

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI



PROGRAMA DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“EFECTOS DE LA NIACINA EN UN MODELO ANIMAL DE
HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO INDUCIDO POR UNA
DIETA OCCIDENTAL”**

Tesis que presenta:

C. Gabriela López Almada

Para obtener el grado de maestro en:

Ciencias de la Salud

Director de Tesis:

Dr. Jonathan Isaac Arauz Cabrera

Una firma manuscrita en azul que parece decir "Jonathan Isaac Arauz Cabrera".

V.º B.º

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la tutoría del Dr. Jonathan Isaac Arauz Cabrera.

DEDICATORIA

A *Leonor*, mi protocolo más complejo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor Dr. Jonathan Isaac Arauz Cabrera. A los maestros que me enseñaron y formaron: Octavio Galindo Hernández, José Gustavo Vázquez Jiménez, Rafael Iván Ayala Figueroa y Nicolás Addiel Serafín Higuera. A las prestaciones del conocimiento de la Dra. Elena Marín para hacer posible este trabajo. A mis hermanas académicas, Jazmín Loera Ramos, por su paciencia y ejemplo, y a Rosa Patricia Cruz Nieves, por su apoyo. A los MPSS y estudiantes que facilitaron este trabajo. A mi esposo, Adrián, que a pesar de hablar el idioma de las artes me apoyó, ayudó y buscó comprender el idioma de la ciencia. Y finalmente a todas aquellas personas que removieron barreras en el camino de la ciencia.

SI 139:6

ÍNDICE

1. ABSTRACT	6
2. RESUMEN	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 GENERALIDADES DEL HÍGADO	8
3.2 ARQUITECTURA DEL HÍGADO	8
3.2.1 MODELO LOBULAR Y ACINAR	9
3.2.2 TIPOS CELULARES PRESENTES EN EL TEJIDO HEPÁTICO	10
4. DAÑO HEPÁTICO	12
4.1 ETIOLOGÍA DE DAÑO HEPÁTICO	12
4.2 DAÑO AGUDO Y DAÑO CRÓNICO	12
4.3 FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO	13
4.4 FIBROSIS, CIRROSIS Y CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)	14
5. ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (EHGNA)	15
5.1 EPIDEMIOLOGÍA Y DEFINICIÓN DE EHGNA, HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (HGNA) Y ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (EHNA)	15
5.2 SÍNDROME METABÓLICO (SM) Y OBESIDAD COMO FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EHGNA	16
5.2.1 SM	17
5.2.2 LA OBESIDAD	18
5.2.2.1 ADIPOCINAS	19
5.3 FISIOPATOLOGÍA DE EHGNA	20
5.3.1 HIPÓTESIS DE “DOBLE ATAQUE” Y “ATAQUES MÚLTIPLES PARALELOS”	20
5.3.2 ESTRÉS OXIDATIVO	22
5.3.3 LIPOTOXICIDAD	23
5.3.4 INFLAMACIÓN	25
5.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	27
5.4.1 ESCALA DE ESTADIFICACIÓN PARA LA EHGNA	28
5.5 TRATAMIENTO ACTUAL	29

5.5.1	ANTIOXIDANTES	30
6.	LA NIACINA EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA	32
6.1	GENERALIDADES Y MECANISMO DE ACCIÓN	32
6.2	EFFECTOS BENÉFICOS DE LA NIACINA EN LA EHGNA	34
7.	MODELO ANIMAL DE EHGNA	35
7.1	MODELO DE DIETA OCCIDENTAL	36
8.	JUSTIFICACIÓN	38
9.	HIPÓTESIS	39
10.	OBJETIVOS	39
11.	METODOLOGÍA	40
12.	RESULTADOS	46
13.	DISCUSIÓN	57
14.	CONCLUSIONES	65
15.	RECURSOS FINANCIEROS E INFRAESTRUCTURA	66
16.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is increasing worldwide and has been linked to the increase in the prevalence of obesity and the premature development of metabolic syndrome (MS). This pathology has been considered as the hepatic manifestation of the MS as well as the manifestation of underlying alterations of lipid metabolism. Niacin is used clinically as a lipid lowering agent in dyslipidemias; recent studies have shown antioxidant, antifibrogenic and anti-inflammatory properties related to niacin. In this study, the effects of niacin were evaluated in an experimental model of fatty liver disease induced by a western diet in Wistar rats. The western diet (WD) consisted of a high fat diet as well as a 20% fructose drink which were administered for an 18 week period. Niacin was administered daily *per os* simultaneously in one of the groups at a dose of 50 mg/kg. At the end of treatment, the activity of liver enzymes alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GTP) were determined in plasma. The lipid profile (triglycerides (TG), total cholesterol (TC), HDL-C and LDL-C) was evaluated. In liver, oxidative stress markers were determined by glutathione quantification (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels. Also, the content of collagen and glycogen in the liver were evaluated to assess the biosynthetic capacity of the organ. A histopathological study was performed through hematoxylin and eosin (H & E) stain. TGF- β expression was determined by western blot. The administration of niacin associated with a WD revealed a significant reduction in total body weight, as well as attenuation of liver damage due to the decrease in the activity of liver enzymes. Likewise, a reduction in TC, LDL-C and TG and an increase in HDL-C were observed compared to the WD group. In addition, niacin was able to prevent oxidative stress and prevent overexpression of TGF- β . Histopathological analysis is consistent with the biochemical and molecular findings. Our results show that in this model niacin prevents the development of steatosis in the liver, thus delaying the development of NAFLD, possibly due to its antioxidant properties but mainly due to its lipid lowering capacity. The attenuation of the inflammatory process is evident when observing a decrease in liver marker enzymes of damage. In addition, niacin diminished total body weight probably by decreasing serum lipid levels. Other studies are necessary to elucidate the anti-inflammatory mechanism and the abatement of disease progression.

2. RESUMEN

La enfermedad hepática por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es cada vez más frecuente en todo el mundo, la cual se ha relacionado con el aumento en la prevalencia de obesidad y el desarrollo prematuro del síndrome metabólico (SM). Esta patología ha sido considerada como una manifestación hepática relacionada al SM así como a las alteraciones subyacentes del metabolismo lipídico en el SM. La niacina (NA) se utiliza clínicamente como agente hipolipemiante en dislipidemias; estudios recientes sugieren propiedades antioxidantes, antifibrogénicas y antiinflamatorias de la NA. En este estudio se evaluaron los efectos de la NA en un modelo experimental de hígado graso no alcohólico inducido por una dieta occidental (DO) en ratas Wistar. La DO consistía de una dieta alta en grasas así como una bebida que contenía fructosa al 20% la cual fue administrada por un periodo de 18 semanas. La NA se administró de manera simultánea en uno de los grupos diariamente por vía oral en una dosis de 50mg/kg. Al término del tratamiento se determinó en plasma la actividad de las enzimas hepáticas: alanino aminotransferasa (ALT) y gama-glutamiltanspeptidasa (γ -GTP). Se evaluó el perfil lipídico (triglicéridos (TG), colesterol total (CT), c-HDL y c-LDL). En hígado se determinaron marcadores de estrés oxidativo mediante la cuantificación de glutatión (GSH) y los niveles de malondialdehído (MDA). También, en hígado se evaluó el contenido de colágeno y glucógeno para valorar la capacidad biosintética del órgano. Se realizó un estudio histopatológico mediante tinción hematoxilina y eosina (H y E). Se determinó la expresión del TGF- β por western blot. La administración de NA asociado a una DO mostró una reducción significativa en el peso corporal total, así como una atenuación del daño por la disminución de la actividad de las enzimas hepáticas. Así mismo se observó una reducción del CT, c-LDL y de TG, y un aumento de c-HDL. Además, la NA fue capaz de prevenir el estrés oxidativo y prevenir la sobreexpresión del TGF- β . El análisis histopatológico concuerda con los hallazgos bioquímicos y moleculares. Nuestros resultados muestran que en nuestro modelo la NA previene el desarrollo de la esteatosis hepática posiblemente por las propiedades antioxidantes pero principalmente debido a su capacidad hipolipemiante. Es necesario realizar otros estudios para elucidar el mecanismo antiinflamatorio y la disminución en la progresión de la enfermedad.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES DEL HÍGADO

El hígado es el órgano intraperitoneal más grande del cuerpo humano. Se encuentra en la cavidad abdominal con un peso que puede alcanzar hasta 1,600 g. en el adulto. Es vital para la conservación de homeostasis del organismo y es considerado una glándula mixta al llevar a cabo múltiples funciones tales como: de síntesis (de factores de coagulación, bilis, colesterol, lipoproteínas), de reserva (de vitaminas, hierro, glucógeno, sangre), metabolismo de xenobióticos (sustancias ajenas al organismo), participación en la respuesta inmunológica, metabolismo de macromoléculas (tales como carbohidratos y lípidos) y la secreción de tales sustancias.

El hígado posee dos propiedades que lo hacen un órgano peculiar. La primera de ellas es que es ampliamente perfundido al recibir doble irrigación sanguínea, ya que recibe sangre venosa rica en sustancias exógenas, nutrimentales y hormonas por la vena porta en un 60%-70% y sangre oxigenada por la arteria hepática en un 30%-40%. Ambas penetran a través del hilio hepático, o porta hepática, permitiendo la mezcla de esta sangre y sus componentes en los sinusoides hepáticos (Ekataksin, W. et al. 1999). La segunda propiedad que caracteriza al hígado es una capacidad regenerativa extraordinaria la cual no se observa en otros órganos. Esto se hace evidente en el modelo de hepatectomía parcial en roedores, donde dos tercios del hígado es removido; modelo útil, popular y aceptado por múltiples investigadores para el estudio regenerativo del órgano que típicamente requiere de tan solo 5-7 días en la rata y el ratón (Michalopoulos, G.K. et al. 2010). Esto se debe al potencial proliferativo que poseen las células propias del hígado, los hepatocitos (Mao, Sa. et al. 2014).

3.2 ARQUITECTURA DEL HÍGADO

A pesar de que los hepatocitos son la célula del parénquima hepático, la unidad funcional del hígado aún continúa en debate, ya que se han propuesto múltiples

unidades diferentes entre bibliografías. No obstante, el estudio del hígado es facilitado a partir de la microarquitectura hepática en modelos que toman como unidad estructural clásica al lobulillo hepático (Saxena, R. et al. 1999). Destacan el modelo lobular y acinar.

3.2.1 MODELO LOBULAR Y ACINAR

- **Modelo lobular hexagonal clásico:** Este modelo establece al lobulillo hepático como unidad funcional, el cual es delimitado en su centro por la vena central o vena hepática terminal (ramas de la vena hepática) y en la periferia por vénulas portales, lo cual divide a los hepatocitos en 2 zonas: centrilobular y periportal. Se le otorga una forma hexagonal la cual no es real. Se encuentran de 50,000 a 100,000 lobulillos en el hígado, con un diámetro de 1-2mm. **(Fig. 1).**

- **Modelo acinar “de Rappaport”:** Este modelo se centra en las funciones metabólicas de los hepatocitos, en donde se identifican 3 zonas del parénquima hepático como resultado de su actividad metabólica así como del gradiente de oxigenación. Establece al acino hepático como “la unidad hepática microcirculatoria”, delimitado en su centro por una vénula portal y en la periferia por 2 venas centrales hepáticas. Fue propuesta inicialmente por Rappaport en 1950 (Rappaport, A.M., et al. 1954) **(Figura 1).**

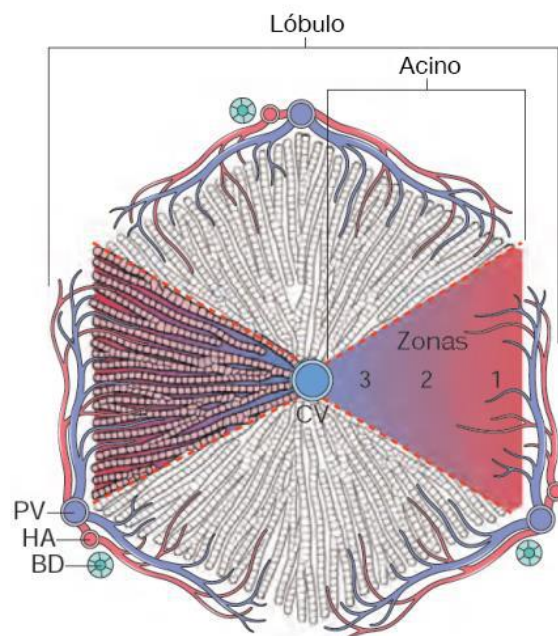


Fig. 1. Estructura del modelo lobular y acinar.

