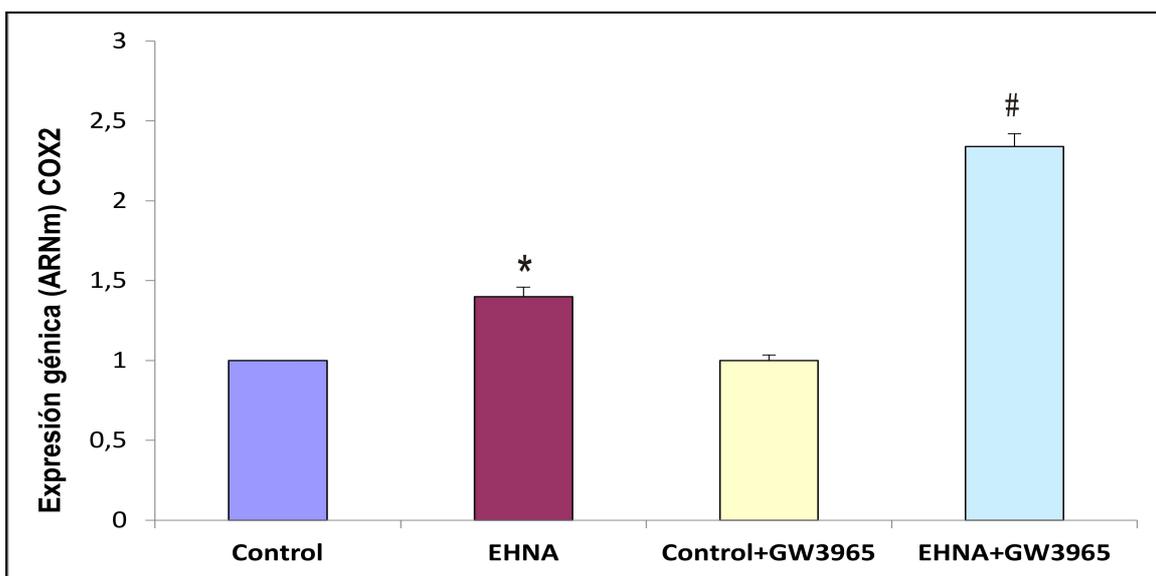
**Figura 31.** Concentración hepática de la proteína TNF- $\alpha$ . El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio. Los niveles de proteína fueron normalizados respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control (100%). Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control. ♦p<0,05 Control+GW3965 respecto a Control.

De manera similar a lo descrito para la citoquina TNF- $\alpha$ , el desarrollo de EHNA en los ratones tratados con la dieta MCD se acompañó de una inducción de la expresión génica (ARNm) de *OPN* respecto a los ratones control (+25%). El tratamiento de los animales con el agonista GW3965 disminuyó de forma significativa la expresión de *OPN* en los animales que recibieron la dieta deficiente en metionina y colina (-34%) (Figura 32).

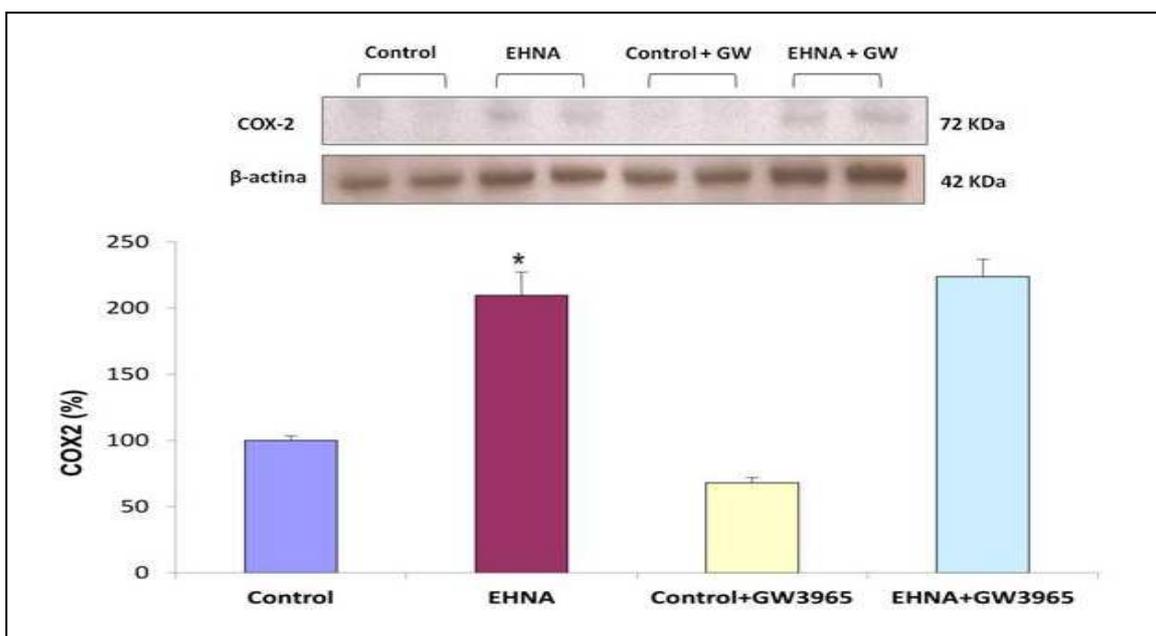


**Figura 32.** Expresión génica (ARNm) de *OPN* en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control. #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es una enzima que cataliza la conversión del ácido araquidónico a prostanoïdes y tromboxanos; algunos de estos productos tienen actividad pro-inflamatoria. En hepatocitos la COX-2 es rápidamente inducida por mediadores como TNF- $\alpha$  e IL-6, que se encuentran incrementados en el suero e hígado de pacientes con EHNA. De forma similar a lo observado para TNF- $\alpha$ , la expresión génica de COX-2 tanto a nivel de ARNm como de proteína se incrementó significativamente en los animales tratados con la dieta MCD (EHNA vs control; ARNm: +40%; Proteína: +109%) (Figuras 33 Y 34). El tratamiento de los ratones EHNA con el agonista incrementó la expresión de COX-2, de forma significativa en el caso de la concentración de ARNm (+14%). Sin embargo, la administración de GW3965 a ratones sanos disminuyó la concentración hepática de COX-2, si bien no fue una inhibición significativa (-32%) (Figura 34).



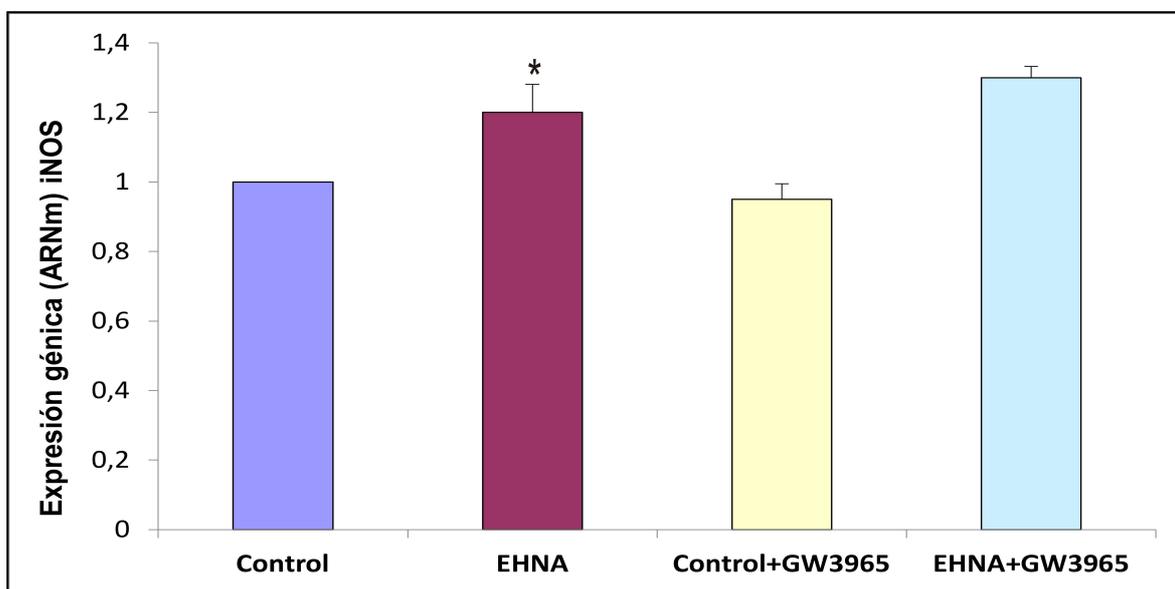
**Figura 33.** Expresión génica (ARNm) de COX-2 en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control. # $p < 0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA.



**Figura 34.** Concentración hepática de COX-2. El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio. Los niveles de proteína fueron normalizados respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control.

La enzima oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es una óxidorreductasa responsable de la síntesis del óxido nítrico (ON); su incremento se ha asociado con la patogénesis del modelo MCD. En nuestro estudio, la expresión génica de *iNOS* aumentó

en los ratones del grupo EHNA (+20%), mientras que el tratamiento con el agonista GW3965 no modificó la expresión de dicha enzima ni en animales control ni tratados con la dieta MCD (Figura 35).



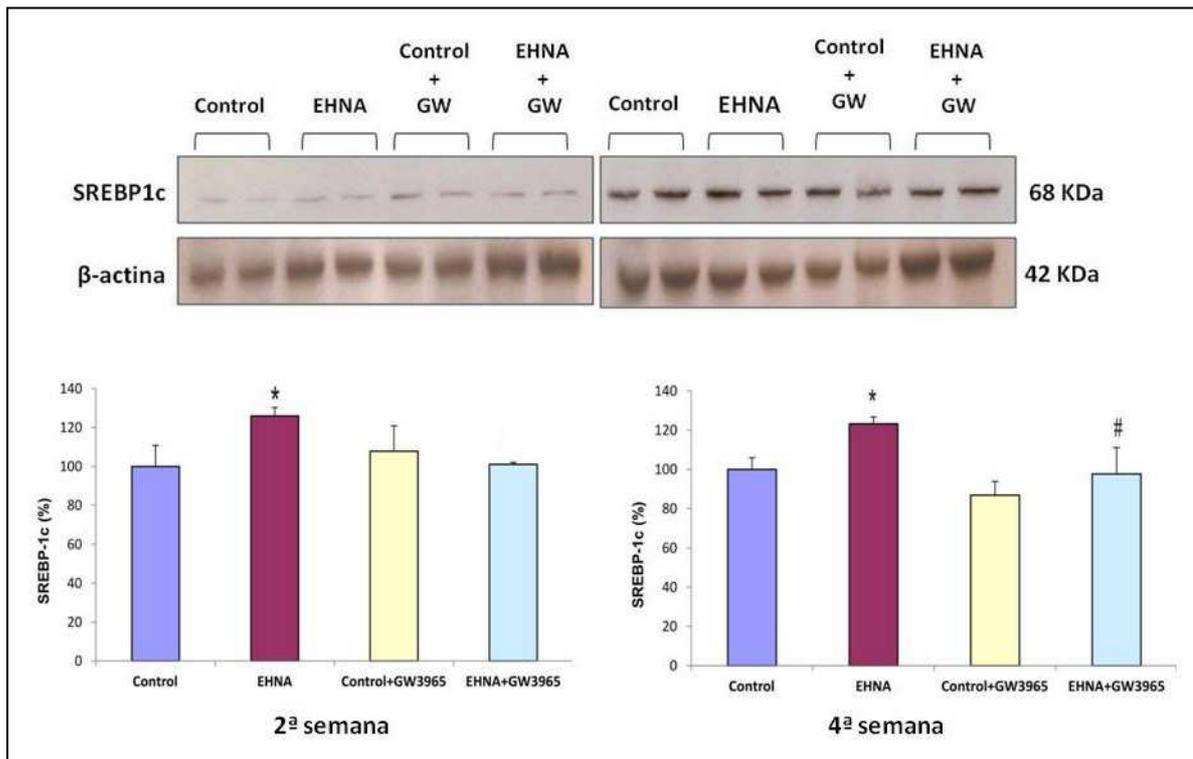
**Figura 35.** Expresión génica (ARNm) de *iNOS* en la segunda semana de tratamiento y en los diferentes grupos de estudio. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control.

#### 4.8.2 Efecto de la EHNA y del agonista GW3965 sobre la expresión de genes lipogénicos

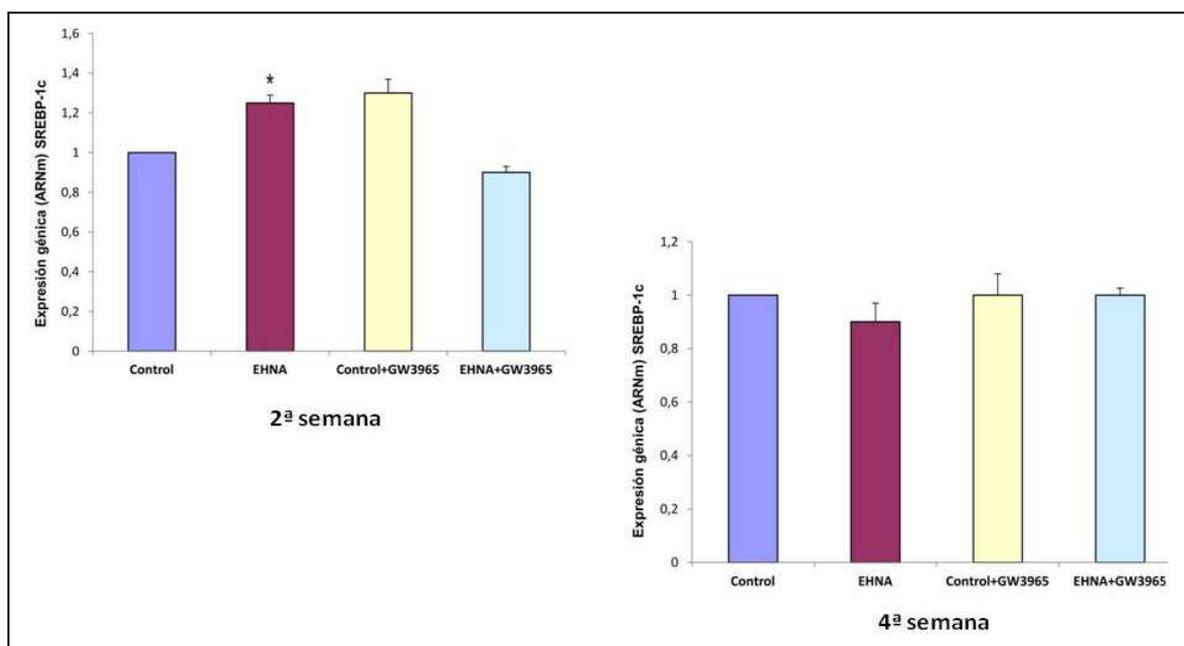
La proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), está conformada por una familia de factores de transcripción que regulan la homeostasis de los lípidos en las células animales. El incremento dependiente del tiempo en su isoforma SREBP-1c, que activa genes necesarios para la lipogénesis de *novo* y en especial para la síntesis de ácidos grasos libres, ha sido asociada con la esteatosis que se observa en diferentes modelos animales de EHNA. A su vez, los estudios sobre la regulación de SREBP-1c han demostrado que el receptor hepático LXR $\alpha$  es un fuerte activador del gen promotor *SREBP-1c* y que su concentración y expresión en la EHNA se incrementa de forma paralela con la de SREBP-1c (Ai y cols., 2011; Park y cols., 2011). Debido a ello, en el presente estudio se estudió la expresión génica de los genes *SREBP-1c* y *LXR- $\alpha$*  en los diferentes grupos experimentales.

