



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**



FACULTAD DE FARMACIA

**“Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTORA EN FARMACIA

PRESENTA:

JANET SÁNCHEZ QUEVEDO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARIA DE LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO

CUERNAVACA, MORELOS

Septiembre 2023

Agradecimientos

Agradezco primeramente a DIOS que me ha permitido vivir experiencias que me han llenado de satisfacción, una de ellas el poder llegar al Laboratorio 6 de la Facultad de Farmacia donde he podido desarrollar este proyecto bajo la dirección de la Dra. Lourdes Rodríguez Fragoso a quien agradezco por todo lo que ha invertido en este proyecto. Su dirección y apoyo junto con la del Dr. Jorge Reyes Esparza a quien recuerdo con agradecimiento y cariño, fue lo que nos permitió concluir con este proyecto.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio 6 Rubí Escobar Reséndiz, Anahí Rodríguez López, Esdras Alfredo Zamora Moran, Juan Pablo Gonzales Castillo y Emanuel Ocampo por su apoyo y enseñanza que contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mi comité tutorial la Dra. Leticia González Maya y el Dr. Alfonso Leija Salas por sus aportaciones en cada evaluación.

Agradezco a la Dra. Leticia González Maya, Dra. Judith González Christen, Dr. Ismael Ricardo Campos Nonato, Dra. Julieta Ivonne Castro Romero y a la Dra. María Antonieta Gómez Solís por sus observaciones aportadas para esta tesis.

Agradezco de manera especial a mi familia que han estado cada día apoyándome incondicionalmente, cada uno de ellos ha sido parte de este logro a través de su apoyo en todo lo que he necesitado. Mis padres José Sánchez Rodríguez y Juventina Quevedo Sánchez, mi hermano Omar Sánchez Quevedo, mi hermana Eleazar Sánchez Quevedo, mi esposo Abraham Calzada Dorantes y mi hija Valeria Calzada Sánchez.

Índice

1.- Introducción	1
2.- Antecedentes	3
2.1 Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)	3
2.1.1 El papel de la LDN en el desarrollo de esteatosis en el hígado	4
2.1.2 El papel de la fructosa en el desarrollo de EHGNA	5
2.2 Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)	8
2.3 El papel de SREBP-1c en el desarrollo de EHNA	9
2.4 Características histológicas de EHNA	11
2.4.1 El papel citocinas en el desarrollo del proceso inflamatorio en EHNA	12
2.5 Desarrollo de fibrosis en la esteatohepatitis no alcohólica	15
2.6 Diagnóstico de EHNA	17
2.7 Tratamientos para EHNA	17
2.8 La L-carnitina en el tratamiento de enfermedades metabólicas	19
2.8.1 Efecto de β -Hidroxifosfocarnitina (β -HFC) en el tratamiento de alteraciones metabólicas	20
3. Justificación	22
4. Hipótesis	22
5. Objetivo general	22
6. Objetivos específicos	23
7. Materiales y métodos	23
7.1 Inducción de NASH	24
7.2 Tratamiento farmacológico	25
7.3 Sacrificio y obtención muestras	25
7.4 Preparación de muestras para análisis histológico	25

7.3 Análisis histopatológico	26
7.3.1 Tinción Hematoxilina & Eosina	26
7.3.2 Tinción tricrómica de Masson	26
7.4 Detección de α-SMA por inmunofluorescencia	27
7.5 Evaluación de la expresión de SREBP-1 en tejido hepático	28
7.6 Evaluación de la expresión IL-1β en tejido hepático	28
7.7 Evaluación de la expresión de TNF-α en tejido hepático	29
7.8 Análisis de glucógeno por tinción PAS	29
7.9 Análisis bioquímico y niveles enzimáticos hepáticos	30
7.10 Cuantificación de glucógeno en hígado	30
7.11 Análisis estadístico	31
8. Resultados	32
8.1 Desarrollo del modelo de esteatohepatitis no alcohólica	32
8.2 Efecto de β-HFC sobre las alteraciones de la arquitectura hepática en ratas con EHNA	34
8.3 Efecto de β-HFC en la expresión de SREBP-1 de ratas con EHNA	35
8.4 Efecto de β-HFC sobre la esteatosis de ratas con EHNA.....	37
8.5 Efecto de β-HFC sobre la expresión de IL-1β en ratas con EHNA.....	38
8.6 Efecto de β-HFC sobre la expresión de TNF-α de ratas con EHNA	40
8.7 Efecto de β-HFC sobre la fibrosis en ratas con EHNA	42
8.8 Efecto de β-HFC sobre la expresión de α-SMA en ratas con EHNA.....	44
8.9 Efecto de β-HFC sobre los niveles de enzimas hepáticas de ratas con EHNA	46
8.10 Efecto de β-HFC sobre parámetros bioquímicos de ratas con EHNA	47

8.11 Efecto de β-HFC sobre el glucógeno hepático de ratas con EHNA	49
8.12 Análisis comparativo entre el efecto de pioglitazona y β-HFC sobre la EHNA	51
9. Discusión de resultados	52
10. Conclusión	64
11. Perspectivas	65
12. Referencias	66

Índice de figuras

Figura 1. Papel de SREBP-1c en el desarrollo de esteatosis en EHNA.....	10
Figura 2. Citocinas que conducen a inflamación	11
Figura 3. Secreción de IL-6 por dieta alta en calorías	12
Figura 4. Activación de IL-1 β en EHNA	14
Figura 5. Comparación esquemática de método Ishak, Metavir y Knodell para el análisis de fibrosis.....	16
Figura 6. Mecanismo de acción de L-carnitina	20
Figura 7. Estudios previos de seguridad y eficacia de β -HFC	21
Figura 8. Esquema de inducción de EHNA y tratamiento de animales.....	24
Figura 9. Inducción de la esteatohepatitis no alcohólica	33
Figura 10. Efecto de β -HFC en la arquitectura hepática de ratas con EHNA	34
Figura 11. Efecto de β -HFC en la expresión de SREBP de ratas con EHNA	36
Figura 12. Cuantificación de la coloración marrón del análisis de SREBP-1.....	36
Figura 13. Efecto de β -HFC sobre la esteatosis de ratas con EHNA	37
Figura 14. Efecto de β -HFC sobre la expresión de IL-1 β en ratas con EHNA	39
Figura 15. Cuantificación de la coloración marrón del análisis de IL-1 β	39
Figura 16. Efecto de β -HFC sobre la expresión de TNF- α en ratas con EHNA	41
Figura 17. Cuantificación de la coloración marrón de TNF- α	41

Figura 18. Efecto de β-HFC sobre la fibrosis hepática de ratas con EHNA	43
Figura 19. Cuantificación de la coloración azul observada en la evaluación de fibrosis	43
Figura 20. Evaluación de la expresión de α-SMA en tejido de ratas con EHNA	45
Grafica 21. Cuantificación de la fluorescencia verde observada en la evaluación de la expresión de α-SMA	45
Figura 22. Efecto de β-HFC sobre niveles de enzimas hepáticas de ratas con EHNA	47
Figura 23. Efecto de β-HFC sobre parámetros bioquímicos de ratas con EHNA	48
Figura 24. Efecto de β-HFC en acumulación de glucógeno en ratas con EHNA	50
Figura 25. Efecto de β-HFC en la acumulación de glucógeno de ratas con EHNA	50

Índice de tablas

Tabla 1. Fármacos actuales en fase 3 de investigación para el tratamiento de EHNA acorde a Ensayosclnicos.gov	18
Tabla 2. Comparación entre el efecto de β-HFC y pioglitazona	51

Índice de abreviaturas

ACC Acetil-CoA carboxilasa (por sus siglas en inglés)

ACL Adenosina trifosfato citrato liasa (por sus siglas en inglés)

AG Ácidos grasos

ALP Fosfatasa alcalina (por sus siglas en inglés)

ALT Alanina aminotransferasa (por sus siglas en inglés)

AMP Adenosin monofosfato (por sus siglas en inglés)

AST Aspartato aminotransferasa (por sus siglas en inglés)

ATP Adenosín trifosfato

CACT Transportar los ácidos grasos de cadena larga unidos a la carnitina (por sus siglas en inglés)

CCl₄ Tetracloruro de carbono

CCR2 Receptor de quimiocinas C-C tipo 2 (por sus siglas en inglés)

CEH Célula estelar hepática

ChREBP Proteína de unión al elemento regulador de carbohidratos (por sus siglas en inglés)

CPT2 Carnitina palmitoiltransferasa II

DAB Diaminobencidina

DAMPs Patrones moleculares asociados a daño

DHA dihidroxiacetona

DMT2 Diabetes mellitus tipo 2

EHGNA Enfermedad del hígado graso no alcohólico

EHNA Esteatohepatitis no alcohólica

FAS Sintasa de ácidos grasos (por sus siglas en inglés)

FITC Isotiocianato de fluoresceína

GA3P gliceraldehído-3 fosfato

GGT Gamma glutamil transferasa

H&E Hematoxilina & eosina

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno

H₂SO₄ Ácido sulfúrico

HRP Peroxidasa de rábano

ICAM-1 Molécula de adhesión intercelular 1

IMP Trifosfato de inosina

KHK Cetohechoquinasa (por sus siglas en inglés)

KOH Hidróxido de potasio

LDN Lipogénesis de novo

LXR Receptor X del hígado (por sus siglas en inglés)

MEC Matriz extracelular

PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés)

PAS Tinción de ácido peryodico de Schiff (por sus siglas en inglés)

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas (por sus siglas en inglés)

PKF-1 Fosfofructoquinasa-1 (por sus siglas en inglés)

PPAR Receptor activado por proliferador peroxisomico (por sus siglas en inglés)

RE Retículo endoplásmico

RI Resistencia a la insulina

ERO Especies reactivas de oxígeno

SGLT-2 Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (por sus siglas en inglés)

SREBP-1 Proteína de unión al elemento regulador del esteroI (por sus siglas en inglés)

TG Triglicéridos

TGF-β Factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés)

TNF-α Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés)

TNFR1 Receptor 1 de factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)

VLDL lipoproteína de baja densidad (por sus siglas en inglés)

α-SMA Actina del musculo liso alfa (por sus siglas en inglés)

β-HFC Beta hidroxifosfocarnitina

Resumen

El objetivo del proyecto fue evaluar el efecto farmacológico de β -HFC en la esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas.

Introducción: La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de esteatosis, inflamación y fibrosis progresiva. El amplio espectro de alteraciones que caracterizan a EHNA, dificultan su tratamiento. Actualmente no hay una farmacoterapia específica para el tratamiento de la EHNA. Pioglitazona es un fármaco dado en la clínica para la EHNA, pero está asociado a graves efectos secundarios, por lo que hay una necesidad en el desarrollo de un fármaco efectivo para el tratamiento de la EHNA. β -HFC un análogo de L-carnitina ha demostrado tener efecto en reducir alteraciones del síndrome metabólico, estrechamente relacionado con el desarrollo de EHNA, por lo que se evaluó su efecto en ratas con EHNA.

Método: EHNA fue desarrollada en ratas Wistar macho, mediante la administración de una solución alta en fructosa, grasas saturadas y tetracloruro de carbono. Se dividieron en 6 grupos; EHNA, EHNA-pioglitazona, EHNA- β -HFC y sus respectivos controles de ratas sanas. La evaluación del desarrollo de la EHNA se realizó en cortes histológicos de hígado mediante la tinción H&E y tricromica de Masson. Se evaluó el efecto de β -HFC sobre los parámetros bioquímicos y de enzimas indicadoras de daño hepático. Se observó la expresión de SREBP-1c, α -SMA y de citocinas inflamatorias IL-1 β y TNF- α en tejido hepático mediante inmunohistoquímica. Se cuantificó la acumulación de glucógeno hepático por medio de la tinción PAS y se comprobó por un método químico.

Resultados: La EHNA fue comprobada por la presencia de alteraciones características de la enfermedad; esteatosis, inflamación, necrosis y la formación de hepatocitos en balón las cuales fueron observadas en el análisis histológico; así como fibrogénesis, y el desarrollo de inflamación, que se comprobó por el aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α . El efecto de β -HFC sobre la EHNA se demostró por la atenuación de las alteraciones observadas en el análisis histológico. La reducción de la expresión de IL-1 β y TNF- α indicó disminución de la inflamación lo que se vio reflejado en un menor grado de fibrosis. La reducción de la fibrosis fue comprobada por la evaluación de la activación de las CEH, a través de la expresión de α -SMA. La β -HFC disminuyó la acumulación de glucógeno hepático aumentado por la administración de fructosa en las ratas con EHNA, lo que nos indicó que β -HFC podría estar aumentando la beta oxidación de AG. Se evaluó el efecto de β -HFC sobre la LDN, a través de la expresión de SREBP-1c, que se observó aumentada por el desarrollo de EHNA y disminuida por el efecto de β -HFC. La reducción de SREBP-1c, podría justificar la reducción de la esteatosis y TG y como consecuencia la mejora de todas las alteraciones hepáticas desencadenadas por el desarrollo de EHNA.

Conclusión: El efecto de β -HFC sobre el metabolismo lipídico disminuyó la esteatosis, inflamación y fibrosis en ratas con EHNA.

Abstract

The aim of the project was to evaluate the pharmacological effect of β -HFCs on non-alcoholic steatohepatitis induced in rats.

Introduction: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a disease characterized by the presence of steatosis, inflammation and fibrosis. The wide spectrum of alterations that characterize NASH make its treatment difficult. Currently there is no specific pharmacotherapy for the treatment of NASH. Pioglitazone is a drug given in the clinic for NASH, but it is associated with serious side effects. Furthermore, it has a high prevalence, so there is an urgent need for the development of an effective drug for the treatment of NASH. β -HFC, an analog of L-carnitine, has been shown to have an effect in reducing alterations in the metabolic syndrome, closely related to the development of NASH, so its effect was evaluated in rats with NASH.

Method: NASH was developed in male Wistar rats, by administering a high fructose solution, saturated fat and carbon tetrachloride. They were divided into 6 groups; NASH, NASH-pioglitazone, NASH- β -HFC and their respective controls from healthy rats. The evaluation of the development of NASH was performed in liver histological sections using H&E and Masson's trichrome staining. The effect of β -HFC on biochemical parameters and enzymes that indicate liver damage was evaluated. Expression of SREBP-1c, α -SMA, and inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α was observed in liver tissue by immunohistochemistry. Liver glycogen accumulation was quantified by PAS staining and verified by a chemical method.

Results: The development of the NASH model was verified by the presence of characteristic alterations of NASH. Steatosis, inflammation, necrosis, and ballooning of hepatocytes were observed on histological analysis of NASH rats. Fibrogenesis was observed as a consequence of the damage, and the development of inflammation was confirmed by the increase in the expression of IL-1 β and TNF- α . The effect of β -HFC on NASH was demonstrated by the attenuation of the alterations seen on histological analysis. The reduction in the expression of IL-1 β and TNF- α indicated a decrease in inflammation, which was reflected in a lower degree of fibrosis. The reduction of fibrosis was confirmed by the evaluation of the activation of HSCs, through the expression of α -SMA. β -HFC decreased hepatic glycogen accumulation increased by fructose administration in NASH rats, indicating that β -HFC could be increasing FA beta oxidation. The effect of β -HFC on LDN was evaluated through the expression of SREBP-1c, which was observed to be increased by the development of NASH and decreased by the effect of β -HFC. The reduction of SREBP-1c could justify the reduction of steatosis and TG and, as a consequence, the improvement of all the liver alterations triggered by the development of NASH.

Conclusion: The effect of β -HFC on lipid metabolism decreased steatosis, inflammation and fibrosis in rats with NASH.

1.- Introducción

Actualmente el ritmo de vida al que el humano se ha sometido, lo ha llevado a la necesidad de modificar hábitos alimenticios que se acoplen a su acelerado ir y venir, entre estos hábitos está el uso de comidas rápidas [1]. Por su parte la industria alimentaria modificó el uso de azúcar de caña por jarabe de maíz de alta fructosa por ser más económico y de fácil manejo. Estos dos factores; el abuso de comidas rápidas ricas en grasas saturadas y de bebidas procesadas, son considerados principales causantes de alteraciones metabólicas que desencadenan el desarrollo de patologías como la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) entre otras [2]. Es imposible ignorar la cantidad de evidencia científica de la correlación de ingesta de fructosa con el desarrollo de enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), que como se conoce clínicamente conlleva a EHNA, fibrosis y cirrosis [3].

La fructosa es un monosacárido que se absorbe en los enterocitos del intestino, se ha demostrado que parte de la fructosa se metaboliza a glucosa en los enterocitos, pasando menos fructosa a circulación. Sin embargo, cuando se consumen altas cantidades de fructosa, se sobrepasa la capacidad metabólica en los enterocitos permitiendo que una mayor cantidad pase a circulación [4]. El hígado juega un papel importante en la eliminación de la fructosa, por lo que es el principal órgano afectado por el abuso en el consumo de bebidas con alto contenido de fructosa. Sin embargo, es importante mencionar que no es la fructosa en sí la que provoca daño, sino sus productos metabólicos y las vías que activa dentro de la célula. La fructosa activa factores de transcripción hepáticos que regulan la expresión de enzimas lipogénicas más eficazmente que la glucosa [5]. Cuando hay abundante glucosa, sobrepasando las necesidades energéticas, el hígado convierte la glucosa en ácidos grasos a través de la lipogénesis de novo (LDN). Ésta es una vía metabólica que convierte el exceso de carbohidratos de la dieta en ácidos grasos, que son principalmente almacenados en el tejido adiposo, sin embargo, cuando hay exceso estos son almacenados en otros órganos como hígado, páncreas, corazón, etc. [6]. Aun cuando una de las funciones del tejido adiposo es almacenar ácidos grasos

esterificados, se ha observado que en casos de obesidad se desarrolla un proceso inflamatorio, que además conduce a un estado de resistencia a la insulina local. Debido al papel de la insulina en la supresión de la lipólisis en tejido adiposo, la resistencia a la insulina en tejido adiposo genera una constante liberación de ácidos grasos que llegan al hígado, por lo que también es considerada una contribución al aumento de ácidos grasos en hígado [7].

Las lipoproteínas de varias clases desempeñan funciones importantes en los lípidos sistémicos. En el intestino encontramos la lipoproteína ApoB48, a la que los triglicéridos se ensamblan alrededor, formando quilomicrones. En hígado encontramos lipoproteínas de baja densidad más pequeña ApoB 100. Ambos tipos de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG) sirven para transportar ácidos grasos a órganos periféricos, en particular tejido adiposo, músculo esquelético y corazón [8]. En un intento por parte del hígado de atenuar la dislipidemia, se reduce la excreción de TG acoplados a ApoB100, exacerbando la acumulación lipídica en hígado. Se ha observado en pacientes con NASH diagnosticados por biopsia, una menor expresión de ApoB100, lo cual sugiere que la reducción de ApoB100 es uno de los mecanismos de acumulación lipídica en hígado [9].

El daño constante de los factores ya mencionados conlleva al desarrollo de un proceso inflamatorio y al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, a su vez, activa las células estelares hepáticas (CEH). Estas se diferencian a un fenotipo de miofibroblasto, aumentando la producción de matriz extracelular llevando a fibrosis [10,11]. El avance del grado de fibrosis disminuye la funcionalidad del hígado, provocando cirrosis; caracterizada por la formación de nódulos de regeneración que da un aspecto rugoso al hígado y es la etapa terminal de la enfermedad. El aumento en la prevalencia de patologías asociadas a EHNA se ha reflejado en la prevalencia de EHNA. Se considera que EHNA llegará a ser una de las principales causas de trasplante de hígado en los próximos años. El problema se hace mayor debido a la falta de una terapia farmacológica específica para el tratamiento de EHNA.

La EHNA es una enfermedad compleja debido a las patologías asociadas a su desarrollo y al amplio espectro histopatológico que abarca su desarrollo, que va desde esteatosis, esteatohepatitis, terminando en cirrosis o en algunos casos en cáncer hepático. Diversos son los factores que dificultan el desarrollo de una terapia farmacológica específica. Lo ideal sería una terapia que abarcara todo el espectro de patologías que caracterizan a EHNA. Actualmente el fármaco utilizado para el tratamiento de EHNA es la pioglitazona, conjuntamente con el tratamiento de comorbilidades asociadas, así como vitamina E como antioxidante y el cambio de estilo de vida. Sin embargo, tanto la pioglitazona como la vitamina E, están asociadas al desarrollo de cáncer, por lo que no son seguras por periodos de tiempo largos. Dada la naturaleza crónica de la enfermedad es necesario emplear tratamientos prolongados. Generalmente junto con el tratamiento farmacológico se recomienda llevar un estilo de vida, pero la mayoría de los pacientes no logran mantener un estilo de vida sano, por lo que la terapia no produce un cambio significativo en los pacientes con EHNA. Debido a esta problemática mundial es necesario el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de EHNA. Existen varias propuestas en desarrollo, pero hasta ahora ninguna se ha implementado en pacientes [12].

2. Antecedentes

2.1 Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)

La EHGNA es una enfermedad común, caracterizada por la presencia significativa de grasa en más del 5% de los hepatocitos, en pacientes sin antecedentes de consumo de alcohol o consumo mínimo 30 g/día para mujeres y 40g/día para hombres [13]. Es una enfermedad heterogénea y compleja, un claro ejemplo de su heterogeneidad se refleja en el amplio espectro de la enfermedad y su presencia tanto en personas obesas como no obesas [14]. Hasta la fecha muchos aspectos de EHNA en no obesos sigue siendo controversial, entre ellos su prevalencia y patología. La EHNA es una enfermedad progresiva, que abarca desde la acumulación de grasa en los hepatocitos (esteatosis), fibrosis, terminando en

cirrosis o en cáncer hepático en algunos casos [15]. La EHGNA está asociada con el consumo excesivo de grasas saturadas, bebidas procesadas y al estilo de vida sedentario. La prevalencia de EHGNA es de un 25-30% de la población mundial adulta, el 50 % de adultos con diabetes mellitus 2 (DMT2) y del 70 al 90 % en personas obesas. Debido a estas estadísticas, el EHGNA se considera una epidemia mundial [16, 17]. Se han identificado 3 mecanismos como fuentes que contribuyen al desarrollo de esteatosis; aumento de la lipólisis de tejido adiposo visceral, activación de la lipogénesis de novo hepática y un alto contenido de calorías y/o grasa de la dieta [18]. El incremento de la lipólisis del tejido adiposo puede ser consecuencia de un tejido adiposo resistente a la insulina. La función principal del tejido adiposo es el almacenar el exceso de ácidos grasos (AG) como triacilgliceroles, cuando aumenta la demanda de energía, estos triacilgliceroles se descomponen en los AG que los constituyen y glicerol. EL destino de los AG liberados puede ser como molécula de señalización, oxidación para generar ATP (Adenosín trifosfato) o reesterificación de nuevo como triacilgliceroles. Sin embargo, el exceso de estos ácidos grasos puede tener efectos nocivos a través de la acumulación de metabolitos tóxicos, resultando en inflamación, resistencia a la insulina (RI) o apoptosis [19]. La lipogénesis de novo (LDN) es un proceso que regula exceso de carbohidratos convirtiéndolos en ácidos grasos, por lo que un aumento de LDN resulta en un incremento de ácidos grasos y con ello de triglicéridos en circulación, así como su acumulación en hígado [20].