CV: VENA CENTRAL, PV: VENULA PORTAL, BD: CONDUCTO BILIAR. Imagen tomada y modificada de: Robbins & Cotran, Pathologic Basis of Disease, 9th Ed. Guyton and Hall, Medical Physiology 12th Ed.

3.2.2 TIPOS CELULARES PRESENTES EN EL TEJIDO HEPÁTICO

El hígado se compone por múltiples células que llevan a cabo diversas funciones. La distribución cuantitativa de las células en el hígado es conocida. Los hepatocitos representan el 70% aproximadamente de las células presentes en el órgano. El resto es representado por células de Kupffer (15-25%), células endoteliales sinusoidales (10-20%), células estelares (de Ito) (<5%) y células de pit (<5%) (Si-Tayeb, K. et al. 2010).

- **Células parenquimatosas**

Los hepatocitos son células epiteliales poliédricas de 30 a 40 μm de diámetro; llevan a cabo la mayoría de las funciones metabólicas del órgano. Para suplir sus numerosas funciones, los hepatocitos contienen un gran número de mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, aparatos de Golgi y retículos endoplásmico liso y rugoso (Muriel, P. 2017). Los hepatocitos están dispuestos en cordones o placas de alrededor de 2 células en grosor que conectan a las diferentes zonas, desde los tractos portaes a la vena hepática terminal. El complejo formado por hepatocitos, capilar de la arteria hepática, capilar porta, conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios, forman la llamada triada o espacio porta (Ekataksin, W., y Kaneda, K., 1999).

- **Sinusoides hepáticos**

Los sinusoides hepáticos están formados por células endoteliales fenestradas, las cuales forman estructuras cilíndricas de tan solo 1 célula de grosor. En la luz de los capilares sinusoidales se mezcla sangre venosa y arterial derivada de la vena porta y la arteria hepática. Los sinusoides bañan a los hepatocitos en sus 2 caras y drenan en la vena central (vena hepática). La fenestración permite el paso de sustancias del plasma hacia el espacio de Disse. En condiciones normales no hay discontinuidad entre las células endoteliales que no sean las fenestraciones (Muriel, P. 2017).

- **El espacio de Disse y células estelares (de Ito)**

El espacio de Disse, también conocido como “espacio perisinusoidal”, es un espacio delimitado entre las microvellosidades de los hepatocitos y las células endoteliales de los sinusoides. Contienen a las células de Ito, células tipo miofibroblasto que en su forma quiescente reciben este nombre y desempeñan una función de reserva para lípidos y regulación de la homeostasis del ácido retinoico (vitamina A) (Ito, T. 1973). Al activarse posterior a múltiples señales (citocinas y quimiocinas inflamatorias TNF, IL1-B, TGF- β , PDGF, productos de peroxidación lipídica provenientes de las células de Kupffer, células endoteliales y apoptosis de hepatocitos), son capaces de migrar y adquirir un fenotipo miofibroblástico, fundamental en el proceso fibrótico del daño hepático al participar en la síntesis, secreción y degradación de componentes de la matriz extracelular (MEC) (Moreira R. K. 2007).

- **Células de Kupffer**

Las células de Kupffer son células macrófago residentes del hígado derivadas del sistema fagocítico mononuclear que se encuentran en los sinusoides hepáticos unidas al endotelio en la cara luminal. Su principal función es fagocitar, detectar y presentar patógenos, endotoxinas, detritus celulares, microorganismos y sustancias foráneas, eliminando estos compuestos y otras proteínas que ingresan desde la vena porta y la circulación arterial. Las células de Kupffer intervienen en el proceso inflamatorio mediante su activación, síntesis de citocinas y reclutamiento de otras células (Duarte, N. et al. 2015).

- **Células de Pit y linfocitos**

Las células de Pit fueron inicialmente descritas en hígado de rata en la década de los setenta (Wisse, E. 1976), obteniendo su nombre por los gránulos citoplasmáticos característicos que presentan. Son células “natural killer” del hígado, o linfocitos granulares, que se encuentran ancladas al endotelio del sinusoides hepático y a células de Kupffer, con capacidad de penetrar y migrar mediante pseudópodos a través de la pared sinusoidal e interactuar con los microvellos de los hepatocitos. Son capaces de producir factores inflamatorios y quimiocinas modulando la inflamación y la inmunidad del hígado dañado. Estas células son capaces de “espontáneamente” inducir apoptosis

sin una activación previa (Peng, H. et al, 2016). Se pueden encontrar otras células linfocíticas en el hígado tales como linfocitos T, Natural Killer, Natural Killer T y células dendríticas. Estas componen el sistema inmunológico del hígado el cual participa en la presentación de antígenos, eliminación o neutralización de antígenos y sustancias foráneas que se extiendan al hígado desde el intestino (Tiegs, G., & Lohse, A. W. (2010).

4. DAÑO HEPÁTICO

4.1 ETIOLOGÍA DE DAÑO HEPÁTICO

Dado a las múltiples funciones del hígado y a su vasta irrigación sanguínea, el hígado se encuentra expuesto a una gran variedad de agentes metabólicos, tóxicos, microbianos, circulatorios y neoplásicos que predisponen al daño hepático. Entre las más importantes destacan: el abuso en el consumo del alcohol, infección por virus de hepatitis B y C, enfermedades colestásicas y actualmente se le ha dado una mayor importancia a los factores nutricionales (Sebastiani, G. et al. 2014) (Zhou, W. et al. 2014). La exposición a los agentes previamente mencionados puede iniciar la señalización de daño y de intento curativo y regenerativo en el hígado.

4.2 DAÑO AGUDO Y DAÑO CRÓNICO

El daño hepático puede clasificarse en agudo y crónico por lo siguiente: el daño agudo se caracteriza por la destrucción súbita de un gran número de hepatocitos secundario a la presencia transitoria de un agente etiológico. Por lo general, la inflamación y el daño observado es autolimitado y raramente culmina en falla hepática. Hay remodelación del tejido dañado en un intento de compensación y cicatrización con cambios en la composición de la matriz, los cuales son temporales, ya que la arquitectura del hígado es restaurada eventualmente (Sun, M., y Kisseleva, T. 2015).

El daño hepático crónico es caracterizado por la permanencia del estímulo dañino que interrumpe de manera crónica la homeostasis del órgano, y aún si la

destrucción de hepatocitos es menor, se inicia una respuesta inflamatoria crónica y la acumulación aumentada de tejido fibrótico cicatricial que progresivamente reemplaza al parénquima hepático (Friedman, S.L. et al. 2008). Es el daño hepático crónico mayormente de nuestro interés en este estudio.

4.3 FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO

El daño hepático crónico se caracteriza histológica y químicamente por cambios en la composición y un aumento severo en el contenido total de MEC, secundarios a la desregulación en la síntesis y proteólisis de la misma. La MEC regula múltiples funciones tales como brindar un soporte estructural a todas las células, adhesión, migración, diferenciación y proliferación. Está formada por una red compleja de proteínas y carbohidratos; en el hígado sano las principales proteínas de la MEC son colágeno tipo I, II, y elastina. La síntesis y proteólisis de la MEC es regulada por las metaloproteinasas (MMPs; por sus siglas en inglés) y las enzimas inhibitoras de metaloproteinasas (TIMPs; por sus siglas en inglés) (Duarte, S. et al. 2015).

Las MMPs, también llamadas matrixinas, son una familia de 24 endopeptidasas dependientes de calcio y zinc capaces de degradar componentes colagenosos y no colagenosos de la MEC, así como de participar en la regulación de la inflamación. Se pueden clasificar en 5 grupos según la especificidad del sustrato a degradar (colagenasas, gelatinasas, matrilisinas, estromalisinas y las tipo-membranales) (Naim, A., et al. 2017).

Su contraparte, las TIMPs, son una familia de 4 isoformas (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4) capaces de regular las actividades proteolíticas de los MMPs al unirse a estas de manera reversible y suprimir su actividad, inhibiendo así la degradación de la MEC (Visse, R., y Nagase, H., 2003).

Las MMPs y TIMPs son sintetizadas por células que participan en el daño hepático crónico. El daño al hepatocito activa a la célula de Kupffer que secreta citocinas profibrogénicas y proinflamatorias, resultando en la activación de las células estelares

(HSC; por sus siglas en inglés). Las HSC son fibroblastos que, al ser activados, fenotípicamente se *trans*-diferencian en células tipo-miofibroblasto proliferativas y adquieren la capacidad de expresar proteínas contráctiles, tal como la α -SMA, y producir y secretar grandes cantidades de proteínas de la MEC y sus componentes, entre estas, colágena tipo I y III, así como MMPs y TIMPs en diferentes marcos de tiempo. TIMP-1 ha demostrado ser un regulador en la fibrogénesis hepática; esta enzima, además de promover el aumento en la síntesis y depósito de MEC al disminuir la actividad de las colagenasas, inhibe la apoptosis de las HSC activadas, preservando el proceso fibrogénico (Iredale, JP. et al. 1992).

Es debido a esto que se le atribuye un rol central a la HSC en el desarrollo de la fibrosis hepática al modificar la cantidad y la composición de la MEC. Los hepatocitos, así mismo, sintetizan factores de crecimiento y MMPs, que amplifican la respuesta al daño (Gressner, OA. et al. 2008).

4.4 FIBROSIS, CIRROSIS Y CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)

Como se mencionó anteriormente, el proceso fibrótico es una respuesta de intento curativo en forma de cicatrización al daño hepático e inflamación crónica caracterizado por el depósito excesivo de MEC, la pérdida del número de hepatocitos por reemplazo de MEC y alteración de la arquitectura del hígado. Por lo general ésta respuesta es observada a largo plazo y evoluciona durante décadas; la naturaleza lenta en la progresión de la fibrosis se le atribuye a la gran capacidad regenerativa del hígado. La fibrosis es el mejor predictor de pronóstico y mortalidad en la enfermedad hepática, ya que tiene el potencial de progresar a las complicaciones de la historia natural de la enfermedad, tales como cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC).

La cirrosis es el estadio más avanzado de fibrosis en la cual el tejido hepático normal ha sido sustituido por tejido fibroso o cicatricial con formación de nódulos y septos, alteración el flujo sanguíneo del parénquima hepático y disminución de su capacidad regenerativa, incapacitando al hígado para ejercer sus funciones fisiológicas con alto riesgo de falla hepática. En la mayoría de los casos es irreversible.

La fibrosis y cirrosis aumentan el riesgo de progresión a CHC. El CHC es el principal subtipo histológico de tumores malignos hepáticos primarios, representando el 70-85% del total de los casos de cáncer hepático. El 75-90% de los casos de CHC se desarrollan posterior a cirrosis secundaria a infecciones virales y alcohol (Baffy, G. et al. 2012). Interesantemente, en un estudio la presencia de enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) fue el principal factor etiológico para el desarrollo de CHC, seguido por la presencia de diabetes mellitus tipo 2 (DMII) y virus de la hepatitis C (VHC), respectivamente (Sanyal, A. et al. 2010). Esto sugiere que la presencia de EHGNA, particularmente la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), en la presencia o ausencia de cirrosis, promueve el desarrollo de CHC. La cirrosis y CHC tienen un pobre pronóstico con escasas opciones terapéuticas, colocando al trasplante hepático en ocasiones como única opción.

5. ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (EHGNA)

5.1 EPIDEMIOLOGÍA Y DEFINICIÓN DE EHGNA, HIGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (HGNA) Y ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (EHNA)

La EHGNA se ha convertido en la enfermedad hepática más común a nivel mundial (Younossi, Z. et al. 2019) y la más común en países de occidente con una prevalencia que se estima varía del 20-30% y una mediana del 20% en la población adulta (Vernon, G. et al. 2011) (Berardis, S. et al. 2014). Afecta a una variedad de grupos etarios; es la causa más común de enfermedad hepática en niños en el mundo desarrollado (Mencin, A. et al. 2011), siendo relativamente común en adolescentes (Ayonrinde, O.T. et al. 2011), asociado a complicaciones en mujeres embarazadas (Hagström H, et al. 2016) y encontrándose en más de un tercio de pacientes de la tercera edad, ya que parece aumentar con la edad (Koehler, EM. et al. 2012).

La EHGNA es un trastorno metabólico que se define por la presencia de una infiltración y acumulación excesiva de lípidos en el hígado (esteatosis hepática) la cual se hace evidente mediante métodos de imagen o por histología, en individuos sin

antecedente de abuso de alcohol (<30g/día en hombres y <20g/día en mujeres, o, <21 bebidas alcohólicas/semana en hombres y <14 bebidas alcohólicas/semana en mujeres en un periodo de 2 años considerando que una bebida alcohólica contiene 14 g. de alcohol) (National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, NIH), sin presencia de alguna otra enfermedad hepática, uso de fármacos o trastornos hereditarios causantes de la acumulación de grasa hepática (Chalasani, N. et al. 2018)(Hashimoto, E. et al. 2015).