Como se observa en las Figuras 36 y 37, el tratamiento de los ratones con la dieta MCD indujo a las dos semanas un incremento tanto de la concentración de ARNm como de proteína SREBP-1c (+25% para ambos parámetros) respecto a

ratones control, manteniéndose dicha inducción de la concentración de proteína a la cuarta semana del estudio (+23%, respecto a controles). Respecto al efecto del tratamiento sobre la sobreexpresión de SREBP-1c observada en ratones MCD, dicho tratamiento redujo dicha inducción hasta valores control, tanto en el caso del ARNm como de la proteína en la segunda semana de tratamiento (ARNm: -10%; proteína: -20%, respecto a EHNA), y en el caso de la proteína en la cuarta semana de tratamiento (-21%, respecto a EHNA) (Figura 36).

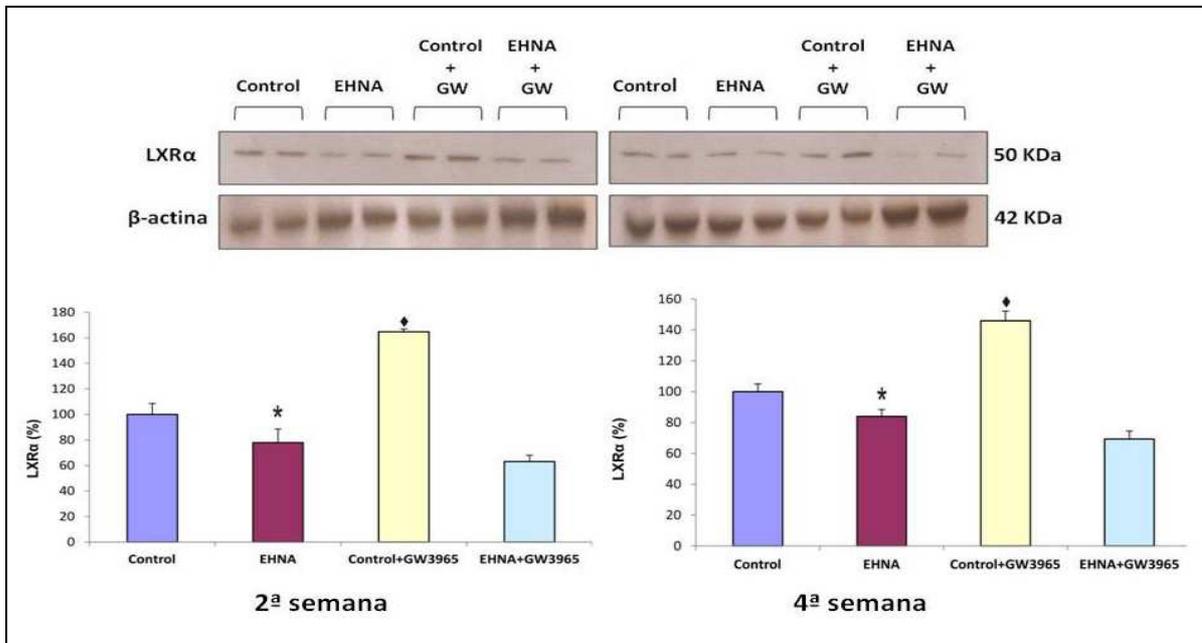


**Figura 36.** Concentración hepática de SREBP-1c. El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio. Los niveles de proteína fueron normalizados respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \* $p < 0,05$  EHNA respecto a Control. # $p < 0,05$  EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

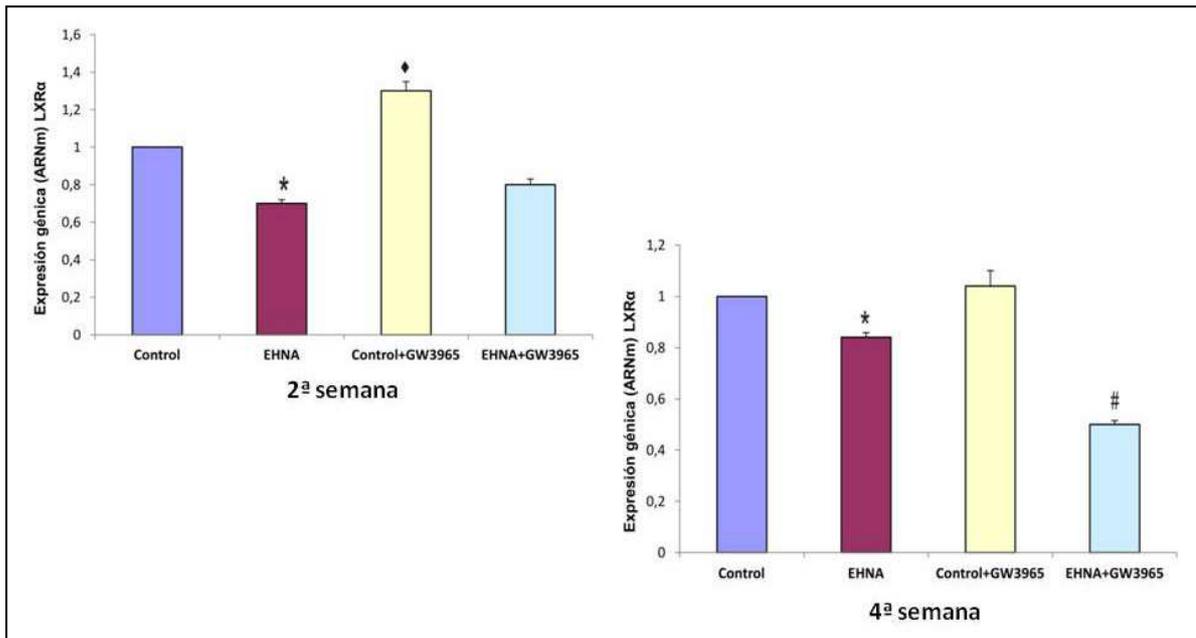


**Figura 37.** Expresión génica (ARNm) de *SREBP-1c* en los diferentes grupos de estudio. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control. #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA.

El análisis de los resultados obtenidos para el gen *LXR $\alpha$*  mostró que la expresión génica resultó significativamente inhibida en los ratones del grupo EHNA, con respecto a los del grupo control, durante las dos semanas de seguimiento, tanto a nivel de ARNm (2ª semana: -30%; 4ª semana: -16%) como de proteína (2ª semana: -22%; 4ª semana: -16%) (Figuras 38 y 39). Como cabía esperar, el tratamiento con GW3965 incrementó significativamente la expresión de *LXR $\alpha$*  en los animales del grupo control tanto a nivel de ARNm como de proteína, respecto a los animales no tratados (ARNm; 2ª semana: -30%; 4ª semana: -16 %; Proteína; 2ª semana: -22%; 4ª semana: -16% %). Sin embargo, en aquellos animales que presentaban EHNA establecida, el tratamiento con el agonista redujo la expresión de *LXR $\alpha$*  en ambas semanas consideradas en el estudio (ARNm; 2ª semana: -10%; 4ª semana: -34%; Proteína; 2ª semana: -14%; 4ª semana: -14%) (Figuras 38 y 39).



**Figura 38.** Concentración hepática de LXR $\alpha$ . El panel superior muestra Western Blots representativos de los diferentes grupos de estudio. Los niveles de proteína fueron normalizados respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control. ♦p<0,05 Control+GW3965 respecto a Control.



**Figura 39.** Expresión génica (ARNm) de LXR $\alpha$  en los diferentes grupos de estudio. Valores medios  $\pm$  E.E.M; n=6 por grupo. \*p<0,05 EHNA respecto a Control. #p<0,05 EHNA+GW3965 respecto a EHNA. ♦p<0,05 Control+GW3965 respecto a Control.

## **5. DISCUSIÓN**

## 5.1 Comprobación de la idoneidad del modelo de EHNA

Debido a que el presente estudio está orientado al esclarecimiento de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la EHNA mediante la utilización de un modelo animal de dicha patología, se consideró como un objetivo inicial la comprobación de que el modelo nutricional de EHNA elegido, la MCD, cumple las condiciones adecuadas que garanticen el desarrollo de una enfermedad hepática similar a la esteatohepatitis humana, descritas en el apartado correspondiente de antecedentes.

La deficiencia en metionina y colina ha sido bien documentada como modelo de EHNA. Diversos estudios demuestran que ratones C57BL/6 alimentados con la dieta MCD disminuyen significativamente su peso (hasta un 40% en 10 semanas), debido probablemente a un incremento en la tasa metabólica. Así mismo, el tamaño del hígado disminuye proporcionalmente con la pérdida del tejido adiposo blanco sin alterar la relación hepatosomática (Kirsch y cols., 2006; Leclercq y cols., 2007b; Yamazaki y cols., 2008; Hebbard y George, 2011). De manera similar, en nuestro estudio los ratones alimentados con la dieta MCD disminuyeron progresivamente de peso sin modificar la relación hepatosomática.

De igual manera, se reconoce que la dieta MCD induce rápidamente esteatohepatitis en roedores. En estudios previos llevados a cabo por distintos autores, los análisis histológicos muestran que estos animales desarrollan inflamación hepática (después de 3 días), esteatosis macrovesicular severa en la zona pericentral en 1-2 semanas, necroinflamación (después de 2 semanas) y balonización (después de 3 semanas), seguida por fibrosis pericelular y pericentral. El infiltrado hepático inflamatorio incluye linfocitos y polimorfonucleares neutrófilos (Rizki y cols., 2006; Yu y cols., 2007; Larter y cols., 2008b; Hebbard y George, 2011). De forma similar, en nuestro estudio los ratones alimentados con la dieta MCD desarrollaron esteatosis y moderada inflamación desde la segunda semana, con presencia de marcada balonización (desde la tercera semana), cuerpos acidófilos y cuerpos de Mallory. La ausencia de fibrosis en nuestro modelo, se debe muy probablemente, a que el tiempo transcurrido entre el inicio del estudio y el sacrificio de los animales no fue el suficiente para el desarrollo de la fibrogénesis (Nan y cols., 2009; 2010; Starkel y cols., 2011; Mu y cols., 2012; Min y cols., 2012).

Con respecto a los marcadores plasmáticos de daño hepático, el modelo MCD se caracteriza por el incremento de la actividad enzimática de las transaminasas y la ALP, sin alteración en los parámetros bioquímicos de cronicidad como la concentración plasmática de albúmina (Assy y cols., 2006; Kirsch y cols., 2006; Oz y cols., 2006; Giamfy y cols., 2008; Fisher y cols., 2010). De igual forma, en nuestro estudio el desarrollo de EHNA en los animales alimentados con la dieta MCD se acompañó por un incremento en las actividades de AST, ALT y ALP, sin modificación de las concentraciones plasmáticas de albúmina.

Los resultados de las pruebas bioquímicas relacionadas con detoxificación hepática en el grupo de EHNA mostraron un incremento de las concentraciones plasmáticas de bilirrubina total y directa, más marcado en la última fase del tratamiento. Este hallazgo coincide con lo indicado en ratones C57BL/6J alimentados con la dieta MCD por un periodo de dos semanas en los que aumentaron las concentraciones plasmáticas de bilirrubina total (Macfarlane y cols., 2011). Aunque no existe ningún estudio que indique que la dieta MCD por sí misma puede inducir colestasis, el incremento de ALP y bilirrubina observado en nuestra investigación corrobora la hipótesis planteada en estudios anteriores, en los que se indica que el incremento observado en los niveles plasmáticos de ALP y ácidos biliares en este modelo nutricional, puede ser consecuencia de la colestasis inducida por la compresión y obstrucción de los conductos biliares producida por la grasa acumulada en los hepatocitos a consecuencia de la deficiencia en metionina y colina (Giamfy y cols., 2008; 2009).

Desde hace algunos años se conocen los efectos que la privación de metionina y colina tiene sobre el metabolismo de los lípidos (Leclercq y cols., 2000; Ip y cols., 2003; Rizki y cols., 2006; Yu y cols., 2007; Larter y cols., 2008b; Rinella y cols., 2008). Estudios llevados a cabo en pacientes con EHNA y en modelos animales han evidenciado bajos niveles 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 EHNA. Esta deficiencia compromete la síntesis y secreción de las VLDL y conlleva a la disminución del aclaramiento de los triglicéridos con la concomitante reducción en los niveles circulantes y posterior acumulación en el hígado (Gambino y cols., 2007; Giamfy y cols., 2008; Fujita y cols., 2009; Fon Tacer y Rozman, 2011). La disminución en la concentración de las VLDL conlleva, así mismo,

la disminución en las concentraciones plasmáticas de c-HDL y c-LDL. Este hallazgo se corrobora con 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 la formación de las HDL originando cambios en la composición de las HDL3, y que las lipoproteínas de baja densidad se originan a partir del catabolismo de las VLDL en circulación (Patsch y cols. 1978; Taskinen y cols. 1981; Fujita y cols., 2009; Fon Tacer y Rozman, 2011; Nakajima y cols., 2011). De acuerdo con lo descrito anteriormente, en los ratones alimentados con la dieta MCD las concentraciones plasmáticas de c-total, c-HDL, c-VLDL, c-LDL y triglicéridos disminuyeron significativamente y se incrementaron las de triglicéridos hepáticos respecto a los controles.