2.1.1 El papel de la LDN en el desarrollo de esteatosis en el hígado

Como se ha mencionado la LDN es un proceso de síntesis de ácidos grasos a partir del exceso de carbohidratos de la dieta. Se estimó que, en un adulto delgado, sano y en ayunas la LDN participaba con menos del 5% de la síntesis total de TG. Sin embargo, bajo alimentación las tasas de LDN son aproximadamente 25% más que en ayunas [21]. La LDN se lleva a cabo en todas las células ya que los ácidos grasos son los elementos de las membranas celulares, pero es más activa en los tejidos metabólicos, como el hígado, tejido adiposo y musculo esquelético. En roedores el

hígado es el principal contribuyente a la lipogénesis de todo el cuerpo y el tejido adiposo en menor medida. Sin embargo, en humanos alimentados con una dieta rica en carbohidratos se demostró que el tejido adiposo contribuía en mayor medida que la LDN hepática [22]. El proceso de LDN se puede dividir en tres pasos secuenciales: síntesis de ácidos grasos, alargamiento/ desaturación de ácidos grasos y ensamblaje en triglicéridos. Los carbohidratos de la dieta se descomponen en monosacáridos de seis carbonos, glucosa o fructosa, cuyo metabolismo converge en la producción de tres carbonos intermedios, gliceraldehído-3 fosfato (GA3P) y fosfato de dihidroxiacetona (DHA). Estos intermediarios pueden interconvertirse o metabolizarse más a piruvato, el producto final del metabolismo citoplásmico de carbohidratos. El piruvato puede ingresar a las mitocondrias, donde se convierte en acetil-CoA, para ser utilizado en el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT), para la producción de energía. Cuando las reservas de energía son abundantes, los intermediarios de CAT se acumulan y el citrato es transportado de regreso al citoplasma por el sistema de transporte de tricarboxilato mitocondrial. El citrato se convierte en acetil-CoA, por la acción de la adenosina trifosfato citrato liasa (ACL), que es el primer paso de la síntesis de ácidos grasos endógenos. Además, el citrato es un activador alostérico de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) citoplasmática, cuya acción es convertir la acetil-CoA en malonil-CoA, iniciando así la lipogénesis de novo [23].

2.1.2 El papel de la fructosa en el desarrollo de EHGNA

La fructosa es un edulcorante energético que proviene de diferentes fuentes naturales (frutas, bayas y verduras) o se agrega a refrescos, productos de panadería y dulces como jarabe de maíz de alta fructosa. Su consumo ha aumentado recientemente en muchas partes del mundo debido al creciente uso de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa en bebidas y comida. Los estudios sobre dietas ancestrales han demostrado que la ingesta media de fructosa *per cápita* fue de alrededor de 2 kg por año, mientras que el consumo promedio mundial actual de fructosa *per cápita* es de 25 kg por año. En países en desarrollo, como México, su

importación de Estados Unidos ha aumentado significativamente, lo que indica una mayor demanda de azúcares añadidos en estos mercados emergentes. Las bebidas endulzadas proporcionan el 60% de la ingesta diaria de azúcar en los Estados Unidos. México tiene el mayor número de consumidores de bebidas azucaradas en todo el mundo, donde tales bebidas proporcionan el 69% del azúcar añadido total en la dieta diaria [24]. Años atrás la fructosa era considerada una alternativa saludable como edulcorante para pacientes diabéticos debido a su bajo índice glucémico [25,26]. Con base en experimentos con modelos animales y estudios clínicos, hoy en día, la fructosa es reconocida como un mediador importante de EHGNA y se ha encontrado una correlación significativa entre la ingesta de fructosa y el grado de fibrosis [27].

La fructosa libre se absorbe directamente desde el lumen intestinal, la fructosa en moléculas de carbohidratos más grandes se escinde primero en la membrana luminal de enterocitos. El transporte de fructosa intestinal se ve facilitado principalmente por el transportador de glucosa 5 (GLUT5 / SLC2A5) en el lado luminal y el transportador de glucosa 2 (GLUT2 / SLC2A2) en el lado basolateral. La fructosa ingerida se extrae casi por completo de la sangre portal en el primer paso. A diferencia de la glucosa ingerida, solo una pequeña fracción de la fructosa ingerida finalmente entrará en la circulación sistémica [28]. En condiciones fisiológicas normales, la fructosa es pasivamente absorbida a través de la luz intestinal, y luego transportado al hígado, donde es metabolizado por la cetohecoquinasa (KHK) a fructosa-1-fosfato. Posteriormente, la fructosa-1-fosfato se metaboliza a glucosa, acetil-CoA, ácidos grasos, lactato y triglicérido. En contraste con la fosforilación de la glucosa, la fosforilación de fructosa es rápida y no está regulada por inhibición por retroalimentación. La fosforilación de fructosa utiliza ATP, que agota tanto el ATP como el fosfato intracelular, lo que lleva a la activación de adenosina monofosfato (AMP) desaminasa, y la conversión de AMP a trifosfato de inosina (IMP), y posteriormente, a ácido úrico. El ácido úrico se ha relacionado con el estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. Los altos niveles de ácido úrico circulante son comúnmente observados en individuos con alto consumo de fructosa [29].

Si bien la glucosa es el sustrato principal del LDN, la fructosa es un sustrato altamente lipogénico y se cree que esto surge de él, sin pasar por el punto regulador crítico catalizado por fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) en la glucólisis [30]. La síntesis de ácidos grasos y grasas en el hígado es una vía metabólica muy regulada que es fundamental para la distribución de energía. Al tener características comunes en sus regiones promotoras, los genes lipogénicos se regulan coordinadamente a nivel de transcripción. Los factores de transcripción, como USF, SREBP-1c, LXR y ChREBP, juegan un papel fundamental en este proceso [31]. La LDN depende de enzimas clave acetil-CoA, carboxilasa (CoA) y la sintasa de ácido graso (FAS) cuya expresión puede ser activada por fructosa. Algunos investigadores han observado que la principal vía por la que se activan las enzimas lipogénicas es a través de SREBP-1, que es un factor de transcripción que se genera en el retículo endoplásmico principalmente en hígado [32]. SREBP-1 se activa por cambios nutricionales, se ha observado que el consumo de fructosa aumenta la expresión de SREBP-1. Una de las funciones de SREBP-1 es regular la producción de enzimas lipogénicas como CoA y FAS [33]. La LDN no es la única alteración lipídica relacionada con la fructosa, sus metabolitos de triosa fosfato pueden entrar en el ciclo del ácido cítrico para la oxidación intrahepática o la síntesis de glucosa, lactato y / o lípidos. Las células carecen de la maquinaria de fructólisis, pero utilizarán fácilmente la glucosa y el lactato recién sintetizados, como fuente de energía. Por lo tanto, a través de este mecanismo de dos pasos, la fructosa produce un cambio de fuente de energía de la oxidación de lípidos a carbohidratos, y esto puede influir en la acumulación de lípidos al disminuir la oxidación y producción de lípidos hepáticos [34]. Esto se demostró en ratas, donde la perfusión con sangre enriquecida con fructosa inhibió la oxidación hepática de AG por el sustrato competencia [35]. La presencia permanente de los lípidos en los hepatocitos activa vías que favorecen el desarrollo de un proceso inflamatorio, llevando al paciente a la siguiente etapa de la enfermedad, la esteatohepatitis no alcohólica.

2.2 Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)

La EHNA es considerada un grave problema de salud pública a nivel mundial, principal factor asociado a cáncer hepático y primera causa de trasplante de hígado. En 2018 se estimó que alrededor del 25% de la población mundial tenía EHGNA. En un principio se consideraba a EHGNA como la forma no progresiva de la enfermedad, ahora se sabe que cierto porcentaje de personas con EHGNA desarrollan EHNA [36]. La EHNA es una enfermedad asintomática, su diagnóstico se realiza mediante marcadores bioquímicos o ultrasonido que no son tan certeros como una biopsia. Es importante mencionar que para el diagnóstico de EHNA no se usa biopsia por ser un método invasivo y que conlleva riesgo, por lo que generalmente la EHNA se descubre en etapas avanzadas y deja cierto grado de incertidumbre acerca del porcentaje de prevalencia real [37, 38]. El aumento de la prevalencia de factores de riesgo asociados a EHNA se ha reflejado en la prevalencia de EHNA, debido a la estrecha relación bien establecida de factores como obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y dislipidemias. La relación de EHNA con otras patologías la hacen una enfermedad compleja.

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) se caracteriza principalmente por esteatosis e inflamación. Varios estímulos patológicos contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio, estos pueden tener su origen fuera del hígado (como tejido adiposo e intestino) o dentro del órgano (lipotoxicidad, respuesta inmune innata, vías de muerte celular, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico) [39]. El hígado está compuesto por hepatocitos que componen el parénquima hepático, y células no parenquimatosas; células estrelladas, células endoteliales sinusoidales. Entre las células inmunes más abundantes están las células de Kupffer, células dendríticas, neutrófilos, etc. El hígado recibe principalmente su suministro de sangre a través de la vena portal que viene del intestino, por lo que es rica en toxinas, antígenos alimentarios y productos bacterianos del medio ambiente, por lo que, una de las funciones del hígado es lograr la desintoxicación y las necesidades metabólicas del cuerpo [40]. Al ser el hígado el principal órgano involucrado en el metabolismo está expuesto al efecto nocivo de alteraciones

nutricionales. Existen diversas teorías para intentar explicar el desarrollo de EHNA, actualmente se considera una combinación múltiple de agresiones paralelas que actúan sobre individuos predispuestos genéticamente. Varios factores de transcripción se han visto involucrados en el desarrollo y control de EHNA, uno muy relacionado con la ingesta de fructosa es SREBP-1c [41].

2.3 El papel de la proteína de unión al elemento regulador de esterol (SREBP-1c) en el desarrollo de EHNA

SREBP son una familia de factores de transcripción. Estas proteínas se sintetizan como precursores inactivos de 110 aminoácidos; luego, se insertan en la membrana del retículo endoplásmico (RE), donde interactúan con un sensor de esteroides, la proteína de activación de escisión SREBP proteína (Scap). El complejo SREBP / Scap se mueve al Aparato de Golgi, donde las formas maduras o nucleares de SREBP son generadas por dos proteasas, la proteasa del sitio 1 y la proteasa del sitio 2 y una proteína de anclaje [42].

La homeostasis de los lípidos hepáticos es principalmente regulada por PPAR y SREBP-1c, que coordina las respuestas transcripcionales a condiciones metabólicas como la alimentación y el ayuno para promover el almacenamiento de grasa o el catabolismo, respectivamente [43]. Por lo que, SREBP1c es un objetivo usado para el tratamiento de EHNA. La expresión y la activación postraduccional de SREBP1c está fuertemente estimulada por la señalización de insulina; este mecanismo asegura una respuesta LDN coordinada en condiciones de alta disponibilidad de glucosa. Las dietas altas en fructosa comúnmente inducen resistencia sistémica a la insulina e hiperinsulinemia en ayunas, lo que promueve la activación de SREBP1c mediada por insulina y la síntesis de lípidos hepáticos [44]. Sin embargo, las observaciones de que la depleción de insulina y la desactivación del receptor de insulina específico del hígado en ratones, también muestran una inducción de SREBP1c tras la administración aguda de azúcar o con dieta alta en fructosa a corto plazo, sugieren que este factor de transcripción también está

regulado por señales de nutrientes, independiente de la señalización de la insulina (ver figura 1) [45].

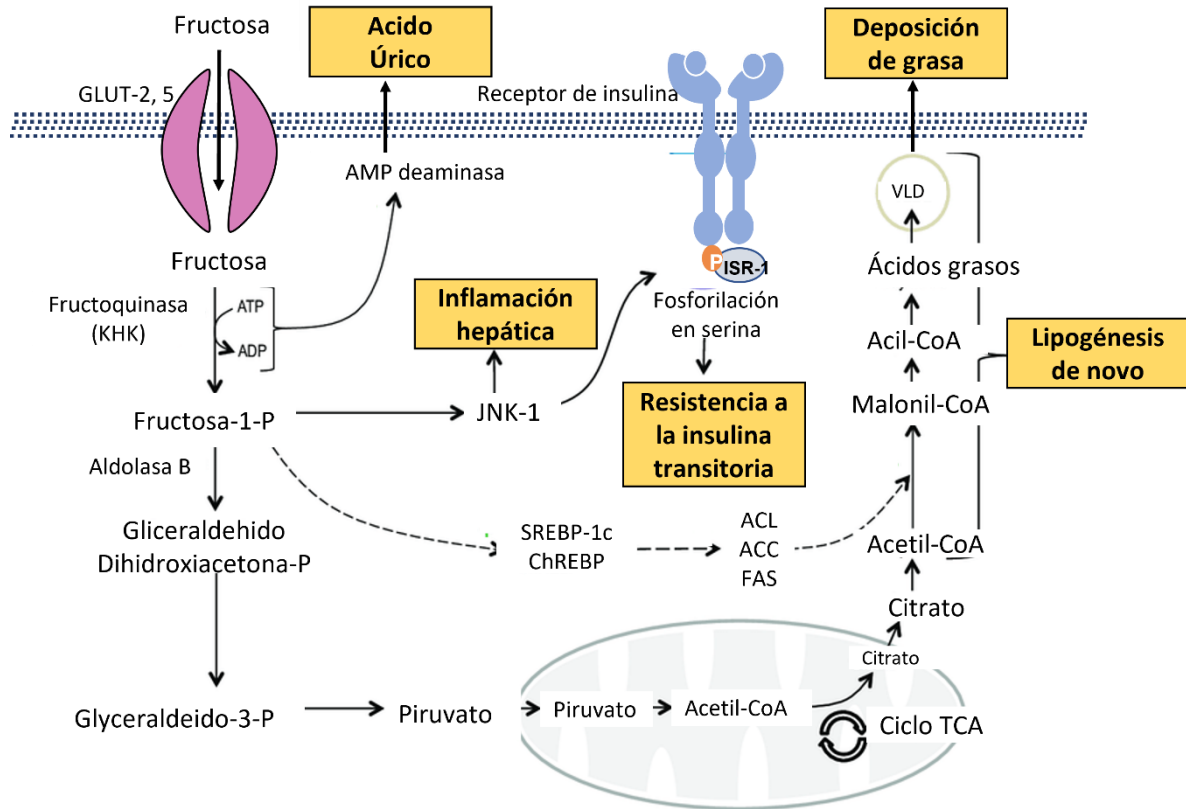


Figura 1. Papel de SREBP-1c en el desarrollo de esteatosis en EHNA

[imagen modificada de 46].

2.4 Características histológicas de EHNA

Las características histológicas de EHNA incluyen esteatosis macro y microvesicular, hepatocitos en balón, inflamación dispersa (principalmente lobulillar), distorsión de la arquitectura hepática y cuerpos apoptóticos. Debido a la complejidad inherente de la enfermedad y al amplio espectro de hallazgos, se han diseñado sistemas de puntuación para ayudar a los patólogos a evaluar la gravedad de la EHNA [47]. La esteatosis es la característica histológica que une todas las diversas formas de EHNA, pero es una lesión común y completamente inespecífica que puede verse en el trasfondo de muchas enfermedades hepáticas. Por convención, la esteatosis debe involucrar al menos el 5% de los hepatocitos (por estimación visual) para ser considerados clínicamente significativos [48].

La etapa inflamatoria de EHNA se atribuye a la activación de macrófagos hepáticos residentes, reclutamiento de células inflamatorias circulantes, y regulación positiva de varios mediadores inflamatorios solubles. Es ampliamente aceptado el papel que juegan las citocinas como mediadores de inflamación. Estudios previos reportan varias citocinas involucradas en el desarrollo de EHNA, como la interleucina (IL)-6, la IL-1 β y el factor de necrosis tumoral - α (TNF- α) (ver figura 2) [49].

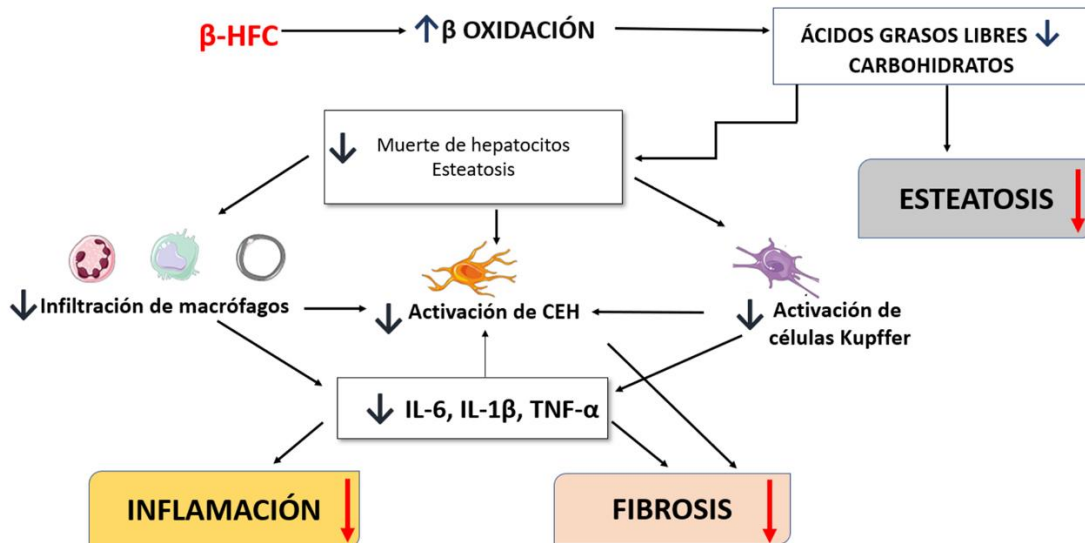


Figura 2. Citocinas que conducen a inflamación [50]

2.4.1 El papel citocinas en el desarrollo del proceso inflamatorio en EHNA

La IL-6 es crítica en el desarrollo de EHNA, evidencia científica sugiere que tiene propiedades proinflamatorias como antiinflamatorias [51]. En un estudio hepático realizado mediante biopsia en pacientes con EHNA mostraron niveles elevados de IL-6 en comparación con pacientes con solo esteatosis o sanos. Sin embargo, en personas obesas los niveles de IL-6 son más altos en pacientes con esteatosis severa que en aquellos con esteatosis leve [52]. Debido a su correlación con EHNA, se ha llegado a considerar como un blanco terapéutico, sin embargo, por su papel antiinflamatorio no ha permitido tener resultados favorables (ver figura 3).

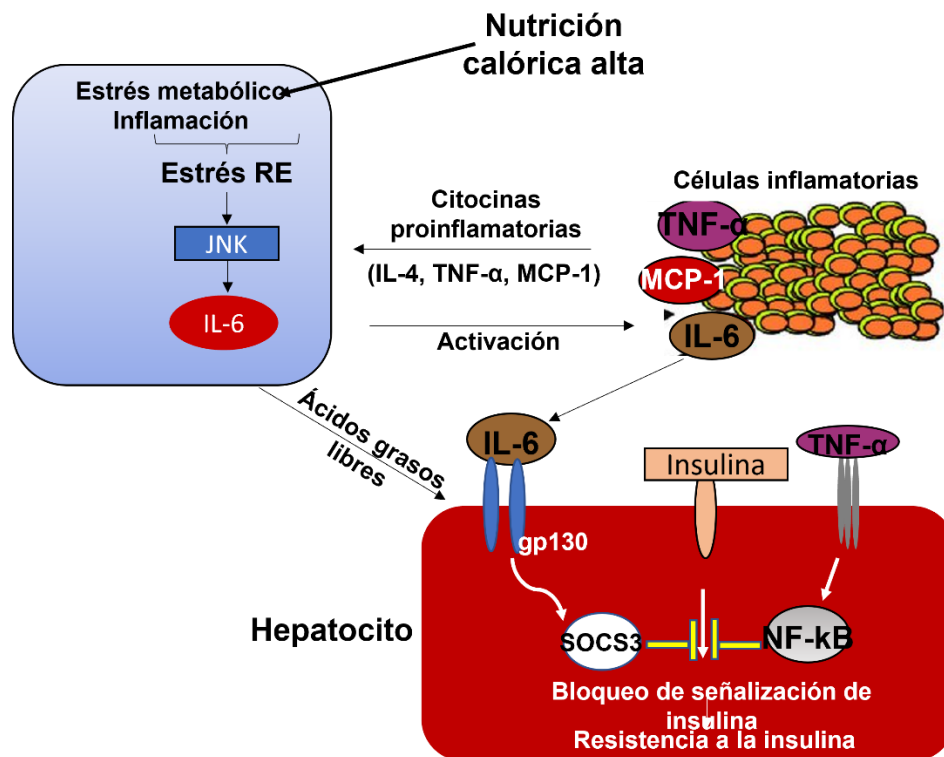


Figura 3. Secreción de IL-6 por dieta alta en calorías [53]

Aunque no se comprende del todo el mecanismo que subyace a EHNA, sí se sabe que la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 juegan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad. Ahora se sabe que el complejo proteico citosólico llamado inflamosoma NLRP3 es importante para la activación de citocinas proinflamatorias. NLRP3 activa la proteasa caspasa 1 que escinde pro IL-1 β convirtiéndola en su forma activa [54]. IL-1 β promueve la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis mediante la señalización a través del receptor de IL-1 expresado en las diferentes subpoblaciones de células hepática. La IL-1 β promueve la esteatosis hepática al estimular la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos primarios del hígado y la formación de gotitas de lípidos. Al actuar sobre las células endoteliales sinusoidales del hígado, la IL-1 β promueve la inflamación del hígado al regular al alza la expresión de ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) que atrae a los neutrófilos en el hígado [55]. Por su parte IL-1 α es un precursor importante, que se activa en la necrosis hepática. IL-1 α tiene doble función, prevenir la inflamación inducida por señales proapoptóticas, pero también actúa como factor proinflamatorio después de la necrosis tisular (ver figura 4). Debido al importante papel que juega la familia de IL-1 es investigado como un blanco terapéutico en EHNA [56].

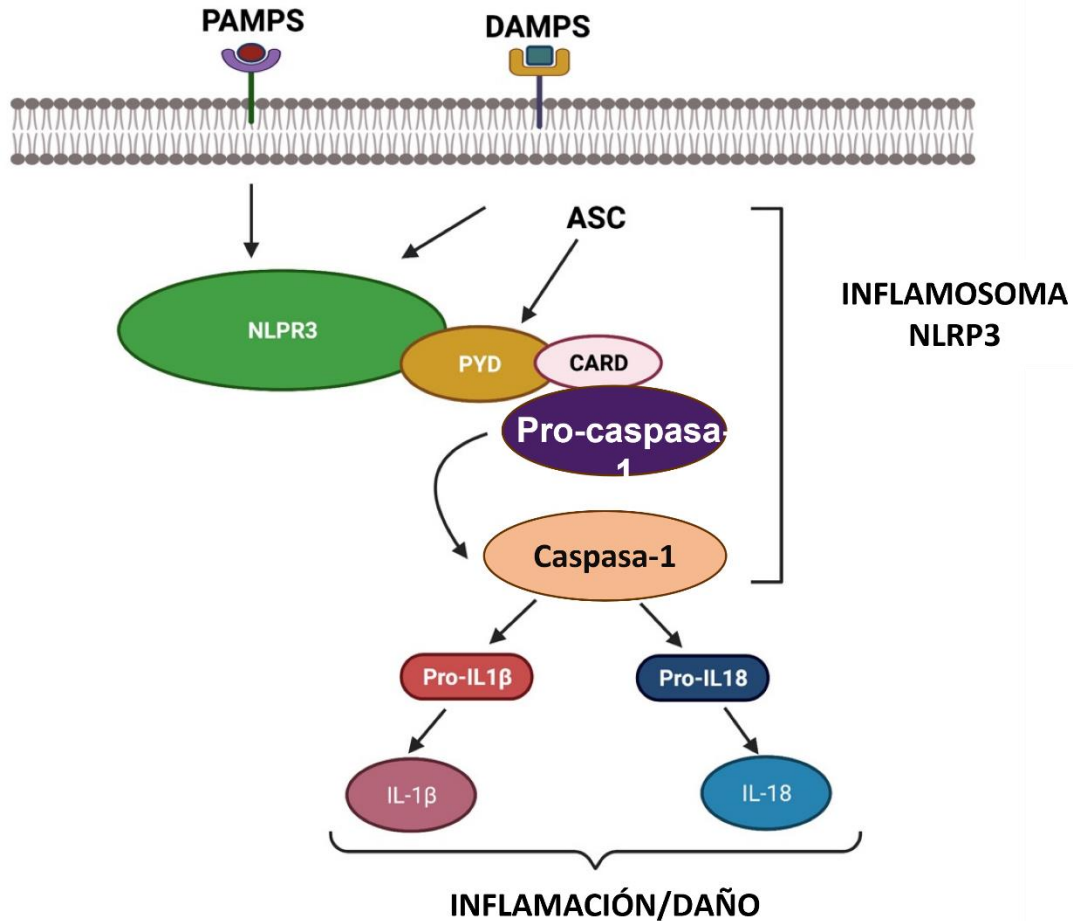


Figura 4. Activación de IL-1 β en EHNA [57]

TNF- α también es una citocina proinflamatoria que tiene amplias funciones, muy bien establecidas en la homeostasis tisular. Su transducción de señales corriente abajo regula la proliferación, muerte celular, inflamación, y la producción de otras citocinas [58]. En pacientes obesos, el tejido adiposo es una fuente sistémica de TNF- α , por lo que sus niveles están más elevados en suero. En el hígado se libera principalmente por las células de Kupffer razón por la que en pacientes con EHNA TNF- α está más elevado en hígado [59]. Estudios en roedores demostraron que el antagonismo de TNF- α redujo la inflamación y esteatosis, por lo que su reducción podría reducir el riesgo de desarrollar cirrosis [60]. Sin embargo, el problema con la terapia antagonista de TNF- α , es que la transducción de señal de TNF- α esta

mediada por los receptores TNFR1 y TNFR2, donde TNFR1 impulsa la inflamación y alteraciones metabólicas, mientras que, TNFR2 regula la regeneración y la respuesta inmune en forma protectora. Por lo que, un bloqueo de sus receptores alteraría la respuesta inmune de manera perjudicial.