La EHGNA comprende un espectro de variables presentaciones las cuales se pueden clasificar, tras hallazgos histológicos, en 2 principales entidades: hígado graso no alcohólico (HGNA) o esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). El HGNA se caracteriza histológicamente por triglicéridos intracelulares visibles en $\geq 5\%$ de los hepatocitos sin evidencia de daño hepatocelular manifestada en forma de balonización de hepatocitos (degeneración balonoide). En cambio, la EHNA se define histológicamente por esteatosis en $\geq 5\%$ de los hepatocitos y la presencia de inflamación (de ahí el sufijo "itis") y daño hepatocelular (balonización, necroapoptosis) con o sin fibrosis (Kleiner, D.E., et al. 2005)(Brunt, E.M., et al. 1999). A pesar de que el HGNA es un estado generalmente benigno y potencialmente reversible, si el depósito de grasas persiste, esta condición tiene el potencial de progresar a EHNA; aproximadamente el 30%-40% de los pacientes con HGNA desarrollan EHNA (Ekstedt, M. et al. 2006). Una vez que los pacientes desarrollan EHNA, hasta el 50% podría desarrollar fibrosis avanzada (Clark, J.M. et al. 2006). El riesgo de progresión de EHNA a cirrosis es estimado a ser entre 21-26% en un periodo de 8 años (Perumpail, B.J. et al. 2017) y la incidencia de desarrollo de CHC relacionado con EHGNA ha ido en aumento (Baffy, G. et al. 2012), volviéndose así una condición eventualmente fatal.

5.2 EL SÍNDROME METABÓLICO (SM) Y OBESIDAD COMO FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EHGNA

Las enfermedades crónicas no transmisibles son la principal causa de muerte en el mundo entero, representando el 70% de muertes a nivel mundial. Las enfermedades

cardiovasculares, la diabetes y el cáncer se encuentran entre las principales etiologías (OMS). Distintos factores no-genéticos como la inactividad física, hábitos nutricionales y composiciones de la dieta, estrés crónico, y el estilo de vida se han implicado en la aparición y progresión de estas enfermedades y de otros factores de riesgo metabólicos, como la obesidad.

En la última década, México ha tenido un aumento significativo en la prevalencia de obesidad en sus diferentes grupos etarios. La CDC en 2017 reportó una prevalencia de obesidad en niños (de 6-11 años) en Estados Unidos de 18.4%, siendo ésta mayor en raza hispánica (Hales, CM et al. 2017). Por otra parte, ENSANUT 2018 reportó una prevalencia de obesidad en niños (de 5-11 años) de 17.5%, lo que comprueba el problema en países de occidente.

La World Obesity Federation, en su reporte 2020, categorizó a México dentro de los primeros 6 países con el mayor número de adultos que padecen de obesidad en el mundo en 2016. Recientemente en 2017, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) declaró a México con la tasa más alta de sobrepeso, incluida la obesidad en adultos, obteniendo el 2do lugar a nivel mundial con 33% (después de E.U.)(OECD, 2017). Así mismo, ENSANUT 2018-19 reportó un porcentaje de 74.8% de adultos de 20 años o más con sobrepeso y obesidad a nivel nacional. La prevalencia nacional de sobrepeso fue de 39.5% y la de obesidad 35.3%, confirmando un problema de salud pública en el país.

La alta prevalencia de sobrepeso y obesidad, particularmente la abdominal, en la población mexicana predispone a la población al desarrollo del SM con un aumento en el riesgo al desarrollo de múltiples enfermedades y complicaciones, entre éstas, la EHGNA.

5.2.1 EL SINDROME METABÓLICO (SM)

Recientemente la EHGNA se ha asociado al SM, denominándose como “la manifestación hepática del SM”. En consecuencia, se le ha otorgado al SM como factor de riesgo importante en el desarrollo de daño hepático crónico.

El síndrome metabólico se define por la presencia de 3 o más de las siguientes características: (1) obesidad abdominal (circunferencia abdominal (>102 cm en hombres y >88 cm en mujeres), (2) hipertrigliceridemia (>150 mg/dL), (3) disminución niveles de c-HDL <40 mg/dL en hombres, <50mg/dL en mujeres), (4) hipertensión arterial sistémica, >130/80 mm/Hg) e (5) hiperglucemia (> 110 mg/dL en ayuno) (ATP III, 2001).

5.2.2 LA OBESIDAD

La obesidad es considerada un estado crónico inflamatorio de bajo grado. Esto se debe a que el tejido adiposo contiene adipocitos y macrófagos principalmente, que además de almacenar energía en forma de triacilgliceroles, secretan una variedad de moléculas que regulan la sensibilidad a la insulina, la presión arterial, el apetito, la inmunidad y la reproducción, actuando como una glándula endocrina. El aumento en la acumulación de grasa en el tejido adiposo produce hipertrofia del adipocito y un límite de almacenamiento de lípidos que resulta en un tejido adiposo disfuncional y la iniciación de la cascada inflamatoria mediante la síntesis de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-6 (Interleucina 6), TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa) y MCP-1 (Proteína Quimioatrayente de Monocitos), así como la desregulación en la síntesis y secreción de adipocinas (**ver “adipocinas”**) (Balogun, K.A., et al. 2016).

El TNF- α e IL-6 son consideradas eslabones entre la esteatosis, obesidad, resistencia a la insulina y la EHGNA. El TNF- α es sobreproducida por tejido adiposo y muscular en humanos y modelos roedores obesos. Los niveles aumentados de TNF- α en suero y en hígado se han correlacionado con la actividad de EHGNA medidos por parámetros histológicos así como en el desarrollo de resistencia a la insulina. TNF- α tiene el potencial de activar señalización proapoptótica o antiapoptótica, que conducen a la activación de NF- κ B en hepatocitos bajo condiciones de estrés oxidativo, promoviendo la resistencia a la insulina y regulando la inflamación y la producción de citocinas entre otras cosas. Además, TNF- α antagoniza la citocina antiinflamatoria adiponectina (**ver “adipocinas”**) (Duarte, N. et al. 2015).

El tejido adiposo visceral de individuos obesos secretan grandes cantidades de IL-6; esto se asocia a niveles aumentados de esta citocina en plasma, inflamación y fibrosis hepática en pacientes con EHGNA (Duarte, N. et al. 2015). La expresión de IL-6 regula así mismo la resistencia a la insulina al aumentar la lipogénesis de novo (DNL; de novo lipogénesis) y un aumento en SREBP-1c (Meli, R. et al. 2014).

5.2.2.1 ADIPOCINAS

Además de la liberación de ácidos grasos y la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias antes mencionadas, el adipocito también produce y libera adipocinas (adipocitocinas), hormonas estructuralmente similares a citocinas, con propiedades anti- o pro-inflamatorias. Inicialmente ejercen una función anti-lipotóxica con el fin proteger a otros tejidos de los efectos citotóxicos de las altas concentraciones de ácidos grasos. Sin embargo, en la obesidad y la EHGNA se ha identificado la desregulación en la liberación y las concentraciones de estas adipocinas, con un desequilibrio a favor de un estado proinflamatorio que contribuye a los trastornos metabólicos e inflamación sistémica. Entre las principales adipocinas destacan la adiponectina y la leptina.

- **Adiponectina**

La adiponectina es una hormona peptídica, producida principalmente por adipocitos. Es la adipocina más abundante en suero humano y es categorizada como una adipocina anti-inflamatoria ya que sus niveles se han correlacionado inversamente con el IMC, en individuos con SM, EHGNA y en estados elevados de estrés oxidativo (Bugianesi, E. et al. 2005). La adiponectina sensibiliza a las células a la insulina, promueve la oxidación de ácidos grasos y posee propiedades antiinflamatorias, al parecer al inhibir la producción de TNF- α , IL-6 e IL-18 al bloquear la activación de NF- κ B y al estimular la liberación de IL-10, al promover el cambio fenotípico de las células de Kupffer activadas, suprimir la activación de las células hepáticas estelares y al disminuir el contenido intrahepático de triglicéridos así como la atenuación de peroxidación lipídica y estrés oxidativo (Gatselis, N.K., et al. 2014).

Los ratones knockout con delección del gen de adiponectina que consumen una dieta alta en grasas desarrollan esteatosis hepática, así como un aumento en la expresión hepática de TNF- α . El mecanismo por el que esto sucede es dado al aumento inicial en la producción de TNF- α por las células de Kupffer. Esta citocina induce resistencia a la insulina, al inhibir la fosforilación de tirosina del receptor IRS-1 (del inglés “insulin receptor substrate-1”) (Asano, T. et al. 2009). La resistencia a la insulina promueve la lipólisis y el aumento del depósito de ácidos grasos libres al hígado, propiciando un ciclo vicioso en la aberración del metabolismo de lípidos y carbohidratos que culminan en esteatosis. Otro modelo animal reportó que el aumento de adiponectina contrarresta la expresión genética de la enzima acetil-CoA carboxilasa hepática (ACC) y la actividad de la enzima ácido graso sintasa (“FAS” por sus siglas en inglés) (Liu, L. et al.. 2016); ambas enzimas participan en la síntesis de ácidos grasos intrahepáticos, disminuyendo así, la esteatosis hepática.

- **La leptina**

Los niveles de leptina aumentan en la obesidad y es reconocida como una adipocina pro-inflamatoria, ya que la leptina aumenta la producción de citocinas tales como IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , entre otros. Además induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en macrófagos y células endoteliales. Esta adipocina interactúa directamente con la células hepáticas estelares y estimula la producción de colágeno (tipo 1), provocando la evolución y progresión de la fibrosis hepática (Saxena, N.K., et al. 2002). Esto se debe al aumento directo de la producción de TIMP-1 por la leptina; se han intentado explicar múltiples mecanismos, entre estos, mediante la vía de señalización de transductor de señal y activador de transcripción JAK/STAT (del inglés “Janus kinase”) (Lin, S. et al. 2006).

5.3 FISIOPATOLOGÍA DE EHGNA

5.3.1 HIPÓTESIS DE “DOBLE ATAQUE”Y “ATAQUES MÚLTIPLES PARALELOS”

La acumulación de grasas en los hepatocitos es resultado de una acumulación ectópica de grasa, dado a un límite de almacenamiento y disfunción del tejido adiposo (**ver sección “Obesidad”**) y la incapacidad del hígado al almacenamiento masivo de grasas a pesar de su participación en la movilización de lípidos y su metabolismo.

En 1981, Ludwig et al. (Ludwig, J., et al., 1980) inicialmente describió a la esteatohepatitis como la manifestación de trastornos del metabolismo de ácidos grasos y de daño al hepatocito de múltiples etiologías. Su definición hoy en día se encuentra lejos de ser obsoleta ya que la patogénesis de la EHNA ha mostrado ser sumamente compleja e incorpora la disfunción del metabolismo lipídico. Fue posteriormente propuesta la “hipótesis de dos golpes” (en inglés “two-hit hypothesis”), que describe a la esteatosis hepática como un primer ataque secundario a alteraciones metabólicas (tales como resistencia a la insulina, hiperglucemia e hiperlipidemia). El segundo ataque describe la progresión a EHNA secundario a estrés celular tal como estrés oxidativo y apoptosis (Day, C.P., et al. 1998).

Sin embargo el reconocimiento de la participación de vías moleculares adicionales, cambios en la estructura de organelos celulares y el desarrollo paralelo de componentes del SM, son algunos de los factores que se han reconocido como importantes mecanismos iniciadores y de progresión en la enfermedad. Esto ha dado mayor aprobación a la nueva “hipótesis de ataques múltiples y paralelos” (Buzzetti, E., et al. 2016), que intenta explicar la fuerte asociación que hay entre la EHNA y la obesidad, el aumento de tejido adiposo, una mayor liberación de ácidos grasos y triglicéridos que, acoplado a un consumo excesivo de grasas y azúcar en la dieta, lleva a una alteración en el metabolismo de lípidos y glucosa, en la tasa de ingreso y egreso de ácidos grasos, resultando en una acumulación ectópica de lípidos en el hígado y otros tejidos no-adiposos, dando lugar al desarrollo de la esteatosis característica de la EHNA (Fabbrini, E., et al. 2010) (Kawano, Y. et al. 2013).

A pesar de que esta hipótesis intenta explicar la complejidad de la enfermedad, es claro que la progresión de la EHNA se debe a la presencia de esteatosis, estrés oxidativo e inflamación, que participan en un ciclo vicioso (Cobbina, E. et al. 2018).