En nuestro estudio, el grupo EHNA mostró una disminución de las concentraciones de glucosa sérica y hepática, y en las de glucógeno hepático, respecto al grupo control. Estos datos son coincidentes con estudios previos (Leclercq y cols., 2007b; Rinella y cols., 2008; Marcolini y cols., 2011), que indican una relativa hipoglucemia con un incremento de la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta MCD. Alternativamente, la producción hepática de glucosa en estos animales se limita como consecuencia de la caquexia y la disminución en los depósitos de glucógeno en el hígado producida por la inhibición de la glucogénesis propia de este modelo (Leclercq y cols., 2007).

Una vez establecido que el modelo utilizado desarrolló esteatosis e inflamación hepáticas, y con el fin de contribuir al esclarecimiento de los potenciales mecanismos por los cuales la dieta MCD las induce, examinamos los efectos que la deficiencia en metionina y colina tiene sobre la expresión de los genes lipogénicos SREBP-1c y LXR $\alpha$  y sobre genes involucrados en el proceso inflamatorio asociado al desarrollo de EHNA (CYP2E1, TNF- $\alpha$ , OPN, iNOS y COX-2).

En la actualidad se reconoce que la lipogénesis de *novo* (LDN) desempeña un papel importante en la acumulación de triglicéridos hepáticos observada en la EHNA. En el hígado, la LDN requiere la transcripción de genes lipogénicos que son estimulados por la insulina a través de la proteína 1c de unión a los elementos reguladores de esteroides (SREBP-1c), que a su vez es activada por el receptor

hepático LXR $\alpha$  (Marra y cols., 2008; Fon Tacer y Rozman, 2011; Korach-André y cols., 2011). Aunque está comprobado que en humanos la EHNA estimula la expresión de dichos genes (Tsukamoto y cols., 2008; Fon Tacer y cols., 2011), existe controversia con respecto al comportamiento de SREBP-1c y no se tienen datos sobre el perfil de expresión de LXR $\alpha$  en el modelo MCD. Estudios previos muestran que la privación de metionina y colina no estimula la expresión de genes lipogénicos en el hígado y que en algunos casos puede reprimir a SREBP-1c (Rinella y cols., 2008; Pickens y cols., 2009; Macfarlane y cols., 2011). Por el contrario, otras investigaciones indican la existencia de una inducción de SREBP-1c en ratones H-RXR $\alpha^{-/-}$  alimentados con la dieta MCD (Gyamfi y cols., 2009) y en ratas suplementadas con una combinación de dietas MCD y alta en grasa (Ota y cols., 2007). Dichos ensayos tienen en común que valoran la expresión del gen en una única semana de tratamiento (2, 4 u 8 semanas). Hasta la fecha, el primer trabajo que realiza un seguimiento en el tiempo de los cambios en la expresión génica de SREBP-1c en el modelo MCD es el realizado por Park y colaboradores, quienes observaron un considerable incremento en la expresión de SREBP-1c y de otros genes lipogénicos en la primera semana de tratamiento, y una disminución posterior, en la sexta semana de seguimiento. Dichos hallazgos les llevó a sugerir que el incremento en la lipogénesis de *novo* es un determinante importante en los estadios tempranos de la enfermedad, pero no en los crónicos (Park y cols., 2011). De manera similar, en nuestro estudio se observó un incremento tanto de la concentración de ARNm como de proteína de SREBP-1c en la segunda semana de tratamiento, con una posterior reducción del ARNm en la cuarta semana. Estos resultados sugieren que la expresión de este gen en ratones alimentados con la dieta MCD depende del periodo considerado en el establecimiento y evolución de dicha EHNA. De manera opuesta a lo indicado con SREBP-1c, en los ratones del grupo EHNA se observó una inhibición de la expresión génica de LXR $\alpha$  tanto a nivel de ARNm como de proteína. Este comportamiento podría sugerir que la represión del gen LXR $\alpha$  en este modelo actúa como un mecanismo compensatorio que busca frenar el incremento en la lipogénesis de *novo* inducida por SREBP1-c, atenuando así la esteatosis hepática originada por la deficiencia en metionina y colina.

En los últimos años, los investigadores han demostrado que la presencia de inflamación es uno de los principales hallazgos de la EHNA. Dentro de las señales inflamatorias hepáticas relacionadas con la EHNA en el hombre se encuentran el incremento en las citoquinas TNF- $\alpha$  y OPN, la sobreexpresión del citocromo CYP2E1 y

la inducción de las enzimas COX-2 e iNOS (Marra y cols., 2008; Syn y cols., 2009; Farrel y cols., 2012), características todas ellas que se encuentran presentes en la deficiencia en metionina y colina, como modelo nutricional de EHNA (Oz y cols., 2007; Jia y cols., 2012; Almonacid y cols., 2012). De manera similar, en nuestro estudio los ratones alimentados con la dieta MCD presentaron una expresión incrementada de los genes CYP2E1, TNF- $\alpha$ , OPN, COX-2 e iNOS en la segunda semana de seguimiento.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el modelo nutricional de EHNA, utilizado en el presente estudio, cursa con una alteración hepática progresiva en el tiempo y compatible con el desarrollo de esteatohepatitis, tal y como se deriva de los resultados bioquímicos, histológicos y moleculares obtenidos.

## **5.2 Efecto del agonista GW3965 sobre ratones C57BL/6J sanos**

Una vez comprobada la idoneidad del modelo de EHNA, y antes de administrar el agonista a ratones afectados de EHNA, se consideró necesario comprobar la acción del agonista GW3965 en ratones C57BL/6J sanos, con el fin de verificar si su administración origina alteraciones compatibles con EHNA.

Aunque no existen estudios sobre el efecto que la dosificación por un tiempo superior a dos semanas con GW3965 tiene sobre el peso y la relación hepatosomática de ratones C57BL/6J, nuestra población se comportó de manera similar a lo observado por Grefhorst y colaboradores, quienes demostraron que la administración por un periodo de 10 días de 0,03% (p/p) de este agonista a ratones C57BL/6J, aunque no afecta al peso de los animales, incrementa la relación hepatosomática de los mismos (Grefhorst y cols., 2005).

Los análisis histológicos no demostraron esteatosis, esteatohepatitis, inflamación, ni fibrosis en ninguno de los animales. Así mismo, se observó un incremento no significativo en las concentraciones hepáticas de colesterol y triglicéridos en los ratones C57BL/6J tratados con el agonista GW3965. Aunque varios estudios indican que la activación farmacológica de los receptores hepáticos LXR conduce a esteatosis hepática severa (Zhu y cols., 2009; Oosterveer y cols., 2010; Viennois y cols., 2012), existen evidencias contradictorias sobre la capacidad del

agonista GW3965 para inducir esteatosis y esteatohepatitis. Es así como ratones C57BL/6J tratados durante 3 días con este agonista no mostraron incremento en los depósitos hepáticos de colesterol y triglicéridos a ninguna de las dosis utilizadas (20-100 mg/kg/día) (Miao y cols., 2004). Por el contrario, estos mismos animales dosificados con 0,03% (p/p) de GW3965 por un periodo de tiempo más prolongado (10 días), quintuplicaron su contenido de triglicéridos en el hígado y desarrollaron esteatosis hepática severa (Grefhorst y cols., 2005). Estos resultados sugieren que la acción de GW3965 sobre la lipogénesis y la función hepática es dependiente de la dosis utilizada y el tiempo de administración. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios con diferentes dosis y tiempos que permitan clarificarlo.

En relación con el comportamiento de los marcadores plasmáticos de daño y detoxificación hepática, se observó que la administración del agonista a ratones C57BL/6J sanos no modificó los niveles de bilirrubina total y directa, ni la actividad enzimática de la ALT y ALP, pero incrementó la actividad plasmática de la AST. Existen pocos estudios que relacionen la acción del agonista GW3965 sobre marcadores de lesión y disfunción hepática. Se ha comprobado que el pre-tratamiento con 0,3 mg/kg de GW3965 atenúa el incremento en los niveles de ALT y bilirrubina total en ratas Wistar con endotoxemia experimental, y de AST y ALT en ratas con sepsis polimicrobiana inducida por ligamiento y punción cecal (Wang y cols., 2006; 2011). Estos resultados permitieron sugerir que la activación del receptor LXR $\alpha$  por el agonista GW3965 reduce el daño hepático propio de estas dos patologías. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos un aumento de la actividad de la AST en ratones sanos tratados con GW3965. Dado que, a diferencia de la ALT, la AST no es una enzima específica del hígado (Harrison, 2008), la presencia de niveles normales de ALT con incremento en los de AST, nos permite sugerir que el aumento de esta última podría no tener origen hepático y provenir de otros tejidos corporales, tales como el cardíaco, renal o musculoesquelético, donde se expresa la enzima en alta proporción (Treseler, 2003). Por ello parece necesaria la realización de estudios complementarios que aborden la acción del agonista GW3965 sobre diferentes órganos de ratones C57BL/6J.

Con respecto a la acción que la activación de los receptores hepáticos LXR tienen sobre el metabolismo lipídico, estudios realizados en diversos modelos murinos demuestran que su agonista sintético GW3965 es un potente inductor de la expresión

de la proteína transportadora del colesterol ABCA1, y por lo tanto estimula el transporte reverso del colesterol e incrementa significativamente las concentraciones de c-HDL y c-total en la circulación (Miao y cols., 2004; Grefhorst y cols., 2005; Brunham y cols., 2006; Naik y cols., 2006). De manera parecida, en nuestro estudio, en los ratones sanos que recibieron este agonista aumentaron los niveles de c-HDL y c-total en todas las semanas de tratamiento. Así mismo, aunque en la actualidad no hay publicaciones que indiquen el efecto del agonista sobre los niveles plasmáticos de c-LDL en ratones C57BL/6J, un estudio desarrollado en células hepáticas HepG2 humanas demostró que el tratamiento de las mismas con GW3965 inhibe la captación de las LDL a través de la reducción en la expresión hepática de su receptor LDLR, lo que afecta a su internalización y aclaramiento (Zelcer y cols., 2009). Esto podría explicar el incremento en los niveles séricos de c-LDL observado en los ratones del grupo control de nuestro estudio a quienes se les administró el agonista GW3965.

De la misma manera que para el c-LDL, por el momento no se posee información definitiva relacionada con el mecanismo de acción del agonista GW3965 sobre el metabolismo de las VLDL en modelos murinos, y los datos disponibles varían de acuerdo con la especie. En hámsters tratados con este agonista durante 7 días a dosis de 30 mg/kg/día y en ratones wild-type dosificados con diferentes concentraciones de GW3965 durante 3 días (5-50 mg/kg/día), se incrementaron las concentraciones de VLDL (Groot y cols., 2005; Quinet y cols., 2006). Mientras que, en ratones *Abca1* y ratones híbridos Sv129/C57BL/6 tratados con el agonista, no se modificaron las concentraciones de estas lipoproteínas (Bruham y cols., 2006, Quinet y cols., 2006). Sin embargo, en nuestros resultados se produce una disminución en las concentraciones séricas de c-VLDL en los ratones sanos tratados con el agonista GW3965. Aunque se ha demostrado que la inducción del receptor LXR $\alpha$ , producida por la ingesta de una dieta aterogénica, disminuye la concentración de VLDL y triglicéridos en ratones hembras C57BL/6 y ratones LXR $\alpha$ <sup>-/-</sup> (Korach y cols., 2009), no se conoce exactamente el mecanismo involucrado. Sin embargo, la disminución observada, en hepatocitos humanos tratados con GW3965 y en algunos modelos animales, de los niveles de diacil glicerol transferasa (DAGT2), enzima que juega un papel importante en el ensamble de los triglicéridos sintetizados de *novo* dentro de las VLDL (Yu y cols., 2005; Kotokorpi y cols., 2007), puede jugar un papel importante en la disminución en el c-VLDL observada en nuestro estudio. Ahora bien, son necesarios estudios complementarios que permitan dilucidarlo.

La inducción de hipertrigliceridemia por los agonistas de los LXR, incluyendo el GW3965, es controvertida y es una de las causas por la que aún no se utilizan como medicamentos antiaterogénicos. En estudios realizados en macrófagos y en ratones C57BL/6J, wild type y LDLR<sup>-/-</sup>, el tratamiento con GW3965 a diferentes dosis no afectó la concentración de triglicéridos plasmáticos (Miao y cols., 2004; Grefhorst y cols., 2005; Quinet y cols., 2006). Por el contrario, en hámsters y ratones apoE dosificados con el mismo agonista se desarrolló hipertrigliceridemia (Groot y cols., 2005; van der Hoorn y cols., 2011). Otros investigadores indican incrementos transitorios en dicho parámetro (Joseph y cols., 2002b). En nuestro estudio se observó una disminución en los niveles de triglicéridos plasmáticos en los ratones sanos tratados con el agonista. Estos resultados coinciden con lo observado en monos cynomolgus o cangrejeros (*Macaca fascicularis*) dosificados con 10 mg/kg de GW3965 por un periodo de 21 días (Groot y cols., 2005). La razón de este hallazgo no está totalmente establecida en la actualidad, pero podría explicarse por el secuestro de los ácidos grasos en el hígado (Miao y cols., 2004; Oosterveer y cols., 2010) o por la inducción de genes y proteínas lipolíticas demostrada en adipocitos humanos y murinos tratados con diferentes dosis del agonista GW3965 (Stenson y cols., 2011).

Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa plasmática y hepática ni en la concentración de glucógeno entre los ratones sanos con y sin tratamiento con GW3965. Estos hallazgos coinciden con lo indicado por otros autores quienes demostraron que los agonistas de LXR mejoran el control de la glicemia en modelos de roedores diabéticos, pero no afectan el metabolismo de la glucosa en animales normoglicémicos (Cao y cols. 2003; Laffitte y cols., 2003; Grefhorst y cols., 2005; Oosterveer y cols., 2010).

Los resultados obtenidos en los ensayos de expresión génica indican que de acuerdo con lo esperado, y teniendo en cuenta lo indicado en estudios anteriores, la inducción del receptor LXR $\alpha$  por el agonista GW3965 incrementa la expresión de los genes lipogénicos SREBP-1c y LXR- $\alpha$  (Laffitte y cols., 2003b; Miao y cols., 2004; Wang y cols., 2006; Naik y cols., 2006) y atenúa la de los genes inflamatorios CYP2E1, OPN, TNF $\alpha$ , COX-2 e iNOS (Joseph y cols., 2003; Ogawa y cols., 2005; Wang y cols., 2006). Así mismo, pudimos observar en nuestro estudio la existencia de una disminución progresiva de la expresión de los genes lipogénicos SREBP-1c y

LXR $\alpha$  a lo largo del periodo considerado, lo que contribuye a corroborar el planteamiento de que la expresión de dichos genes varía en el tiempo.