2.5 Desarrollo de fibrosis en la esteatohepatitis no alcohólica

La fibrosis es el resultado de un desbalance entre la producción de matriz extracelular y su degradación. En el hígado las células estelares hepáticas son las principales productoras de matriz extracelular, el objetivo es restaurar la arquitectura y la función del órgano después de un daño grave [61]. De hecho, las señales inflamatorias promueven la regeneración hepática, las células inflamatorias proporcionan la eliminación de restos celulares, mientras que la fibrosis permite la estabilidad mecánica [62]. Sin embargo, la cicatrización sostenida altera gradualmente la función celular causando falla del órgano que la padece. El miofibroblasto es una célula similar a un fibroblasto con propiedades contráctiles, que se deriva típicamente de células de linaje mesenquimatoso mediante transdiferenciación, a menudo denominada "activación". Los miofibroblastos proliferantes son la fuente clave del exceso de moléculas de matriz extracelular (MEC), como el colágeno tipo I y III, así como otras proteínas que constituyen el tejido fibroso patológico. El principal tipo de células fibrogénicas en el hígado son las células estelares hepáticas (CEH) [63]. Las CEH representan aproximadamente el 10% de todas las células hepáticas y residen en el espacio de Disse (el espacio perisinusoidal), entre los hepatocitos. En su estado latente, las CEH muestran un fenotipo no proliferativo inactivo o quiescente (qCEH) y se caracterizan por almacenar ácido retinoico (vitamina A), ésteres de colesterol y triglicéridos en vacuolas lipídicas citosólicas [64]. La infiltración de las células inmunes activa promueve la transdiferenciación de CEH en miofibroblastos productores de colágeno. Las vías de señalización propuestas asociadas con la activación de las CEH y la progresión de la fibrosis incluye factores como: el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF),

el inflammasoma (NLRP3) -caspasa 1 y la vía WNT/ β -catenina [65]. La fibrosis del parénquima hepático comienza alrededor de las venas centrales, progresa a las áreas portal y periportal, formando puentes entre venas centrales o entre espacios portales [65]. En 1981 Knodell et al, propusieron una puntuación semicuantitativa para diagnosticar la hepatitis crónica y registró los resultados de clasificación y estadificación como el índice de actividad histológica. La principal limitación del sistema de puntuación de Knodell es que combina necroinflamación y fibrosis, pero histológicamente estos dos los cambios no ocurren en paralelo. Además, el histológico el índice de actividad es un recuento ponderado, que puede dar lugar a inconsistencias. Por lo tanto, el sistema de puntuación de Knodell no se utiliza con frecuencia, mientras que los sistemas de puntuación de Scheuer, METAVIR e Ishak se utilizan actualmente con mayor frecuencia (ver figura 5) [66].

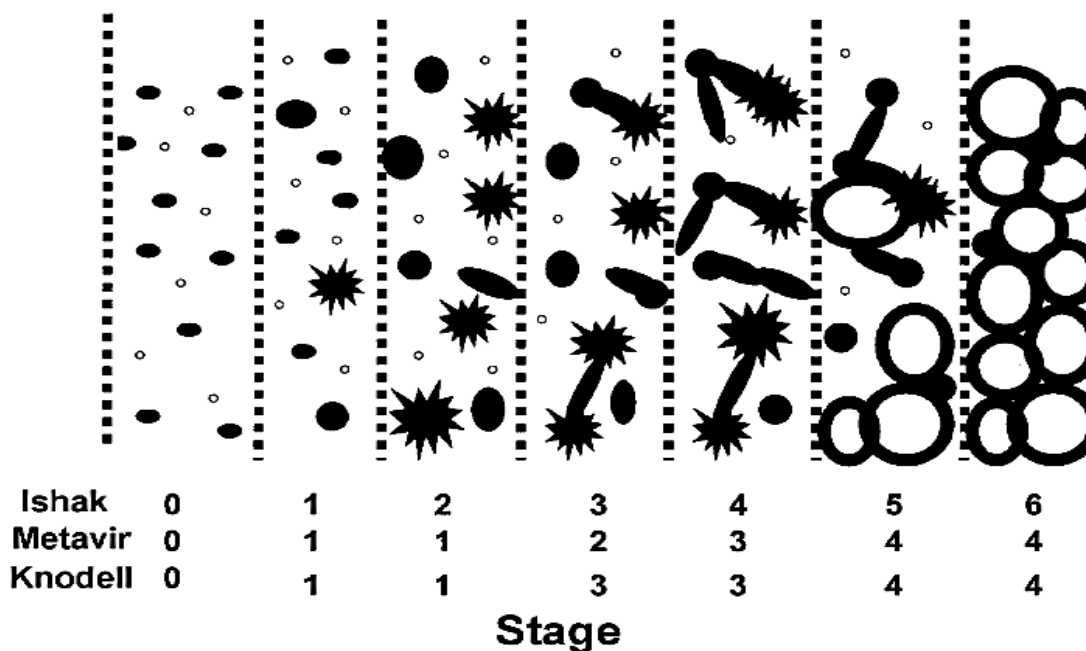


Figura 5. Comparación esquemática de método Ishak, Metavir y Knodell para el análisis de fibrosis. Puntaje Ishak 0-6, Metavir y Knodell 0-4 [67]

2.6 Diagnóstico de EHNA

La EHNA es una enfermedad asintomática por lo que, generalmente se diagnostica en grados avanzados de la enfermedad. El estándar de oro para su diagnóstico es la biopsia, ya que permite evaluar varios parámetros histológicos y permite determinar el grado de la enfermedad. Sin embargo, este método es invasivo, costoso, doloroso y pone en riesgo al paciente. Generalmente ante sospecha de daño hepático se evalúan los factores de riesgo mediante una entrevista con el paciente, complementando con una prueba de laboratorio de marcadores enzimáticos. Enzimas hepáticas como aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT), son enzimas que, al ser dañada la membrana celular, son liberadas a circulación aumentando los niveles séricos, por lo que es usada clínicamente como indicador de daño hepático. Los niveles de enzimas hepáticas fosfatasa alcalina (ALP) y gama gluamil transferasa (GGT) aumentan cuando la función celular es alterada, por lo que son un indicador del funcionamiento celular. Los niveles de colesterol y triglicéridos también son un factor de riesgo asociado a la presencia de alteraciones metabólicas relacionadas con EHNA. Todos estos parámetros se utilizan para evaluar el estado funcional del hígado y detectar lesión en el hígado [68].

2.7 Tratamientos para EHNA

Actualmente no hay fármaco específico y aprobado para el tratamiento de EHNA. Por lo tanto, la terapia se ha basado principalmente en el estilo de vida, con el objetivo de lograr la pérdida de peso con ejercicio y una dieta baja en colesterol, grasas saturadas y fructosa. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes es un estilo de vida difícil de sostener a largo plazo. Según estudios realizados a pesar de que pioglitazona ha mostrado reducir alteraciones bioquímicas características de EHNA, su uso ha sido reducido debido al riesgo de cáncer de vejiga y el aumento de peso que provoca su administración. La vitamina E como antioxidante se ha

visto ser eficaz, pero está prohibido su uso por tiempo prolongado por su riesgo de desarrollar cáncer de próstata, además de que está contraindicado en casos de fibrosis [69, 70].

Las comorbilidades asociadas a EHNA representan las principales causas de mortalidad en la EHGNA. Morbilidad y mortalidad relacionada con el hígado solo aumenta significativamente con la fibrosis en etapa 2 y especialmente con la cirrosis. Por lo tanto, la prevención y la terapia deben abordar dos objetivos en gran medida independientes: el tratamiento de complicaciones metabólicas que pueden tratarse con una variedad de medicamentos eficaces, y el tratamiento de la fibrosis de moderada a avanzada (etapa 2-4). Sin embargo, para esta última no existen medicamentos aprobados que demuestren un beneficio significativo en la prevención o reversión de esta [71, 72]. No obstante, con la profundización e investigación de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de todo el espectro de enfermedades que caracteriza a EHNA se han realizado estudios centrados en fármacos potentes y eficaces, así como terapias novedosas que se dirigen específicamente a todas las alteraciones que caracterizan a EHNA (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Fármacos actuales en fase 3 de investigación para el tratamiento de EHNA acorde a Ensayosclínicos.gov [73]

Fármacos	Mecanismos de acción	Finalización estimada	Estudio/identificador
Resmetirom (MGL-3196)	Agonista del receptor de la hormona tiroidea	March 2024	[MAESTRO-NASH]NCT03900429
Dapaglifozin	Inhibidor SGLT-2	Noviembre 2021	[DEAN] NCT03723252
Aramchol	Inhibidor SCD1	Diciembre 2024	[ARMOR] NCT04104321
Cenicriviroc	Antagonista CCR2-CCR5	Octubre 2028	[AURORA] NCT03028740
Elafibranor	Agonista PPAR	Diciembre 2021	[RESOLVE-IT]NCT02704403
Obeticholic acid	Agonista FXR	Octubre 2022	[REGENERATE] NCT02548351

2.8 La L-carnitina en el tratamiento de enfermedades metabólicas

La L-carnitina (3-hidroxi-4-N-trimetilamonibutanoato) se descubrió en 1905 como un constituyente del músculo. El nombre carnitina proviene de la palabra latina "carnis" (carne). Es un aminoácido no proteico, cuyas fuentes primarias en los seres humanos incluyen tanto la dieta como la síntesis endógena. Se encuentra en alimentos de origen animal como carne, pescado, leche y productos lácteos y se sintetiza principalmente en el hígado y riñones a partir de lisina y metionina. La L-carnitina juega un papel vital en el metabolismo de los lípidos al transportar ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias, estimulando así la beta-oxidación (ver figura 6) [74]. Estudios realizados en pacientes diabéticos han mostrado que 1000mg de L-carnitina mejora la capacidad de oxidación de ácidos grasos y las alteraciones metabólicas [75]. El proceso de oxidación es una de las principales vías subyacentes al metabolismo de los lípidos. La inhibición de la oxidación conduce a la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos. Se demostró que la administración de L-carnitina mejora o previene el daño hepático mediante el aumento de la capacidad antioxidante hepática. Estudios recientes han mostrado que L-carnitina interfiere con las vías oxidativas, por lo que es favorable para el tratamiento de EHNA [76]. Además, se ha demostrado que L-carnitina disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias, mejora la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina (RI) [77]. Sin embargo, la eficiencia de la absorción de L-carnitina tiende a disminuir a medida que aumenta la dosis. De hecho, algunos estudios han encontrado que la absorción de L-carnitina se satura con dosis de 2 g / 12 h. La L-carnitina se absorbe en parte a través de la difusión pasiva y en parte a través del transporte mediado por portadores en el colon en el intestino delgado. La L-carnitina dietética se degrada en el intestino en parte por el N-óxido de trimetilamina y en parte por la gamma-butirotbetaína. La mayoría de estos estudios han investigado la absorción en humanos sanos y no está claro si existen diferencias en la absorción de L-carnitina en individuos con EHNA [78].

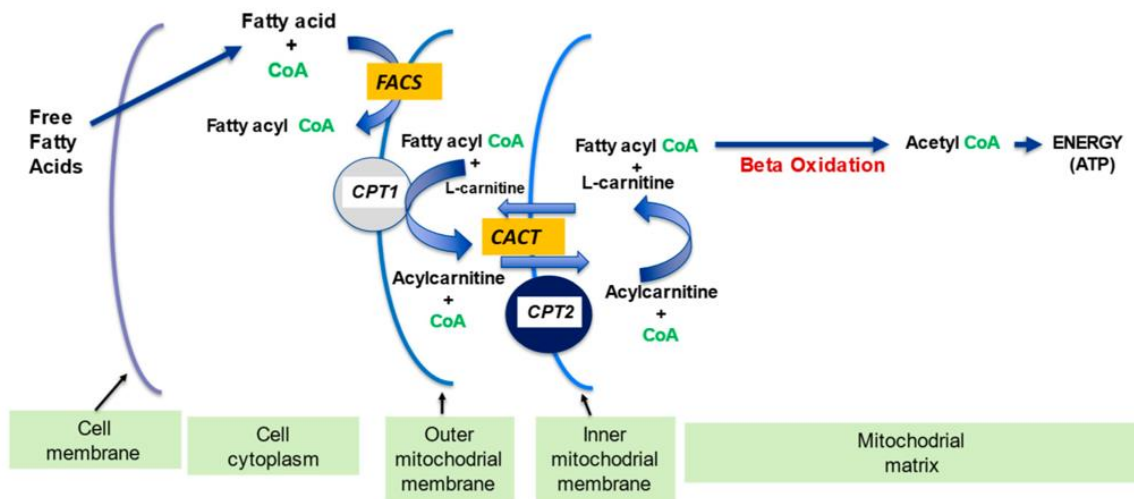


Figura 6. Mecanismo de acción de L-carnitina [79]

2.8.1 Efecto de β -Hidroxfocarnitina (β -HFC) en el tratamiento de alteraciones metabólicas

Debido a la baja absorción de L-carnitina y que ha mostrado mejorar alteraciones metabólicas en humanos, varios investigadores han realizado modificaciones a la molécula para generar varios análogos, con la finalidad de aumentar su absorción, pero mantener su efecto farmacológico. La β -HFC es un análogo de L-carnitina que ha mostrado ser más efectivo farmacológicamente y más seguro, que ha demostrado reducir eficazmente los niveles de insulina y los niveles séricos de glucosa, triglicéridos y colesterol en el hígado y suero de ratas obesas Zucker fa / fa, así como en ratas que se volvieron resistentes a la insulina, con una dieta rica en fructosa [80]. Estudios previos sobre su toxicidad han demostrado que el β -HFC tiene un excelente margen de seguridad en estudios preclínicos (ver figura 7) [81]. Los estudios farmacocinéticos de β -HFC mostraron una mayor absorción en comparación con su precursora L-carnitina [82]. Dado el efecto positivo del β -HFC en las alteraciones metabólicas, es posible que sea eficaz para el tratamiento de la EHNA.

Ratas obesas Zucker <i>fa/fa</i>	Ratas Wistar macho con RI
β-HFC \uparrow glucógeno y \downarrow glucosa hepático Dosis 100mg/Kg, v.o. / 5 sem	β-HFC \downarrow triglicéridos séricos Dosis 100mg/Kg, v.o./ 2 sem
β-HFC \downarrow <u>triglicéridos sérico y hepático</u> Dosis 100mg/Kg, v.o./5 sem	β-HFC \downarrow triglicéridos hepáticos Dosis 100mg/Kg, v.o. /2 sem
β-HFC \downarrow de colesterol hepático Dosis 100mg/Kg, v.o. /5 sem	β-HFC \downarrow colesterol Dosis 100mg/Kg, v.o./2 sem
β-HFC \downarrow insulina Dosis 100mg/Kg, v.o./14 sem	β-HFC \downarrow ganancia de peso Dosis 100mg/Kg, v.o./2 sem
β-HFC \downarrow <u>ALT, AST Y FA</u> Dosis 100mg/Kg de β -HFC, v.o./14 sem	
β-HFC \downarrow <u>esteatosis y mejoro arquitectura del hígado</u>	

Figura 7. Estudios previos de seguridad y eficacia de β -HFC [83].

3. Justificación

La esteatohepatitis no alcohólica es una enfermedad que se asocia principalmente con obesidad y diabetes mellitus tipo 2. Tiene una alta prevalencia hasta el grado de ser considerada una epidemia mundial. No existe una farmacoterapia específica para su tratamiento y los tratamientos actuales que se recomiendan en la clínica son para el tratamiento de factores asociados a esta enfermedad. Sin embargo, la terapia actual provoca efectos secundarios severos que impiden utilizarlos por periodos de tiempo prolongados. Debido a esta problemática existen en experimentación varias propuestas para el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica. La β -HFC ha mostrado ser una molécula segura y reducir niveles de triglicéridos, glucosa y colesterol en ratas obesas. Debido a que las alteraciones metabólicas son determinantes para el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica consideramos que la β -HFC podría ser efectiva como tratamiento para esta enfermedad.

4. Hipótesis

La β -HFC mejorará la funcionalidad y alteraciones estructurales del tejido hepático en ratas con esteatohepatitis no alcohólica.

5. Objetivo general

Realizar la evaluación farmacológica del efecto de β -HFC en la esteatohepatitis no alcohólica inducida en rata.

6. Objetivos específicos

Desarrollar un modelo de EHNA en ratas Wistar macho.

Evaluar si β -HFC modifica la esteatosis hepática en ratas con EHNA.

Evaluar si β -HFC modifica los marcadores de inflamación en ratas con EHNA.

Evaluar si β -HFC modifica las alteraciones histopatológicas del hígado en ratas con EHNA.

Evaluar si β -HFC modifica la fibrosis hepática en ratas con EHNA.

Evaluar si β -HFC modifica las alteraciones bioquímicas presentes en ratas con EHNA.

Evaluar si β -HFC modifica las alteraciones de la función hepática en ratas con EHNA.

7. Materiales y métodos

β -HPC fue donada por NUCITEC S.A. de C.V. (Qro., México) y disuelta en agua desionizada estéril antes del uso experimental. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas con un peso de 100 g, (Harlan Laboratories Inc. México). Los animales se aclimataron durante una semana en un ambiente de temperatura y humedad controladas con comida (Dieta Estándar Purina Chow, México) y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CCUAL-FM UAEM (2009)) [84].

7.1 Inducción de EHNA

Trascurrida la semana de aclimatación se inició el desarrollo del modelo que se realizó mediante la administración de una solución alta en fructosa (400 kcal) *ad libitum* utilizada como agua de bebida durante 9 semanas, la administración diaria de una solución alta en grasas trans (16 kcal) en dosis de 2 mL vía oral durante 9 semanas y una solución de tetracloruro de carbono (CCl_4) (48.1 mg/kg) por vía intraperitoneal 2 veces por semana durante 7 semanas (ver figura 1), la fructosa se administró *ad libitum* desde la primer semana. Las grasas saturadas se administraron a partir de la segunda semana por medio de cánula. El CCl_4 fue administrado para acelerar el daño e iniciar la fibrosis [19]. La administración del CCl_4 comenzó dos semanas después de iniciada la inducción del modelo y hasta que se desarrolló el modelo. Una vez desarrollado, la administración de CCl_4 se redujo a una dosis por semana hasta la penúltima semana del tiempo total del tratamiento farmacológico. El modelo fue desarrollado en 4 semanas y se siguió administrando los inductores de EHNA hasta el final del tratamiento farmacológico, en total 9.5 semanas.

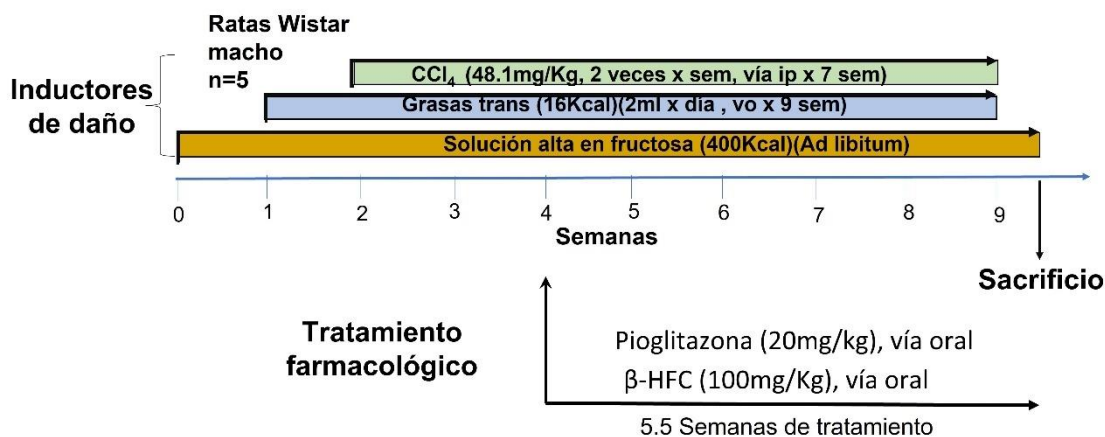


Figura 8. Esquema de inducción de EHNA y tratamiento de animales

7.2 Tratamiento farmacológico

Agrupamos las ratas en 6 grupos (n=5): (1) Control, (2) Pioglitazona (3) β -HFC, (4) EHNA, (5) EHNA + pioglitazona, y (6) EHNA + β -HFC. La β -HFC fue administrada a una dosis de 100mg/Kg en 200 μ L de agua, vía oral a través de una cánula. El tratamiento con β -HFC fue dado una vez desarrollado el modelo de EHNA, durante 5.5 semanas. La pioglitazona fue administrada a una dosis de 20 mg/Kg en 200 μ L de agua, vía oral a través de una cánula. El tratamiento con pioglitazona se dio por 5.5 semanas a partir del desarrollo del modelo de EHNA.

Después del tratamiento las ratas fueron privadas de alimento, pero no de agua, por 12 horas previo a realizar el sacrificio.

7.3 Sacrificio y obtención muestras

Una vez concluidas las 5.5 semanas de tratamiento farmacológico, las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia. Se abrió la caja torácica, para extraer hígado, riñón, páncreas y musculo, los órganos se mantuvieron en formaldehido al 4% hasta su procesamiento. Se extrajo la sangre por punción intracardiaca, y se centrifugo a 3000 rpm, a 4°C durante 10 minutos para la obtención del suero. Suero, tejido de hígado y musculo fue mantenido a -70°C, para la evaluación de los parámetros bioquímicos y enzimáticos que se realizaron.

7.4 Preparación de muestras para análisis histológico

Los órganos se mantuvieron en formalina 24 horas antes de su procesamiento. En el caso del hígado se hizo un corte transversal en el centro del lóbulo mayor para obtener 3 trozos de tejido no mayor a 4cm x 1.5 cm. Los cortes

se colocaron en cassettes de histología y se mantuvieron en un frasco con formalina al 4% hasta su procesamiento. Para la inclusión del tejido en parafina los cortes de los tejidos se deshidrataron con un tren de etanol de 70, 90, 96 y 100° por 10 minutos. Posteriormente se dejó en xileno por 10 minutos. El tejido se sumergió en parafina líquida para posteriormente realizar el encastramiento para formar el bloque con el tejido. El bloque se usó para realizar los cortes del tejido con un microtomo.

7.3 Análisis histopatológico

7.3.1 Tinción Hematoxilina & Eosina

Se realizaron cortes histológicos 2 a 3 micras de tejido de hígado embebido en parafina, se desparafinaron con xilol y se hidrataron con un tren de etanol descendente. Se realizó la tinción con hematoxilina por 3 minutos, se hicieron lavados con agua y posteriormente se realizó la tinción con eosina por 30 segundos. Se deshidrató el tejido con un tren de etanol ascendente y por último se realizó el montaje en un portaobjetos.