5.3.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN LA EHGNA

El estrés oxidativo (EO) es considerado un factor fundamental en el desarrollo y establecimiento de la enfermedad hepática. El EO indica una situación de desequilibrio (de aquí deriva el término empleado “estrés”) en la cual la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS, del inglés “reactive oxygen species”) supera los mecanismos de defensa antioxidante del organismo. Las ERO son compuestos inestables con un tiempo de vida muy corto y altamente reactivos al actuar como radicales libres, es decir, con capacidad de acomodar o donar electrones. Entre las ERO principales se encuentran los radicales superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2 ; no un radical estrictamente) y productos aldehídos como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). Para antagonizar este sistema y mantener un balance de óxido-reducción, el cuerpo humano cuenta con un sistema antioxidante. Este sistema incluye enzimas y moléculas no enzimáticas que actúan mediante la eliminación y/o la prevención de la formación de ERO (**Figura 2**). Entre las moléculas antioxidantes destaca el glutatión (GSH).

Las ERO se consideran hepatotóxicas por su potencial para reaccionar con la mayoría de las macromoléculas celulares, al causar modificaciones postraduccionales de las proteínas, daño al ADN y la inducción de reacciones de peroxidación lipídica que dan lugar a la destrucción de las membranas biológicas y la generación de más ERO por los hepatocitos, células estelares, células de Kupffer y otras células inflamatorias capaces de iniciar la señalización que promueve la fibrogenesis. Así mismo se ha reconocido la participación de organelos en el desarrollo de EO y en la fisiopatología de la EHGNA, ya que la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico rugoso y la cadena respiratoria mitocondrial son fuentes de ERO y del desequilibrio redox (Marí M, et al. 2006; Sunny, N.E., et al. 2011).

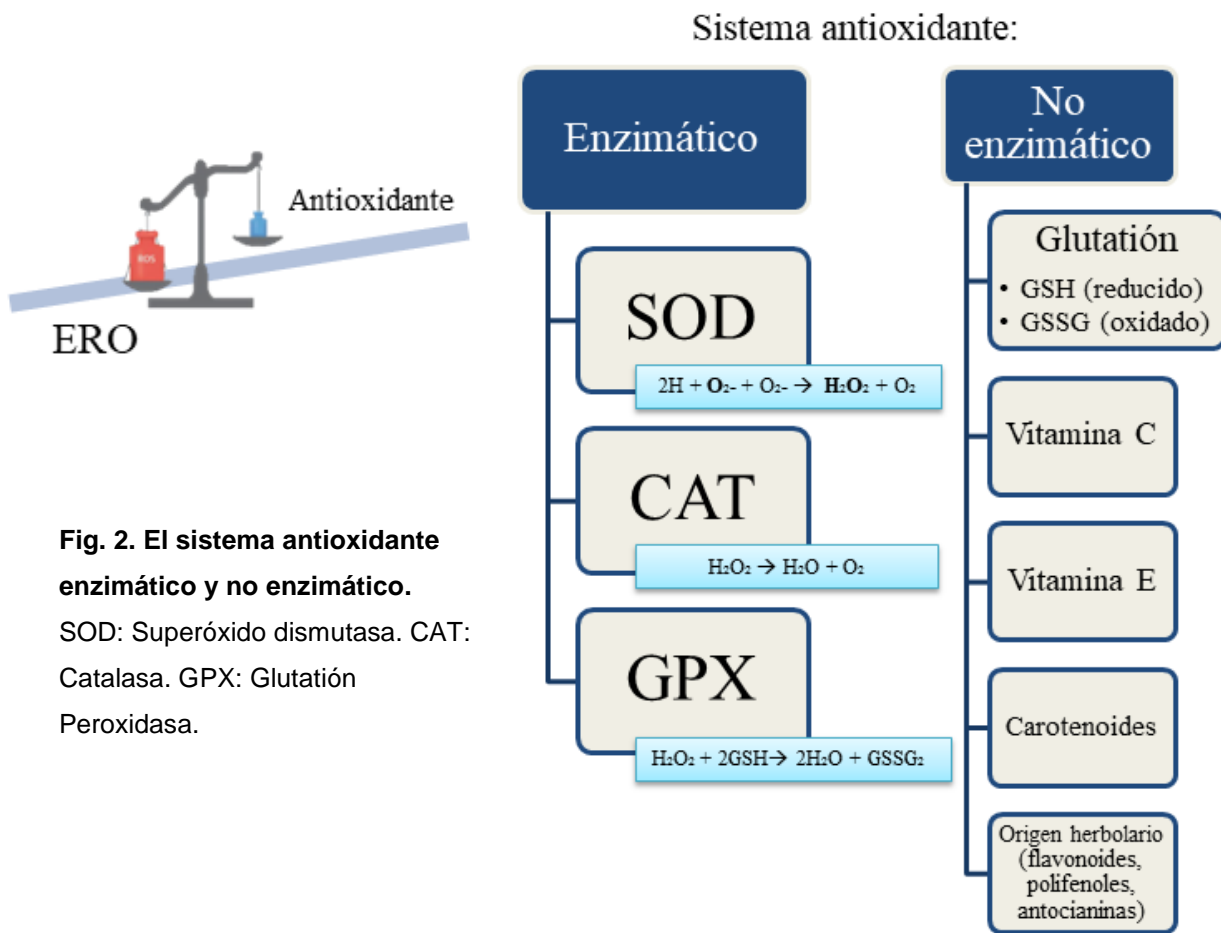


Fig. 2. El sistema antioxidante enzimático y no enzimático.

SOD: Superóxido dismutasa. CAT: Catalasa. GPX: Glutathión Peroxidasa.

5.3.3 LIPOTOXICIDAD

Normalmente, los ácidos grasos son almacenados en tejido adiposo en forma de triglicéridos. La acumulación aumentada de grasa en este tejido induce hipertrofia de adipocitos y una limitación al almacenamiento adicional de lípidos. En un intento de compensación, el almacenamiento es iniciado por el hígado y el músculo esquelético; sin embargo esto es considerado ectópico ya que no es la función principal de estos órganos, causando daño y la activación de mediadores inflamatorios (Balogun, K.A., et al. 2016).

La lipotoxicidad se refiere a los efectos dañinos de los lípidos y sus derivados sobre las células y organelos (principalmente mitocondria y retículo endoplásmico) mediante la generación de ERO. Al generarse y propagarse, estos radicales llevan a la destrucción de la membrana lipídica en hepatocitos, células estelares, células de Kupffer y otras células inflamatorias, produciendo una variedad de productos

intermedios en un proceso llamado peroxidación lipídica o lipoperoxidación (Marí, M., et al. 2006). Entre los principales productos intermedios se encuentra el malondialdehído (MDA). El MDA se utiliza ampliamente mediante su cuantificación y métodos colorimétricos para indicar la extensión de peroxidación lipídica y daño oxidativo en tejidos.

Es conocido que ciertos lípidos pueden ser dañinos para los hepatocitos, entre estos se encuentran los ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol libre. Creciente evidencia ha demostrado que el tipo de ácido graso libre es de mayor importancia que la cantidad, con respecto al desarrollo de daño celular, generación de ERO y muerte celular (McClain, C.J., et al. 2007)(Guturu y Duchini, 2012). Esto es particularmente cierto para los ácidos grasos saturados (AGS) de cadena larga palmitato (C16: 0) y estearato (C18: 0), que son abundantes en grasa animal, productos lácteos y se producen en el hígado a partir del azúcar dietético (Duwaerts, C.C., et al. 2015). La relación (AGS/AGMI) (AGMI: ácidos grasos monoinsaturados) determina el nivel de daño en los hepatocitos. Las dietas altas en grasas y altas en carbohidratos tienen un vasto componente de (AGS), con una relación AGS/AGMI más alta, crítica para la progresión de la EHGNA (Rizki, G., et al. 2006)(Su, X. et al. 2009). Esto se correlaciona con los datos obtenidos de las dietas altas en grasas.

Uno de los mecanismos que explican la lipotoxicidad y lipoapoptosis inducida por los ácidos grasos libres y AGS es mediante la activación de la proteína quinasa N-terminal c-Jun (JNK) en los hepatocitos, que sensibiliza a las células a la toxicidad y muerte celular mediada por TNF- α (Nakamura, T. et al. 2010). La activación sostenida de JNK es mediada por el aumento en los niveles intracelulares de Bim y activación de Bax, así como la modulación en la familia de proteínas Bcl-2, que llevan a una permeabilización de la mitocondria, generación excesiva de ERO y EO, liberación de citocromo c, y activación de caspasas finalizando en muerte celular (Malhi, H., et al. 2006) (**Figura 3**). Así mismo, la formación de metabolitos lipídicos tóxicos tales como ceramidas y diacilglicerol, resultan en disfunción mitocondrial. Los AGS han mostrado inducir a la activación sostenida de JNK, por lo que son considerados más tóxicos que los ácidos grasos monoinsaturados (Malhi, H. y Gores, G.J. 2008).

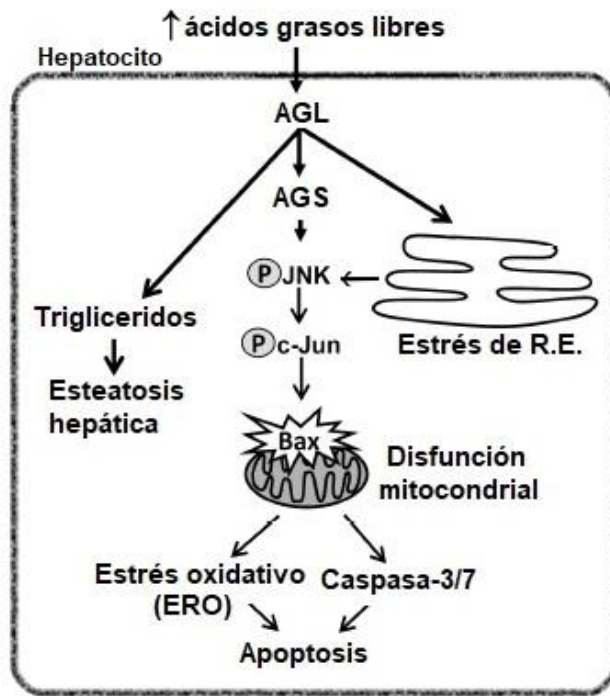


Figura 3. Mecanismo de lipotoxicidad y lipoapoptosis inducida por ácidos grasos libres en el hepatocito. AGL: ácidos grasos libres. AGS: ácidos grasos saturados. JNK: proteína quinasa N-terminal c-Jun . R.E. retículo endoplásmico. Imagen tomada y modificada de: M. Mota, 2016.

Así mismo se ha demostrado que una dieta alta en grasas y ciertos lípidos citotóxicos son capaces de estimular la activación de la proteína quinasa C (PKC), que mediante la regulación a la alza del factor de transcripción regulador de la adipogénesis (C/EBP β), aumenta la expresión de DGAT2 y de la esteatosis (ver “**la niacina en la enfermedad hepática**”) (Schroeder-Gloecker, J.M., et al. 2007) (Millward, C.A., et al. 2007).

5.3.4 INFLAMACIÓN

El proceso inflamatorio en etapas tempranas posterior al daño hepático tiene la intención de ser benéfica como parte de un mecanismo reparador. Sin embargo la persistencia del estímulo sin una resolución exitosa lleva a una respuesta inflamatoria

nociva que resulta en la producción continua de factores fibrogénicos, citocinas y quimiocinas y el potencial avance hacia la fibrosis y la carcinogénesis (Meli, R., et al 2014).

Los ácidos grasos, los hepatocitos y las células de Kupffer presentan un papel importante en la generación de esta respuesta inflamatoria aberrante en la EHGNA. Las células de Kupffer son activadas mediante la fagocitosis de hepatocitos apoptóticos. Una vez activadas, estas células secretan citocinas inflamatorias, enlazando el proceso de apoptosis al de inflamación.

Se ha observado que dietas altas en grasas en modelos murinos llevan a un aumento en la esteatosis, la expresión hepática de NF- κ B y aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1B, TGF- β y TNF- α . Esto se correlaciona con lo observado en humanos y se intenta explicar mediante el siguiente mecanismo: la esteatosis macrovesicular y TG causan un aumento en la señalización del factor de transcripción NF- κ B mediante la activación río arriba de IKKB. La activación de NF- κ B induce la producción de mediadores proinflamatorios TNF- α , IL-6 e IL1B con el posterior desequilibrio de adipoquinas, reclutamiento y activación de células de kupffer, amplificando el proceso inflamatorio (Cobbina, E., et al. 2017) (Cai et al., 2005; Furukawa et al., 2004; Xu et al., 2003). Se le ha atribuido a la vía canónica de la inflamación como el “mecanismo canónico” en la progresión de EHGNA, la conexión con el proceso inflamatorio, la resistencia a la insulina y la progresión del cáncer observada en el CHC (Desterke, C., et al. 2019)

Por todo lo anterior se consideran a TNF- α , IL6 e IL1B como las principales citocinas inflamatorias involucradas, tanto en humanos como en modelos animales, en el desarrollo de EHGNA. Así mismo, el TGF- β es considerado clave en la iniciación y progresión de la fibrosis e inflamación ya que esta citocina pro-inflamatoria se muestra altamente expresada en el daño y proceso fibrótico hepático. Esta citocina inhibe las MMPs, que tienen como función inicial la degradación de MEC, dando como resultado un desbalance entre la génesis, la deposición y la degradación de MEC, promoviendo así el proceso fibrótico.