Todos los hallazgos encontrados nos permiten concluir que la administración del agonista GW3965 a ratones C57BL/6J sanos incrementa la síntesis de colesterol y de las lipoproteínas plasmáticas especializadas en su transporte HDL y LDL, a la vez que disminuye la de triglicéridos y sus lipoproteínas transportadoras, las VLDL. Así mismo, induce la expresión de genes lipogénicos y disminuye la de genes inflamatorios, sin favorecer el desarrollo de EHNA y preservando la arquitectura y funcionalidad hepáticas.

### **5.3 Efecto del agonista GW3965 sobre ratones C57BL/6J con dieta MCD afectados de EHNA**

Una vez comprobado que la administración del agonista GW3965 a ratones C57BL/6J sanos no genera en ellos cambios compatibles con esteatohepatitis, se procedió a estudiar los efectos de su aplicación en el modelo experimental de EHNA. Es de resaltar que en la actualidad no existen estudios que documenten la acción de este compuesto en modelos animales de esta enfermedad.

En el presente estudio, si bien la administración del agonista no evitó la pérdida de peso propia del modelo MCD, sí aumentó de manera muy marcada la relación hepatosomática en los ratones con EHNA a los que se les suministró. Este hallazgo es indicativo de un incremento en el peso del hígado de estos animales, propio de una lesión en el tejido hepático, y coincide con lo observado en ratones C57BL/6 tratados con 0,03% (p/p) de GW3965 por un periodo de 10 días (Grefhorst y cols., 2005).

Desde hace algunos años se conoce que los diversos cambios metabólicos asociados a la patogenia de la EHNA conducen a esteatosis hepática (Leclercq y cols., 2007b; Capeau 2008; Farrell y cols., 2012), y que roedores alimentados con una dieta MCD deficiente en metionina y colina desarrollan una grave esteatosis macrovesicular acompañada por reducción en el aclaramiento de los triglicéridos e incremento en sus depósitos hepáticos (Groot y cols., 2005; Kirsch y cols., 2006; Yamakazi y cols., 2008; Hebbard y George, 2011). Nuestros resultados muestran que la administración del

agonista GW3965 a ratones con EHNA acelera el desarrollo de la esteatosis, observándose ya esteatosis severa grado 3 en todos los individuos desde la segunda semana de tratamiento y un incremento significativo en la concentración de triglicéridos hepáticos durante todo el periodo de estudio. Aunque no se ha estudiado la acción de los agonistas de los receptores hepáticos LXR en modelos animales de EHNA, estos hallazgos coinciden con lo observado por otros autores los cuales demuestran que el agonista sintético GW3965 puede inducir lipogénesis hepática, incremento en los depósitos hepáticos de triglicéridos y esteatosis (Groot y cols., 2005; Grefhorst y cols., 2005).

Si bien la actividad antiinflamatoria de los receptores LXR ha sido descrita con anterioridad (Joseph y cols., 2003; Lund y cols., 2003; Blaschke y cols., 2006), en nuestro estudio los ratones del grupo EHNA que recibieron el agonista manifestaron mayor grado de inflamación que aquellos del mismo grupo que no lo recibieron, desde la segunda semana de tratamiento. Así mismo, un 50% de los animales tratados evolucionaron de inflamación lobulillar moderada en la segunda semana de estudio a grave en la cuarta, en contraste con los del grupo EHNA sin tratar en los que un 17% pasó de inflamación moderada en la segunda semana a leve en la cuarta. Estos hallazgos son similares a los encontrados en modelos de artritis reumatoide (Fontaine 2007; Asquith y cols., 2009, 2011; Morello 2009) y en células en células endoteliales tratadas con los agonistas sintéticos GW3965 y T0901317 (Morello y cols., 2009, Naito 2005), y se discuten a profundidad en este mismo documento, en el apartado correspondiente a la acción del agonista GW3965 sobre los marcadores de inflamación, en ratones afectados de EHNA.

Por otra parte, cuando comparamos con el grupo EHNA que no recibió el tratamiento, los ratones EHNA a los que se les administró el agonista presentaron un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de AST, ALT, ALP, bilirrubina total y bilirrubina directa, indicativos de lesión hepatocelular aguda y colestasis (Harrison 2008; Siegenthaler 2009), durante todo el periodo de seguimiento. Estos resultados, correlacionados con los hallazgos histopatológicos del estudio de las biopsias que mostraron inflamación lobulillar grave y cambios degenerativos hepatocelulares (esteatosis macro y microvesicular severa, balonización, cuerpos de Mallory y necrosis individual y lobar focal), demuestran que la administración del agonista GW3965 intensifica el daño hepático preexistente en la EHNA. Dichos

resultados plantean la necesidad de realizar estudios complementarios que indaguen sobre su potencial hepatotóxico antes de considerar su utilización en pacientes con hígado graso, esteatohepatitis, o lesión hepática de cualquier tipo.

En relación con el metabolismo de los lípidos, el tratamiento de los ratones del grupo EHNA con el agonista GW3965 incrementó de manera significativa las concentraciones de c-total, c-HDL, c-LDL, c-VLDL y triglicéridos, con respecto al grupo EHNA no tratado. Estos resultados demuestran que, a semejanza de lo observado en diversos modelos animales utilizados para el estudio del metabolismo lipídico, la aplicación de GW3965 a ratones C57BL/6J con deficiencia nutricional de metionina y colina, potencia el transporte reverso del colesterol (Brunham y cols., 2006; Naik y cols., 2006; Quinet y cols., 2006), disminuye la captación y aclaramiento de las LDL (Zelcer y cols., 2009; Calkin y Tontonoz, 2010) y puede favorecer la hipertrigliceridemia al estimular la secreción de los triglicéridos dentro de las VLDL (Zhu 2009). Sin embargo, la reducción observada en la expresión de los genes lipogénicos SRBP-1c y LXR $\alpha$  en este grupo experimental, muy probablemente como un mecanismo compensador ante la hipertrigliceridemia desarrollada, nos permite sugerir que el incremento en las concentraciones de triglicéridos no se produce a expensas de la lipogénesis de *novo*. Por ello, consideramos que son necesarios estudios complementarios que profundicen en la acción que tiene el agonista GW3965 sobre el metabolismo de los lípidos, en modelos animales de EHNA.

Con respecto a la acción de GW3965 sobre los niveles de glucosa (hepática y plasmática) y sobre los depósitos hepáticos de glucógeno, nuestro estudio demostró que desde el inicio del estudio el agonista acentuó la disminución de los depósitos de glucógeno y glucosa hepáticos, propias del modelo MCD, sin alterar sus concentraciones en plasma. Es probable que este comportamiento se origine, como han demostrado diversos investigadores, por la supresión por parte del agonista de genes que codifican para proteínas involucradas en la gluconeogénesis hepática, acompañada por la inducción en la expresión de la enzima glucoquinasa, que promueve la utilización hepática de la glucosa (Laffitte y cols. 2003; Mitro y cols., 2007; Dave y Kaul, 2010). Sin embargo, parecen necesarios estudios complementarios que permitan comprobarlo.

Los dos más importantes mecanismos reguladores del colesterol son la transcripción de los factores de transcripción SREBP-1c y LXR. Se sabe que en numerosos tipos de células, incluidos los hepatocitos, LXR activa a SREBP-1c mediante un mecanismo en el que los oxisteroles activan el heterodímero RXR/LXR, que a su vez induce la expresión del gen SREBP-1c a través de un elemento de respuesta LXRE localizado en su promotor proximal (Repa y cols., 2000; Fon Tacer y cols., 2011). Así mismo, se ha descrito un antagonismo bidireccional entre PPAR $\alpha$  y LXR $\alpha$  en macrófagos y hepatocitos. Estudios realizados *in vivo* en ratones C57BL/6J tratados con agonistas de PPAR y LXR entre los que se encuentran GW3965 y T0901317, demuestran que la activación de PPAR $\alpha$  puede suprimir la transcripción de SREBP-1c por inhibición de la formación del heterodímero LXR/RXR, mientras que la activación de LXR puede bloquear PPAR $\alpha$  mediante la inhibición de los heterodímeros PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  y la formación de heterodímeros PPAR $\alpha$ /LXR $\alpha$ . Los complejos PPAR $\alpha$ /LXR $\alpha$  no pueden unirse a PPRE o LXRE, interfiriendo así con la acción de PPAR y LXR y contribuyendo con la inhibición del sistema LXR-SREBP-1c (Ide y cols., 2003; Yoskihawa y cols., 2003; Colin y cols., 2008). De igual manera, modelos nutricionales de EHNA evidencian inhibición de PPAR $\alpha$ . Es así como ratas Sprague Dawley mantenidas con una dieta rica en grasa (Wang y cols., 2012; Zhao y cols., 2012b) y ratones C57BL/6J y Swiss Websters alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina, mostraron disminución en la expresión hepática de PPAR $\alpha$  (Donthamsetty y cols., 2008; Yamaguchi y cols., 2010). Adicionalmente, en nuestro estudio en los ratones del grupo EHNA se observó una inhibición de la expresión génica de LXR $\alpha$  tanto a nivel de ARNm como de proteína.

Con base en todo lo anterior, podemos plantear que la falla en la inducción de los genes lipogénicos LXR $\alpha$  y SREBP-1c en ratones EHNA dosificados con el agonista GW3965 observada en nuestro modelo, es producto del incremento en la represión de PPAR $\alpha$  ejercida por la activación de LXR $\alpha$  por el agonista GW3965. Represión que a su vez suprime la vía LXR-SREBP-1c. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios que permitan comprobarlo.

De forma equivalente con la inflamación encontrada en los estudios histopatológicos, en nuestro estudio se observó un incremento de la expresión de los genes de respuesta inflamatoria CYP2E1, TNF- $\alpha$  y COX-2, en los ratones EHNA a quienes se les suministró GW395. Estos hallazgos permiten indicar que este agonista

incrementa la respuesta inflamatoria en ratones afectados de EHNA, debido probablemente a que, como han descrito con anterioridad otros investigadores, la activación de los receptores LXR por agonistas endógenos o sintéticos incrementa el estrés oxidativo y la producción de EROs, y como consecuencia estimula vías de señalización de la inflamación en macrófagos humanos y en modelos murinos de artritis reumatoide (Fontaine 2007; Asquith y cols., 2009, 2011; Morello 2009). Así mismo, estudios realizados en células endoteliales demuestran que los agonistas sintéticos GW3965 y T0901317 pueden, sin activar los LXR, inducir la expresión de marcadores y mediadores de inflamación a través del incremento en la síntesis de oxysteroides, que a su vez estimulan vías de señalización inflamatorias y conducen a la sobreexpresión de moléculas de adhesión (ICAM1, VCAM1, SELE), citoquinas (IL-8, IL-1 $\alpha$ , CCLs y CXCLs), factores de transcripción (EGR1, FOS) y enzimas como la COX-2 (Morello y cols., 2009, Naito 2005) y a la subregulación de la eNOS (Naito 2005; Morello y cols., 2009). Como ya se indicó con anterioridad, el estrés oxidativo y la producción de EROs están implicados en la génesis de la EHNA, patología que a su vez cursa con un incremento de oxysteroides derivados de la oxidación de las lipoproteínas por las EROS (Bogdanova y cols., 2006; Buqué y cols., 2008; Rolo y cols., 2012). Por lo tanto, estos mecanismos podrían representar potenciales vías que conducen a la inflamación observada en los animales afectados de EHNA tratados con GW3965. En vista de los resultados obtenidos, sería recomendable realizar estudios complementarios con el fin de profundizar en los mecanismos involucrados en el efecto de este agonista sobre las diferentes vías de inflamación involucradas en la EHNA.

Todos los hallazgos encontrados nos permiten concluir que la administración del agonista GW3965 a ratones C57BL/6J afectados de EHNA acelera el desarrollo de la esteatosis y la inflamación e incrementa el daño hepático preexistente en la EHNA, a la vez que induce la expresión de genes inflamatorios y disminuye la de genes lipogénicos.

## **6. CONCLUSIONES**

### **6.1 Conclusión primera**

Los ratones C57BL/6J alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina (MCD), modelo nutricional de esteatohepatitis (EHNA) utilizado en el presente estudio, reproducen las principales características de la EHNA humana tales como la presencia de esteatosis e inflamación hepáticas, incremento en los marcadores de daño y destoxificación hepática, y mayor expresión del gen lipogénico SREBP-1c y de los de respuesta inflamatoria CYP2E1, TNF- $\alpha$ , OPN, COX-2 e iNOS.

### **6.2 Conclusión segunda**

La administración de GW3965, agonista sintético de los receptores X hepáticos, a ratones C57BL/6J sanos incrementa la síntesis de colesterol y de las lipoproteínas plasmáticas especializadas en su transporte HDL y LDL, a la vez que disminuye la de triglicéridos y sus lipoproteínas transportadoras, las VLDL. Así mismo, induce la expresión de genes lipogénicos y disminuye la de genes inflamatorios, sin favorecer el desarrollo de EHNA y preservando la arquitectura y funcionalidad hepáticas.

### **6.3 Conclusión tercera**

La administración del agonista GW3965 a ratones C57BL/6J afectados de EHNA induce la expresión de genes inflamatorios y disminuye la de genes lipogénicos, lo que podría en parte estar relacionado con la aceleración del proceso de esteatosis y el incremento en la inflamación y en el daño hepático preexistente en la EHNA.

### **6.4. Conclusión final**

Los resultados obtenidos parecen indicar que los receptores hepáticos LXR median vías que podrían exacerbar la inflamación, la esteatosis y el daño hepático característicos de la EHNA.

## **7. BIBLIOGRÁFÍA**

Abel T, Fehér J, Dinya E, Eldin MG, Kovács A. Safety and efficacy of combined ezetimibe/simvastatin treatment and simvastatin monotherapy in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit.* 2009; 15:MS6-MS11.

Abdelmalek MF, Sanderson SO. Betaine for treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2006; 44:200A.

Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ.* 2005a; 172: 899-905.

Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005b; 129: 113–121.

Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med.* 2005c; 22:1129–1133.

Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol.* 2007; 17:863-869.

Adams LA, Waters OR, Knuiaman MW, Elliott RR, Olynyk JK. NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study. *Am. J. Gastroenterol.* 2009; 104: 861–867.

Adler M, Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med.* 1979; 67: 811-816.

Ahmed MH, Byrne CD. Non-alcoholic steatohepatitis. In: Byrne CD., Wild SH eds. *Metabolic Syndrome.* 1<sup>a</sup> ed. England; John Wiley & Sons; 2005. P. 279-305.

Ai ZL, Zhu CH, Min M, Wang J, Lan CH, Fan LL, Sun WJ, Chen DF. The role of hepatic liver X receptor  $\alpha$ - and sterol regulatory element binding protein-1c-mediated lipid disorder in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Int Med Res.* 2011; 39: 1219-1229.

Akiyama T, Yoneda M, Inamori M, Iida H, Endo H, Hosono K, Yoneda K, Fujita K, Koide T, Tokoro C, Takahashi H, Goto A, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Nakajima A. Visceral obesity and the risk of Barrett's esophagus in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterology.* 2009; 9: 56-62.

Alba LM, Lindor K. Review article: non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; 17: 977–986.

Almonacid-Urrego CC, Sanchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. Non-alcoholic steatohepatitis: what can we learn from animal models?. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 1389-1404.

Aly FZ, Kleiner DE. Update on fatty liver disease and steatohepatitis. *Adv Anat Pathol.* 2011; 8: 294-300.

Amarapurkar DN, Hashimoto E, Lesmana LA, Sollano JD, Chen PJ, Goh KL. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 22: 788–793.

American Heart Association. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on the detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final Report. *Circulation.* 2002; 106: 3143-3421.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl Med.* 2002; 346: 1221-1231.

Angulo P. GI epidemiology: non alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 25: 883-889.

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

Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 7025-7035.

Argo C, Northup PG, Al-Osaimi A, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatology.* 2009; 51: 371-379.

Asquith DL, Miller AM, Hueber AJ, McKinnon HJ, Sattar N, Graham GJ, McInnes IB. Liver X receptor agonism promotes articular inflammation in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 2655-2665.

Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Welsh P, Sattar N, McInnes IB. Simultaneous activation of the liver X receptors (LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ ) drives murine collagen-induced arthritis disease pathology. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 2225-2228.

Assy N, Grozovski M, Bersudsky I, Szvalb S, Hussein O. Effect of insulin-sensitizing agents in combination with ezetimibe, and valsartan in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:4369-4376.

Assy N, Hussein O, Abassi Z. Weight loss induced by orlistat reverses fatty infiltration and improves hepatic fibrosis in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2007; 56: 443-444.

Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, Hardies LJ, Glass L, Cersosimo E, Miyazaki Y, DeFronzo RA. Decreased plasma adiponectin concentration are closely correlated to hepatic fat content and hepatic insuline resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 200-206.

Bhat G, Baba CS, Pandey A, Kumari N, Choudhuri G. Life style modification improves insulin resistance and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2012; 4: 209-217.

Balistreri WF. Nonalcoholic fatty liver disease: insights and controversies. *Med Escape.* 2007;1: 1-3.

Balmer ML, Siegrist K, Zimmermann A, Dufour JF. Effects of ursodeoxycholic acid in combination with vitamin E on adipokines and apoptosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2009; 29: 1184-1188.

Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, Collins A, Tontonoz P, Hsueh WA, Tangirala RK. A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circ Res.* 2006; 99: e88-99.

Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59: 31-55.

Barberino JL, Carvalho FM, Silvany-Neto AM, Cotrim HP, Goes RC, Rosa H, Gidi JF, Valladares CM, Guedes F. Liver changes in workers at an oil refinery and in a reference population in the state of Bahia, Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2005; 17: 30-37.

Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Badger TM, Ronis MJ. A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 294: G27-G38.

Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology.* 2005; 42: 44-52.

Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2006 ;355: 2297-2307.

Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, Sodde M, Fratti N, De Martin C, Cristianini G. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos study. *Hepatology.* 1994; 20: 1442-1449.

Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med.* 2000; 132: 112-117.

Bellentani S, Marino M. Hepatology, Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Annals of Hepatology.* 2009; 8: S4-S8.

Bełtowski J. Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia. *Cardiovasc Ther.* 2008; 26: 297-316.

Bernal-Reyes R, Saenz-Labra A, Bernardo-Escudero R. Prevalencia de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Estudio comparativo con diabéticos. *Rev Gastroenterol Mex.* 2000; 65: 58-62.

Bernal-Reyes R, Bernal-Serrano D. Utilidad de las pruebas de funcionamiento hepático (PHF) y del ultrasonido (US) en el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). *Rev Gastroenterol Mex.* 2006; 71: 6-10.

Bitencourt AG, Cotrim HP, Alves E, Almeida AM, Barbosa DB, Santos AS, Lobo AP, Athayde LG, Rios A, Gouveia M, Freitas LA. Nonalcoholic fatty liver disease: clinical and histological characteristics in obese who underwent bariatric surgery. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2007; 37: 224-230.

Blackburn GL, Mun EC. Effects of weight loss surgeries on liver disease. *Semin. Liver Dis*. 2004; 24: 371-379.

Bogdanova K, Pocztakova H, Uherkova L, Riegrova D, Rypka M, Feher J, Marchesini G, Vesely J. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)—a novel common aspect of the metabolic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006; 150: 101–104.

Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterology*. 2004a; 99: 292-298.

Browning JD, Szczepaniak LD, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004b; 40:1 387-1395.

Browning JD. New Imaging Techniques for Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009; 13: 607–619.

Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ Res*. 2006; 99: 672-674.

Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94: 2467- 2474.

Brunt EM. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2002; 6:3 99-420.

Brunt EM, Tiniakos DG. Pathology of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002; 16: 691-707.

Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2004:24: 3-20.

Brunt EM, Tiniakos D. Pathological features of NASH. *Front Biosci*. 2005; 10: 1475-1484.

Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol*. 2007; 20: S40–S48.

Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA, NASH Clinical Research Network (CRN). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011; 53: 810-820.

Buckingham RE. Thiazolidinediones: Pleiotropic drugs with potent anti-inflammatory properties for tissue protection. *Hepatol Res*. 2005; 33: 167-170.

- Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, David E, Rizzetto M, Marchesini G. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 1082–1090.
- Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B. Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008; 100: 565-578.
- Byrne C, Olufadi R, Bruce K, Cagampang F, Ahmed M. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (London).* 2009; 116: 539-564.
- Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 2009; 15: 1546-1558.
- Calkin AC, Tontonoz P. Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 1513-1518.
- Clarck JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002; 122: 1649-1657.
- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003a; 98: 960-967.
- Clark JM, Diehl AM. Defining nonalcoholic fatty liver disease: implications for epidemiologic studies. *Gastroenterology.* 2003b; 124: 248–250.
- Canga F, Castellano G, Colina F, González A, Garfia C, Sánchez F. Liver diseases associated with the toxic oil syndrome (TOS). A twelve years follow up: 1981-1993. *J Hepatol.* 1995; 23: 242.
- Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP, Schmidt RJ, Zhang Y, Stayrook KR, Suen C, Otto KA, Miller AR, Dai J, Foxworthy P, Gao H, Ryan TP, Jiang XC, Burris TP, Eacho P.I, Etgen GJ. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem.* 2003; 278: 1131-1136.
- Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, Svegliati-Baroni G, Sofi F, Milani S, Abbate R, Surrenti C, Casini A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23: 1143–1151.
- Capeau J. Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab.* 2008; 34:649-657
- Carrasco-Loza R, Castillo-Peñaloza R, Huerta-Bustamante P, Thieleman L. La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. *MED UNAB.* 2003; 6:15-20.
- Carrillo R, Muciño J. Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. Conceptos actuales. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM.* 2011; 54:29-45.
- Carrión JA. Utility of Fibroscan in the evaluation of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2009; 32:415-423.

Castellano G, Pérez Carreras M. Esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica. Panel de expertos Mayo 2003. Recuperado el 12 de octubre del 2012 de <http://www.hepatonet.com>.

Castera L. Non-invasive diagnosis of steatosis and fibrosis. *Diabetes Metab.* 2008; 34: 674-679.

Cave M, Deaciuc I, Mender C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McCalin C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem.* 2007; 18: 184-195.

Colin S, Bourguignon E, Boullay AB, Tousaint JJ, Huet S, Caira F, Staels B, Lestavel S, Lobaccaro JM, Delerive P. Intestine-specific regulation of PPARalpha gene transcription by liver X receptors. *Endocrinology.* 2008;149: 5128-5135.

Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, Parks DJ, Wilson JG, Tippin TK, Binz JG, Plunket KD, Morgan DG, Beaudet EJ, Whitney KD, Kliewer SA, Willson TM. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem.* 2002; 45: 1963-1966.

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav.* 2004; 81: 243-248.

Comar K, Sterling R. Review article: drug therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23: 207-215.

Córdova V, Ortiz G, Gómez A. Hígado graso no alcohólico: un encuadre didáctico para un problema latente (primera parte). *Med Int Mex.* 2009; 25: 38-57.

Córdova V. Hígado graso no alcohólico: un encuadre didáctico para un problema latente (segunda parte). *Med Int Mex.* 2009; 25: 129-153.

Cortés V, Quezada N, Rigotti A, Maiz A. Nuevos receptores nucleares heterodiméricos: reguladores metabólicos con impacto en fisiopatología y su proyección terapéutica en dislipidemias y diabetes mellitus. *Rev Méd Chile.* 2005; 133: 1483-1492.

Crespo J, Cayón A, Pons F. Enfermedad hepática por depósito de grasa. Patogenia y tratamiento. *Revista de la ACAD.* 2005; 4: 115-124.

Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology.* 2012; 142: 711-725.

Chang KC, Shen Q, Oh IG, Jelinsky SA, Jenkins SF, Wang W, Wang Y, LaCava M, Yudit MR, Thompson CC, Freedman LP, Chung JH, Nagpal S. Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. *Mol Endocrinol.* 2008; 2407-2419.

Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Barrientos-Gutierrez T, Mendez-Sanchez N, Lizardi-Cervera J, Uribe M. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 1:CD007340.

Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 2007; 5: 73-79.

Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of non alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2004a; 8: 575-594.

Choudhury J, Sanyal JA. Clinical aspects of fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2004b; 24: 349-362.

Chuu CP. Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. *Med Hypotheses.* 2011; 76:697-699.

Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, Nebb HI. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem.* 2003; 278: 48283-48291.

Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sørensen TI, Becker U, Bendtsen F. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut.* 2004; 53: 750-755.

Dave VP, Kaul D. Coronary heart disease: Significance of liver X receptor  $\alpha$  genomics. *World J Cardiol.* 2010; 2:1 40-149.

Day CP, James O. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology* 1998;114: 842-845.

De Freitas AC, Campos AC, Coelho JC. The impact of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11: 267-274.

De la Peña A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2005; 129: 1663-1674.

De la Peña A, Leclercq I, Williams J, Farrell G. NADPH oxidase is not an essential mediator of oxidative stress or liver injury in murine MCD diet-induced steatohepatitis. *J Hepatol.* 2007; 46: 304-313.

Di D, Wang Z, Liu Y, Luo G, Shi Y, Berggren-Söderlund M, Nilsson-Ehle P, Zhang X, Xu N. ABCA1 upregulating apolipoprotein M expression mediates via the RXR/LXR pathway in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 421: 152-1566.

Diehl AM. Esteatohepatitis no alcohólica: Estado del arte. *Gastr Latinoam.* 2002; 13: 55-58.

Diehl AM. Fatty liver, hypertension, and the metabolic syndrome. *Gut.* 2004; 53: 923-924.

Di Mauro D, Pagano F, Magaúdda L, Speciale F, Speranza G, Bonaiuto M, Mallamace A, Trimarchi F. Aerobic exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a case report. *J Sports Med Phys Fitness*. 2009; 49: 448-452.

Dixon JB. Surgical treatment for obesity and its impact on non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Liver Dis*. 2007; 11: 141-154.

Donthamsetty S, Bhave VS, Mitra MS, Latendresse JR, Mehendale HM. Nonalcoholic steatohepatitic (NASH) mice are protected from higher hepatotoxicity of acetaminophen upon induction of PPARalpha with clofibrate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 230: 327-337.

Donati G, Stagni B, Piscaglia F. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance. *Gut*. 2004; 53: 1020-1023.

Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med*. 2010; 103: 71-83.

Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 33: 525-540.

Dumortier J, Giostra E, Belbouab S, Morard I, Guillaud O, Spahr L, Boillot O., Rubbia-Brandt L., Scoazec JY., Hadengue A. Non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients: another story of "seed and soil". *Am J Gastroenterol*. 2010; 105: 613-620.

Edmison J, McCollough AJ. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. *Clin Liver Dis*. 2007; 11: 75-104.

Ekstedt M, Franzen LE, Mathiensen UI, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006; 44: 865-873.

El-Koofy NM, Anwar GM, El-Raziky MS, El-Hennawy AM, El-Mougy FM, El-Karaksy HM, Hassanin FM, Helmy HM. The association of metabolic syndrome, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease in overweight/obese children. *Saudi J Gastroenterol*. 2012; 18: 44-49.

El-Serag HB, Richardson OA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma. A case-control study among United States veterans. *Am J. Gastroenterol*. 2001; 96: 2462-2467.

European Association For The Study Of The Liver (EASL). 42nd Annual Meeting For The European Association For The Study Of The Liver. April 11.15 de 2007. Barcelona-España.

Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis*. 2001; 21:17-26.