7.3.2 Tinción tricromica de Masson

Se realizaron cortes histológicos 2 a 3 micras de tejido de hígado embebido en parafina, se desparafinaron con xilol y se hidrataron con un tren de etanol descendente. Se realizó un desenmascaramiento con un buffer de Citrato al 0.1M pH 6. Para la tinción de tricromico de Masson se utilizaron varios colorantes, primero hematoxilina de Weigert y posteriormente se coloreó con fucsina acida y escarlata de Biebrich durante 20 minutos. Para el contraste se utilizó azul de anilina por 20 minutos y posteriormente se diferenció con ácido acético al 1% por 5 min. Se

deshidrató con un tren de etanol ascendente para por último se realizó el montaje en un portaobjetos.

7.4 Detección de α -SMA por inmunofluorescencia

Se realizaron cortes histológicos de tejido de 2 a 3 micras, los cuales fueron desparafinados y rehidratados en Xilol, etanol y agua destilada. Para la inmunohistoquímica se empleó el anticuerpo anti- α -SMA monoclonal (sc-32251, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.) y el anticuerpo secundario IgG conjugado con FITC de cabra anti ratón (H+L) (Invitrogen 62-6511) a una dilución 1:20; para el desmascaramiento de epítomos se utilizó Epitope Retrieval Solution pH 6 (Novocastra Leica Biosystem Newcastle Ltd, United Kingdom) e ImmunoDNA Retrifer with EDTA pH9 (Bio SB Bioscience for the world, Santa Barbara CA U.S.A.), para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena las muestras fueron tratadas con peróxido de Hidrógeno al 0.9% en medio acuoso por 5 minutos, posteriormente las muestras se incubaron por 60 minutos con el anticuerpo Anti α -actina músculo liso, clona 1A4 dilución 1:50 (Santa Cruz CA USA sc-32251). Posteriormente los cortes histológicos se incubaron con el anticuerpo secundario y el conjugado HRP Bond™ Polymer Refine Detection por 10 minutos c/u, (Leica Biosystems Newcastle Ltd, United Kingdom), para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-deaminobencidina-H₂O₂, (Biocare Medical CA USA) durante 5 minutos misma que fue monitoreada al microscopio, el contraste se realizó con hematoxilina de Gill y el viraje con solución de hidróxido de amonio al 0.37 M. La expresión de α -SMA se identificó por la presencia de fluorescencia color verde. Se realizó la cuantificación de la fluorescencia de las laminillas por medio del programa image pro 10, se obtuvo un promedio para graficar y comparar resultados entre los grupos.

7.5 Evaluación de la expresión de SREBP-1 en tejido hepático

Se realizaron cortes histológicos de tejido de 2 a 3 micras, los cuales fueron desparafinados con Xilol durante 5 minutos y rehidratados con etanol y agua destilada. El desenmascaramiento se realizó con citrato durante 15 minutos y para el bloqueo se utilizó peróxido de hidrogeno 0.9%. Los cortes histológicos se incubaron con el anticuerpo SREBP-1c, (Santa Cruz Biotechnology, INC sc-365513) durante 40 minutos. Posteriormente se utilizó un sistema de detección polimérico PolyDetector Plus HRP/DAB de ratón/conejo que da una tinción color marrón. El contraste se realizó con hematoxilina. Por ultimo los cortes se deshidrataron con agua y etanol para su montaje. Se realizó la cuantificación de la coloración marrón de las laminillas por medio del programa image pro 10, se obtuvo un promedio para graficar y comparar resultados entre los grupos.

7.6 Evaluación de la expresión IL-1 β en tejido hepático

Se realizaron cortes histológicos de tejido hepático de 2 a 3 micras, fueron desparafinados con Xilol y rehidratados con etanol y agua destilada. El desenmascaramiento se realizó con citrato por 15 minutos y para el bloqueo se utilizó peróxido de hidrogeno 0.9%. Los cortes histológicos de tejido se incubaron con el anticuerpo IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology, sc-52012) durante 40 minutos. Se utilizó un sistema de detección polimérico PolyDetector Plus HRP/DAB de ratón/conejo que da una tinción color marrón. El contraste se realizó con hematoxilina y por ultimo los cortes se deshidrataron con agua y etanol para su montaje. La expresión de IL-1 β se identificó por la inmunotinción color café. Se realizó la cuantificación de la coloración marrón de las laminillas por medio del programa image pro 10, se obtuvo un promedio para graficar y comparar resultados entre los grupos.

7.7 Evaluación de la expresión de TNF- α en tejido hepático

Se realizaron cortes histológicos de tejido de 2 a 3 micras, fueron desparafinados y rehidratados en Xilol, etanol y agua destilada. El desenmascaramiento se realizó con citrato, para el bloqueo se utilizó peróxido de hidrogeno 0.9%. Los cortes histológicos se incubaron con el anticuerpo TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, INC sc-52746) durante 40 minutos. Para la detección se utilizó un sistema polimérico PolyDetector Plus HRP/DAB de ratón/conejo que da una tinción color marrón. Para el contraste se utilizó hematoxilina, por ultimo los cortes se deshidrataron con agua y etanol para su montaje. La expresión de TNF- α se identificó por la inmunotinción color café. Se realizó la cuantificación de la coloración marrón de las laminillas por medio del programa image pro 10, se obtuvo un promedio para graficar y comparar resultados entre los grupos.

7.8 Análisis de glucógeno por tinción de ácido peryodico de Schiff (PAS)

Se realizaron cortes histológicos de tejido fijado en formaldehido/embebido en parafina de 2 a 3 micras. Se desparafinaron los tejidos y se rehidrataron en agua destilada. Para la tinción se dejaron en solución de ácido Peryódico 2 gotas (100 μ l) durante 20 min, se tiñeron con reactivo de Schiff 2 gotas (100 μ l) durante 20 a 30 min. El contraste se realizó con Hematoxilina 2 gotas (100 μ l) durante 3 a 5 min. Para el viraje se utilizó carbonato de litio 2 gotas (100 μ l) durante 3 a 5 min. Los depósitos de glucógeno fueron identificados por la intensidad de coloración violeta en el tejido. Su observación se realizó en un microscopio de epifluorescencia IX81.

7.9 Análisis bioquímico y niveles enzimáticos hepáticos

El suero fue colectado por centrifugación de la sangre y fue usado para la cuantificación de glucosa, triglicéridos y colesterol. Los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol fueron determinados por métodos colorimétricos siguiendo las especificaciones del fabricante (Glucose PAP SL, Triglycerides SL and Cholesterol PAP SL, ELITech, México). La actividad enzimática de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), y gamma glutamil transferasa fue medida usando un kit comercial y se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (kit ALT/GPT 4+1 SL y ALP (DEA) SL, ELITech, México), (kit GOT (AST)-LQ y γ -GT-LQ, SPINREACT S.A.U.).

7.10 Cuantificación de glucógeno en hígado

El glucógeno fue evaluado por el método antrona descrito por Fong et al. [19]. Se pesaron 500mg de musculo e hígado, se cortó en trozos pequeños que se agragaron a un tubo de ensayo con 3ml de KOH al 3% para su digestión, los tubos tapados se llevaron a baño Maria durante 20 minutos (hasta no ver muestra solida). Los tubos se enfriaron en hielo y el caldo formado se pasó a un tubo falcon donde se aforo a 25 ml. Se diluyo dos veces tomando una alicuota de 8 y 16 ml, ambas aforadas a 25ml. Posteriormente se tomó 1ml y se mezcló con 2 ml de antrona (preparada con ácido sulfurico (H_2SO_4)). Se utilizó un blanco y un estandar, 1 ml de agua y 1ml de glucosa respectivamente y se les agrego 2ml de antrona a ambas soluciones. En este metodo el glucogeno es hidrolizado por el H_2SO_4 , hasta obtener monosacaridos, que son deshidratados dando como producto el furfural que reacciona con la antrona, formando un product que da colaración azul verdoso. Las muestras se sometieron nuevamente a baño Maria por 10 minutos. Las soluciones se enfriaron y se realizó la cuantificación por medio de un espectrofotometro Victor X3 a 550 nm.

7.11 Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. Diferencias estadísticas fueron detectadas mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y prueba de Tukey como prueba paramétrica.

8.- Resultados

8.1 Desarrollo del modelo de esteatohepatitis no alcohólica

Para la evaluación del efecto farmacológico de β -HFC se utilizó un modelo de EHNA en ratas, que se desarrolló por medio de la administración de grasas saturadas, fructosa y CCl_4 . La administración de los inductores de daño condujo a la alteración del metabolismo lipídico generando las alteraciones que caracterizan a EHNA: esteatosis, inflamación y fibrosis. El desarrollo de la patología fue comprobado por la presencia de esteatosis macro y microvesicular en los hígados de los animales, y fue corroborada por la expresión del factor de transcripción de enzimas lipogénicas SREBP-1. El desarrollo de inflamación fue evidenciado por la presencia de células inflamatorias, y corroborado por la expresión de citocinas inflamatorias IL-1 β y TNF- α . La fibrogénesis fue observada en el tejido hepático con tinción H&E y verificada por medio de la tinción de Masson. Se relacionó el desarrollo de la fibrosis con la expresión de α -SMA utilizado como marcador de la activación de CEH, que son las principales células relacionadas con el desarrollo de fibrosis (ver figura 9).

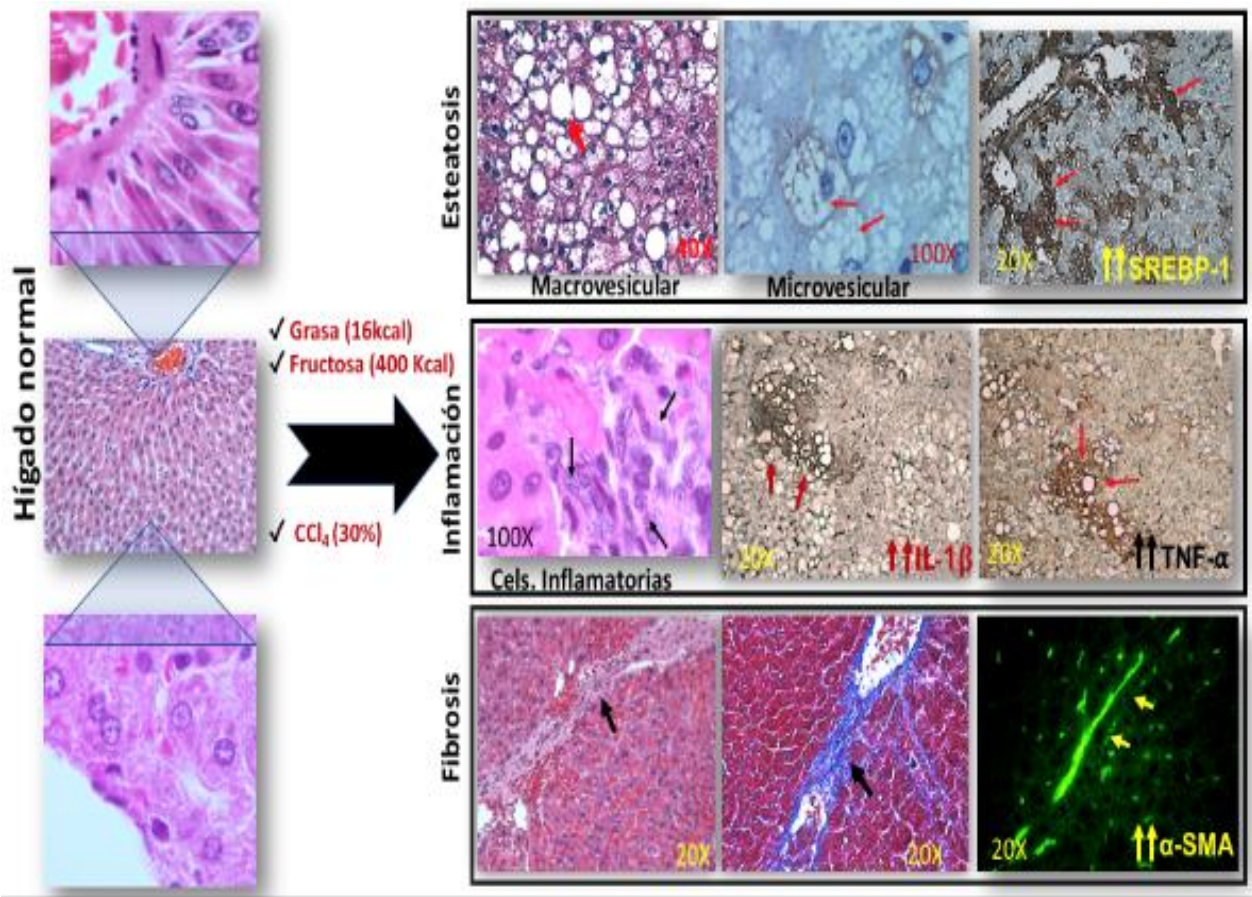


Figura 9. Inducción de la esteatohepatitis no alcohólica

8.2 Efecto de β -HFC sobre las alteraciones de la arquitectura hepática en ratas con EHNA

Se analizaron cortes histológicos tenidos con H&E para evaluar el efecto de β -HFC en la arquitectura hepática de las ratas con EHNA. Como vemos en la figura 9, del control el hígado sano está formado por hepatocitos dispuestos en forma de cordones radiales rodeados por sinusoides. No hay esteatosis ni hepatocitos en balón. En contraste cuando hay desarrollo de EHNA, el orden de los hepatocitos se pierde, hay presencia de esteatosis macro y microvesicular y se forman hepatocitos en balón como podemos ver en el corte de las ratas con EHNA. Las ratas con pioglitazona mostraron reducción de la esteatosis, mejora de la arquitectura hepática, y menor presencia de hepatocitos en balón. El efecto con β -HFC evidenció ser mejor que pioglitazona al reducir la esteatosis de manera más evidente en los cortes histológicos, mejoró la arquitectura hepática y también mostró menor formación de hepatocitos en balón. Es importante resaltar que la pioglitazona y la β -HFC por si solas no causaron ninguna alteración hepática en las ratas sanas (ver figura 10).

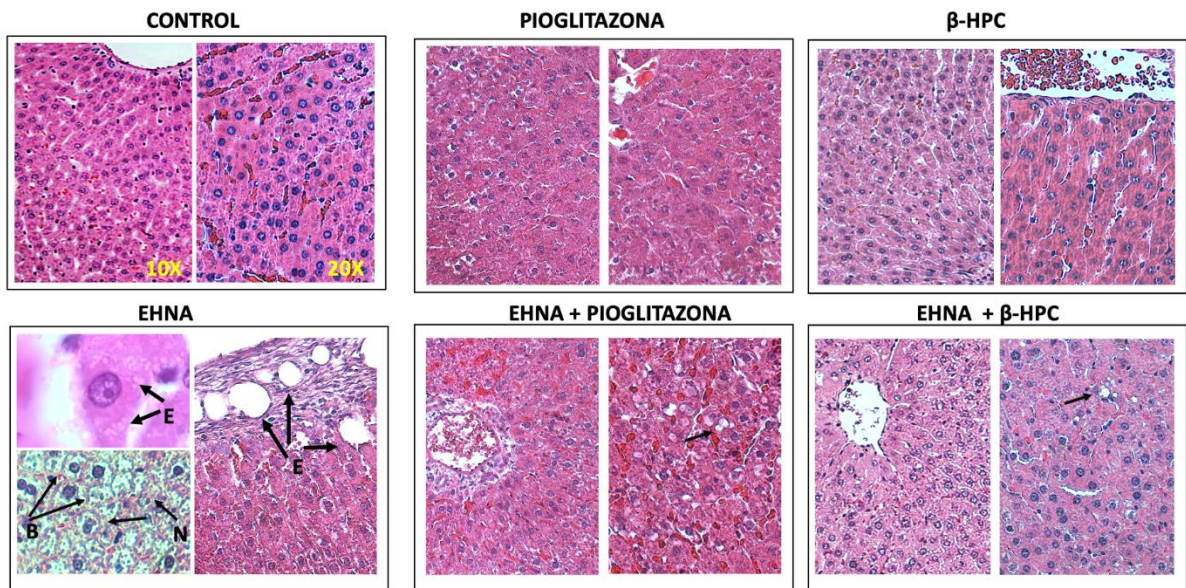


Figura 10.- Tinción H&E de cortes histológicos hepáticos de ratas con EHNA y grupos control de ratas sanas (flecha corta indica grasa microvesicular, flecha larga indica grasa macrovesicular) ampliación 20x.

8.3 Efecto de β -HFC en la expresión de SREBP-1 de ratas con EHNA

SREBP-1c es un factor de transcripción de enzimas lipogénicas, su expresión en el hígado está asociado al desarrollo de esteatosis y al aumento de TG. Por lo que se evaluó su expresión en el tejido hepático de las ratas con EHNA por inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que, en el tejido hepático sano, la coloración marrón que indica expresión de SREBP-1 es poca o nula, por lo que no hay expresión notoria de SREBP-1. Por el contrario, en el grupo EHNA hay una intensa coloración marrón, lo que indica mayor expresión de SREBP-1. El tratamiento con pioglitazona, disminuyó la expresión de SREBP-1, pero fue más la reducción con el tratamiento de β -HFC, alcanzando valores cercanos al control (ver figura 11). Se realizó una cuantificación de la coloración de todas las laminillas, por lo que observamos que SREBP-1c se encontró 15.6 más elevado en las ratas con EHNA que el grupo control de ratas sanas ($p < 0.05$). Pioglitazona solo logró reducir la expresión de SREBP-1 1.48 menos que el grupo EHNA ($p < 0.05$). En cambio, la administración de β -HFC logró atenuar la expresión de SREBP-1, 3 veces menos que el grupo EHNA, lo que también se manifestó en la reducción de los niveles de TG séricos y hepáticos ($p < 0.05$). El tratamiento con pioglitazona y β -HFC por sí solo, no indujo la expresión de SREBP-1 (ver figura 11 y 12).

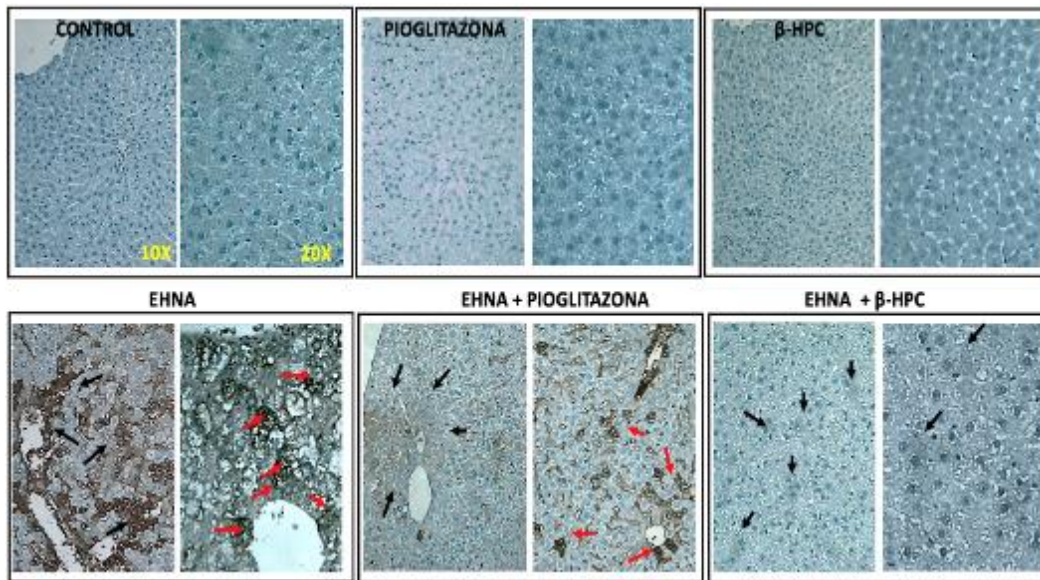


Figura 11. Efecto de β -HFC en la expresión de SREBP de ratas con EHNA. Coloración marrón indica expresión de SREBP-1c (señalado con flechas negras y rojas) amplificación 10 y 20x.

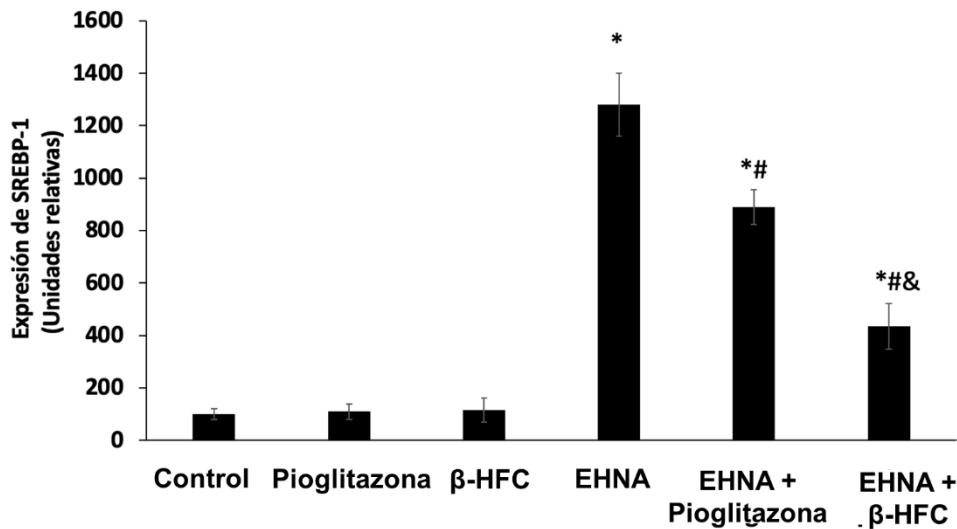


Figura 12. Análisis semicuantitativo de la expresión de SREBP-1 en ratas con EHNA. Los datos se representan como media \pm DE (n=5), *p<0.05 en comparación con el grupo de control, # p<0,05 en comparación con el grupo, & p<0,05 en comparación con el grupo EHNA. Prueba de Tukey

8.4 Efecto de β -HFC sobre la esteatosis de ratas con EHNA

La esteatosis es una de las principales alteraciones de la EHNA, y se sabe es clave en el desarrollo de la etapa inflamatoria de la enfermedad. Por lo que, se evaluó el efecto de β -HFC en la esteatosis de las ratas con EHNA. Como podemos observar en el corte del grupo control, el tejido hepático sano no muestra acumulación de grasa. Por el contrario, el tejido hepático de las ratas con EHNA, muestra una excesiva acumulación de grasa macro y micro vesicular. El tratamiento con pioglitazona redujo la esteatosis considerablemente, observándose solo una pequeña cantidad de micro vesículas. Sin embargo, β -HFC fue más efectiva en reducir la esteatosis que pioglitazona, ya que se nota menor cantidad de grasa en el tejido de este grupo. Resaltamos que la reducción de esteatosis en este grupo con β -HFC fue muy similar al tejido del grupo control. También se muestra que el tratamiento con pioglitazona y β -HFC por sí solos no indujeron el desarrollo de esteatosis (ver figura 13).

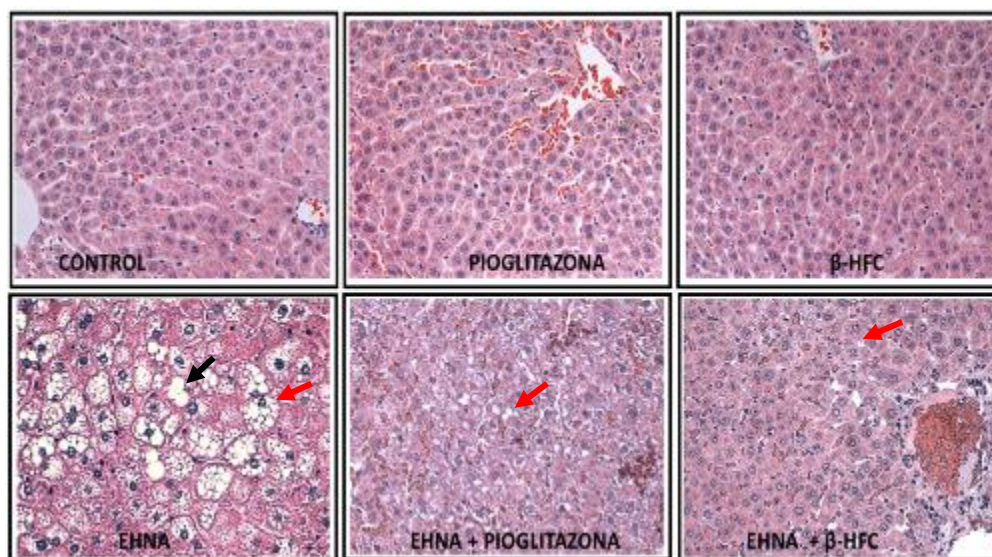


Figura 13. Efecto de β -HFC sobre la esteatosis de ratas con EHNA, (flecha roja indica grasa microvesicular, flecha negra macrovesicular) amplificación 40x.