5.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE EHGNA

Actualmente el Consenso Mexicano de la Enfermedad por Hígado Graso No Alcohólico a través de su guía clínica en 2019 recomienda pruebas de escrutinio en pacientes con factores de riesgo para desarrollar EHGNA mediante ultrasonido abdominal y/o pruebas de función hepática (AST, ALT, GGT y FA) con la finalidad de un diagnóstico temprano de esteatosis (Bernal-Reyes, 2019). Sin embargo estas pruebas son poco confiables para el diagnóstico preciso y se recomienda una biopsia hepática al igual que otras guías (AASLD, AGA, ACG, 2012) que consideran la biopsia hepática y los hallazgos histológicos como el estándar de oro para el diagnóstico, en especial para el diagnóstico de EHNA (Chalasani, N., et al. 2012).

Para otorgar el diagnóstico de EHGNA es necesario evidenciar la presencia de esteatosis por métodos de imagen o por histología, descartar el consumo significativo de alcohol, así como de alguna otra etiología causante de esteatosis y/o de daño hepático crónico (Chalasani N, et al., 2018).

La EHGNA aún se encuentra subdiagnosticada ya que la mayoría de los médicos no realizan regularmente biopsia hepática para confirmar el diagnóstico. Un estudio reciente utilizando una encuesta estandarizada confirmó que la mayoría de los clínicos entrevistados no llevan a cabo de manera regular la biopsia hepática para guiar el tratamiento, concluyendo un pobre apego a las guías de práctica establecidas para EHGNA y EHNA. La biopsia hepática parece realizarse cada vez con menos frecuencia para la toma de decisiones terapéuticas con menos del 25% de los profesionales encuestados requiriéndola para hacer el diagnóstico de EHNA (Rinella, M.E., et al. 2016).

La biopsia hepática es crucial para el análisis histológico y poder así diferenciar entre una simple esteatosis (HGNA) y la esteatosis con inflamación (EHNA). Solo es necesario que la biopsia sea teñida mediante técnica de hematoxilina y eosina (H y E) y/o Tricrómico de Masson, lo que hace este procedimiento relativamente fácil y accesible. Es importante conocer los diferentes sistemas de clasificación que, más que otorgar un diagnóstico, auxilia al clínico a establecer el grado de actividad y severidad de la enfermedad para una posible acción terapéutica adecuada.

5.4.1 ESCALA DE ESTADIFICACION PARA LA EHGNA

Existen múltiples sistemas de clasificación y de puntuación histológica para EHGNA. Se reconoce una mayor utilidad de estos en el área de la investigación que para un diagnóstico. Sin embargo, los puntajes altos se correlacionan con una mayor frecuencia de diagnóstico de EHNA (Arab, J.P., et al. 2014). Inicialmente, Ludwig et al. (1980) describieron las características histopatológicas de la esteatohepatitis. Brunt et al. en 1999 propusieron un primer sistema de clasificación histológica para la evaluación semicuantitativa de las lesiones que reconocen a EHNA, mediante una estadificación. Sin embargo fue desarrollado para describir la esteatohepatitis y toda la constelación de características más que una particular, sin incorporar todos los hallazgos que son posibles encontrar en todo el espectro de la EHGNA.

El Comité de patología del NASH Clinical Research Network (NASH CRN), patrocinado por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK, 2002) en asociación con Kleiner et al. (2005) modificaron esta estadificación inicial para validar un sistema dirigido a la comparación y estadificación de biopsias en ensayos clínicos, haciéndolo útil asimismo para la población adulta y pediátrica, conocido como puntaje histológico NAFLD Activity Score (NAS).

NAS incluye 14 características histológicas, 4 de las cuales se evalúan de manera semicuantitativa: esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-2), balonización hepatocelular (0-2) y fibrosis (0-4). Otras características, no incluidas en el puntaje NAS, se califican cualitativamente como presentes o ausentes (esteatosis microvesicular, cuerpos acidófilos, microgranulomas, lipogranulomas, macrófagos pigmentados, megamitocondrias, cuerpos de Mallory y núcleos glicogenados). De manera práctica, se construyó una escala de puntaje con los 3 parámetros de mayor significancia estadística para obtener un puntaje de 0-8: esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3), y balonización (0-2).

La fibrosis, por ser una variable considerada irreversible, se evalúa por separado en una escala de 4 etapas (Arab, J.P., et al. 2014). Para el uso de la escala NAS primeramente se debe dar el diagnóstico de EHNA (o, en su defecto, de hígado graso no diagnóstico de EHNA), y posteriormente, NAS se utiliza para calificar la actividad. La

escala NAS continua siendo de los principales sistemas de evaluación semicuantitativa de las lesiones de la EHGNA utilizadas en la actualidad. Otro sistema de evaluación reciente, el puntaje SAF (steatosis, activity and fibrosis) (Bedossa, P. et al. 2012) difiere con el anterior en los objetivos iniciales ya que fue desarrollado para uso diagnóstico (aunque también se puede utilizar en estudios clínicos) (Chalasanani, N., et al. 2018). Al utilizar el puntaje SAF se disocia el grado de esteatosis, el grado de actividad y el estadio de fibrosis en lugar de simplemente establecer la presencia o ausencia de NASH (Bedossa, P., et al. 2012) .

5.5 TRATAMIENTO ACTUAL

Existe una creciente demanda por tratamiento médico a medida que aumentan los pacientes con EHGNA. Las intervenciones al estilo de vida con cambios en la dieta y el ejercicio físico continúan siendo la base del manejo así como el tratamiento de primera línea (Thoma, C., et al. 2012) y se han demostrado superiores en combinación que al intento de una terapia farmacológica por sí sola (Akyuz, F., et al. 2007). Estas intervenciones tienen como principal finalidad la disminución de peso, que ha demostrado disminuir la resistencia a la insulina, el contenido de grasa intrahepática así como cambios bioquímicos e histológicos positivos en la enfermedad. Sin embargo, la adherencia a las intervenciones en el estilo de vida es deficiente (Le, T.A. y Loomba, R. 2012).

En la actualidad no hay un agente farmacológico específico que se considere la base farmacológica del tratamiento de la EHGNA. Esto se debe parcialmente a la necesidad de individualizar el tratamiento inicial otorgado a cada paciente, considerando las condiciones metabólicas y comorbilidades asociadas (tales como obesidad, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, DMII, dislipidemia e hipertensión), resultando por lo general en polifarmacia. Asimismo, la cronicidad de la enfermedad va acompañada de un tratamiento a largo plazo, que reta a los estudios clínicos para resultados significativos.

Las guías actuales para el diagnóstico y tratamiento de EHGNA sugieren que el intento de una terapia farmacológica efectiva debe limitarse a aquellos con

esteatohepatitis confirmada por punción hepática (Starley, B.Q, et al. 2010) (Bernal-Reyes, 2019), que muestren un estadio avanzado y progresivo (fibrosis septal) y ante la presencia de comorbilidades que funcionan como factores de potencial progresión (edad >50 años, DMII, SM, alteraciones hepáticas bioquímicas). Muchos de los fármacos estudiados son fármacos utilizados en DMII, sin embargo los efectos adversos y la falta de evidencia limitan el uso y la indicación de estos fármacos para la EHGNA además de la falta de evidencia del uso de estos a largo plazo.

Actualmente, en las diversas guías del diagnóstico, manejo y tratamiento de la EHGNA se recomienda reducir el consumo de bebidas con alto contenido de fructosa y de alimentos altos en grasas.

5.5.1 ANTIOXIDANTES

Algunos de los fármacos estudiados para el posible tratamiento de EHGNA comparten una característica; esto es su propiedad antioxidante. Los antioxidantes naturales y sintéticos han mostrado efectos preventivos y de tratamiento de enfermedades hepáticas al disminuir el estrés oxidativo, al proteger las estructuras celulares de los radicales libres y los productos reactivos de la lipoperoxidación, así como reversión del agotamiento de los antioxidantes endógenos (Arauz, J., et al. 2016).

La vitamina E (α tocopherol) (VE), es el principal antioxidante liposoluble en el cuerpo humano; este atrapa radicales peroxilo y disminuye su propagación en el proceso de lipoperoxidación y protege a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana (Raederstorff, D., et al. 2015). Sus niveles plasmáticos se han reportado bajos en pacientes con EHNA (Erhardt, A. et al. 2011). Múltiples ensayos han estudiado el beneficio del tratamiento con VE al demostrar mejoría histológica significativa y mejoría en la esteatosis e inflamación, en comparación con placebo y otros grupos de tratamiento (Fukui, A. et al. 2015) (Lavine, J.E. et al. 2011) (Sanyal, A.J. et al. 2010). La VE es una opción terapéutica que se ha considerado en múltiples guías como un acercamiento al tratamiento farmacológico; la AASLD la recomienda en

una dosis diaria de 800IU/d como primera línea farmacológica una vez diagnosticada la EHNA.

Inicialmente tuvo controversia este tratamiento por un aumento en tasas de mortalidad sin embargo estudios recientes han mostrado que el tratamiento a largo plazo con VE no tiene efectos en la mortalidad por daño hepático crónico (Bjelakovic, G. et al. 2007) (Lai, G.Y. et al. 2014) (Abner, E.L. et al. 2011).

A pesar de esto el efecto es variable y la evidencia para aprobarlo como medicamento para la EHGNA es insuficiente (Baran, B. y Akyuz, F., 2014). Debe evitarse en pacientes con DMII y riesgo cardiovascular hasta contar con datos suficientes de su uso a largo plazo y que su seguridad sean establecidos.

Entre otros antioxidantes se encuentran la vitamina C, el resveratrol y la cafeína (Oliveira, C.P., et al. 2003). El interés en el estudio de la cafeína surgió tras la atribución de efectos antifibrogénicos, antiinflamatorios y antioxidantes ante el consumo de café el cual es una mezcla de más de un millar de compuestos con múltiples sustancias bioactivas. En un intento de atribuir estas propiedades a alguno de los compuestos, se estudió la cafeína al ser el principal componente, y se demostró la reducción de los niveles de enzimas hepáticas tras la administración crónica de cafeína y la prevención del desarrollo de fibrosis y cirrosis en modelos experimentales de daño hepático en ratas (Arauz, J., et al. 2013) (Arauz, J., et al. 2014) así como una disminución en el desarrollo de cirrosis y hepatocarcinoma en pacientes que cursan con enfermedades hepáticas (Liu, F. et al. 2015) (Barros, R.K. et al. 2016). Entre otros componentes del café se encuentra la niacina y de aquí surge el interés en estudiar este componente y sus efectos.

Adicionalmente, la mayoría de los fármacos antioxidantes estudiados para la reversión y/o prevención de la EHGNA tienen efectos orientados en el estadio de EHNA o fibrosis. Consideramos que un fármaco con acción en el primer estadio, la esteatosis, puede ser un fármaco prometedor.

6. LA NIACINA EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA

6.1 GENERALIDADES Y MECANISMO DE ACCIÓN

La niacina (NA), también conocida como vitamina B3 y/o ácido nicotínico, es una vitamina hidrosoluble. Otras formas de esta vitamina incluyen a la niacinamida (nicotinamida). La NA es convertida en el cuerpo biosintéticamente a NAD⁺, la cual es reconocida como coenzima para la transferencia de enzimas esenciales en reacciones catabólicas productoras de energía, tal como la degradación de carbohidratos, grasas, proteínas y alcohol (Sauve, A.A., 2008).

Además de ser un nutriente, la NA se ha utilizado en el tratamiento de esquizofrenia, diabetes tipo I, pelagra, psoriasis, como suplemento dietético en alimentos y en cosméticos. Actualmente su uso se limita en la clínica como agente hipolipemiante en el tratamiento de dislipidemias asociadas a enfermedad cardiovascular, teniendo como indicación el tratamiento de hiperlipidemia tipo IV y V y de manera más habitual, el aumento intencionado del c-HDL (Lamon-Fava, S. et al, 2008) (van der Hoorn, J.W., et al., 2008). Ante el mecanismo de acción de la niacina se reconoce su capacidad de inhibir la lipólisis y disminuir la síntesis hepática de triglicéridos, VLDL y c-LDL, así como de mejorar la función endotelial como efecto benéfico pleiotrópico (Stach, K., et al 2012).