- Falchuk KR, Fiske SC, Haggitt RC, Federman M, Trey C. Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus. *Gastroenterology*. 1980; 78: 535-541.
- Fan JG, De Peng Y. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: Asian definitions and Asian studies. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007a; 6: 572-578.
- Fan JG, Li F, Cai XB, Peng YD, Ao QH, Gao Y. Effects of nonalcoholic fatty liver disease on the development of metabolic disorders. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007b; 22: 1086-1091.
- Fan JG, Farrell JC. Does non-alcoholic fatty liver disease predispose patients to type 2 diabetes in the absence of obesity?. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25: 352-356.
- Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL. Hyperferritinemia, iron overload, and metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96: 2448-2455.
- Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver*. 2012; 6: 149-171.
- Feldstein AE, Charatcharoenwitthaya P, Treeprasertsuk S, Benson JT, Enders JB, Angulo P. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years. *Gut*. 2009; 58:1538-1544.
- Ferrer-Márquez M, Rico-Morales M, Carvia- Pousaillé C, Gálvez-Miras A, Casado-Martín M, Velasco-Albende J, Ferrer-Ayza M. Prevalencia y factores asociados a la esteatohepatitis no alcohólica en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica. *Cir Esp*. 2008; 84: 313-317.
- Fiévet C, Staels B. Liver X receptor modulators: effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77: 1316-1327.
- Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, Oude Elferink RP, Besselsen DG, Erickson RP, Cherrington NJ. Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 613: 119-127.
- Fitz NF, Cronican A, Pham T, Fogg A, Fauq AH, Chapman R, Lefterov I, Koldamova R. Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J Neurosci*. 2010; 30: 6862-86772.
- Fluhr JW, Crumrine D, Mao-Qiang M, Moskowitz DG, Elias PM, Feingold KR. Topical liver x receptor activators accelerate postnatal acidification of stratum corneum and improve function in the neonate. *J Invest Dermatol*. 2005; 125: 1206-1214.
- Fong DG, Nehra V, Lindor D, Buchman AL. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*. 2000; 32: 3-10.
- Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids*. 2011; 2011: 1-14.

Fontaine C, Rigamonti E, Nohara A, Gervois P, Teissier E, Fruchart JC, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ Res.* 2007; 101: 40-49.

Fradera X, Vu D, Nimz O, Skene R, Hosfield D, Wynands R, Cooke AJ, Haunsø A, King A, Bennett DJ, McGuire R, Uitdehaag JC. X-ray structures of the LXRA LBD in its homodimeric form and implications for heterodimer signaling. *J Mol Biol.* 2010; 399: 120-132.

Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Davey Smith G, Lawlor DA. Alanine aminotransferase, g-glutamyltransferase, and incident diabetes The British Women's Heart and Health Study and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2009; 32: 741-750.

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2247-2250.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.

Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, Endo H, Takahashi H, Inamori M, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nakajima A. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology.* 2009; 50: 772-780.

Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 7686-7689.

Furuya Jr C, de Oliveira C, de Mello E, Faintuch J, Raskovski A, Matsuda M, Vezozzo DC, Halpern A, Garrido AB Jr, Alves VA, Carrilho FJ. Effects of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: preliminary findings after 2 years. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 22: 510-514.

García Martínez M. Generación de un ratón deficiente en 6-fosfofructoquinasa muscular: un modelo de glucogenosis tipo VII. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica; 2006.

García-Monzón C, Martínez-Pérez E, Iacono OL, Fernández-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, Larrañaga E, Moreno-Otero R. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol.* 2000; 33: 716-724.

García-Monzón C. Esteatohepatitis no alcohólica. *Gastroenterol Hepatol.* 2001; 24:395-402.

Giannarelli C, Cimmino G, Connolly TM, Ibanez B, Ruiz JM, Alique M, Zafar MU, Fuster V, Feuerstein G, Badimon JJ. Synergistic effect of liver X receptor activation and simvastatin on plaque regression and stabilization: a magnetic resonance imaging study in a model of advanced atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2012; 33: 264-273.

Gong H, Guo P, Zhai Y, Zhou J, Uppal H, Jarzynka MJ, Song WC, Cheng SY, Xie W. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol Endocrinol*. 2007; 21: 1781-1790.

Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2010; 16: 403-410.

Grempler R, Günther S, Steffensen KR, Nilsson M, Barthel A, Schmoll D, Walther R. Evidence for an indirect transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by liver X receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 ; 338: 981-986.

Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Groot PH, Reijngoud DJ, Kuipers F. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 289: E829-E838.

Griesel BA, Weems J, Russell RA, Abel ED, Humphries K, Olson AL. Acute inhibition of fatty acid import inhibits GLUT4 transcription in adipose tissue, but not skeletal or cardiac muscle tissue, partly through liver X receptor (LXR) signaling. *Diabetes*. 2010; 59: 800-807.

Gronbak H, Thomsen KL, Schmitz O, Vilstrup H. Role of nonalcoholic fatty liver disease in the development of insulin resistance and diabetes. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008; 2: 705-711.

Groot PH, Pearce NJ, Yates JW, Stocker C, Sauermelch C, Doe CP, Willette RN, Olzinski A, Peters T, d'Epagnier D, Morasco KO, Krawiec JA, Webb CL, Aravindhan K, Jucker B, Burgert M, Ma C, Marino JP, Collins JL, Macphee CH, Thompson SK, Jaye M. Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *J Lipid Res*. 2005; 46: 2182-2191.

Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, Franchimont D, Louis H, Devière J, Le Moine O. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology*. 2006; 43: 989-1000.

Gyamfi M, Damjanov I, French S, Wan YJ. The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 981-995.

Gyamfi MA, Tanaka Y, He L, Klaassen CD, Wan YJ. Hepatic effects of a methionine-choline-deficient diet in hepatocyte RXRalpha-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 234: 166-178.

Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med*. 2005; 143: 722-728.

Harrison SA, Hayashi P. Clinical factors associated with fibrosis in 102 patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2002; 36: 412.

Harrison SA, Ramrakhiani S, Brunt EM, Anbari MA, Cortese C, Bacon BR. Orlistat in the treatment of NASH: a case series. *Am J Gastroenterol*. 2003a; 98: 926-930.

Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2003b; 98: 2485-2490.

Harrison SA, Fincke C, Helinski D, Torgerson S, Hayashi P. A pilot study for orlistat treatment in Obese, non-alcoholic steatohepatitis patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004a; 20: 623-628.

Harrison SA, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2004b; 8: 861-879.

Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology.* 2009; 49: 80-86.

Harrison TR. *Principios de medicina interna.* 17ª ed. México: Mc Graw Hill; 2008.

Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor beta-1 level and efficacy of  $\alpha$ -tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001; 15: 1667-1672.

Hsieh PS, Hsieh YJ. Impact of liver diseases on the development of type 2 diabetes mellitus. *World J Gastroenterol.* 2011; 17: 5240-5245.

Hatano Y, Man MQ, Uchida Y, Crumrine D, Mauro TM, Feingold KR, Elias PM, Holleran WM. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 160-169.

Hatzitolios A, Savopoulos C, Lazaraki G, Sidiropoulos I, Haritanti P, Lefkopoulos A, Karagiannopoulou G, Tzioufa V, Dimitrios K. Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia. *Indian J Gastroenterol.* 2004; 23: 131-134.

Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 8: 35-44.

Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut.* 2004; 53: 413-419.

Huang MA, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, Emick D, Lok AS, Conjeevaram HS. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100:1 072-1081.

Ide T, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yatah S, Iizuka Y, Tomita S, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Osuga J, Ishibashi S, Yamada N. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid

metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 1255-1267.

Ip E, Farrell G, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPAR $\alpha$ -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 123-132.

Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPAR $\alpha$  agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2004; 39: 1286-1296.

Jamroz-Wiśniewska A, Wójcicka G, Horoszewicz K, Bełtowski J. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007; 61: 760-785.

Jia YH, Wang RQ, Mi HM, Kong LB, Ren WG, Li WC, Zhao SX, Zhang YG, Wu WJ, NanYM, Yu J. Fuzheng Huayu recipe prevents nutritional fibrosing steatohepatitis in mice. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 45-55.

Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabetic Med.* 2005; 22: 1141-1145.

Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusic AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002a; 99: 7604-7609.

Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, Tontonoz P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem.* 2002b; 277: 11019-11025.

Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 2003; 9:213-219.

Julve J. El receptor huérfano hepático (LXR): avances en el conocimiento de una nueva diana terapéutica. *Rev Esp Obes.* 2003; 1: 21-28.

Kase ET, Wensaas AJ, Aas V, Højlund K, Levin K, Thoresen GH, Beck-Nielsen H, Rustan AC, Gaster M. Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes.* 2005; 54: 1108-1115.

Kaser A, Crespo J, Cayón A, Pons-Romero F, Tilg H. Chemokine expresión in non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol;* 2004:57-130.

Kaser S, Moschen AR, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in nonalcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005; 54: 117-121.

Katz A, Udata C, Ott E, Hickey L, Burczynski ME, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol*. 2009; 49: 643-649.

Kelishadi R, Cook SR, Adibi A, Faghihimani Z, Ghatrehsamani S, Beihaghi A, Salehi H, Khavarian N, Poursafa P. Association of the components of the metabolic syndrome with non- alcoholic fatty liver disease among normal-weight, overweight and obese children and adolescents. *Diabetol Metab Syndr*. 2009;1: 29.

Keppler D, Decker K. Glycogen determination with amyloglucosidase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 3 (ed. H. U. Bergmeyer), 1974; pp. 1127-1131. New York: Academic Press.

Ketterer C, Müssig K, Machicao F, Stefan N, Fritsche A, Häring HU, Staiger H. Genetic variation within the NR1H2 gene encoding liver X receptor  $\beta$  associates with insulin secretion in subjects at increased risk for type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)*. 2011; 89: 75-81.

Kim SO, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K. Two Cases of Non-Alcoholic Steato-Hepatitis Developing from Simple Fatty Liver *J Gastrointestin Liver Dis*. 2009; 18: 491-495.

Kinugasa A, Tsunamoto K, Furukawa N, Sawada T, Kusunoki T, Shimada N. Fatty liver and its fibrous changes found in simple obesity of children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1984; 3: 408-414.

Kirsch R, Clarkson V, Verdonk RC, Marais AD, Shephard EG, Ryffel B, de la M Hall P. Rodent nutritional model of steatohepatitis: effects of endotoxin (lipopolysaccharide) and tumor necrosis factor alpha deficiency. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: 174-182.

Knobler H, Schattner A, Zhornicki T, Malnick SDH, Keter D, Sokolovskaya N, Lurie Y, Bass DD. Fatty liver-an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. *Q J Med*. 1999; 92: 73-79.

Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol*. 2003; 38: 954-961.

Koppe S, Sahai A, Malladi P, Whittington P, Green R. Pentoxifylline attenuates steatohepatitis induced by methionine choline deficient diet. *J hepatology*. 2004;41: 592-598.

Korach-André M, Archer A, Gabbi C, Barros RP, Pedrelli M, Steffensen KR, Pettersson AT, Laurencikiene J, Parini P, Gustafsson JÅ. Liver X receptors regulate de novo lipogenesis in a tissue-specific manner in C57BL/6 female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011; 301: E210-E222.

Kotokorpi P, Ellis E, Parini P, Nilsson LM, Strom S, Steffensen KR, Gustafsson JA, Mode A. Physiological differences between human and rat primary hepatocytes in response to liver X receptor activation by 3-[3-[N-(2-chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-

(2,2-diphenylethyl)amino]propyloxy]phenylacetic acid hydrochloride (GW3965). *Mol Pharmacol*. 2007; 72: 947-955.

Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietilainen KH, Yki-Jarvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 3490-3497.

Kumar KS, Malet PF. Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc*. 2000; 75: 733-739.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-686.

Laemmli, UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol*. 1973; 80: 575-599.

Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, Castrillo A, Wilpitz DC, Mangelsdorf DJ, Collins JL, Saez E, Tontonoz P. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003a; 100: 5419-5424.

Laffitte BA, Joseph SB, Chen M, Castrillo A, Repa J, Wilpitz D, Mangelsdorf D, Tontonoz P. The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol Cell Biol*. 2003b; 23: 2182-2191.

Larter CZ, Yeh MM, Cheng J, Williams J, Brown S, dela Pena A, Bell-Anderson KS, Farrell GC. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by dietary fish oil attenuates steatosis, but does not prevent experimental steatohepatitis because of hepatic lipoperoxide accumulation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008a; 23: 267-275.

Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008b; 23: 1635-1648.

Laurencikiene J, Rydén M. Liver X receptors and fat cell metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2012 ;36:1494-1502

Lavine JE, Schwimmer JB, Molleston JP, Scheimann AO, Murray KF, Abrams SH, Rosenthal P, Sanyal AJ, Robuck PR, Brunt EM, Unalp A, Tonascia J, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network Research Group. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children: TONIC trial design. *Contemp Clin Trials*. 2010; 31: 62-70.

Leclercq I, Farrell G, Field J, Bell D, Gonzalez F, Robertson G. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1067-1075.

Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol*. 2007a; 47: 142-156.

Leclercq I, Lebrun V, Stärkel P, Horsmans Y. Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPAR $\alpha$  agonist pioglitazone. *Lab Invest*. 2007b; 87: 56-65.

Lee JH, Zhou J, Xie W. PXR and LXR in hepatic steatosis: a new dog and an old dog with new tricks. *Mol Pharm*. 2008; 5: 60-66.

Lee YM, Sutedja DS, Wai CT, Dan YY, Aung MO, Zhou L, Cheng CL, Wee A, Lim SG. A randomized controlled pilot study of Pentoxifylline in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatol Int*. 2008; 2:1 96-201.

Leik CE, Carson NL, Hennan JK, Basso MD, Liu QY, Crandall DL, Nambi P. GW3965, a synthetic liver X receptor (LXR) agonist, reduces angiotensin II-mediated pressor responses in Sprague-Dawley rats. *Br J Pharmacol*. 2007; 15: 450-456.

Lenaerts J, Verresen L, Van Steenberghe W, Fevery J. Fatty liver hepatitis and type 5 hyperlipoproteinemia in juvenile diabetes mellitus. Case report and review of the literature. *J Clin Gastroenterol*. 1990; 12: 93-97.

Leone N, Bugianesi E, Brunello F, Carucci P, Vanni E, Marchesini G. Does nonalcoholic steatohepatitis progress to cryptogenic cirrhosis and hepatocellular carcinoma? A case-control study. *Hepatology*. 2001; 34: 449A.

Leoni V, Caccia C. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids*. 2011; 1 64: 515-524.

Lieber CS, Leo MA, Cao Q, Mak KM, Ren C, Ponomarenko A, Wang X, Decarli LM. The Combination of S-adenosylmethionine and Dilinoleoylphosphatidylcholine Attenuates Non-alcoholic Steatohepatitis Produced in Rats by a High-Fat Diet. *Nutr Res*. 2007; 27: 565-573.

Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology*. 2004; 39: 770-778.

Lirussi F, Mastropasqua E, Orando S, Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane file Syst Rev*. 2007; 24: CD005165.

Liu X, Lazenby AJ, Clements RH, Jhala N, Abrams GA. Resolution of nonalcoholic steatohepatitis after gastric bypass surgery. *Obes Surg*. 2007; 17: 486-492.