8.5 Efecto de β -HFC sobre la expresión de IL-1 β en ratas con EHNA

Se reporta en la literatura que la esteatosis provoca la activación de células de Kupper y la infiltración de macrófagos, que son clave en el desarrollo de la etapa inflamatoria de la EHNA. Dos de las citosinas principales involucradas en el proceso inflamatorio de la EHNA son la IL-1 β y el TNF- α , por lo que se evaluó su expresión en tejido hepático. El tejido de las ratas con EHNA expresaban IL-1 β 5.1 veces más que las ratas del grupo control sanas ($p < 0.05$). El tratamiento con pioglitazona redujo 2.8 veces menos la expresión de IL-1 β ($p < 0.05$), lo que comprueba que aun cuando se sabe que tiene propiedades antiinflamatorias, requiere más tiempo para lograr una mejora considerable. En cambio, la β -HFC fue más efectiva que pioglitazona en reducir las alteraciones de la ENHA, lo que resultó en 4.6 veces menor expresión de IL-1 β ($p < 0.05$) (ver figura 14 y 15). Cabe resaltar que ni pioglitazona ni β -HFC por si solas produjeron alteraciones en la expresión de estas citocinas en animales sanos.



Figura 14. Efecto de β -HFC sobre la expresión de IL-1 β en ratas con EHNA. Expresión de IL-1 β se muestra en coloración marrón (señalada con flecha roja) amplificación 20x.

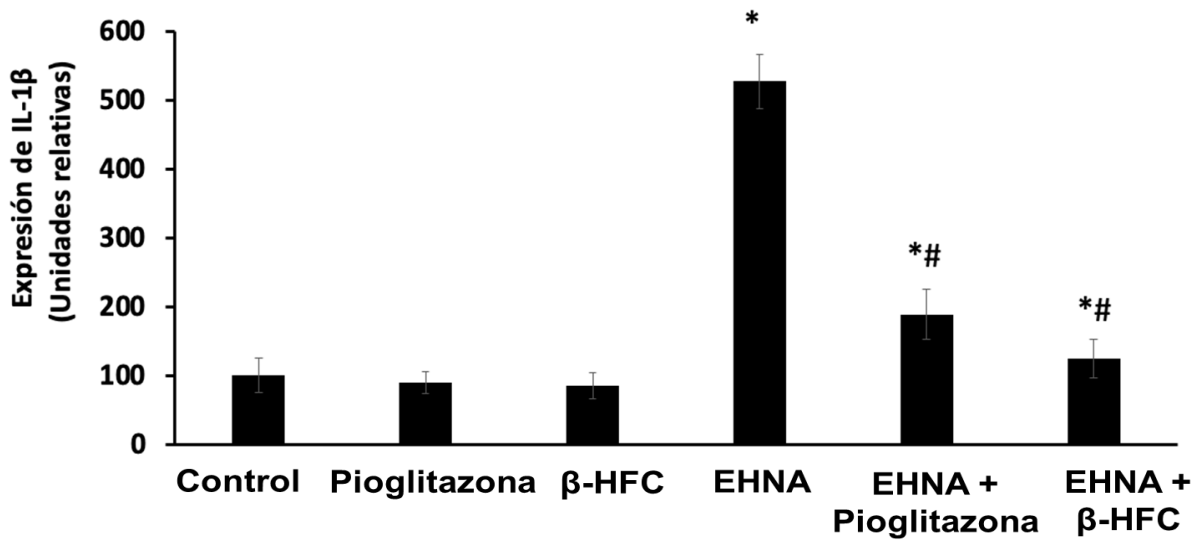


Figura 15. Análisis semicuantitativo de la expresión de IL-1 β en ratas con EHNA. Los datos se representan como media \pm DE (n=5), *p<0,05 en comparación con el grupo de control, # p<0,05 en comparación con el grupo EHNA. Prueba de Tukey

8.6 Efecto de β -HFC sobre la expresión de TNF- α en ratas con EHNA

TNF- α es otra citosina relacionada con el desarrollo inflamatorio de la EHNA. Algunas de sus actividades son la activación de la vía de las caspasas que conduce a apoptosis, está relacionada con la resistencia a la insulina y promueve la secreción de quimiocinas perpetuando el estado inflamatorio. Debido a su amplia variedad de funciones en EHNA, la expresión de TNF- α fue evaluada por inmunohistoquímica en el tejido de las ratas de nuestro modelo. La expresión de TNF- α está indicada por la coloración marrón en el tejido. El grupo control muestra ausencia de esta coloración marrón lo que indica que no hay expresión de TNF- α . En contraste con el grupo control, el grupo EHNA sí mostró esta coloración marrón de manera evidente, indicando una elevada expresión de TNF- α . El tratamiento con pioglitazona redujo la expresión de TNF- α . En el tejido no se observa mucha diferencia entre EHNA + pioglitazona y EHNA, pero en la cuantificación de la coloración vemos que sí hubo reducción significativa ($p < 0.05$). El tratamiento con β -HFC en las ratas con EHNA, redujo la expresión de TNF- α de manera más evidente que pioglitazona, esto fue comprobado por la cuantificación de la coloración donde hay diferencia significativa entre el resultado de pioglitazona y β -HFC ($p < 0.05$). Pioglitazona y β -HFC por sí solas no indujeron la expresión de TNF- α en ratas sanas (ver figura 16 y 17).

Tanto IL-1 β como TNF- α están relacionadas con la activación de vías de señalización que lleva a la apoptosis de los hepatocitos. Por lo que, su reducción justifica la disminución de las enzimas hepáticas que son usadas como indicadores de la funcionalidad y daño en los hepatocitos (ver figura 22).

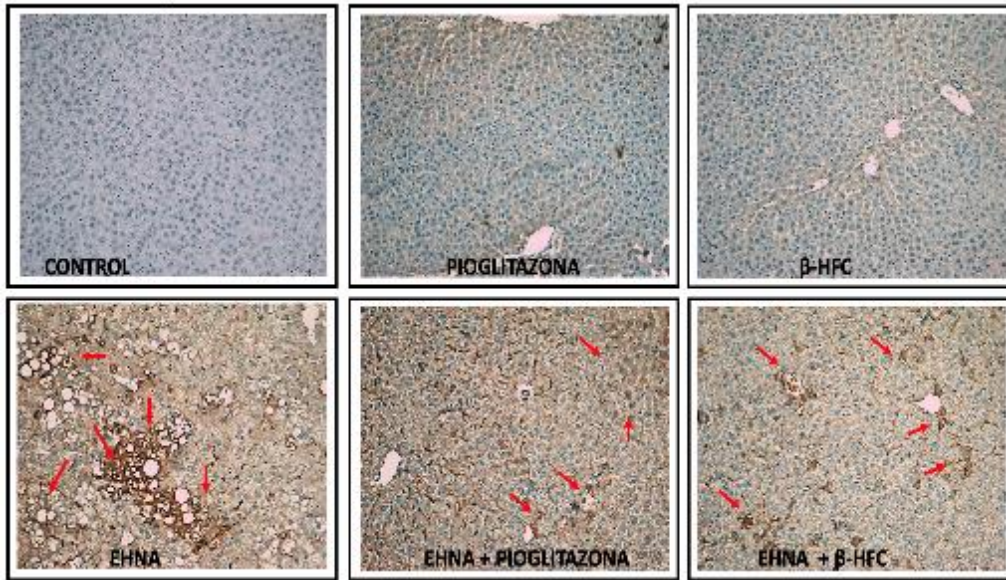


Figura 16. Efecto de β -HFC sobre la expresión de TNF- α en ratas con EHNA. Expresión de TNF- α se muestra en coloración marrón (señalada con flecha roja) amplificación 20x.

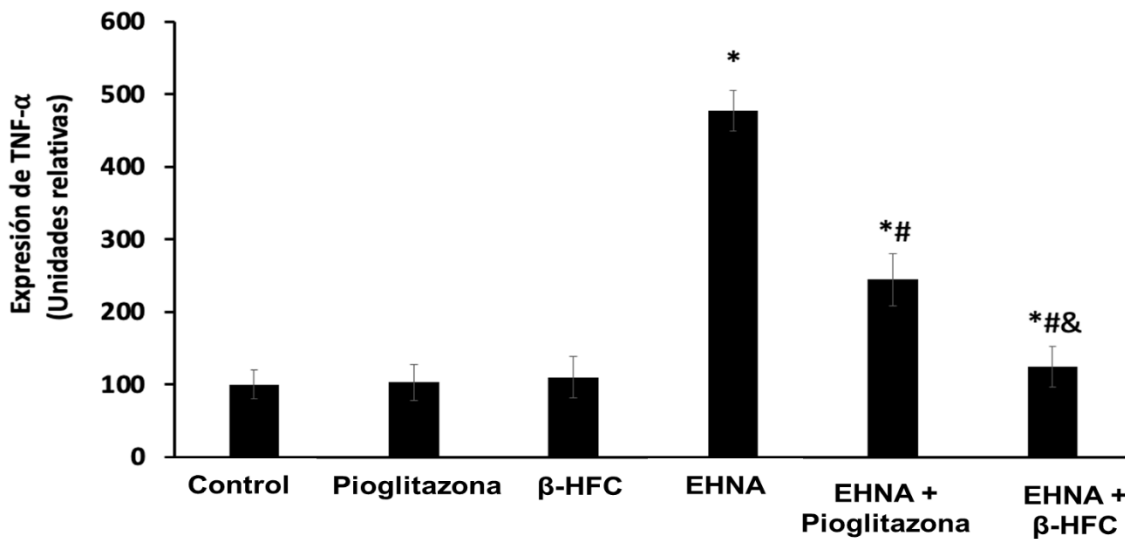


Figura 17. Análisis semicuantitativo de la expresión de TNF- α en ratas con EHNA. Los datos se representan como media \pm DE (n=5), *p<0,05 en comparación con el grupo de control, # p<0,05 en comparación con el grupo EHNA. Prueba de Tukey

8.7 Efecto de β -HFC sobre la fibrosis hepática de ratas con EHNA

Una característica común de las enfermedades hepáticas crónicas es el desarrollo de fibrosis, que es resultado del daño crónico al hígado y de la acumulación de matriz extracelular (MEC). La acumulación de proteínas de MEC distorsiona la arquitectura hepática formando una cicatriz fibrosa. Conforme el grado de fibrosis es mayor, la funcionalidad del hígado se ve alterada por lo que es importante el tratamiento farmacológico a tiempo. Uno de los objetivos de nuestro proyecto fue evaluar el efecto de β -HFC en el desarrollo de fibrosis

Las fibras de colágena normalmente las encontramos rodeando vasos, área portal o vena central, tiene la función de dar flexibilidad a estas áreas. En los cortes histológicos de los grupos control vemos la presencia de cierta cantidad alrededor de las venas centrales como se describió previamente, pero sin invasión del órgano. Sin embargo, cuando hay un desequilibrio entre su producción y su degradación como sucede en la fibrosis. La cantidad de fibras de colágena comienza a engrosar y a invadir el órgano formando puentes de fibras de colágena entre venas o con espacios portales. Por lo que el grosor y la formación de puentes es usado para asignar un grado de avance. En el grupo EHNA se observa un mayor grosor de las fibras de colágena, así como la formación de puentes entre las venas lo que indica el desarrollo del proceso de fibrogenesis. Pioglitazona redujo el grosor de las fibras de colágena en el tejido hepático de las ratas con EHNA. En el grupo EHNA + β -HFC el grosor y la invasión de las fibras de colágena disminuyó, lo que indica un menor grado de fibrosis, resultado del efecto de β -HFC. La administración de pioglitazona y β -HFC en ratas sanas mostró que por sí solos no inducen fibrosis (ver figura 18). Al igual que las anteriores evaluaciones se realizó la cuantificación de la coloración azul, para obtener un promedio de cada grupo. El resultado mostró aumento significativo de EHNA con respecto al control ($p < 0.05$). Reducción significativa de la fibrosis con ambos tratamientos, y reducción significativa entre el tratamiento de pioglitazona y el de β -HFC ($p < 0.05$) (ver figura 18 y 19).

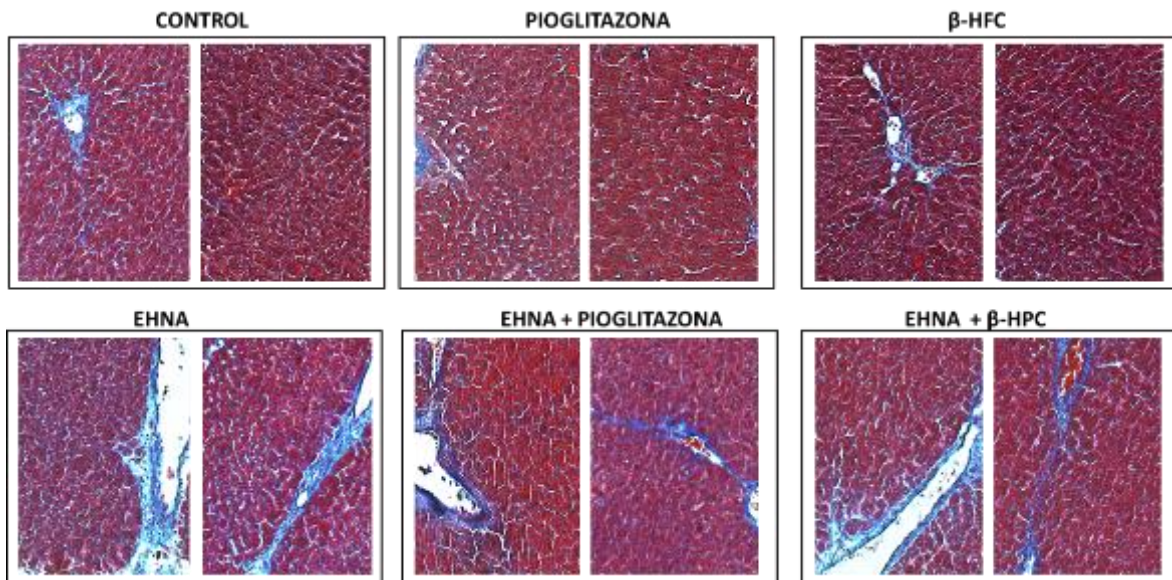
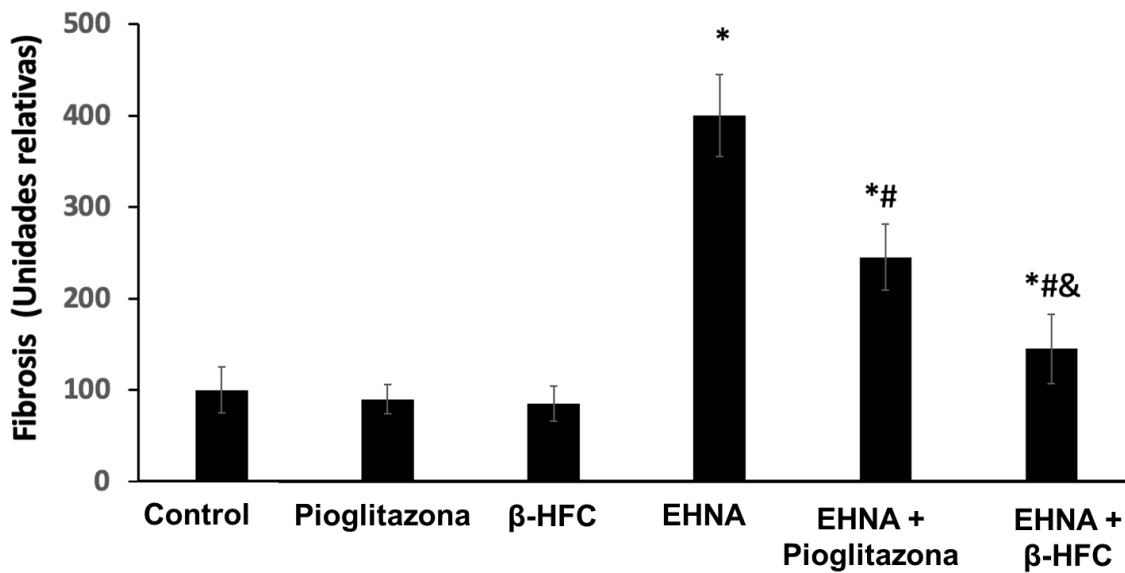


Figura 18. Efecto de β -HFC sobre la fibrosis hepática de ratas con EHNA. Tinción tricromica de Masson amplificación 20x.



Grafica 19. Análisis semicuantitativo de la fibrosis en ratas con EHNA. Los datos se representan como media \pm DE (n=5), *p<0,05 en comparación con el grupo de control, # p<0,05 en comparación con el grupo, & p<0,05 en comparación con el grupo EHNA. Prueba de Tukey

8.8 Efecto de β -HFC sobre la expresión de α -SMA en ratas con EHNA

Un evento importante para el desarrollo de fibrosis es la activación de las CEH, por lo que era importante evaluar su activación en los tejidos de las ratas con EHNA. Un marcador de la activación de las CEH que muchos autores utilizan es la expresión de α -SMA. Los resultados de la expresión de α -SMA en los tejidos se muestra en la figura 20, y corrobora con el desarrollo de la fibrosis que observamos en la figura 17. El tejido del grupo control muestra expresión de α -SMA, lo que indica que hay CEH activadas. Sin embargo, como vimos en la figura 18 no hay desarrollo de fibrosis en este grupo, lo que indica que es normal encontrar cierta cantidad de CEH activadas en tejido sano. En cambio, en el grupo EHNA, se observó mayor expresión de α -SMA, indicando que hay más CEH activadas y corrobora con el grado de fibrosis observado en este grupo. El tratamiento con pioglitazona redujo la expresión de α -SMA en comparación con el grupo EHNA. Las ratas con EHNA que fueron administradas con β -HFC también mostraron reducción de la expresión de α -SMA. La cuantificación de la fluorescencia verde de las laminillas mostró que las ratas del grupo EHNA mostraban 4 veces más expresión de α -SMA ($p < 0.05$). Aun cuando pioglitazona redujo la expresión de α -SMA 1.6 veces, fue mejor el efecto con β -HFC que redujo 2.8 veces más la expresión de α -SMA ($p < 0.05$). La activación de las CEH mostrada por la expresión de α -SMA es congruente con el grado de fibrosis observado en las laminillas. El tratamiento con pioglitazona y β -HFC por si solos no indujo la activación de las CEH más allá de las observadas en el tejido control sano) (ver figura 20 y 21).

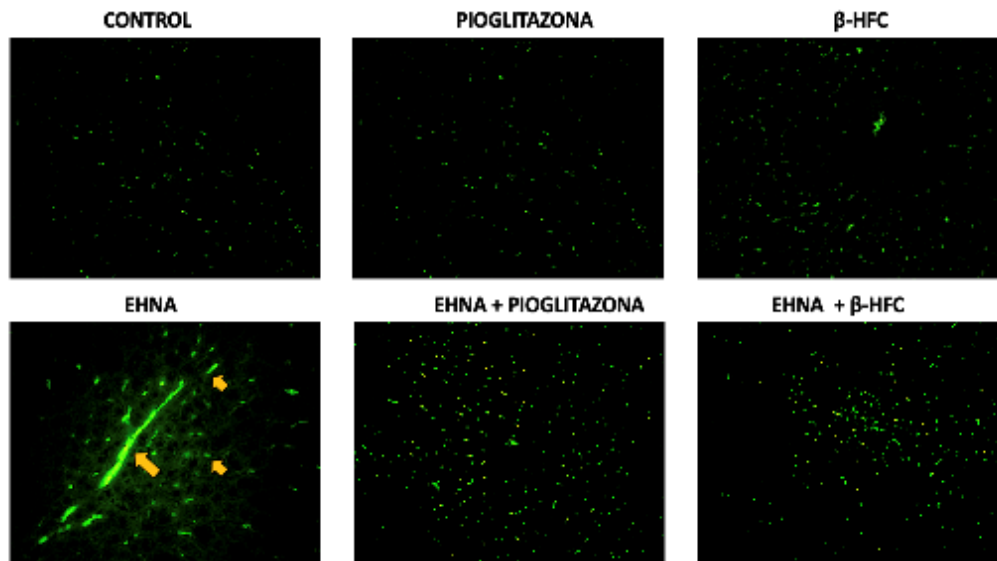
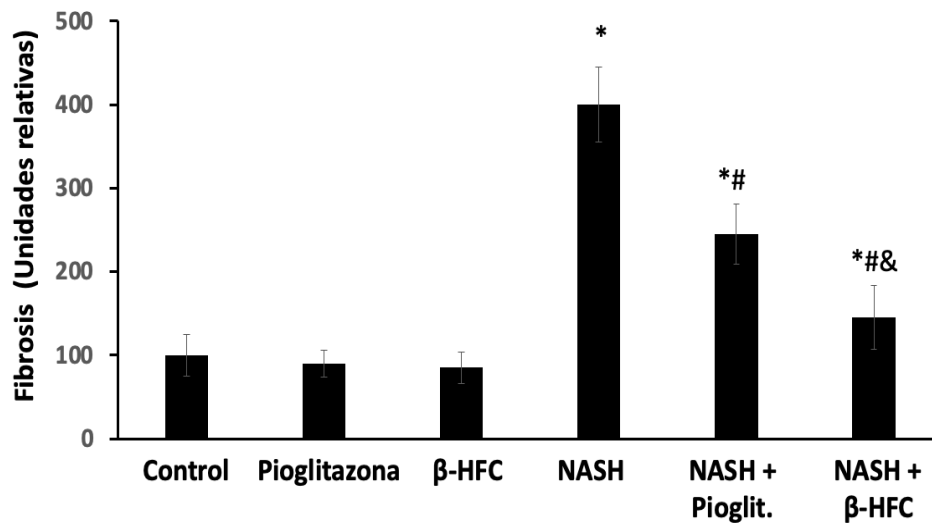


Figura 20. Evaluación de la expresión de α -SMA en tejido de ratas con EHNA (las flechas amarillas indican mayor expresión de α -SMA) ampliación 10X.



Grafica 21. Análisis semicuantitativo de la expresión de la expresión de α -SMA en ratas con EHNA. Los datos se representan como media \pm DE (n=5), *p<0,05 en comparación con el grupo de control, # p<0,05 en comparación con el grupo, & p<0,05 en comparación con el grupo EHNA. Prueba de Tukey

8.9 Efecto de β -HFC sobre los niveles de enzimas hepáticas en ratas con EHNA

En la práctica clínica se evalúan los niveles de las enzimas AST, ALT, ALP y GGT que ayudan al diagnóstico ante sospecha de daño hepático. Algunas enzimas como AST y ALT son liberadas a circulación cuando hay un daño en la membrana celular, por lo que aumentan sus niveles en sangre. La producción de GGT y ALP aumenta por la alteración de la funcionalidad del hepatocito, por lo que junto con AST y ALT nos dan una idea del estado del hígado. Los niveles de las enzimas AST, ALT, GGT y ALP se encontraban bajos en suero, indicando que las ratas sin tratamiento no tenían daño hepático. En cambio, la administración de los inductores de daño usados para el desarrollo del modelo incrementó los niveles de estas enzimas en las ratas. Las ratas con EHNA mostraron 3.37 veces más U/L de AST, y 2.84 veces más U/L de ALT comparado con el control ($p < 0.05$). En el caso de GGT aumento 4.37 veces más y ALP 3.68 veces más con respecto al control ($p < 0.05$). El incremento de estas enzimas fue resultado del daño en el tejido que mostramos previamente por el desarrollo de EHNA. La administración de pioglitazona en las ratas con EHNA redujo los niveles de las enzimas hepáticas, pero solo en los niveles de ALP y GGT fue significativa esta reducción (1.5 y 2.1 veces menos respectivamente) en comparación con el grupo EHNA ($p < 0.05$). Con la administración de β -HFC se redujo los niveles de las enzimas hepáticas, pero al igual que pioglitazona esta reducción solo fue significativa en los niveles de ALP y GGT (1.6 y 3.2 veces menos respectivamente) en comparación con el grupo EHNA ($p < 0.05$). También se muestra en la figura que los niveles enzimáticos de las ratas sanas administradas con pioglitazona y β -HFC no hubo variación de los niveles de las enzimas con respecto al grupo control, indicando que por sí solos los tratamientos no causaron daño hepático (ver figura 22).