La niacina inhibe la lipólisis en tejido adiposo como agonista activador del receptor GPR109A en adipocitos (**Figura 4**). Este receptor (también conocido como HCA₂, HM74a, PUMA-G) acoplado a proteína G_i, inicia una cascada de señalización que resulta en la inhibición de la enzima adenilil ciclasa (AC) y disminución de los niveles del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (cAMP). Esto tiene como efecto la disminución de la actividad de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de cAMP, que mediante una fosforilación, disminuye la actividad de la lipasa sensible a hormonas (HSL). Consecuentemente, se reduce la hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos libres (AGL) y glicerol, resultando en menores concentraciones de AGL en sangre (Offermanns, S., 2006). La disminución de AGL priva al hígado de la síntesis de triglicéridos intrahepáticos, resultando en menor esteatosis y síntesis de VLDL y LDL.

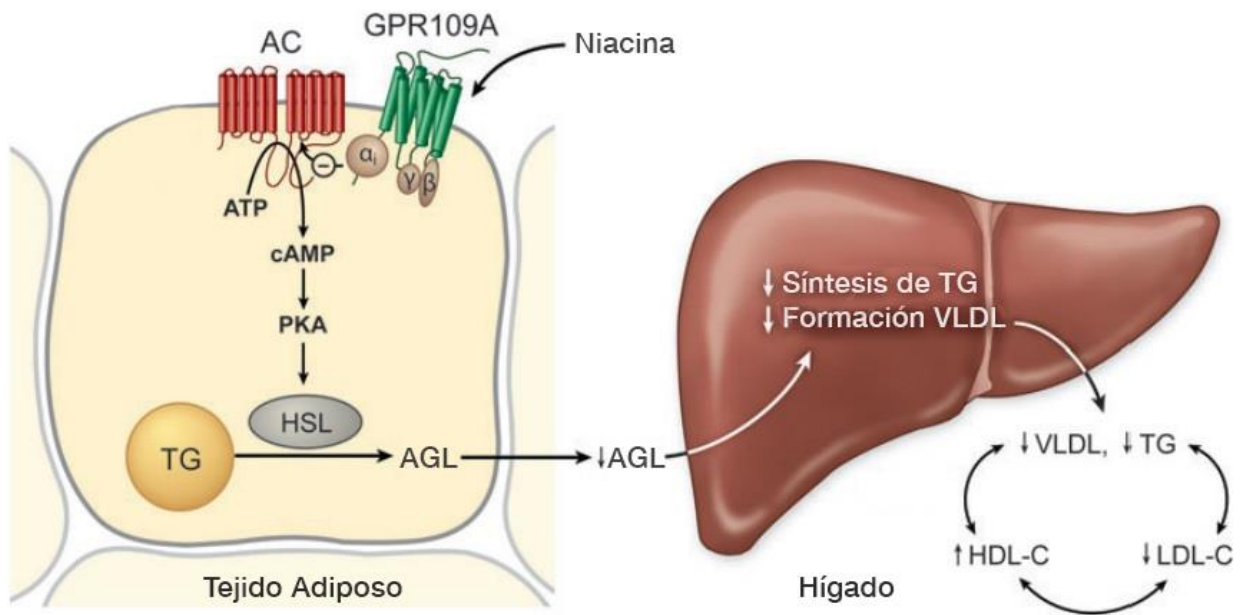


Figura 4. Efectos farmacológicos del ácido nicotínico. La activación del receptor GPR109A en adipocitos induce una inhibición mediada por Gi de la actividad de adenilil ciclasa (AC), resultando en la disminución de los niveles de cAMP. cAMP activa a la proteína cinasa A (PKA), que normalmente aumenta la lipólisis mediante la fosforilación de múltiples proteínas, incluida la lipasa sensible a hormonas (HSL). La inhibición de esta vía tiene un efecto antilipolítico mediante la disminución en la liberación de ácidos grasos libres (AGL) que resulta en una disminución de la formación de triglicéridos intrahepáticos y lipoproteína VLDL. Como resultado, disminuyen los niveles de VLDL, TG y LDL en plasma sanguíneo. Imagen tomada y modificada de: Gille, A. 2008.

Así mismo, la niacina disminuye la síntesis hepática de triglicéridos mediante la inhibición no competitiva de la enzima diacilglicerol acetiltransferasa (DGAT), disminuyendo su actividad. DGAT se encuentra en 2 isoformas: DGAT1 y DGAT2. Entre las principales diferencias de estas isoformas se encuentran: 1) DGAT 1 se encuentra expresada mayormente en el intestino delgado, mientras que la expresión de DGAT2 es mayor en hígado y tejido adiposo, y 2) Se ha demostrado que en hígado, DGAT1 utiliza principalmente ácidos grasos exógenos para la síntesis de TG, por el contrario, DGAT2 utiliza ácidos grasos provenientes de DNL (Gluchowski, N. L., et al 2019). Ambas enzimas se consideran limitantes al catalizar el último paso en la síntesis

de triglicéridos. Los ácidos grasos en hígado son esterificados en monoglicéridos y diglicéridos. DGAT2 utiliza a los ácidos grasos y al diacilglicerol como sustratos, convirtiendo los diglicéridos en TG mediante una acilación.

Ganji, S.H. et al. en 2004, por medio de un modelo *in vitro* utilizando la línea celular HepG2, demostraron que la niacina inhibe selectivamente la actividad de DGAT2, y no de DGAT1, sugiriendo una inhibición directa y no competitiva sobre esta enzima. El mismo equipo en 2014 demostró que la niacina disminuye el depósito de lípidos intrahepáticos al inhibir la expresión de mRNA de DGAT2.

6.2 EFECTOS BENÉFICOS DE LA NIACINA EN LA EHGNA

Se le han otorgado propiedades hepatoprotectoras al ácido nicotínico al disminuir la esteatosis y mostrar un efecto antiinflamatorio, antioxidante y antifibrótico en múltiples modelos *in vitro* e *in vivo*.

La disminución de esteatosis con el uso de niacina ha sido evidente en múltiples estudios experimentales y humanos, observándose una regresión de esteatosis del 42-55% en un modelo murino (Ganji, S.H., et al.. 2014), y reportándose resultados similares en un ensayo clínico de 39 pacientes adultos (Hu, M., et al.. 2012).

Los efectos antioxidantes se han descrito en múltiples modelos, entre estos en un modelo animal de fibrosis experimental en el cual la niacina previno completamente el aumento de MDA, marcador de lipoperoxidación lipídica (Arauz, J., 2015). Ganji et al.. mostraron que la niacina se asocia a la disminución de la producción hepática de ERO al inhibir la NADPH oxidasa, una enzima clave involucrada en la producción de ERO localizada en células de Kupffer y hepatocitos (Ganji, S.H., et al.. 2014).

Conjuntamente se han descrito los efectos antiinflamatorios tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. En un modelo *in vitro* de HepG2, la niacina demostró la habilidad para disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias tales como IL-8, involucrada en la respuesta quimioatrayente que amplifica la respuesta inflamatoria (Ganji, S.H., et

al. 2015). Esta citocina se ha demostrado aumentada en pacientes con EHNA (Bahcecioglu, I. H., et al. 2005)

La disminución de componentes profibróticos se han descrito en modelos animales (Gurujeyalakshmi, G., et al. 1996)(Traister, A., et al. 2005), previniendo la progresión de la esteatosis y fibrosis hepática mediante la inducción de apoptosis de las células hepáticas estrelladas y reduciendo la expresión de citocinas profibrogénicas. Se ha demostrado la prevención del aumento de TGF- β , de manera parcial pero significativa, inducido por daño hepático en un modelo de fibrosis hepático experimental (Arauz, J., 2015), así mismo mediante la regulación de la expresión de TGF- β , la regulación río abajo de la expresión del gen pro-colágeno y de TNF- κ B en un modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina (Gurujeyalakshmi, G. y Giri, S. N., 2000).

Adicionalmente, evidencia creciente ha mostrado que la niacina aumenta las concentraciones séricas de adiponectina en humanos y animales (Plaisance, E. P., et al. 2008) (Wanders, D., et al.. 2013). Al parecer este efecto es dependiente de la activación del receptor GPR109A (Plaisance, E.P., et al., 2009) y del aumento en la expresión de mRNA de adiponectina (Linke, A., et al. 2009).

Por todo lo anterior surge nuestro interés en el uso de esta vitamina, la cual puede obtenerse mediante la dieta o como suplemento alimenticio y medicamento, para la prevención del desarrollo de la esteatosis: el “primer golpe” en la EHNA.

7. MODELO ANIMAL DE EHNA

Los modelos animales son herramientas esenciales en la investigación ya que son modelos preclínicos que buscan imitar las características fisiopatológicas, morfológicas e histológicas más importantes de la enfermedad humana a estudiar para una mejor comprensión de la patogenia, descubrir estrategias terapéuticas apropiadas y demostrar los posibles efectos adversos. La elección del modelo animal adecuado es fundamental; algunos de los factores importantes a considerar son que deben ser reproducibles, fidedignos, simples y económicamente accesibles (Angulo, P., et al.

2015) (Kucera, O., y Cervinkova, Z., 2014). Los animales más utilizados para la reproducción experimental de daño hepático y EHGNA han sido las ratas y los ratones.

Actualmente se encuentran múltiples modelos genéticos y/o dietéticos que han logrado aproximarse a desarrollar EHGNA. Sin embargo, aún no se define un modelo animal ideal para el estudio de esta enfermedad, ya que existen algunas diferencias significativas entre estos. Por ejemplo, al utilizar la intervención dietética para inducir estos modelos, la susceptibilidad a una dieta alta en grasas se ha mostrado diferente entre cepas de ratones y ratas; las cepas C57BL/6, Wistar y Sprague Dawley son predispuestas genéticamente a desarrollar DMII, obesidad y EHGNA (Van Herck, M.A., 2017).

El tiempo requerido para inducir el modelo es también un factor importante a considerar. Una dieta alta en grasas (“HFD” del inglés “high fat diet”) logra inducir obesidad y resistencia a la insulina con hallazgos variables en inflamación y fibrosis hepática en un periodo extenso de 52 semanas. Por el contrario, en el modelo de dieta deficiente de metionina y colina (MCD por sus siglas en inglés), los animales logran desarrollar fibrosis en un periodo de 8 semanas, pero fallan en desarrollar el síndrome metabólico (Angulo, P., et al. 2015).

7.1 EL MODELO DE DIETA OCCIDENTAL

Los modelos dietéticos han sido utilizados ampliamente para simular los malos hábitos alimenticios que culminan en el desarrollo de obesidad, SM y la EHGNA. En la intervención dietética con una HFD, se logra replicar el fenotipo observado en los humanos los cuales incluye obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperlipidemia después de 10 semanas aproximadamente (Panchal, S.K. y Brown, L. 2011) (Kucera, O., y Cervinkova, Z., 2014). La esteatosis e HGNA logra inducirse de manera exitosa a partir de 6 a 12 semanas. Los regímenes del contenido de grasa en la HFD pueden variar desde 30 a 75 Kcal% entre modelos (Van Herck, M.A., 2017).

El modelo de dieta occidental (DO) (en inglés “Western Diet”), obtiene su nombre al constar de una dieta que simula los hábitos alimenticios del mundo occidental, esto es, una dieta alta en grasas saturadas complementada con colesterol en combinación con fructosa la cual imita la ingesta de bebidas ricas en carbohidratos. El modelo de DO logra replicar el síndrome metabólico y causa una EHNA de grado leve en un tiempo aproximado de entre 16 a 52 semanas (Angulo, P., et al. 2015).

La fructosa es un monosacárido que ha mostrado efectos agravantes en el metabolismo de lípidos y glucosa, acelerando así el desarrollo de EHGNA. La adición de fructosa a una dieta HFD en modelos murinos ha mostrado inducir un aumento mayor en la ganancia de peso, triglicéridos plasmáticos, glucosa plasmática y enzimas hepáticas en comparación con los compuestos por separado (Sellmann, C., et al. 2015) (Crescenzo, R. et al. 2014). Así mismo ha mostrado inducir una acumulación mayor de lípidos intrahepáticos en comparación con otros carbohidratos (glucosa o sacarosa), razón por la cual pudiese considerarle el “carbohidrato lipogénico más potente” (Jegatheesan, P., & De Bandt, J. P., 2017).