Loeffler B, Heeren J, Blaeser M, Radner H, Kayser D, Aydin B, Merkel M. Lipoprotein lipase-facilitated uptake of LDL is mediated by the LDL receptor. *J Lipid Res*. 2007; 48: 288-298.

London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis*. 2007; 11: 55-74.

Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, Bass NM, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Association between diabetes, family history of diabetes and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology*. 2012; 56: 943-951.

Lo Sasso G, Murzilli S, Salvatore L, D'Errico I, Petruzzelli M, Conca P, Jiang ZY, Calabresi L, Parini P, Moschetta A. Intestinal specific LXR activation stimulates

reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab.* 2010; 12: 187-193.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proc.* 1980; 55: 434-438.

Lund EG, Menke JG, Sparrow CP. Liver X receptor agonists as potential therapeutic agents for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1169-1177.

Lutchman G, Modi A, Kleiner DE, Promrat K, Heller T, Ghany M, Borg B, Loomba R, Liang TJ, Premkumar A, Hoofnagle JH. The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2007; 46: 424-429.

Luyckx FH, Desai C, Thiry A, Dewé W, Scheen AJ, Gielen JE, Lefèbvre PJ. Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *Int J Obes.* 1998a; 22: 222-226.

Luyckx FH, Scheen AJ, Desai C, Dewé W, Gielen JE, Lefebvre PJ. Effects of gastroplasty on body weight and related biological abnormalities in morbid obesity. *Diabetes Metab.* 1998b; 24: 355-361.

McAvoy NC, Ferguson JW, Campbell IW, Hayes PC. Nonalcoholic fatty liver disease: natural history, pathogenesis and treatment. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 2006; 6: 251-260.

McClain CJ, Mokshagundam SPL, Barve SS, Song Z, Hill DB, Chen T, Deaciuc I. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol.* 2004; 34: 67-79.

McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 2002; 34: 55-62.

Macfarlane DP, Zou X, Andrew R, Morton NM, Livingstone DE, Aucott RL, Nyirenda MJ, Iredale JP, Walker BR. Metabolic pathways promoting intrahepatic fatty acid accumulation in methionine and choline deficiency: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300: E402-E409.

Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006; 45: 600-606.

Madan K, Batra Y, Gupta SD, Chander B, Rajan KD, Tewatia MS, Panda SK, Acharya SK. Non-alcoholic fatty liver disease may not be a severe disease at presentation among Asian Indians. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 3400-3405.

Manco M, Marcellini M, Devito R, Comparcola D, Sartorelli MR, Nobili V. Metabolic syndrome and liver histology in paediatric non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Obes (Lond).* 2008; 32: 381-387.

Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 1513-1517.

- Marchesini G, Marzocchi R. Metabolic syndrome and NASH. *Clin Liver Dis.* 2007; 11: 105-117.
- Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LA, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol.* 2011; 48: 72-79.
- Martínez E, Domínguez J, Hernández Z, Panduro A. Esteatohepatitis no alcohólica. *Investigación en salud.* 2005; VII: 10-17.
- Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med.* 2008; 14: 72-81.
- Mas E, Danjoux M, Garcia V, Carpentier S, Ségui B, Levade T. IL-6 deficiency attenuates murine diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One.* 2009; 4: e7929.
- Matafome P, Nunes E, Louro T, Amaral C, Crisóstomo J, Rodrigues L, Moedas AR, Monteiro P, Cipriano A, Seiça R. A role for atorvastatin and insulin combination in protecting from liver injury in a model of type 2 diabetes with hyperlipidemia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009; 379: 241-251.
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999; 116:1413-1419.
- Medina J, Fernández-Salazar LI, García-Buey L, Moreno Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabet Care.* 2004; 27: 2057-2066.
- Méndez-Sánchez N, Chávez-Tapia NC, Uribe M. Hígado graso no alcohólico. Nuevos conceptos. *Rev Invest Clín.* 2004; 56: 72-82.
- Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, Hormazdi M, Naserimoghadam S, Mikaeli J, Farahvash MJ, Ansari R, Sotoudehmanesh R, Khatibian M. Probucol in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: an open-labeled study. *J Clin Gastroenterol.* 2003; 36: 266-268.
- Merat S, Khadem-Sameni F, Nouraie M, Derakhshan MH, Tavangar SH, Mossaffa S, Malekzadeh R, Sotoudeh MA. Modification of the Brunt System for Scoring Liver Histology of Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Arch Iran Med.* 2010; 13: 38-44.
- Michailova A, Kuneva T, Popov T. A comparative assessment of liver function in workers in the petroleum industry. *Int Arch Occup Environ Health.* 1998; 71: S46-S49.
- Miao B, Zondlo S, Gibbs S, Cromley D, Hosagrahara VP, Kirchgessner TG, Billheimer J, Mukherjee R. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res.* 2004; 45:1 410-417.

- Min AK, Kim MK, Kim HS, Seo HY, Lee KU, Kim JG, Park KG, Lee IK. Alpha-lipoic acid attenuates methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Life Sci.* 2012 30; 90:200-205.
- Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* 2007a; 581: 1721-1726
- Molleston JP, White F, Teckman J, Fitzgerald JF. Obese children with steatohepatitis can develop cirrhosis in childhood. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 2460–2462.
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* 2007; 445: 219-223.
- Morales A, Arrese M. Hígado graso no alcohólico: Patogenia y tratamiento. *Gastroenterol latinoam.* 2008; 19: 96-100.
- Morales JR, Ballesteros I, Deniz JM, Hurtado O, Vivancos J, Nombela F, Lizasoain I, Castrillo A, Moro MA. Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. *Circulation.* 2008; 118: 1450-1459.
- Morello F, Saglio E, Noghero A, Schiavone D, Ann Williams TA, Verhovez A, Bussolino F, Veglio F, Mulatero P. LXR-activating oxysterols induce the expression of inflammatory markers in endothelial cells through LXR-independent mechanisms. *Atherosclerosis.* 2009; 207: 38-44.
- Moreno D, Solís-Herruzo JA, Vargas J, Colina F, Lizasoain M. Esteatohepatitis no alcohólica. Estudio clínico-analítico de 40 casos. *Med Clin (Barc).* 1987; 89: 188-193.
- Moreno-Sánchez D. Patogenia de la hepatopatía grasa no alcohólica primaria. *Med Clin (Barc).* 2005; 124: 668-677.
- Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc. Dis.* 2007; 17: 63-70.
- Moy G, Juarranz M, Soriano T. Esteatohepatitis no alcohólica. *Revisiones SMG.* 2005; 79: 722-728.
- Mu YP, Ogawa T, Kawada N. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. *Lab Invest.* 2010; 90: 245-256.
- Mu YP, Ogawa T, Kwada N. Mechanism of hepatocyte apoptosis in rats with liver fibrosis induced by lipogenic methionine-choline-deficient diet. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2012; 41: 112-118.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
- Nader N, Ng SS, Wang Y, Abel BS, Chrousos GP, Kino T. Liver X receptors regulate the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor: implications for the carbohydrate metabolism. *PLoS One.* 2012; 7: e26751-e26751.

Nagasawa T, Inada Y, Nakano S, Tamura T, Takahashi T, Maruyama K, Yamazaki Y, Kuroda J, Shibata N. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol.* 2006; 536: 182-191.

Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* 2006; 113: 90-97.

Nair S, Eason JD, Loss GE, Mason AL. Relative risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis due to fatty liver disease: a study based on incidental hepatocellular carcinoma in liver transplant recipient (Abstract). *Hepatology.* 2001; 34: 462a.

Naito Y, Shimosawa M, Kuroda M, Nakabe N, Manabe H, Katada K, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Noguchi N, Yoshikawa T. Tocotrienols reduce 25-hydroxycholesterol-induced monocyte-endothelial cell interaction by inhibiting the surface expression of adhesion molecules. *Atherosclerosis.* 2005; 180: 19-25.

Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Stanhope KL, Havel PJ, Okazaki M, Ai M, Tanaka A. Postprandial lipoprotein in metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 1306-1318.

Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Yasutake K, Yoshimoto T, Harada N, Yada M, Higuchi N, Kato M, Kohjima M, Taketomi A, Maehara Y, Nishinakagawa T, Machida K, Matsunaga K, Nakashima M, Kotoh K, Enjoji M. Therapeutic effect of bezafibrate against biliary damage: a study of phospholipid secretion via the PPARalpha-MDR3 pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010; 48: 22-28.

Nakao H, Yoneda M. The intertwined correlations among non-alcoholic fatty liver disease, atherosclerosis, and metabolic syndrome. *J Gastroenterol.* 2009, 44: 1162-1164.

Nan YM, Fu N, Wu WJ, Liang BL, Wang RQ, Zhao SX, Zhao JM, Yu J. Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol.* 2009; 44: 358-365.

Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am.* 1996; 80: 1147-1166.

Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with PPAR gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology.* 2003; 38: 1008-1117.

Nobili V, Marcellini M, Devito R, Ciampalini P, Piemonte F, Comparcola D, Sartorelli MR, Angulo P. NAFLD in children: a prospective clinical-pathological study and effect of lifestyle advice. *Hepatology.* 2006; 44: 458-465.

Obika M, Noguchi H. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 1-12.

Ogawa D, Stone JF, Takata Y, Blaschke F, Chu VH, Towler DA, Law RE, Hsueh WA, Bruemmer D. Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin

expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. *Circ Res.* 2005; 96: e59-e67.

Ogihara T, Chuang JC, Vestermark GL, Garmey JC, Ketchum RJ, Huang X, Brayman KL, Thorner MO, Repa JJ, Mirmira RG, Evans-Molina C. Liver X receptor agonists augment human islet function through activation of anaplerotic pathways and glycerolipid/free fatty acid cycling. *J Biol Chem.* 2010; 285: 5392-5404.

Oliveira C, Alves V, Lima V, Stéfano J, Debbas V, Sá S, Wakamatsu A, Corrêa-Giannella ML, de Mello ES, Havaki S, Tiniakos DG, Marinos E, de Oliveira MG, Giannella-Neto D, Laurindo FR, Caldwell S, Carrilho FJ. Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein (MTP) induced by s-nitroso-acetylcysteine in ob/ob mice. *Bichem Pharmacol.* 2007; 74: 290-297.

Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Hatta H, Sato M, Hamasaki M, Sadakane Y, Tashiro T, Fukuhata M, Miyata Y, Tamaru S, Tanaka K, Mune M. Olive leaf extract prevents spontaneous occurrence of non-alcoholic steatohepatitis in SHR/NDmcr-cp rats. *Pathology* 2010; 42: 66-72.

Ong JP, Younossi ZM. Approach to the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2005a; 9: 617-634.

Ong J, Elariny H, Collantes R, Younoszai A, Chandhoke V, Reines HD, Goodman Z, Younossi ZM. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg.* 2005b; 15: 310-315.

Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease after liver transplantation: a case of nurture and nature. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105:621-623.

Oosterveer MH, Grefhorst A, Groen AK, Kuipers F. The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond Implications for drug design. *Prog Lipid Res.* 2010; 49: 343-352.

Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2007; 132: 282-293.

Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM., Johnson RJ., Abdelmalek MF. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2008; 48: 993-999.

Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 20: 39-47

Oz HS, Chen TS, Neuman M. Methionine deficiency and hepatic injury in a dietary steatohepatitis model. *Dig Dis Sci.* 2008; 53: 767-776.

Park MC, Kwon YJ, Chung SJ, Park YB, Lee SK. Liver X receptor agonist prevents the evolution of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49: 882-890.

- Park HS, Jeon BH, Woo SH, Leem J, Jang JE, Cho MS, Park IS, Lee KU, Koh EH. Time-dependent changes in lipid metabolism in mice with methionine choline deficiency-induced fatty liver disease. *Mol Cells*. 2011; 32: 571-577.
- Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK, Kim BI. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: 138-143.
- Pascale A, Pais R, Ratziu V. An overview of nonalcoholic steatohepatitis: past, present and future directions. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2010; 19: 415-423.
- Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*. 2009; 13: 9-19.
- Passonneau JV, Lauderdale VR. A Comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Analytical Biochemistry*. 1974; 60: 405-412.
- Patel MD, Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis*. 2006; 186: 12-19.
- Patton HM, Sirlin C, Behling C, Middleton M, Schwimmer JB, Lavine JE. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a critical appraisal of current data and implications for future research. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006; 43: 413-427.
- Patsch JR, Gotto AM Jr, Olivercrona T, Eisenberg S. Formation of high density lipoprotein2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75: 4519-4523.
- Pérez-Aguilar F, Benloch S, Berenguer M, Beltrán M, Berenguer J. Non-alcoholic steatohepatitis: physiopathological, clinical and therapeutic implications. *Rev Esp Enferm. Dig*. 2004; 9: 628-648.
- Perez-Carreras M. Estudio anatomoclínico y fisiopatológico de una serie de 85 pacientes con esteatohepatitis no alcohólica. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2001.
- Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Non alcoholic steatohepatitis (NASH): potential cause and pathogenic mechanisms. In: Gerbes AL., Beuers U., Jüngst D., Pape GR., Sackmann M., eds. *Hepatology 2000 (Falk Symposium N0 117)* 1ª ed. Germany: Kluwer Academic Publishers; 2001. pp 57-76.
- Perez M, González L, Olarte R, Rodríguez NI, Tabares M, Salazar JP, Jaimes S, García RG, López-Jaramillo P. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with insulin resistance in a young Hispanic population. *Prev Med*. 2011; 52: 174-177.
- Peters RL, Gay T, Reynolds TB. Post-jejunoileal bypass hepatic disease: its similarity to alcoholic hepatic disease. *Am J Clin Pathol*. 1975; 63: 318-331.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes *Diabetes*. 2005; 54: 603-608.