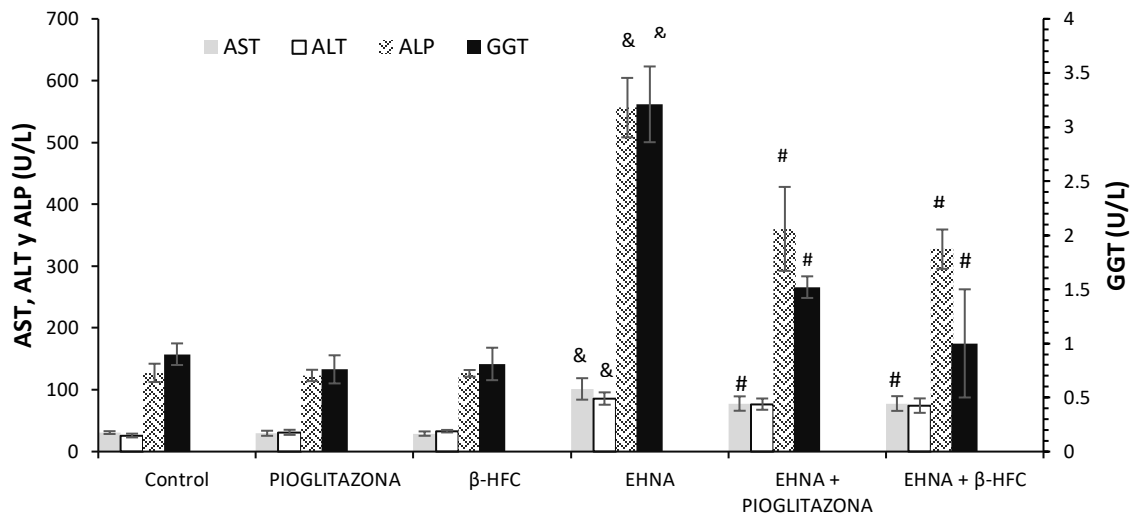


Figura 22. Efecto de β -HFC sobre niveles de enzimas hepáticas de ratas con EHNA. Análisis estadístico mediante prueba de Kruskal Wallis, $\&p>0.05$ con respecto al grupo control, $\#p>0.05$ con respecto al grupo EHNA.

8.10 Efecto de β -HFC sobre parámetros bioquímicos de ratas con EHNA

El daño hepático altera parámetros bioquímicos como glucosa, triglicéridos y colesterol, en pacientes con EHNA generalmente se encuentran elevados. Por lo que era importante evaluar el efecto de β -HFC sobre estos parámetros. En la literatura se reporta la capacidad de la fructosa para aumentar la expresión SREBP-1, que ya comprobamos previamente, induciendo niveles altos de TG. Al evaluar los niveles séricos de glucosa, TG y colesterol en las ratas observamos niveles bajos en el grupo control, como era de esperarse al ser ratas sanas. En el grupo con EHNA solo los TG aumentaron significativamente con respecto al control ($p<0.05$), glucosa y colesterol se observaron similares al control. Los niveles de TG aumentaron 4 veces más con respecto al control ($p<0.05$), que puede estar relacionado con el aumento de la expresión de SREBP-1 en este grupo.

El tratamiento con Pioglitazona disminuyó los niveles de TG en las ratas con EHNA 4 veces menos con respecto al grupo EHNA ($p < 0.05$). El efecto de β -HFC disminuyó los niveles de TG séricos 5.2 veces con respecto al EHNA ($p < 0.05$). Los tratamientos de pioglitazona y β -HFC en las ratas sanas no indujeron modificación alguna en estos parámetros con respecto al control (ver figura 23).

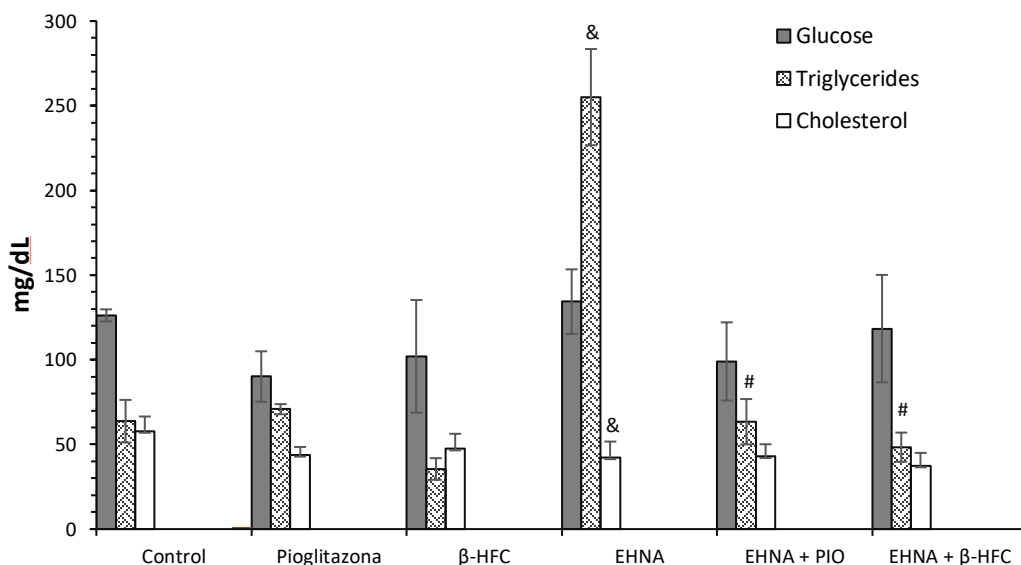


Figura 23. Efecto de β -HFC sobre parámetros bioquímicos de ratas con EHNA. Análisis estadístico mediante prueba de Kruskal Wallis, $\&p > 0.05$ con respecto al grupo control, $\#p > 0.05$ con respecto al grupo EHNA.

8.11 Efecto de β -HFC sobre el glucógeno hepático de ratas con EHNA

Cuando la fructosa entra a la célula es utilizada principalmente para la producción de energía (ATP), síntesis de AG y para ser almacenada como glucógeno cuando. Por lo que, el consumo en exceso de fructosa aumenta triglicéridos y glucógeno principalmente, ya que la producción de energía según la literatura es limitada por la presencia de enzimas necesarias como es la palmitoil carnitina I y II. Se cuantificó la acumulación de glucógeno con la finalidad de evaluar el efecto de β -HFC sobre el metabolismo lipídico. Lo que se propone es que β -HFC aumenta la beta oxidación de AG, que resultaría disminución de la acumulación de glucógeno. La acumulación de glucógeno se evaluó por medio de la tinción PAS y fue corroborado por medio de una cuantificación por un método químico. La tinción PAS muestra el glucógeno en el tejido en coloración magenta. El grupo control presenta muy poco de esta coloración, casi imperceptible, pero en la cuantificación por el método químico vemos que si hay presencia de glucógeno en el tejido sano. De manera muy contrastante el tejido del grupo EHNA, presentó una excesiva acumulación de glucógeno, 3.6 veces más que el grupo control ($p < 0.05$). En el grupo con EHNA administrado con pioglitazona se observó menos coloración magenta, por la cuantificación química vimos que pioglitazona redujo 2 veces menos la acumulación de glucógeno en el grupo EHNA ($p < 0.05$). El grupo de EHNA que fue administrado con β -HFC mostró menos coloración magenta que el grupo EHNA, lo que indicó que su efecto causó menor acumulación de glucógeno. Tanto pioglitazona como β -HFC redujeron la acumulación de glucógeno, en el caso de pioglitazona sabemos que lo hace a través de PPAR. Sin embargo, β -HFC podría estar reduciendo los niveles de glucógeno a través del aumento de la beta oxidación de ácidos grasos. (ver figura 24 y 25).

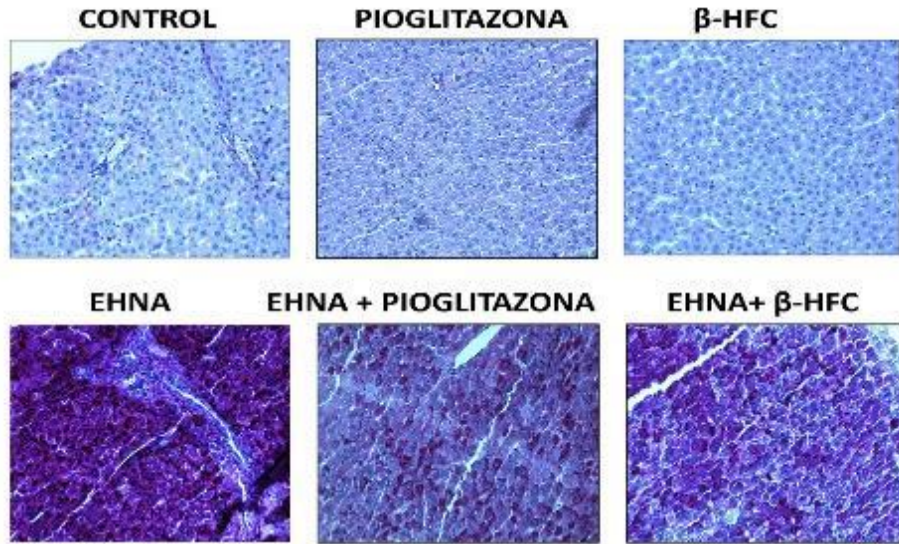


Figura 24. Efecto de β -HFC en acumulación de glucógeno en ratas con EHNA. Tinción ácido perydico de schiff (PAS) (20x)

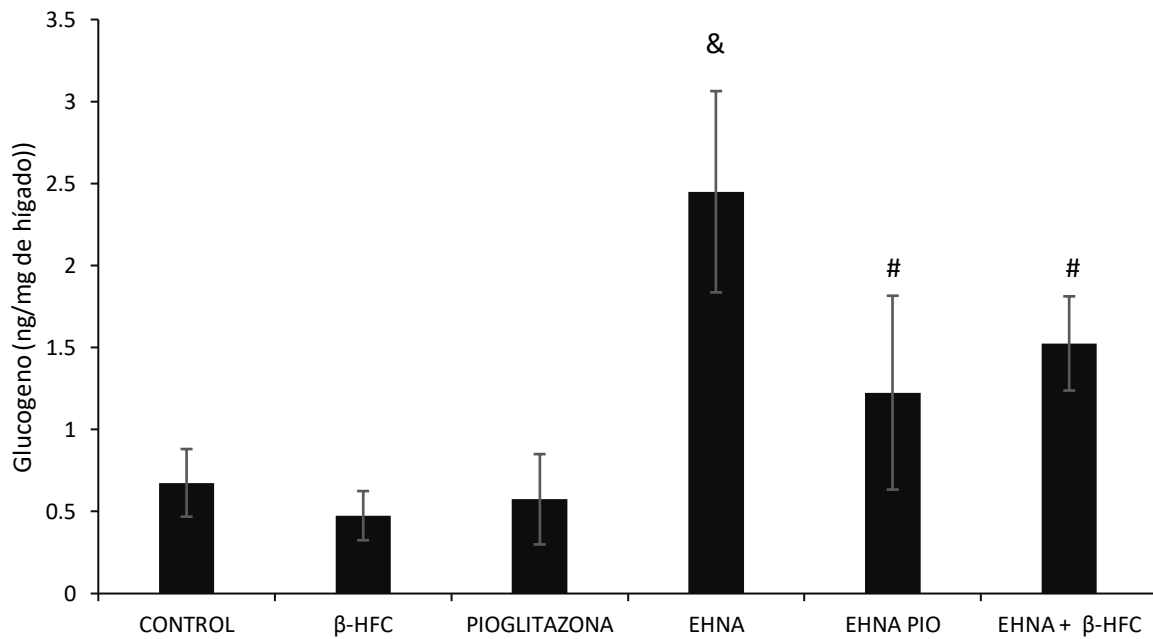


Figura 25. Efecto de β -HFC en la acumulación de glucógeno de ratas con EHNA. Cuantificación por método químico. Análisis estadístico mediante prueba de Kruskal Wallis, & $p > 0.05$ con respecto al grupo control, # $p > 0.05$ con respecto al grupo EHNA.

8.12 Análisis comparativo entre el efecto de pioglitazona y β -HFC sobre la EHNA

Se realizó un análisis comparativo entre los resultados de pioglitazona y EHNA. Se les signo + para indicar que tanto vario un resultado respecto a otro. Las ratas del grupo EHNA son las que mostraron mayor alteración hepática debido a que no recibieron ningún tratamiento que frenara el daño causado por el CCl_4 , fructosa y grasas saturadas. El daño se reflejó en el aumento en todos los parámetros evaluados, por lo que se les asigno la mayor puntuación (+++). La administración de pioglitazona redujo casi el total de los parámetros evaluados. Sin embargo, el efecto de β -HFC redujo más significativamente las alteraciones de EHNA que el efecto de pioglitazona ($p < 0.05$). Los parámetros en los que fue mejor el efecto de β -HFC se remarcaron en naranja en la tabla (ver tabla 18).

Tabla 2. Comparación entre el efecto de β -HFC y pioglitazona.

EFECTO DE FARMACOS SOBRE EHNA		
EHNA	PIOGLITAZONA	β -HIDROXIFOSFOCARNITINA
Esteatosis \uparrow (+++)	++	+
Estructura de tejido hepático \uparrow (+++)	+++	++
TG \uparrow (+++)	+	+
SREBP-1 \uparrow (+++)	++	+
IL-1 β , TNF- α \uparrow (+++)	++	+
α -SMA \uparrow (+++)	++	+
AST, ALT \uparrow (+++)	++	++
GGT, ALP \uparrow (+++)	+	+
Glucógeno \uparrow (+++)	++	++

(La presencia de daño se indica: + indica bajo; ++ mediano; y +++ mayor daño)

9. Discusión de resultados

La EHNA es una enfermedad del hígado, que se caracteriza por una serie de alteraciones que van de esteatosis, fibrosis, hasta cirrosis y en algunos casos cáncer hepático. Es una enfermedad silenciosa y su amplio espectro de alteraciones dificulta su tratamiento. Por lo que actualmente no hay un fármaco específico para EHNA. Es una enfermedad que está asociada a factores metabólicos. Actualmente se sabe que la fructuosa contenida en bebidas procesadas y a las grasas saturadas de las comidas rápidas son parte importante en el desarrollo de esta patología. Además, la EHNA tiene una alta prevalencia paralela a la obesidad, por lo que hay una necesidad urgente en el desarrollo de una farmacoterapia que sea efectiva para el amplio del espectro de alteraciones caracterizan a EHNA. Es por lo que en este proyecto evaluamos el efecto de β -HFC, que ha mostrado en estudios previos ser efectiva en reducir alteraciones del síndrome metabólico asociados al desarrollo de EHNA. Aún se desconoce el mecanismo de acción de β -HFC, pero se ha observado en estudios previos que reduce ganancia de peso, glucosa, colesterol, triglicéridos y mejora la resistencia a la insulina. Por lo que se cree que mantiene las propiedades farmacológicas de su precursor la L-carnitina, siendo su mecanismo de acción principal a través del aumento de la beta oxidación de AG en la mitocondria. La mayoría de las moléculas en estudio para EHNA, ejercen su efecto por vías diferentes a la de β -HFC, por ejemplo, inhibiendo de genes o vías lipogénicas. El metabolismo lipídico es controlado por múltiples vías, por lo que es difícil inhibir cada una de ellas. Es por eso que a la hora de probar su efecto en un modelo donde están activas todas las vías involucradas no se obtiene una mejora significativa. La oxidación de AG es un proceso normal de la célula por lo que beneficiaría el estado de pacientes con EHNA, sin causar efectos secundarios.

Para la evaluación de β -HFC desarrollamos un modelo de EHNA en ratas Wistar macho mediante la administración de fructosa y grasas saturadas, asemejando los factores que en el humano llevan al desarrollo de esta patología. Con la finalidad de evaluar el efecto de β -HFC en la fibrosis se administró CCl_4 para acelerar el daño.

La toxicidad de la alta ingesta de fructosa se atribuye al aumento de la LDN que lleva a la esteatosis hepática. Estudios han demostrado que el cuerpo está preparado para combatir los efectos tóxicos de la fructosa. Un estudio realizado con fructosa marcada demostró que parte de la fructosa se metaboliza a glucosa en los enterocitos, al encontrarse glucosa marcada en circulación. Con este mecanismo el cuerpo garantiza menor entrada de fructosa a la célula. Sin embargo, el consumo en exceso de fructosa a través de bebidas procesadas sobrepasa este mecanismo protector del cuerpo [85]. Actualmente México es uno de los principales consumidores de refrescos, lo que se ha reflejado en los altos índices de obesidad y de enfermedades metabólicas, asociadas al desarrollo de EHNA [86].

Las grasas saturadas que se encuentran en productos procesados alteran la acumulación lipídica y se sabe que participan en el desarrollo del proceso inflamatorio a través de la activación de los DAMPs y PAMPs. Regiones como China con una dieta hipercalórica alta en grasas saturadas tienen los índices más altos de EHNA [87].

El CCl_4 es usado comúnmente para el desarrollo de modelos de fibrosis, su mecanismo principal es a través de la producción de radicales libres, causando daño en la membrana celular mitocondrial y en ADN [88]. El desarrollo del modelo fue comprobado por la presencia de las alteraciones características de la EHNA.

La administración de fructosa, grasa saturada y CCl_4 causó esteatosis macro y microvesicular, inflamación, infiltración celular, necrosis, fibrosis y degeneración balonizante. Las características histológicas que observamos en nuestro modelo fueron similares a los que otros autores han reportado [89]. Existen otros modelos usados para el desarrollo de EHNA, usando dietas aterogénicas o a través de modificaciones genéticas en PPAR, PEPCK-NSREBP-1 α , genes involucrados en el metabolismo lipídico. Sin embargo, el modelo que utilizamos para este proyecto es el que más se asemeja a los factores que llevan al desarrollo de EHNA en humanos [90].

Las ratas de nuestro modelo EHNA, presentaban alteraciones en el tejido hepático, generadas por la lipotoxicidad causada por la excesiva acumulación de grasa en los hepatocitos. Varios autores han intentado inhibir la producción de ácidos grasos con la finalidad de disminuir la esteatosis [91]. Sin embargo, en el desarrollo de esteatosis están involucradas varias vías, por lo que es difícil lograr con este cambio una mejora.

Las ratas que fueron administradas con pioglitazona y β -HFC mostraron reducción de esteatosis evidenciando que la molécula influye en el metabolismo lipídico. En el caso de pioglitazona sabemos que su efecto es a través del receptor PPAR. Los PPAR regulan genes implicados en el transporte de los ácidos grasos a través de la membrana celular, en la activación de derivados acil-CoA, en la entrada a la mitocondria, en la degradación de los ácidos grasos a través del proceso de β -oxidación, ya sea en las mitocondrias o en los peroxisomas, y en la síntesis de cuerpos cetónicos [92]. Sin embargo, un efecto no deseado de la pioglitazona es el aumento de la captación de ácidos grasos en el tejido adiposo, lo que provoca aumento de peso en personas que ya padecen de este problema [93]. Algunos fármacos como metformina, fibratos y omega 3 han demostrado mejorar las alteraciones metabólicas. Sin embargo, no es suficiente ya que al ser evaluados para el tratamiento de EHNA no han mostrado mejorar el tejido hepático [94]. El objetivo de la evaluación de β -HFC sobre EHNA no solo es reducir las alteraciones metabólicas, sino además lograr una mejora hepática, garantizando menos efectos secundarios que pioglitazona. La razón por la cual β -HFC disminuye la esteatosis puede deberse al incremento de la beta oxidación de AG, resultando en un aumento de la producción de energía. Existen estudios que han demostrado que la entrada excesiva de fructosa a la célula lleva al agotamiento de ATP, dañando la mitocondria y llevando a la muerte de la célula [95]. Por lo que el aumento de la producción de energía debido al efecto de β -HFC, compensa el gasto de ATP necesario para el metabolismo de fructosa.

Un factor de transcripción reportado como clave en el desarrollo de la esteatosis es SREBP-1, sobre todo cuando hay ingesta de fructosa. Los SREBP son una familia de factores transcripcionales implicados en la homeostasis de los lípidos (colesterol, ácidos grasos y triglicéridos). Ahora sabemos que la activación de SREBP-1 conduce a la síntesis de ácidos grasos a través de la activación de genes relacionados con las vías lipogénicas [96]. Se ha demostrado que la ingesta excesiva de fructosa estimula la expresión de SREBP-1, lo que lleva a la síntesis endógena de lípidos hepáticos, como una vía alterna a la producción de energía.

En la literatura se reporta que la fructosa y las grasas saturadas son los mayores inductores de triglicéridos intrahepáticos, lo que justifica la esteatosis observada en las ratas de nuestro modelo [97]. Varios reportes de estudios realizados sobre el papel de la fructosa en la esteatosis coinciden que lo hace a través del aumento de la LDN. SREBP-1 es un factor de transcripción de enzimas lipogénicas que se ha visto sobreexpresado por la ingesta de fructosa, por lo que se le atribuye el aumento de la LDN. En pacientes con cáncer hepático que mostraron resistencia a Sorafenib se encontraron niveles altos de SREBP-1 y se correlaciono con baja supervivencia. En estudios donde se ha inhibido SREBP-1 se notó mejor efecto antitumoral de Sorafenic en las células hepáticas cancerosas. El papel de SREBP-1 en las alteraciones hepáticas lo hacen ser objeto de estudio para el tratamiento no solo de EHNA, sino también de cáncer hepático.

Debido al importante papel de SREBP-1 sobre la esteatosis a partir de la síntesis de ácido grasos de novo, evaluamos su expresión en las ratas con EHNA y el efecto de β -HFC sobre su expresión. Como esta reportado en la literatura las ratas con EHNA mostraron más expresión SREBP-1 que las ratas sanas. El resultado de nuestro estudio mostro que pioglitazona redujo la expresión de SREBP-1. Algunos estudios reportados han mostrado que pioglitazona inhibe la expresión de SREBP-1, aunque no se conoce el mecanismo, hay evidencia que indica que lo hace a través de la modulación de la lipólisis en el tejido adiposo.

El tratamiento con β -HFC en las ratas con EHNA también redujo significativamente la expresión de SREBP-1, y aún fue más efectiva significativamente en reducir la expresión de este factor de transcripción que pioglitazona. La expresión de SREBP-1 fue correlacionada con el grado de esteatosis observado en el tejido hepático. Pioglitazona que no logró reducir la esteatosis en la misma forma que β -HFC mostro mayor expresión de SREBP-1, en cambio β -HFC que redujo de manera más efectiva a SREBP-1 se reflejó en un mejor grado de esteatosis. Esta correlación confirma el papel de SREBP-1 en el desarrollo de esteatosis, y la importancia de reducir su expresión para el tratamiento de EHNA. Actualmente no existe ningún fármaco que actúe a través de la inhibición de SREBP-1 en el tratamiento de EHNA, por lo que es un hallazgo importante que la administración de β -HFC module la expresión de este factor de transcripción.

Esta descrito en la literatura que la acumulación excesiva de grasa en los hepatocitos activa varios eventos nocivos para la viabilidad celular, entre ellos el desarrollo del proceso inflamatorio [98]. Múltiples sistemas impulsan la inflamación y la progresión de EHNA. La diafonía entre el tejido adiposo, el intestino, la médula ósea y el hígado desencadena la cascada inflamatoria en la EHNA. Mediadores proinflamatorios como IL-1 y TNF- α pueden ser liberados por el tejido adiposo, las células de kuppfer y por macrófagos infiltrados. En este proyecto evaluamos la expresión de IL-1 β y TNF- α en las ratas con EHNA, para observar el efecto de β -HFC sobre la inflamación.