El mecanismo por el cual la fructosa puede inducir esteatosis hepática es el siguiente: la fructosa se metaboliza principalmente en el hígado; difiere del metabolismo de la glucosa ya que no requiere insulina para ingresar a las células. El 50% de la fructosa que ingresa de manera exógena por la dieta es fosforilada en el hígado por la enzima fructoquinasa a fructosa-1-fosfato, que es después convertida a gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato. Gliceraldehído es después convertida en gliceraldehído-3-fosfato y ésta participa en la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Castro, G.S.F., et al. 2011). El aumento en la ingesta de fructosa, al parecer aumenta la lipogénesis *de novo* y así el almacenamiento de triglicéridos hepáticos, la cual se ha demostrado ser dependiente de la enzima fructokinasa C (Ishimoto, T., 2013).

8. JUSTIFICACIÓN

Los cambios en el estilo de vida moderna, la urbanización y el envejecimiento creciente en la población han llevado al surgimiento de ciertas patologías en todo el mundo conocidas como enfermedades crónicas no transmisibles (WHO, 2017) entre las cuales se encuentra la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA).

La EHGNA afecta a una amplia variedad de grupos y edades (Mencin A, Lavine J, 2011) (Ayonrinde O.T, et al.. 2011) (Hagström H, et al.. 2016)(Koehler, EM. et al.. 2012), además se asocia con comorbilidades tales como el desarrollo de resistencia a la insulina, dislipidemia, DMII, enfermedades cardiovasculares, SM y la capacidad de establecer daño hepático crónico (Baffy G, et al.. 2011; Yopp, 2015). A pesar de que la EHGNA es una enfermedad prevenible y que tiene el potencial de ser identificada y tratada a tiempo por profesionales de la salud, el pobre apego a las intervenciones en el estilo de vida conducen a la generación de un proceso fibrótico que puede progresar a la cirrosis y hepatocarcinoma, culminando con pobres opciones terapéuticas y colocando al trasplante hepático, en ocasiones, como única opción. Estas complicaciones aumentan la morbilidad y mortalidad en la población, afectando costos de salud pública y favoreciendo una alarmante situación de salud a nivel mundial. (Starley B, et al.. 2010; Xion J, 2015)

Actualmente no se encuentra disponible un tratamiento farmacológico que prevenga y/o revierta el curso del HGNA. Estudios experimentales recientes han mostrado que la niacina, un hipolipemiante utilizado clínicamente en dislipidemias, reduce el desarrollo y progresión a la fibrosis probablemente por sus efectos antiinflamatorios, antifibrogénicos y antioxidantes, por lo que ha surgido el interés de estudiar el efecto de este fármaco en el HGNA como una posible opción farmacológica preventiva en la etapa temprana de la enfermedad.

9. HIPÓTESIS

La administración de niacina será capaz de prevenir y disminuir la esteatosis hepática experimental inducida por una dieta occidental debido a su capacidad hipolipemiante y antioxidante.

10. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el posible efecto benéfico de la niacina en la prevención de esteatosis hepática en un modelo experimental de hígado graso inducido por una dieta occidental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar el modelo de EHGNA en un modelo murino mediante una dieta occidental.
2. Comparar los cambios histológicos tras la administración de niacina en nuestro modelo animal.
3. Estudiar el efecto de la niacina en la prevención de esteatosis hepática en un modelo murino en rata Wistar de hígado graso experimental inducido por una dieta occidental.
4. Evaluar las propiedades antioxidantes de la niacina en un modelo murino en rata Wistar de hígado graso experimental inducido por una dieta occidental.
5. Analizar las propiedades antiinflamatorias de la niacina mediante la expresión de TGF- β en el modelo de hígado graso experimental inducido por una dieta occidental.
6. Determinar las propiedades hipolipemiantes de la niacina en un modelo murino en rata Wistar de hígado graso experimental inducido por una dieta occidental mediante la determinación de los cambios en el perfil lipídico (colesterol, triglicéridos, C-LDL y C-HDL).

11. METODOLOGÍA

Procedimiento

Se utilizaron 33 ratas macho de la cepa Wistar de 5 semanas de edad, con un peso inicial de 110-120 g obtenidas de UPEAL-UAM (Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio), las cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Medicina de Mexicali, bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y con libre acceso a agua y alimento en jaulas de policarbonato. Los animales recibieron cuidados de acuerdo con los lineamientos de la Institución y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) con respecto a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se formaron 4 grupos respectivamente con los siguientes esquemas de tratamiento durante 18 semanas:

- **Grupo 1:** Control (C; $n=8$), ratas alimentadas con alimento comercial estándar (Purina Rodent Laboratory Chow 5001) y agua natural bebible *ad libitum*.
- **Grupo 2:** Dieta occidental (DO; $n=8$), ratas alimentadas con una dieta alta en grasas saturadas y agua bebible con fructosa (D-fructosa >99%) al 20% *ad libitum*.
- **Grupo 3:** Dieta occidental + niacina (DO + NA; $n=9$), ratas alimentadas con la dieta occidental previamente mencionada *ad libitum* y niacina a dosis de 50mg/kg por vía oral diariamente.
- **Grupo 4:** Niacina (NA; $n=8$), ratas alimentadas con alimento comercial estándar (Purina Rodent Laboratory Chow 5001) y agua natural bebible *ad libitum* y administradas con niacina a dosis de 50mg/kg por vía oral diariamente (**Tabla 1**).

Las composiciones del alimento alto en grasas fueron: 88% fibra, 10% grasas saturadas y 2% colesterol. (Xu, Z.J., et al.. 2010) (Mamikutty, N., 2014). La ganancia en peso fue registrada semanalmente. Al término del tratamiento los animales se sometieron a un ayuno de 12 horas y fueron sacrificados previamente anestesiados mediante pentobarbital intraperitoneal en dosis de 50mg/kg (Nembutal) para la

obtención inmediata de muestras sanguíneas mediante punción cardiaca. Así mismo se extrajo el hígado para obtención de peso, muestras (las cuales se almacenaron en nitrógeno líquido y a -80°C para posterior análisis) y cortes para estudio histopatológico (muestras fijadas en formaldehído al 10%).

Control (C)

- n=8

Dieta Occidental (DO)

- n=8

Dieta occidental + niacina (DO + NA)

- n=9

Niacina (NA)

- n=8

Tabla 1. Esquema de tratamiento

Análisis bioquímico

El plasma de las diversas muestras sanguíneas se separó por centrifugación (VWR Clinical 50, 3000 rpm por 15min) posterior a su obtención. Se cuantificó la actividad de las enzimas hepáticas alanino aminotransferasa (ALT; método según Reitman y Frankel, 1957) y gama-glutamiltanspeptidasa (γ -GTP; método según Glossman y Neville, 1972).

La técnica de ALT determina la actividad de esta enzima mediante la formación de un complejo colorimétrico formado por el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina. Se

rotularon tubos blanco y tubos problema para cada muestra. Se llevó a cabo la lectura mediante espectrofotometría a 515nm.

La técnica de γ -GTP determina la actividad de esta enzima mediante la producción de γ -1-glutamilglicina y p-nitroanilina, tras la actividad de la enzima GTP y el receptor γ -1-glutamil sobre el sustrato glutamil-p-nitroanilida. El producto se leyó mediante espectrofotometría a 410 nm,

Así mismo se valoró el perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL) a través de un laboratorio local (Laboratorio Dorado, Mexicali, B.C.) mediante un analizador automático multicanal (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania).

Determinaciones en hígado

Se evaluó el estrés oxidativo y peroxidación lipídica mediante la cuantificación de glutatión reducido (GSH) y malondialdehído (MDA) respectivamente.

La medición de GSH se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se homogenizaron las muestras (0.3g) previamente congeladas en nitrógeno líquido en 1.2 ml de EDTA 5mM en TCA 5%. Posteriormente se centrifugaron (12,000rpm por 20 minutos) y se extrajo 0.1ml del sobrenadante. Se agregó 2.1ml de solución de fosfatos (Na_2HPO_4 , 0.3M disuelto en agua) y 0.25 mL del reactivo de Ellman, produciendo un producto que se detectó por lectura de absorbancia por espectrofotometría a 412 nm.

El MDA fue determinado mediante el método de Buege y Aust, (1978) (ref: J.A. Buege and S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology 52 (1978), 302-310). En este método la muestra se calienta con TBA en una mezcla de TCA por algunos minutos, y TBA reacciona con MDA.

Tras homogenizar las muestras (0.5g) en 5ml de agua, se tomaron 300 μ l del homogenado al 10% agregándosele después 700 μ l de Tris-HCl 150 mM para completar 1 ml. Posteriormente se incubaron las muestras a 37°C por 30 minutos. Se

agregaron 2 ml de TBA al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético (TCA) al 15% y se colocaron en ebullición por 45 minutos seguido de centrifugación (3000 rpm durante 10 minutos). El método colorimétrico se basa en la reacción de MDA con ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar el producto TBARS (tiobarbituric acid reactive substance). Se obtuvo el sobrenadante y lectura de absorbancia por espectrofotometría a 532 nm.

Se determinaron las concentraciones de proteínas mediante el método de Bradford (1976). Se tomaron 100 μ l del homogenado y se llevó a 1.000 μ l el agua tridestilada. Se tomaron alícuotas para proteínas y se llevaron a 100 μ l con agua (200 μ l de la dilución anterior y 80 μ l de agua tridestilada). Se preparó un blanco con 100 μ l de agua. Se añadió posteriormente 2.4 ml del reactivo (que incluye azul de coomasie G-250). El mecanismo de la reacción es la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie y las proteínas. Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1mg/ml) colocando 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μ l. Se completó con agua a 100 μ l. Se leyó la absorbancia por espectrofotometría a 595 nm.

Se cuantificó glucógeno y colágeno para valorar la capacidad biosintética del órgano. El glucógeno se cuantificó mediante el método de Seifter (VAN DER VIES J.,1954). la cual evita la técnica de precipitación de glucógeno con alcohol y utiliza antrona. Se pesaron las muestras (0.5g) en tubos de ensayo esmerilado y se les añadió 1.5ml de KOH al 30%. Se taparon y se hirvieron en baño de agua durante 30 minutos. Tras enfriarse se pasaron a un matraz volumétrico de 25ml, y se aforaron con agua agitando vigorosamente. Del matraz se tomaron 40 a 160 μ l con una pipeta volumétrica, y se llevó a 1 ml en tubos de ensayo esmerilados de 13x100 por duplicado. Se preparó un tubo blanco que contenía 1 ml de agua y otros 2 estándar con 20 μ l de una solución de glucosa estándar (1 mg/ml) los cuales se llevaron a 1 ml con agua. La solución de glucosa es necesaria para el cálculo de la cantidad de glucógeno. Se preparó la solución de antrona 0.2% en concentrado de H₂SO₄. Esta solución debe prepararse en cada determinación. Se añadió 2 ml a cada tubo agitando cuidadosamente (con ayuda de bureta) y enfriando sobre hielo para prevenir la

generación de calor excesivo. Se taparon los tubos fríos y se pusieron en un baño de agua hirviendo por 15 minutos para el desarrollo del color. Se enfriaron de inmediato sobre agua con hielo y se leyó por espectrofotometría a 620 nm.

El contenido de colágena se llevó a cabo por determinación del contenido de hidroxiprolina, un aminoácido derivado de la prolina componente constitutivo del colágeno, utilizando el método de Rojkind y Gonzalez (1974). Se pesaron las muestras (0.1 g) previamente secado con papel filtro y se colocaron en una ampolleta a las cuales se le agregaron 2 ml de HCl 6N. Las ampolletas fueron selladas con mechero, para posteriormente colocarlas a 100°C en el horno durante 24 horas. Una vez hidrolizada la muestra, se abrieron las ampolletas y se colocaron nuevamente en el horno a 60-80°C aprox. Por 24 horas o hasta secas. Las muestras secas se resuspendieron con 2 ml de solución amortiguadora y se agitaron vigorosamente en vórtex, vaciando posteriormente el contenido en tubos de ensayo. Se centrifugaron (3000 rpm durante 15 min) y en un tubo que contenía una porción de anorita se depositó el sobrenadante, se agitó y centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. Se recolectó 1ml del sobrenadante y se agregó 1 ml de agua y 1 ml de cloramina T. Se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Se hizo un blanco. Después se adicionaron 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2M, 1 ml de NaOH 1N y aproximadamente 2g de NaCl, agitando inmediatamente para detener la reacción. A cada tubo se le agregaron 6 ml de tolueno y se agitaron por 1 minuto. La fase de tolueno se utiliza para la determinación de prolina y la fase acuosa para la hidroxiprolina. Primero se extrajo la capa de tolueno y la porción acuosa se cubrió y se colocó en baño de agua hirviendo por 20 minutos. Se dejaron enfriar los tubos y se les agregaron 6 ml de tolueno agitándose durante 1 minuto. De la fase de tolueno se tomaron alícuotas por duplicado de 1 ml y se les agregó 4 ml del reactivo de Ehrlich agitándose vigorosamente. Se dejaron reposar por 30 minutos para la reacción colorimétrica y se realizó la espectrofotometría posteriormente a 560 nm.