- Pickens\_MK, Yan JS, Ng RK, Ogata H, Grenert JP, Beysen C, Turner SM, Maher JJ. Dietary sucrose is essential to the development of liver injury in the methionine-choline-deficient model of steatohepatitis. *J Lipid Res.* 2009;50:2072-2082.
- Pinto HC, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC. Nonalcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome?. *Clin Nutr.* 1999; 18: 353-358.
- Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res.* 2005; 46: 2468-2476.
- Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene.* 2010; 29: 2712-2723.
- Pons-Romero F. Will non-invasive testing replace liver biopsy in the diagnosis and follow-up of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? *Rev Esp Enferm Dig.* 2009; 101: 521-527.
- Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri V, Palascino G. Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management. *Clin Biochem.* 2005; 38: 203-217.
- Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology.* 1990; 11: 74-80.
- Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, Basso MD, Nambi P. Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 1340-1349.
- Rabl C, Campos GM. The impact of bariatric surgery on nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2012; 32: 80-91.
- Radetti G, Kleon W, Stuefer J, Pittschieler K. Non-alcoholic fatty liver disease in obese children evaluated by magnetic resonance imaging. *Acta Paediatr.* 2006; 95: 833-837.
- Ramesh S, Sanyal AJ. Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2005; 42: S2-S12.
- Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, Khalil L, Turpin G, Opolon P, Poynard T. Liver fibrosis overweight patients. *Gastroenterology.* 2000;118: 1117-1123.
- Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 185-192.
- Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2001; 121: 710-723.
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-

binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000; 14: 2819-2830.

Reschly EJ, Ai N, Welsh WJ, Ekins S, Hagey LR, Krasowski MD. Ligand specificity and evolution of liver X receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 110: 83-94.

Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res.* 2008; 49: 1068-1076.

Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee G, Ng R, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res.* 2006; 47: 2280-2290.

Rocha R, Cotrim HP, Carvalho FM, Siqueira AC, Braga H, Freitas LA. Body mass index and waist circumference in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hum Nutr Diet* 2005; 18: 365-370.

Roesch-Dietlen F, Dorantes-Cuellar A, Carrillo-Toledo MG, Martínez-Sibaja C, Rojas-Carrera S, Bonilla-Rojas QC, Uchino-Higueras V, Lagunas T, Carrasco-Arróniz MA, Soler-Leal B, León-Valdivieso J, Cid-Juárez S, Martínez JA. Frequency of NAFLD in a group of patients with metabolic syndrome in Veracruz, Mexico. *Rev Gastroenterol Mex.* 2006; 71: 446-452.

Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52: 59-69.

Rough JJ, Monroy MA, Yerrum S, Daly JM. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res.* 2010; 3: 13.

Saab S, Cho D, Lassman RC, Gajjar NA, Ghobrial M, Busuttil RW. Recurrent non-alcoholic steatohepatitis in a living related liver transplant recipient. *J Hepatol.* 2005; 42: 148-149.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487-491.

Sanyal AJ. Non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Perspect Gastroenterol.* 2000: 129-139.

Sasaki N, Ueno T, Morita A, Yoshiok S, Nagata E, Sata M. Therapeutic effects of restricted diet and exercise is of benefit to patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Hepatol.* 2003; 38: A4235.

Scholz H, Lund T, Dahle MK, Collins JL, Korsgren O, Wang JE, Foss A. The synthetic liver X receptor agonist GW3965 reduces tissue factor production and inflammatory responses in human islets in vitro. *Diabetología.* 2009; 52: 1352-1362.

Schwimmer JB, McGreal N, Deutsch R, Finegold MJ, Lavine JE. Influence of gender, race, and ethnicity on suspected fatty liver in obese adolescents. *Pediatrics.* 2005; 115: e561565.

Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006; 118: 1388-1393.

Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis*. 2001; 21: 105-113.

Sharma AM, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor and adipose tissue-understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 386-395.

Shenoy SD, Spencer TA, Mercer-Haines NA, Alipour M, Gargano MD, Runge-Morris M, Kocarek TA. CYP3A induction by liver x receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos*. 2004; 32: 66-71.

Shifflet A, Wu G. Non-alcoholic Steatohepatitis: An Overview. *J Formos Med Assoc*. 2009; 108: 4-12.

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*. 1999; 401: 73-76.

Shyangdan D, Clar C, Ghouri N, Henderson R, Gurung T, Preiss D, Sattar N, Fraser A, Waugh N. Insulin sensitizers in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Health Technol Assess*. 2011; 15: 1-110.

Siegenthaler W. Ictericia. En: *Diagnóstico diferencial en medicina interna*. 1ª ed. en español. México Manual Moderno; 2009: pp763-796.

Singh SP, Nayak S, Swain M, Rout N, Mallik RN, Agrawal O, Meher C, Rao M. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in coastal eastern India: a preliminary ultrasonographic survey. *Trop Gastroenterol*. 2004; 25: 76-79.

Sironi L, Mitro N, Cimino M, Gelosa P, Guerrini U, Tremoli E, Saez E. Treatment with LXR agonists after focal cerebral ischemia prevents brain damage. *FEBS Lett*. 2008; 582: 3396-3400.

Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD, Sullivan M, Wedel H, Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2683-2693.

Solís Herruzo JA, Vidal JV, Colina F, Castellano G, Muñoz-Yagüe MT, Morillas JD. Clinico-biochemical evolution and late hepatic lesions in the toxic oil syndrome. *Gastroenterology*. 1987; 93: 558-568.

Soto-González A, Bellido D, Martínez Olmos M, Buño Soto M, de Luis D, Vidal O. Enfermedad hepática grasa no alcohólica. *Rev Esp Obes*. 2005; 3: 95-107.

Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25: 319-333.

- Steffensen KR, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes*. 2004; 53: S36-S42.
- Stenson BM, Rydén M, Venteclef N, Dahlman I, Pettersson AM, Mairal A, Aström G, Blomqvist L, Wang V, Jocken JW, Clément K, Langin D, Arner P, Laurencikiene J. Liver X receptor (LXR) regulates human adipocyte lipolysis. *J Biol Chem*. 2011; 286: 370-379.
- Stulning TM, Steffensen KR, Gao H, Reimers M, Dahlman-Wright K, Schuster GU, Gustafsson JA. Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol Pharmacol*. 2002; 62: 1299-1305.
- Souza MR, Diniz Mde F, Medeiros-Filho JE, Araújo MS. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol*. 2012; 49: 89-96.
- Sumida Y, Eguchi Y, Ono M. Current status and agenda in the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis in Japan. *World J Hepatol*. 2010; 2: 374-383.
- Sun WH, Song MQ, Jiang CQ, Xin YN, Ma JL, Liu YX, Ma L, Lin ZH, Li CY, Liu L, Zhang M, Chu LL, Jiang XJ, Wan Q, Zhou L, Ren R, Meng LF. Lifestyle intervention in non-alcoholic fatty liver disease in Chengyang District, Qingdao, China. *World J Hepatol*. 2012; 4: 224-230.
- Sundaresan S, Vijayagopal P, Mills N, Imrhan V, Prasad C. A mouse model for nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem*. 2011; 22: 979-984.
- Suzuki A, Lindor K, St Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, Okada T, Angulo P. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2005; 43: 1060–1066.
- Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferreti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Am J Pathol*. 2006; 169: 846-860.
- Syn WK, Choi SS, Diehl AM. Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009; 13: 565-580.
- Syn WK, Agboola KM, Swiderska M, Michelotti GA, Liaskou E, Pang H, Xie G, Philips G, Chan IS, Karaca GF, Pereira T de A, Chen Y, Mi Z, Kuo PC, Choi SS, Guy CD, Abdelmalek MF, Diehl AM. NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2012; 61: 1323-1329.
- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 288: E462–E468.
- Tagle M, Poggi L, Ferrari N, Siu H, Aguinagac M, Luna CE, Scavino LY. Clinical, biochemical and hepatic histological findings in overweight and obese peruvian adults: first national prospective study. *Rev Gastroenterol Perú*. 2008; 28: 323-331.

Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007; 30: 1212-1218.

Taskinen MR, Nikkilä EA. High density lipoprotein subfractions in relation to lipoprotein lipase activity of tissues in man--evidence for reciprocal regulation of HDL2 and HDL3 levels by lipoprotein lipase. *Clin Chim Acta*. 1981; 112: 325-332.

Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5: 145-171.

Tokushige K, Hashimoto E, Yatsuji S, Tani M, Shiratori K. Combined pantethine and probucol therapy for Japanese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2007; 37: 872-877.

Tomiya T. Sex difference in non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2010; 40: 108-110.

Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragán VE, Cerbón-Cervantes MA, Torres N. Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr*. 2008; 138: 462-468.

Treseler K. Pruebas de química sanguínea. En: Treseler K. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. 1ª ed. en español. México: Manual Moderno; 2003: pp 70-75.

Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Wang J. Fat paradox of steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23: S104-S107.

Tuba F, Orhun M, Suna O, Aysun B, Buket D. Factors related to non-alcoholic fatty liver disease in obese children. *Turk J Gastroenterol*. 2008; 19: 85-91.

Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, Makishima M. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77: 186-195.

Utzschneider KM, Kahn SE. The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 4753-4761.

Van der Hoorn J, Lindén D, Lindahl U, Bekkers M, Voskuilen M, Nilsson R, Oscarsson J, Lindstedt E, Princen H. Low dose of the liver X receptor agonist, AZ876, reduces atherosclerosis in APOE\*3Leiden mice without affecting liver or plasma triglyceride levels. *Br J Pharmacol*. 2011; 162: 1553-1563.

Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JA, Steffensen KR. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 575-579.

Verrijken A, Francque S, Mertens I, Talloen M, Peiffer F, Van Gaal L. Visceral adipose tissue and inflammation correlate with elevated liver tests in a cohort of overweight and obese patients. *Int J Obes (Lond)*. 2010; 34: 899-907.

- Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S. Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health?. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 351: 129-141.
- Wang YY, Dahle MK, Agren J, Myhre AE, Reinholt FP, Foster SJ, Collins JL, Thiernemann C, Aasen AO, Wang JE. Activation of the liver X receptor protects against hepatic injury in endotoxemia by suppressing Kupffer cell activation. *Shock*. 2006; 25: 141-146.
- Wang YY, Ryg U, Dahle MK, Steffensen KR, Thiernemann C, Chaudry IH, Reinholt FP, Collins JL, Nebb HI, Aasen AO, Gustafsson JÅ, Wang JE. Liver X receptor protects against liver injury in sepsis caused by rodent cecal ligation and puncture. *Surg Infect (Larchmt)*. 2011; 12: 283-289.
- Wang L, Meng X, Zhang F. Raspberry ketone protects rats fed high-fat diets against nonalcoholic steatohepatitis. *J Med Food*. 2012; 15: 495-503.
- Wei Y, Clark SE, Morris EM, Thyfault JP, Uptergrove GM, Whaley-Connell AT, Ferrario CM, Sowers JR, Ibdah JA. Angiotensin II-induced non-alcoholic fatty liver disease is mediated by oxidative stress in transgenic TG(mRen2)27(Ren2) rats. *J Hepatol*. 2008; 49: 417-428.
- Westwater JO, Fainer D. Liver impairment in the obese. *Gastroenterology*. 1958; 34: 686-693.
- Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Horoszewicz K, Bełtowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw*. 2007; 61: 736-1759.
- Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Fujii H, Okanoue T, Yoshikawa T. Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice. *Lab Invest*. 2010; 90: 1169-1178.
- Yamazaki Y, Kakizaki S, Takizawa D, Ichikawa T, Sato K, Takagi H, Mori M. Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 15: 127-130.
- Yan W, Zhang T, Cheng J, Zhou X, Qu X, Hu H. Liver X receptor agonist methyl-3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestanate attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice without increasing plasma triglyceride. *Pharmacology*. 2010; 86: 306-312.
- Yang HR, Kim HR, Kim MJ, Ko JS, Seo JK. Noninvasive parameters and hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 1525-1530.
- Yang S, Lin HZ, Hwang J, Chacko VP, Diehl AM. Hepatic hyperplasia in non cirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition?. *Cancer Res*. 2001; 61: 5016-5023.

Yang Z, Wang X, Wen J, Ye Z, Li Q, He M, Lu B, Ling C, Wu S, Hu R. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its relation to hypoadiponectinaemia in the middle-aged and elderly Chinese population. *Arch Med Sci.* 2011; 7: 665-672.

Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones and the liver in humans. *Curr Opin Lipidol.* 2009; 20: 477-483.

Yokohama S, Tokusashi Y, Nakamura K, Tamaki Y, Okamoto S, Okada M, Aso K, Hasegawa T, Aoshima M, Miyokawa N, Haneda M, Yoneda M. Inhibitory effect of angiotensin II receptor antagonist on hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2006. 12: 322-326.

Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, Shirai Y, Yoshii J, Yanase K, Yamazaki M, Tsujimoto T, Kawaratani H, Akahane T, Aihara Y, Fukui H. Losartan, an angiotensin-II type 1 receptor blocker, attenuates the liver fibrosis development of non-alcoholic steatohepatitis in the rat. *BMC Res Notes.* 2009; 2: 70-72.

Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Yatoh S, Kitamine T, Okazaki H, Tamura Y, Sekiya M, Takahashi A, Hasty AH, Sato R, Sone H, Osuga J, Ishibashi S, Yamada N. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 1240-1254.

Younossi ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 28: 2-12.

Yu J, Ip E, Dela Peña A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, Farrell GC. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology.* 2006; 43: 826-836.

Yu J, Chu ES, Hui AY, Cheung KF, Chan HL, Leung WK, Farrell GC, Sung JJ. Lipoprotein lipase activator ameliorates the severity of dietary steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356: 53-59.

Yu XX, Murray SF, Pandey SK, Booten SL, Bao D, Song XZ, Kelly S, Chen S, McKay R, Monia BP, Bhanot S. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology.* 2005; 42: 362-371.

Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science.* 2009; 325: 100-104.

Zelman S. The liver in obesity. *Arch Intern Med.* 1958; 90: 141-156.

Zeng J, Wu Y, Liao Q, Li L, Chen X, Chen X. Liver X receptors agonists impede hepatitis C virus infection in an Idol-dependent manner. *Antiviral Res.* 2012; 95: 245-256.

Zhao LF, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Fujimoto S, Hashimoto K, Murao K, Terada Y. Liver X receptor  $\alpha$  is

involved in the transcriptional regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Diabetes*. 2012a; 61: 1062-1071.

Zhao JS, Zhu FS, Liu S, Yang CQ, Chen XM. Pioglitazone ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by down-regulating hepatic nuclear  $\kappa$ B and cyclooxygenase-2 expression in rats. *Chin Med J (Engl)* 2012b; 125: 2316-2321.

Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Huang CM, Cao CY. Natural course of nonalcoholic fatty liver disease in southern China: a prospective cohort study. *J Dig Dis*. 2012; 13: 153-160.

Zhu Y, Li Y. Liver X receptors as potential therapeutic targets in atherosclerosis. *Clin Invest Med*. 2009; 32: E383-E394.