En la literatura se reporta que los DAMPs y PAMPs, llevan a la formación del inflamosoma 3 (NLRP3), que se considera crucial para el desarrollo de fibrosis. Los DAMPs y PAMPs son mecanismos de defensa contra patógenos, sin embargo, pueden ser activados por el exceso de ácidos grasos. La formación de NLRP3 libera la caspasa que escinde la forma madura de IL-1 β , por lo que NLRP3 juega un papel importante en la inflamación.

En la literatura se reporta niveles elevados de IL-1 β en modelos animales de EHNA, en nuestro estudio las ratas administradas con fructosa, GS y CCl₄ incrementaron sus niveles de IL-1 β significativamente en comparación con el grupo control.

Estudios realizados en pacientes obesos se encontró, que los niveles séricos de IL-1 β se asocian mejor con el grado de esteatosis que con la función hepática, en animales se ha observado que al bloquear a IL-1 β se reduce la esteatosis. Estos reportes indican que IL-1 β juega un papel importante en el desarrollo de esteatosis, y aunque se ha considerado un objeto de estudio para el tratamiento de EHNA, el papel antiinflamatorio de las citocinas IL-1 impide tener éxito satisfactorio al bloquear esta citocina. Es conocido el efecto antiinflamatorio de pioglitazona a través de PPAR, por lo que redujo la expresión de IL-1 β en las ratas de EHNA. En el tejido se observa mayor expresión de IL-1 β con pioglitazona que con el tratamiento de β -HFC. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre el tratamiento de pioglitazona y el de β -HFC. El tratamiento con β -HFC en las ratas con EHNA disminuyó los niveles de IL-1 β , que puede ser resultado tanto de la disminución de la esteatosis y el daño en los hepatocitos como viceversa. Es decir, la atenuación de IL-1 β podría reducir la esteatosis según lo reportado por otros autores, pero también la reducción de la esteatosis disminuiría el proceso inflamatorio en el tejido [99]. IL-1 β no solo participa en el proceso inflamatorio, sino que, se sabe que está involucrada en el desarrollo de esteatosis, aunque aún se desconoce el mecanismo. Algunos fármacos como pentoxifilina y ácido ursodesoxicólico han mostrado reducir citocinas inflamatorias, pero la evidencia es muy limitada por lo que no puede ser recomendado en el tratamiento de EHNA [100].

Otra citocina multifuncional clave en el desarrollo de la etapa inflamatoria de EHNA es TNF- α . En el hígado, TNF- α induce numerosas respuestas biológicas tales como apoptosis, necrosis, inflamación, regeneración del hígado, y autoinmunidad, pero también progresión a carcinoma hepatocelular. Debido a su papel en la apoptosis de hepatocitos, TNF- α ha sido considerado como un objetivo para el desarrollo de terapias para el tratamiento de EHNA. Sin embargo, su papel en el sistema

autoinmune impide el poder desarrollar una terapia bloqueando su actividad inflamatoria. En estudios reportados en la literatura se observó que al inhibir los receptores de TNF- α disminuyó la fibrosis, demostrando la importancia de TNF- α en el proceso fibrogénico. Por lo que la disminución de TNF- α , no solo disminuirá la apoptosis sino también será efectivo en reducir la fibrosis. En pacientes con EHNA se han observado niveles séricos de TNF α en comparación con grupos control. Los inductores de daño en las ratas de nuestro modelo causaron incremento significativo en los niveles de TNF- α en comparación con el control. Pentoxifilina, que se conoce como un inhibidor no selectivo de la fosfodiesterasa y tiene efectos antioxidante y anti-TNF- α , aumento glutatión y TNF- α . Sin embargo, no ha mostrado evidencia suficiente en el tratamiento de EHNA [101]. En nuestro estudio tanto pioglitazona como β -HFC, lograron reducir la expresión de TNF- α . En este caso si hubo diferencia significativa entre el efecto de pioglitazona y el de β -HFC, siendo más efectiva β -HFC en reducir la expresión de TNF- α . Un hallazgo importante debido al papel de TNF- α en la apoptosis de los hepatocitos y la fibrosis hepática. La expresión de TNF- α en el grupo EHNA + β -HFC no llegó a los niveles de TNF- α observados en el tejido de las ratas sanas del grupo control, que puede justificar que los niveles de AST y ALT no disminuyeran significativamente. Sin embargo, el hecho de que β -HFC haya reducido la expresión de TNF- α significativamente nos indica que en un tiempo más largo de tratamiento la reducción será semejante al tejido de ratas sanas.

Cuando el daño hepático es persistente y no hay un tratamiento adecuado las CEH son activadas aumentando la producción de colágena llevando el desarrollo de la fibrosis. La activación, migración y proliferación de CEH está controlada por una red de señalización compleja que involucra factores de crecimiento, lipotoxicidad, inflamación y estrés celular. La reversión de la activación de la CEH es necesaria para detener el avance de la fibrosis extracelular. Por lo tanto, las vías involucradas en la regulación de la activación de CEH representan objetivos terapéuticos atractivos para el tratamiento y prevención de la fibrosis hepática asociada a EHNA.

La fibrosis representa un pronóstico de mortalidad en pacientes con EHNA. Actualmente no hay ningún tratamiento efectivo para la fibrosis avanzada, por lo que, es importante el desarrollo de un fármaco que pueda reducir o retrasar el desarrollo de la fibrosis. En este estudio evaluamos el efecto de β -HFC sobre la fibrosis, como se mencionó previamente se usó CCl_4 para acelerar el daño y poder hacer esta evaluación. Las ratas de nuestro modelo EHNA mostraron desarrollo del proceso fibrogénico, se observa aumento en el grosor de fibras de colágena y la formación de puentes en comparación con las ratas del grupo control. El resultado de nuestra evaluación con pioglitazona mostro reducción significativa de fibrosis en comparación con el grupo EHNA. Algunos otros autores ya han evidenciado el efecto inhibitor de la fibrosis con la administración de pioglitazona, pero sigue sin resolverse el problema de sus efectos secundarios [102]. Con el objetivo de aprovechar el potencial farmacológico de pioglitazona, algunos científicos trabajan en la modificación de pioglitazona para lograr reducir sus efectos secundarios [103]. Sin embargo, aún no hay nada logrado y sería necesario un largo tiempo para poder ser usado en pacientes.

La administración de β -HFC en EHNA redujo la fibrosis y aun fue más efectiva que pioglitazona, mostrando diferencia significativa entre los efectos de ambas moléculas. Podría relacionarse esta diferencia entre el efecto de pioglitazona y β -HFC con su efectividad en reducir la expresión de $\text{TNF-}\alpha$, ya que como se mencionó previamente se ha observado una asociación entre la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ y el desarrollo de fibrosis.

Existen diversos mecanismos por los cuales se podría reducir la fibrosis, faltaría realizar más estudios para conocer exactamente el mecanismo por el cual β -HFC redujo la fibrosis. Un paso importante en el desarrollo de la fibrosis es la activación de las CEH, por lo que evaluamos el efecto de β -HFC en el estado de estas células. Un marcador utilizado comúnmente debido al aumento en su expresión en CEH activadas es α -SMA. Se evaluó la expresión de α -SMA y los resultados mostraron que en las ratas del grupo EHNA hubo más CEH activadas que en el grupo control.

La activación de las CEH en el grupo EHNA correlaciono con el grado de fibrosis observado en este grupo. Clínicamente es difícil evaluar la expresión de α -SMA en pacientes, ya que la biopsia que es necesaria para realizar esta prueba es un invasiva y de alto riesgo, por lo que solo se realiza en pacientes con EHNA avanzada. El tratamiento con pioglitazona redujo la expresión de las CEH, aunque en la literatura atribuyen su efecto a la disminución de inflamación y la esteatosis, ya que no se conoce un mecanismo directo de pioglitazona para reducir la fibrosis. Esta observación justifica el hecho de que pioglitazona no haya sido tan efectiva como β -HFC, ya que se observa más esteatosis e inflamación en este grupo. El tratamiento con β -HFC redujo de manera más significativa la activación de las CEH, correlacionando con el grado de fibrosis observado. Actualmente no existe ningún fármaco en uso que muestre reducir la activación de CEH, algunos productos naturales como Sylmarin mostraron reducir la activación de las CEH, pero no hubo diferencia significativa en el desarrollo de fibrosis. Aramchol que es un derivado de ácido biliar redujo la activación de las CEH en un estudio de fase 3, redujo la producción de colágena, pero no mostro reprimir la expresión de genes fibrogénicos. La evidencia sugiere que su mecanismo de acción es a través de la disminución de la enzima lipogénica estearoil CoA desaturasa 1, por lo que se propone una nueva vía para inhibir la activación de las CEH. Aun cuando los resultados en laboratorio sobre Aramchol sean muy prometedores, sigue en proceso de investigación. Algunos fármacos como Elafibranor, Cenicriviroc, Selorsentic en fase 3 fue suspendido su desarrollo por falta de eficacia. Seladerpac en fase 2 fue suspendido por efectos adversos significativos. La lista de fármacos que prometían potencial farmacológico para EHNA disminuye, por lo que la búsqueda sigue [104]. Hasta ahora β -HFC ha mostrado ser efectiva y no se conocen efectos secundarios.

Una complicación para el tratamiento de EHNA es su tardío diagnóstico, debido a que es una enfermedad asintomática en sus inicios y cuando se descubre ya está en grados avanzados. La prueba específica es la biopsia, pero es poco usada debido a su alto riesgo. Actualmente se trabaja en el desarrollo de biomarcadores séricos que ayuden a diagnosticar a EHNA en etapas más temprana y así mejorar el pronóstico. Algunos de los marcadores con mayor sensibilidad y especificidad

son: A2M (alfa 2 - macroglobulina, ApoA1 (Apolipoproteína A1), HP (haptoglobina), GGT (gamma glutamil transpeptidasa), TC (colesterol total), GLU (glucosa), ALT, AST. Clínicamente se realiza la cuantificación sérica de enzimas hepáticas AST, ALT, ALP y GGT como indicadores de daño hepático.

Fármacos como metformina, fibratos, agonistas de GLP con potencial en el tratamiento de alteraciones metabólicas no logran reducir los niveles de las enzimas hepáticas, por lo que son descartados debido a falta de evidencia en la mejora de la arquitectura del hígado [105].

Niveles elevados de AST, ALT, ALP y GGT se encontraron en las ratas con EHNA, resultado del daño en la arquitectura hepática. En pacientes como en modelos animales de EHNA, se observan niveles elevados de las enzimas AST, ALT, ALP y GGT, por lo que se evalúa su reducción para indicar efectividad con algún tratamiento [106]. La mejora en la función hepática de ratas con EHNA tratadas con pioglitazona y β -HPC fue corroborada por los niveles de las enzimas hepáticas AST, ALT, ALP y GGT. Es conocido que pioglitazona reduce enzimas hepáticas, razón por la cual es empleada en algunos pacientes con EHNA, aunque no se logra una mejora significativa debido a que no puede ser empleada por largo tiempo. La naturaleza crónica de EHNA requiere tratamientos por largos periodos de tiempo, lo que puede justificar que aun cuando se ha visto mejora significativa en alteraciones clave en el desarrollo de EHNA, los niveles de AST y ALT no redujeron significativamente con pioglitazona ni con β -HFC. En los cortes histológicos con H&E podemos notar que aún existe cierto grado de distorsión en el parénquima hepático aun con los tratamientos, consecuentemente los niveles de AST y ALT no redujeron significativamente. La modulación de las enzimas AST y ALT junto con la mejora de otras alteraciones, nos dan indicio de que, en tiempo más largo de tratamiento, los niveles de AST y ALT reducirán significativamente. Dado que en los estudios de seguridad de β -HFC no mostro producir algún efecto tóxico, consideramos que puede ser empleada por largos periodos de tiempo.

En el caso de ALP y GGT se asocian a obstrucción o disminución de la producción de flujo biliar por parte de los hepatocitos, lo que puede ser causado por la extensión y compresión de las vías biliares por fibrosis; por lo tanto, la presencia de fibrosis también se asocia con un aumento de estas enzimas.

Las ratas con EHNA mantenían niveles elevados de GGT y ALP, indicando alteración de la funcionalidad por el desarrollo de fibrosis, resultando en el aumento de estas enzimas. El grupo de EHNA que fue administrado con pioglitazona redujo significativamente GGT y ALP con el efecto de pioglitazona si se observó reducción significativa, indicando mejora en la funcionalidad de los hepatocitos. Con el tratamiento de pioglitazona hubo reducción de fibrosis, lo que pudo resultar en disminución de las enzimas GGT y ALP.

LA reducción de los niveles séricos de GGT y ALP con β -HPC mostraron que el tratamiento tuvo un efecto positivo sobre la función hepática en ratas con EHNA. Hasta ahora hemos encontrado que β -HPC ha sido efectiva en mejorar esteatosis, inflamación y fibrosis lo que se ve reflejado en la mejora de la funcionalidad de los hepatocitos como podemos ver por la reducción de ALP y GGT.

Clínicamente existe una relación directa entre los parámetros bioquímicos y el riesgo de EHNA. Sin embargo, debido a otros factores que influyen en la gravedad de la enfermedad es que no se consideran determinantes. Generalmente en casos de EHNA en pacientes se encuentran elevados los niveles de glucosa, TG y colesterol principalmente, en algunos otros casos de EHNA con obesidad también se presenta resistencia a la insulina. Nuestro modelo no presentó obesidad ni resistencia a la insulina, pero se evaluaron los niveles de glucosa, TG y colesterol. Debido al papel del hígado en el metabolismo lipídico, los niveles de TG se alteran cuando existe algún daño hepático, por lo que varias enfermedades hepáticas de naturaleza diferente a la metabólica presentan características histológicas similares.

Las ratas de nuestro modelo mantenían niveles elevados de TG, consecuencia de la ingesta de fructosa y la grasa saturada. Uno de los mecanismos del aumento de TG es a través de SREBP-1, que como se mostró en este proyecto se encontró más

expresado en las ratas con EHNA que en el grupo control. En la literatura se reporta que las alteraciones en el metabolismo lipídico conducen al desarrollo de esteatosis y al incremento de los TG en circulación. Por lo que un fármaco que mejore el metabolismo lipídico reduciría la esteatosis y los niveles de TG, como lo ha hecho β -HFC.

Aún falta hacer pruebas para elucidar el mecanismo de acción de β -HFC, pero se propone que mantenga el mecanismo de acción de su precursor la L-carnitina. Se sabe que L-carnitina mejora el proceso de beta oxidación de AG, y puede ser la razón por la cual β -HFC redujo esteatosis y TG. También está reportado que L-carnitina tiene propiedades antiinflamatorias, lo que causó que el efecto de β -HFC fuera mejor en las ratas con EHNA, al reducir la inflamación mediante la reducción de esteatosis y por su propiedad antiinflamatoria. El tratamiento con pioglitazona fue efectivo en mejorar todos los parámetros evaluados, sin embargo, en la mayoría de ellos el efecto de β -HFC fue mejor.

Una de las vías por las cuales la célula hepática responde a la ingesta excesiva de fructosa es mediante la acumulación de glucógeno. Normalmente el glucógeno es almacenado como una reserva endógena de glucosa para estados de ayuno. El aumento de la beta oxidación de AG reduciría la acumulación de glucógeno hepático, por lo que evaluamos el efecto de β -HFC en la acumulación de glucógeno. En pacientes con EHNA es difícil tomar este parámetro ya que requiere biopsia y no es de uso común, además de que en pacientes con EHNA que se acompañan de resistencia a la insulina (RI) el glucógeno disminuye. En modelos animales con resistencia a la insulina el aumento de glucógeno es tomado como una reducción de la RI. Sin embargo, las ratas de nuestro modelo no mostraron alteración de los niveles de glucosa en comparación con el control. En nuestro estudio observamos que las ratas con EHNA mostraron una excesiva acumulación de glucógeno, debido a la fructosa. En las ratas con EHNA que recibieron β -HFC hubo menor acumulación de glucógeno, que puede ser resultado del efecto de β -HFC en el aumento de oxidación de los AG. Pioglitazona también redujo la acumulación de glucógeno, por

ser un agonista de PPAR modula el metabolismo lipídico reduciendo la acumulación de glucógeno.

Aunque los hallazgos respaldan el potencial farmacológico de β -HFC en el modelo de EHNA, hacen falta muchos estudios para conocer el mecanismo de acción por el cual β -HFC ejerce su efecto. El efecto que podría tener β -HFC sobre las especies reactivas de oxígeno y la fibrosis avanzada serian unas perspectivas interesantes en un futuro.

Muchos fármacos que prometen potencial farmacológico para EHNA, son descartados por sus efectos adversos. Los estudios previos de seguridad sobre β -HFC refuerzan su potencial para ser utilizado como tratamiento seguro de EHNA. Su mecanismo de acción a través de procesos normalmente realizados en la célula es una ventaja sobre otros fármacos que alteran genes lipogénicos. Lo ideal sería que se redujera la ingesta excesiva de fructosa en el humano, así como de grasas saturadas. Sin embargo, no todos los pacientes logran hacer un cambio en sus hábitos alimenticios, y aun cuando existe suficiente evidencia de los efectos nocivos de la fructosa en alimentos procesados, en México no está regulado su uso.

10. Conclusión

Dado que NASH es una enfermedad crónica, la mayoría de los pacientes clínicos requieren un tratamiento prolongado para una mejoría observable. Como ya se mencionó, los medicamentos utilizados para tratar NASH producen efectos secundarios y no se puede utilizar para largos periodos de tiempo, lo que los hace inapropiados. Se necesitan alternativas. Estudios previos muestran β -HPC tiene un alto margen de seguridad [16], por lo que podría emplearse durante largos periodos de tiempo. Si bien no fue posible reducir todas las alteraciones funcionales y estructurales de la NASH del hígado en animales tratados con β -HPC durante 4 semanas, este estudio sugiere que, si se administra β -HPC durante un período prolongado, la mejora en la arquitectura del hígado y su consecuente funcionalidad

podría aumentar. Por lo tanto, β -HFC tiene el potencial de ser empleado en tratamiento EHNA.

11. Perspectivas

Elucidar mecanismo de acción de β -HFC en EHNA

Evaluar efecto de β -HFC en la expresión de carnitina palmitoil trasferasa en EHNA

Elucidar mecanismo de acción de β -HFC en fibrosis

Evaluar efecto de β -HFC en la activación de las células estelares hepáticas

12. Referencias

- 1.- Hallsworth K, Adams LA. Lifestyle modification in NAFLD/NASH: Facts and figures. *JHEP Rep.* 2019;1(6):468-479. Published 2019 Nov 5. doi:10.1016/j.jhepr.2019.10.008
- 2.- Shi YN, Liu YJ, Xie Z, Zhang WJ. Fructose and metabolic diseases: too much to be good. *Chin Med J (Engl).* 2021;134(11):1276-1285. Published 2021 May 18. doi:10.1097/CM9.0000000000001545
- 3.- Emma L. Shepherd, Raquel Saborano, Ellie Northall, Kae Matsuda, Hitomi Ogino, Hiroaki Yashiro, Jason Pickens, Ryan E. Feaver, Banumathi K. Cole, Stephen A. Hoang, Mark J. Lawson, Matthew Olson, Robert A. Figler, John E. Reardon, Nobuhiro Nishigaki, Brian R. Wamhoff, Ulrich L. Günther, Gideon Hirschfield, Derek M. Erion, Patricia F. Lalor, Ketohexokinase inhibition improves NASH by reducing fructose-induced steatosis and fibrogenesis, *JHEP Reports*, Volume 3, Issue 2, 2021, 100217, ISSN 2589-5559, <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100217>.
- 4.- Federico A, Rosato V, Masarone M, Torre P, Dallio M, Romeo M, Persico M. The Role of Fructose in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Old Relationship and New Insights. *Nutrients.* 2021; 13(4):1314. <https://doi.org/10.3390/nu13041314>
- 5.- Geidl-Flueck B, Hochuli M, Németh Á, et al. Fructose- and sucrose- but not glucose-sweetened beverages promote hepatic de novo lipogenesis: A randomized controlled trial. *J Hepatol.* 2021;75(1):46-54. doi:10.1016/j.jhep.2021.02.027
- 6.- Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1282-1293. doi:10.1007/s10620-016-4054-0
- 7.- Fazakerley DJ, Krycer JR, Kearney AL, Hocking SL, James DE. Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism?. *J Lipid Res.* 2019;60(10):1720-1732. doi:10.1194/jlr.R087510
- 8.- Heeren J, Scheja L. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol Metab.* 2021;50:101238. doi:10.1016/j.molmet.2021.101238
- 9.- Pydyn N, Miękus K, Jura J, Kotlinowski J. New therapeutic strategies in nonalcoholic fatty liver disease: a focus on promising drugs for nonalcoholic steatohepatitis. *Pharmacol Rep.* 2020;72(1):1-12. doi:10.1007/s43440-019-00020-1
- 10.- Masarone M, Rosato V, Dallio M, et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease [published correction appears in *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Jul 28;2021:9757921]. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:9547613. Published 2018 Jun 11. doi:10.1155/2018/9547613

- 11.- Arroyave-Ospina JC, Wu Z, Geng Y, Moshage H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants* (Basel). 2021;10(2):174. Published 2021 Jan 26. doi:10.3390/antiox10020174
- 12.- Zhang C, Yang M. Current Options and Future Directions for NAFLD and NASH Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7571. Published 2021 Jul 15. doi:10.3390/ijms22147571
- 13.- Chen YY, Yeh MM. Non-alcoholic fatty liver disease: A review with clinical and pathological correlation. *J Formos Med Assoc.* 2021;120(1 Pt 1):68-77. doi:10.1016/j.jfma.2020.07.006
- 14.- Eslam M, Fan JG, Mendez-Sanchez N. Non-alcoholic fatty liver disease in non-obese individuals: the impact of metabolic health. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(8):713-715. doi:10.1016/S2468-1253(20)30090-X
- 15.- Gerges SH, Wahdan SA, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. Non-alcoholic fatty liver disease: An overview of risk factors, pathophysiological mechanisms, diagnostic procedures, and therapeutic interventions. *Life Sci.* 2021;271:119220. doi:10.1016/j.lfs.2021.119220
- 16.- Younossi ZM, Henry L, Epidemiology of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma, *JHEP Reports* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100305>.
- 17.- Wong SW, Ting YW, Chan WK. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma and its implications. *JGH Open.* 2018;2(5):235-241. Published 2018 Jul 17. doi:10.1002/jgh3.12070
- 18.- Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation.* 2019;103(1):e1-e13. doi:10.1097/TP.0000000000002480
- 19.- Yang A, Mottillo EP. Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochem J.* 2020;477(5):985-1008. doi:10.1042/BCJ20190468
- 20.- Geidl-Flueck B, Hochuli M, Németh Á, et al. Fructose- and sucrose- but not glucose-sweetened beverages promote hepatic de novo lipogenesis: A randomized controlled trial. *J Hepatol.* 2021;75(1):46-54. doi:10.1016/j.jhep.2021.02.027
- 21.- Paglialunga S, Dehn CA. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):159. Published 2016 Sep 17. doi:10.1186/s12944-016-0321-5

- 22.- Song Z, Xiaoli AM, Yang F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*. 2018;10(10):1383. Published 2018 Sep 29. doi:10.3390/nu10101383
- 23.- Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1282-1293. doi:10.1007/s10620-016-4054-0
- 24.- Muriel P, López-Sánchez P, Ramos-Tovar E. Fructose and the Liver. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6969. Published 2021 Jun 28. doi:10.3390/ijms22136969
- 25.- Uusitupa MI. Fructose in the diabetic diet. *Am J Clin Nutr*. 1994;59(3 Suppl):753S-757S. doi:10.1093/ajcn/59.3.753S
- 26.- John A. Moorhouse, Robert M. Kark, Fructose and diabetes, *The American Journal of Medicine*, Volume 23, Issue 1, 1957, Pages 46-58, [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(57\)90357-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(57)90357-1).
- 27.- Roeb E, Weiskirchen R. Fructose and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Front Pharmacol*. 2021;12:634344. Published 2021 Feb 8. doi:10.3389/fphar.2021.634344
- 28.- Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2017;9(9):981. Published 2017 Sep 6. doi:10.3390/nu9090981
- 29.- DiStefano JK, Shaibi GQ. The relationship between excessive dietary fructose consumption and paediatric fatty liver disease. *Pediatr Obes*. 2021;16(6):e12759. doi:10.1111/ijpo.12759
- 30.- Sanders FW, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016;91(2):452-468. doi:10.1111/brv.12178
- 31.- Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Jan;17(1):64]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(11):678-689. doi:10.1038/nrm4074
- 32.- Todoric J, Di Caro G, Reibe S, et al. Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation. *Nat Metab*. 2020;2(10):1034-1045. doi:10.1038/s42255-020-0261-2
- 33.- Muriel P, López-Sánchez P, Ramos-Tovar E. Fructose and the Liver. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6969. Published 2021 Jun 28. doi:10.3390/ijms22136969
- 34.- Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2017;9(9):981. Published 2017 Sep 6. doi:10.3390/nu9090981

- 35.- Softic S, Meyer JG, Wang GX, et al. Dietary Sugars Alter Hepatic Fatty Acid Oxidation via Transcriptional and Post-translational Modifications of Mitochondrial Proteins. *Cell Metab.* 2019;30(4):735-753.e4. doi:10.1016/j.cmet.2019.09.003
- 36.- Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology.* 2019;69(6):2672-2682. doi:10.1002/hep.30251
- 37.- Arab JP, Dirchwolf M, Álvares-da-Silva MR, et al. Latin American Association for the study of the liver (ALEH) practice guidance for the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2020;19(6):674-690. doi:10.1016/j.aohep.2020.09.006
- 38.- Peng C, Stewart AG, Woodman OL, Ritchie RH, Qin CX. Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Review of Its Mechanism, Models and Medical Treatments. *Front Pharmacol.* 2020;11:603926. Published 2020 Dec 3. doi:10.3389/fphar.2020.603926
- 39.- Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(6):349-364. doi:10.1038/s41575-018-0009-6
- 40.- Luci C, Bourinet M, Leclère PS, Anty R, Gual P. Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:597648. Published 2020 Dec 14. doi:10.3389/fendo.2020.597648
- 41.- Cariello M, Piccinin E, Moschetta A. Transcriptional Regulation of Metabolic Pathways via Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;11(5):1519-1539. doi:10.1016/j.jcmgh.2021.01.012
- 42.- Moslehi A, Hamidi-Zad Z. Role of SREBPs in Liver Diseases: A Mini-review. *J Clin Transl Hepatol.* 2018;6(3):332-338. doi:10.14218/JCTH.2017.00061
- 43.- Steensels S, Qiao J, Ersoy BA. Transcriptional Regulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolites.* 2020;10(7):283. Published 2020 Jul 9. doi:10.3390/metabo10070283
- 44.- Softic S, Stanhope KL, Boucher J, et al. Fructose and hepatic insulin resistance. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2020;57(5):308-322. doi:10.1080/10408363.2019.1711360
- 45.- Haas JT, Miao J, Chanda D, et al. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metab.* 2012;15(6):873-884. doi:10.1016/j.cmet.2012.05.002

- 46.- Regnault TR, Gentili S, Sarr O, Toop CR, Sloboda DM. Fructose, pregnancy and later life impacts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(11):824-837. doi:10.1111/1440-1681.12162
- 47.- Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*. 2016;65(8):1080-1086. doi:10.1016/j.metabol.2015.11.008
- 48.- Duan Y, Pan X, Luo J, et al. Association of Inflammatory Cytokines With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol*. 2022;13:880298. Published 2022 May 6. doi:10.3389/fimmu.2022.880298
- 49.- Katsarou A, Moustakas II, Pyrina I, Lembessis P, Koutsilieris M, Chatzigeorgiou A. Metabolic inflammation as an instigator of fibrosis during non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2020;26(17):1993-2011. doi:10.3748/wjg.v26.i17.1993
- 50.- Huby, T., Gautier, E.L. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Immunol* 22, 429–443 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00639-3>
- 51.- Li S, Chen L, Lv G. Interleukin-6 Receptor Blockade can Increase the Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Indications From Mendelian Randomization. *Front Pharmacol*. 2022;13:905936. Published 2022 Jun 7. doi:10.3389/fphar.2022.905936
- 52.- Mirea AM, Tack CJ, Chavakis T, Joosten LAB, Toonen EJM. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends Mol Med*. 2018;24(5):458-471. doi:10.1016/j.molmed.2018.03.005
- 53.- Ramadori P, Weiskirchen R, Trebicka J, Streetz K. Mouse models of metabolic liver injury. *Lab Anim*. 2015;49(1 Suppl):47-58. doi:10.1177/0023677215570078
- 54.- Barbier L, Ferhat M, Salamé E, et al. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:2014. Published 2019 Aug 27. doi:10.3389/fimmu.2019.02014
- 55.- Tilg H, Effenberger M, Adolph TE. A role for IL-1 inhibitors in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)? *Expert Opin Investig Drugs*. 2020;29(2):103-106. doi:10.1080/13543784.2020.1681397
- 56.- Ćurčić IB, Kizivat T, Petrović A, Smolić R, Tabll A, Wu GY, et al. Therapeutic Perspectives of IL1 Family Members in Liver Diseases: An Update. *J Clin Transl Hepatol*. Published online: Aug 15, 2022. doi: 10.14218/JCTH.2021.00501.

- 57.- L. Sheriff and P. F. Lalor. The Impact of the NLRP3 Pathway in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol-Related Liver Disease. *Livers* 2021, 1(2), 68-81; <https://doi.org/10.3390/livers1020007>
- 58.- Lu S, Wang Y, Liu J. Tumor necrosis factor- α signaling in nonalcoholic steatohepatitis and targeted therapies. *J Genet Genomics*. 2022;49(4):269-278. doi:10.1016/j.jgg.2021.09.009
- 59.- Tang KT, Dufour JF, Chen PH, Hernaez R, Hutfless S. Antitumour necrosis factor- α agents and development of new-onset cirrhosis or non-alcoholic fatty liver disease: a retrospective cohort. *BMJ Open Gastroenterol*. 2020;7(1):e000349. Published 2020 Apr 15. doi:10.1136/bmjgast-2019-000349
- 60.- Bluemel S, Wang Y, Lee S, Schnabl B. Tumor necrosis factor alpha receptor 1 deficiency in hepatocytes does not protect from non-alcoholic steatohepatitis, but attenuates insulin resistance in mice. *World J Gastroenterol*. 2020;26(33):4933-4944. doi:10.3748/wjg.v26.i33.4933
- 61.- Schwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1913-1928. doi:10.1053/j.gastro.2019.11.311
- 62.- Sircana A, Paschetta E, Saba F, Molinaro F, Musso G. Recent Insight into the Role of Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1745. Published 2019 Apr 9. doi:10.3390/ijms20071745
- 63.- Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;121:27-42. doi:10.1016/j.addr.2017.05.007
- 64.- Zisser A, Ipsen DH, Tveden-Nyborg P. Hepatic Stellate Cell Activation and Inactivation in NASH-Fibrosis-Roles as Putative Treatment Targets?. *Biomedicines*. 2021;9(4):365. Published 2021 Mar 31. doi:10.3390/biomedicines9040365
- 65.- Heyens LJM, Busschots D, Koek GH, Robaeys G, Francque S. Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:615978. Published 2021 Apr 14. doi:10.3389/fmed.2021.615978
- 66.-Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association; Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association; Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Consensus on the diagnosis and treatment of hepatic fibrosis (2019). *J Dig Dis*. 2020;21(3):127-138. doi:10.1111/1751-2980.12854
- 67.- Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 2007;47(4):598-607. doi:10.1016/j.jhep.2007.07.006

- 68.- Contreras-Zentella ML, Hernández-Muñoz R. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress?. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3529149. doi:10.1155/2016/3529149
- 69.- Charlton M. The Future of Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2020;16(5):258-261.
- 70.- Lian J, Fu J. Pioglitazone for NAFLD Patients With Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:615409. Published 2021 Apr 28. doi:10.3389/fendo.2021.615409
- 71.- Fatima K, Moeed A, Waqar E, et al. Efficacy of statins in treatment and development of non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis [published online ahead of print, 2021 Oct 1]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021;101816. doi:10.1016/j.clinre.2021.101816
- 72.- Li J, Tuo B. Current and Emerging Approaches for Hepatic Fibrosis Treatment. *Gastroenterol Res Pract*. 2021;2021:6612892. Published 2021 Jul 16. doi:10.1155/2021/6612892
- 73.- Damiris K, Tafesh ZH, Pirsopoulos N. Efficacy and safety of anti-hepatic fibrosis drugs. *World J Gastroenterol*. 2020;26(41):6304-6321. doi:10.3748/wjg.v26.i41.6304
- 74.- Choi M, Park S, Lee M. L-Carnitine's Effect on the Biomarkers of Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2020;12(9):2795. Published 2020 Sep 12. doi:10.3390/nu12092795
- 75.- Nasir Talenezhad, Masoud Rahmanian, Farhang Mirzavandi, Mahdieh Hosseinzadeh, Hossein Fallahzadeh, Javad Zavar Reza, Hassan Mozaffari-Khosravi, Effects of L-carnitine supplementation on oxidative and metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, clinical trial, *European Journal of Integrative Medicine*, Volume 40, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101243>
- 76.- Mollica G, Senesi P, Codella R, et al. L-carnitine supplementation attenuates NAFLD progression and cardiac dysfunction in a mouse model fed with methionine and choline-deficient diet. *Dig Liver Dis*. 2020;52(3):314-323. doi:10.1016/j.dld.2019.09.002
- 77.- Li N, Zhao H. Role of Carnitine in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Other Related Diseases: An Update. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:689042. Published 2021 Aug 9. doi:10.3389/fmed.2021.689042
- 78.- Savic D, Hodson L, Neubauer S, Pavlides M. The Importance of the Fatty Acid Transporter L-Carnitine in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients*. 2020;12(8):2178. Published 2020 Jul 22. doi:10.3390/nu12082178

- 79.- Li N, Zhao H. Role of Carnitine in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Other Related Diseases: An Update. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:689042. Published 2021 Aug 9. doi:10.3389/fmed.2021.689042
- 80.-Reyes-Esparza J, Mendoza-Rivera B, De la Cruz-Cordero R, et al. Pharmacological evaluation of a β -hydroxyphosphonate analogue of l-carnitine in obese Zucker fa/fa rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;112(4):222-228. doi:10.1111/bcpt.12019
- 81.- Gómez-Solís A, De la Cruz-Cordero R, Avalos-Soriano A, Duarte-Vázquez MA, Reyes-Esparza J, Rodríguez-Fragoso L. Efficacy and safety of two analogs of l-carnitine on rats made insulin resistant by a high-fructose diet. *Pharmacology*. 2011;88(1-2):10-17. doi:10.1159/000328772
- 82.- Reyes-Esparza J, Mendoza-Rivera B, De la Cruz-Cordero R, Duarte-Vázquez M. A, Rosado JL. and Rodríguez-Fragoso L. Preclinical safety assessment of β -hydroxyphospho-carnitine. *Toxicol Int* 2016; 23(2): 170. doi:10.22506/ti/2016/v23/i2/146697
- 83.- Reyes-Esparza J, Mendoza-Rivera B, De la Cruz-Cordero R, Duarte-Vázquez MÁ, Rosado JL, Rodríguez-Fragoso L. Pharmacokinetic and pharmacological effects of β -hydroxyphosphocarnitine in animal models. *Pharmacology*. 2014;94(1-2):90-98. doi:10.1159/000366205
- 84.- Lineamientos para el Uso de Animales de Laboratorio. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CCUAL-FM UAEM (2009)).
- 85.- Shepherd EL, Saborano R, Northall E, et al. Ketohexokinase inhibition improves NASH by reducing fructose-induced steatosis and fibrogenesis. *JHEP Rep*. 2020;3(2):100217. Published 2020 Nov 20. doi:10.1016/j.jhepr.2020.100217
- 86.- Beysen C, Schroeder P, Wu E, et al. Inhibition of fatty acid synthase with FT-4101 safely reduces hepatic de novo lipogenesis and steatosis in obese subjects with non-alcoholic fatty liver disease: Results from two early-phase randomized trials. *Diabetes Obes Metab*. 2021;23(3):700-710. doi:10.1111/dom.14272
- 87.- Batchuluun B, Pinkosky SL, Steinberg GR. Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(4):283-305. doi:10.1038/s41573-021-00367-2
- 88.- Federico A, Rosato V, Masarone M, et al. The Role of Fructose in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Old Relationship and New Insights. *Nutrients*. 2021;13(4):1314. Published 2021 Apr 16. doi:10.3390/nu13041314

- 89.- Merino B, Fernández-Díaz CM, Cózar-Castellano I, Perdomo G. Intestinal Fructose and Glucose Metabolism in Health and Disease. *Nutrients*. 2019;12(1):94. Published 2019 Dec 29. doi:10.3390/nu12010094
- 90.- Steenson S, Umpleby AM, Lovegrove JA, Jackson KG, Fielding BA. Role of the Enterocyte in Fructose-Induced Hypertriglyceridaemia. *Nutrients*. 2017;9(4):349. Published 2017 Apr 1. doi:10.3390/nu9040349
- 91.- Leong, I. The small intestine – a new player in fructose metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 14, 190 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.20>
- 92.- Jang C, Hui S, Lu W, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab*. 2018;27(2):351-361.e3. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.016
- 93.- Malik VS, Hu FB. The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2022;18(4):205-218. doi:10.1038/s41574-021-00627-6
- 94.- Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatol Commun*. 2020;4(4):478-492. Published 2020 Jan 14. doi:10.1002/hep4.1479
- 95.- Luci C, Bourinet M, Leclère PS, Anty R, Gual P. Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:597648. Published 2020 Dec 14. doi:10.3389/fendo.2020.597648
- 96.- Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, Kubes P, Heikenwälder M, Tacke F. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease - novel insights into cellular communication circuits. *J Hepatol*. 2022;77(4):1136-1160. doi:10.1016/j.jhep.2022.06.012
- 97.- Hallsworth K, Adams LA. Lifestyle modification in NAFLD/NASH: Facts and figures. *JHEP Rep*. 2019;1(6):468-479. Published 2019 Nov 5. doi:10.1016/j.jhepr.2019.10.008
- 98.- Gama JFG, Cardoso LMDF, Lagrota-Candido JM, Alves LA. Animal models applied to acute-on-chronic liver failure: Are new models required to understand the human condition?. *World J Clin Cases*. 2022;10(9):2687-2699. doi:10.12998/wjcc.v10.i9.2687
- 99.- Sanches SC, Ramalho LN, Augusto MJ, da Silva DM, Ramalho FS. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *Biomed Res Int*. 2015;2015:574832. doi:10.1155/2015/574832

- 100.- Montandon, S.A., Somm, E., Loizides-Mangold, U. et al. Multi-technique comparison of atherogenic and MCD NASH models highlights changes in sphingolipid metabolism. *Sci Rep* 9, 16810 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53346-4>
- 101.- Van den Hoek AM, Verschuren L, Worms N, et al. A Translational Mouse Model for NASH with Advanced Fibrosis and Atherosclerosis Expressing Key Pathways of Human Pathology. *Cells*. 2020;9(9):2014. Published 2020 Sep 1. doi:10.3390/cells9092014
- 102.- Zhong F, Zhou X, Xu J, Gao L. Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestion*. 2020;101(5):522-535. doi:10.1159/000501851
- 103.- Carreres L, Jílková ZM, Vial G, Marche PN, Decaens T, Lerat H. Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2021;9(4):378. Published 2021 Apr 2. doi:10.3390/biomedicines9040378
- 104.- Batchuluun B, Pinkosky SL, Steinberg GR. Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(4):283-305. doi:10.1038/s41573-021-00367-2
- 105.- Monroy-Ramirez HC, Galicia-Moreno M, Sandoval-Rodriguez A, Meza-Rios A, Santos A, Armendariz-Borunda J. PPARs as Metabolic Sensors and Therapeutic Targets in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):8298. Published 2021 Aug 2. doi:10.3390/ijms22158298
- 106.- White U, Fitch MD, Beyl RA, Hellerstein MK, Ravussin E. Adipose depot-specific effects of 16 weeks of pioglitazone on in vivo adipogenesis in women with obesity: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2021;64(1):159-167. doi:10.1007/s00125-020-05281-7



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janet Sánchez Quevedo _____

Título de la tesis: "Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas" _____

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Leticia González Maya

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado

18 de agosto 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LETICIA GONZALEZ MAYA | Fecha:2023-08-19 10:49:03 | Firmante

tRtv7/So4J84BFqzlyNtBCUCZ5Q/VqY7CyWVZL1k6cQYIT4NTbQEYKqrGoi1jZtkUwgh1e2D1SjfgcRnONWPVvYw0s0hMpTdm+lcQ0nLIPdglJjq9RUUQ8blnHzZ6pi3LtyUiH6fC8t7
LSwUneiWv9KUq8biVLO0QAtx3BT2+G48ZuwuCKSYZrfboK+kFLzaeVpdT1gCW+qMT14ScCKp4dLfsWVzSMGTC4Ym+GzsQVHjyd0kPOH0TBkPY4mkw+/qCnoccz6k2eOQ6G
U2evgsSZ18AVJG6hk+zpdsF8zrTjvnQUKevgQDQMn+T33dTV3fC2EijmYk15A/buwX+s2VXg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xsDEHUXAC](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YW5Q12z8V5AW22nLzGDYV6tMUyN4ytYw>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janet Sánchez Quevedo _____

Título de la tesis: "Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas" _____

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Julieta Ivonne Castro Romero

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado

18 de agosto 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JULIETA IVONE CASTRO ROMERO | Fecha:2023-08-21 14:03:34 | Firmante

V0JZUwoiyN7dXBqBa6V17r+N5+MJL7jy8VaUi02D+rQtOEILQUYCRNYHj0XUrqwO41sHw/HFhOTEbX61k0aWdPvfEVMEFOiuZjw48R85o4DV70YqL8RRaGpG/Zua+eQg5/3xVFO9DXLP3NwcTeTnqn4aagf2j7rFZmjllloyCZJ0Tq+b/MHnXlg9tV3TkN1UhEDWi+cOWkLyVgdDH0l66MNzWWCYIiQQYwt4k++5BMfS/plenc5TIFwdVjLyQ6CT03fT2wQyV6VH4cNZrkEEB0ggTbnayCPGuRFE30Bg6XNykG/vhBcZqUI++w6MJLj2A73R+iRHFdv4unkhFOJqng==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[bqYQgkVPL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Hn80sbJqKdVcG6vNvyGerstYNCSDsEGO>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janet Sánchez Quevedo _____

Título de la tesis: "Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas" _____

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado

18 de agosto 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2023-08-31 09:43:26 | Firmante

OsTFjUDaG3arc3z5C4aLEU73W6QpZCRPv/Ky7W4y5PkWKojXe6pZw0KEx0Jx4Wf0RPNvit3rIAmrhic2v2cS2aifZTRwnTqkfgiq0oClzpNC+cs1O4mTytKB0DwXrJaj093wduABVJ6fPUXFImAcLmHijAOB0/p6DB1oYeFZ0g/WhYU9ExpMkvPACu9x9rzYhMrV0dc37CyFBETJGqqdxLhDpkG+oAEDLryaXKbxz8ZjXw6fwsgZmse0cNI+/zIP5v5xuM4TxfjizHOyJvon3Qmok6RPPBa6QjUAC5W5Qe9lpwQsN5fvkBLLhdIveAzjgKvEtY1vPRTOS54UQp1gg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[s6UHmJTOt](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3qZ680M8MLoin9UWILTCrppp64K7GLyH>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janet Sánchez Quevedo _____

Título de la tesis: "Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas" _____

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado

18 de agosto 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2023-08-20 22:39:14 | Firmante

vj7ILRZUVy7npUB5IFQuVoAJEzjySs6wL.SnyaU34vfv4qJf8jgEkRkDhldk/IJ/6TPDoE3sfuhy/7ximkzZTb8myGUWoZX7hHMANji05AeHBhF/HqHQDoqmDILoS/oCIhYOfsRcNZGiM1UIWca+8ZID+VTQCbd91RiTJxj7pZFjftMtfCFWUvWZd+nk2eOPz8kLx3mEXHOUBeZTZdx262b8di+8KkEe/tPL+7zeFsMxccM16+TRtPmoX0Qia2DgSVBLFjYMI4L9c5O6asgY3XS0DmsN/ysyCtIINTpSI5qWGkqaiUw5tfIMjfHuh0NMLryjRR3pEEJdLCUIqumrJQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[L1Bz2f6qD](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Ulx8aGKFDptal3j11SEqaNc71uInmRE8>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janet Sánchez Quevedo _____

Título de la tesis: "Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas" _____

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Ismael Ricardo Campos Nonato

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado

18 de agosto 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ISMAEL RICARDO CAMPOS NONATO | Fecha:2023-08-29 23:34:15 | Firmante

XM0KYi/2cjbLVHc6MvXfcJxX5zhzHM76WQ1lByOas3fTjzWnrBb5Hnn37bESTHpoRALXgzpUGY/1Uv7jsbei7i9iVeESBtpiXDqJUmizMgT9WGtc3GzheRppCNL1sVBhBqf8iLoqGTjYy4Y2xMlxkoNaX6qV5KgBu5vbWzr4xuex15cokaa1m++H4/qmUDpJZ6OfIKtslGZNQoum/WKyf+eTtpv+7rAmXxgzTn2DpYQ7Kxt4tRpHYulWr8tOq5e0p+CD8VqwQPbZagd3BqdYM/R0Oe8ts4p1A9ZwtBOOBUG+8d4MqNteBXY2y4UNMhxfg8+8jopBFJ8K7a0N09gWqg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



31eDFhuGI

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/y5CFvxBU06qxcPo37N29nj0e52YoNBL>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janet Sánchez Quevedo _____

Título de la tesis: "Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas" _____

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Antonieta Gómez Solís

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi
decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado

18 de agosto 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANTONIETA GOMEZ SOLIS | Fecha:2023-08-21 09:34:00 | Firmante

wS97QBtanCIRSplrFRYePlrmFYp7qi2AEaL5VuwQ8E6+ujr/sI+btFNBUDxoxU29mQiB+s3wlgazai4WblSipa99JhNk0+qQ/fiMp1fm6Qt6/rAIMpcalUWCcQwFrRtZclsEX8hXft1l8qZN1Sr7bs+rajagq1a+5ZDYolRAdKNOYJqUQlJvAt32sJbi8jk9g0A/sESYSHjkTt1oWnlxwAAAq3meZHL4EU035oTHkU4Sggj0GacCyg5hhtN7a0ntIDzaakJwtYRJXxCg68AjzSWEleDb++jlv/4Hgpmm9NMcgU5T4W5J1ds66kv0HVjQjAo2k7g+yVJUvJzj8kSZ6w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[EvFicjzRH](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/J5Qcg8fmO7Mlcg0ZqYYF3FsGhiPhih2S>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Janet Sánchez Quevedo

Título de la tesis: “Evaluación Farmacológica de β -Hidroxifosfocarnitina en la
esteatohepatitis no alcohólica inducida en ratas”

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Maria de Lourdes Rodríguez Fragoso

Firma del miembro del jurado

25 de junio 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DE LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO | Fecha:2023-08-19 13:44:54 | Firmante

lt8wjyS9CSQi/Yo+LRv2mhm1FkfqhMjgwodCB5xNTHylZC+ZosBRT3MArKqinOjYWb4J9rQt7ZuqCDInyQNr/ErWPEBS2+7v443gFjo9Fo7/xuORGe4jRYJiZjeZY2XP+K3WWJxzzR
Auj2MEU0+cr9aZ4W2ksW4O3IAVNEyw7+0Ho/3OVGzOsKt/o8l3nVoV9lB8UOGwpZSOBBrYd6VorUso1azqZCzmrCuBqo5yTcWgW0UvuCg0BI9vFCAQry9PJHH8LbpsaAhA3
Q04F0Drb8N3iUDjysvxyDngr6CWLY7O2pDDpwjQHRJsv1rs03WOrJZt324flob/PeUR+dSFg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[feQZP7CTx](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aACiy4zDgKhixFs3tqn4RY1r9NVPl0ok>