Histopatología del hígado

Las muestras previamente fijadas en formaldehído a 10% fueron lavadas, deshidratadas y fijadas en parafina. Se realizaron cortes histológicos (6-7 μ m) que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H y E) para evaluación convencional del tejido así como para análisis de la presencia de esteatosis y posible daño inflamatorio. El análisis se llevó a cabo por un patólogo certificado de la ciudad (Dra. Ma. Elena Marin, Unidad Médica Marbe, Mexicali, B.C) y se utilizó el sistema de puntaje descrita por Brunt et al.. y modificado por Kleiner et al.. NAS (NAFLD activity score) que valora y da puntaje a la presencia de esteatosis, inflamación lobular y balonización hepatocelular, y se aplicó de la siguiente manera: esteatosis(%): $\leq 5=0$, 5-33=1, 33-66=2, $\geq 66=3$; inflamación lobular ante presencia o ausencia de celular inflamatorias: ninguno=0, foco de $\leq 2=1$, 2-4=2, $\geq 4=3$; balonización hepatocelular: ninguno=0, moderada=1, evidente=2.

Análisis por Western blot:

Se llevó a cabo la extracción de proteínas de muestras almacenadas a -80°C, así como electroforesis en gel SDS-PAGE y Western Blot respectivamente para la determinación de la expresión de la proteína TGF- β en tejido hepático.

Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en buffer de lisis. Se tomó un volumen equivalente a 25 μ g de proteínas de las muestras (determinado por método de Lowry) y se transfirieron al gel de poliacrilamida al 12%. Una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) en una cámara de transferencia húmeda. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas e incubadas con una dilución de leche descremada en polvo al 5% con los anticuerpos primarios respectivos (dirigidos contra factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (GeneTex, Irvine, CA) por la noche en frío (4°C). Al siguiente día las membranas se lavaron, se bloquearon y se incubaron con anticuerpo secundario (anti-rabbit IgG (HRP), anti-TGF- β)(GeneTex, Irvine, CA) por 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavó y se visualizó mediante anticuerpo secundario de

peroxidasa de rábano y el kit de detección TM Plus-ELC (NEN Life Science Products, Elmer LAS Inc., Boston, MA, EEUU). El contenido de β -actina se utilizó como control interno. Las bandas de interés se digitalizaron y la medición semicuantitativa de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante el análisis de densitometría utilizando el software Lab Works 4.0.

Análisis estadístico:

Las determinaciones se realizaron por duplicado. Se obtuvo la media, desviación estándar y el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamientos. El análisis de las medias de cada grupo y su comparación se realizó a través del método ANOVA y posteriormente una prueba de Tukey. Toda la base de datos fue examinada con Prisma (GraphPad, versión 2.0). Se consideró que hubo una diferencia significativa cuando el valor de $P \leq 0.05$.

12. RESULTADOS

Análisis del peso corporal

Fig. 1 muestra los pesos corporales totales al finalizar las 18 semanas de tratamiento. Se observó un aumento progresivamente mayor y significativo en el peso total de las ratas con dieta occidental (DO) en comparación con el grupo control. El grupo niacina mostró una menor ganancia de peso en comparación con el grupo control y significativamente menor en comparación con el grupo DO. Interesantemente la administración de niacina en conjunto con una dieta occidental mostro una ganancia de peso significativamente menor en comparación con el grupo de DO. Estos datos demuestran que se induce un sobrepeso notable en el grupo DO lo cual es importante en nuestro modelo de daño. También los datos sugieren a la niacina como fármaco preventivo en la ganancia de peso total con o sin dieta occidental en este modelo.

Fig. 1. Pesos corporales totales

	Control	DO	DO + NIACINA	NIACINA
18 semanas	563.63±50.70	749.93±90.32 ^a	643±77.26 ^b	510.714±21.82 ^b

Figura 1. Pesos corporales totales al finalizar las 18 semanas.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$.

Análisis macroscópico y de peso hepático

Al extraer los hígados se observaron cambios macroscópicos y de peso importantes, tal como se aprecia en **Figura 2 y Figura 3**. Los hígados pertenecientes al grupo de DO se mostraron grandes en tamaño, longitud y anchura, también friables al tacto, de color amarillento/pálido, no lustroso, en comparación con los hígados del grupo control. En cambio, los hígados pertenecientes al grupo DO + niacina mostraron cambios sin embargo no se mostraban con cambios de color tan importantes, sin un tamaño importante.

Fig. 2

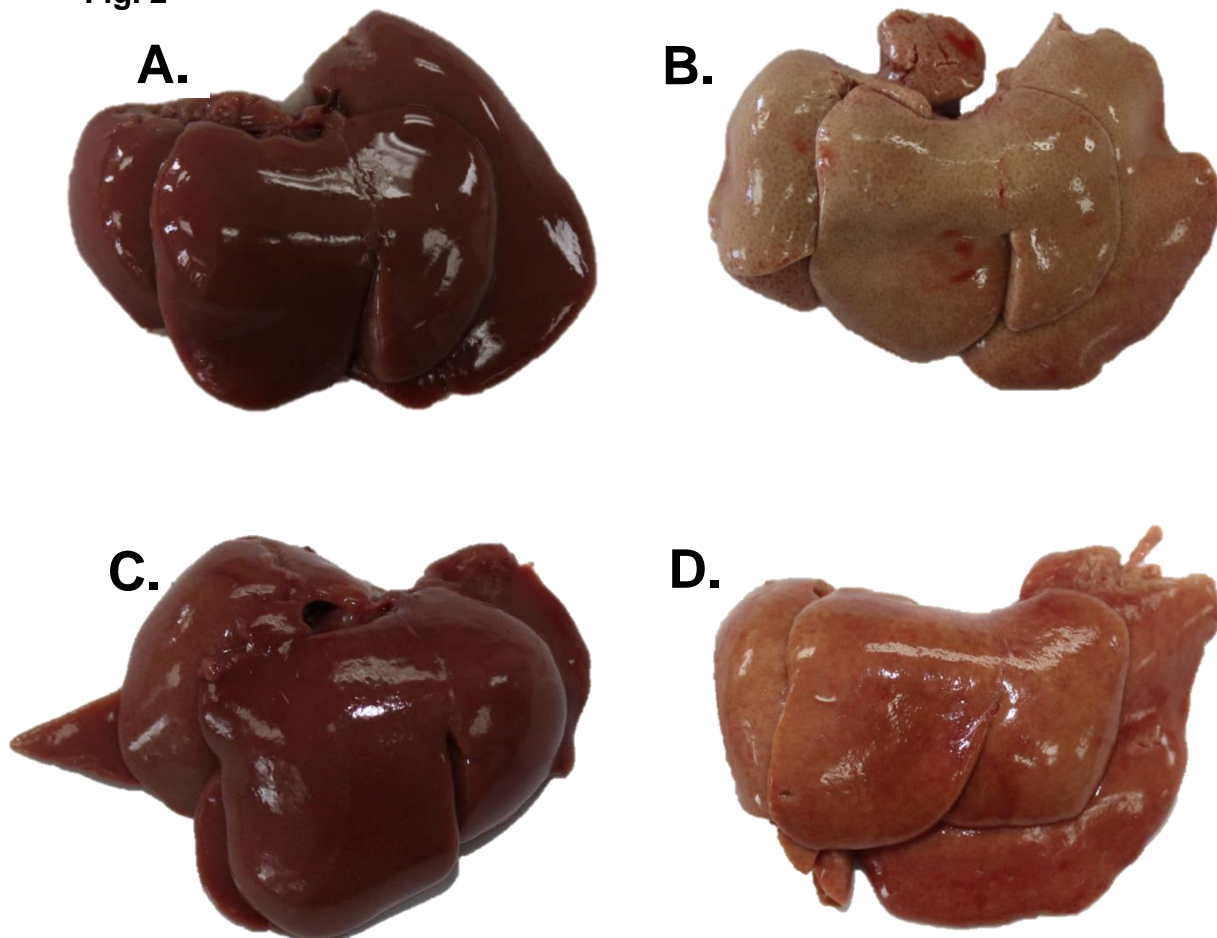


Figura 2. Imágenes representativas de los hígados de los diferentes grupos experimentales. La administración de niacina previene cambios macroscópicos compatibles con esteatosis en hígado. **A.** Hígado representativo de grupo Control a las 18 semanas. Peso del hígado promedio: 16.03 g (n=8). Se aprecia el color rojo grosella del hígado, brillante. **B.** Hígado representativo de grupo DO a las 18 semanas. Peso del hígado promedio: 29.72 g (n=8). Se aprecia un hígado con cambio de color significativo (blanco-amarillo), friable a la manipulación. **C.** Hígado representativo del grupo niacina a las 18 semanas de tratamiento. Peso del hígado promedio: 12.73g (n=8). No se aprecian cambios macroscópicos significativos, solo un cambio sutil de color. **D.** Hígado representativo del grupo DO + Niacina a las 18 semanas de tratamiento. Peso hígado promedio 20.98g. (n=9). Se observa un hígado menos friable con un cambio de color menos importante que el observado en grupo DO.

Fig. 3 .

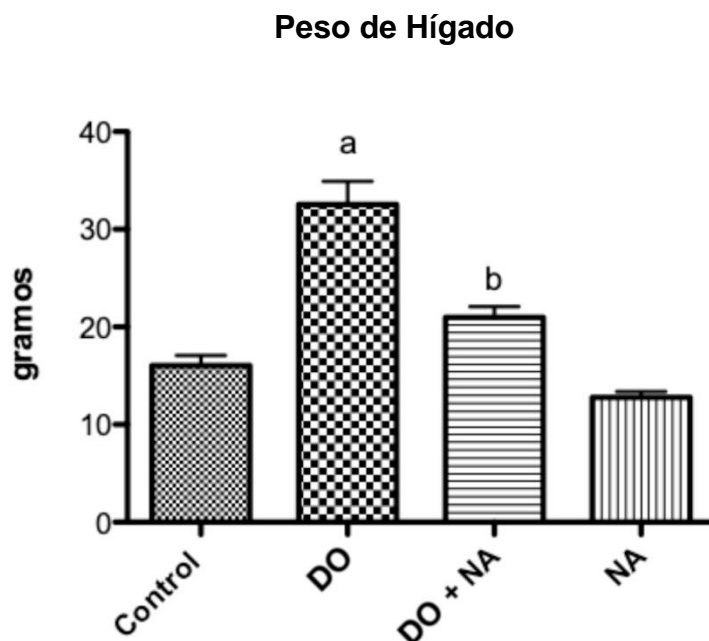


Figura 3. Pesos totales de hígados al finalizar las 18 semanas de consumo de dieta occidental.
a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.
b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$.

Figura 3 muestra la gráfica de los pesos del hígado. El peso total y promedio del hígado perteneciente al grupo DO mostro una ganancia y diferencia significativa con respecto al grupo control. De manera interesante, el grupo DO+NA previno una ganancia importante de peso, mostrando una diferencia significativa en comparación con el grupo DO. Cabe mencionar que el peso total y promedio del grupo NA mostró

una menor ganancia de peso en comparación con el grupo control lo cual nos sugiere la eficacia de la niacina como fármaco hipolipemiante y en este caso preventivo en el peso total probablemente secundario a la acumulación de lípidos intrahepáticos.

Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa (ALT) y gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP)

La ALT es una enzima presente en los hepatocitos la cual se utiliza como marcador de daño hepatocelular mediante su incremento al ser liberada al espacio extracelular tras el daño y pérdida de integridad de la membrana plasmática. Aunque esta enzima se encuentra en otros tejidos y no es la única utilizada para valorar daño hepático, la ALT se encuentra presente en mayores concentraciones en el hígado en comparación con otros tejidos, haciéndola más específica para valorar enfermedad hepática. La γ -GTP se utiliza para valorar el daño hepático y específicamente el daño colestásico (en vías biliares). En la **figura 4-A** se puede observar el aumento de la actividad de la enzima ALT de manera significativa en el grupo de daño DO. El grupo de daño tratado simultáneamente con niacina muestra una prevención del incremento de la actividad de esta enzima de manera significativa en comparación con el grupo DO. El grupo NA mostró valores similares al grupo control. Estos resultados sugieren un probable efecto hepatoprotector de la niacina al añadirse a una dieta occidental en nuestro modelo experimental. Así mismo se demuestra que las dosis del fármaco utilizado no fueron hepatotóxicas, lo cual es importante mencionar ya que uno de los principales efectos adversos de la niacina es el posible daño hepático.

Fig. 4A

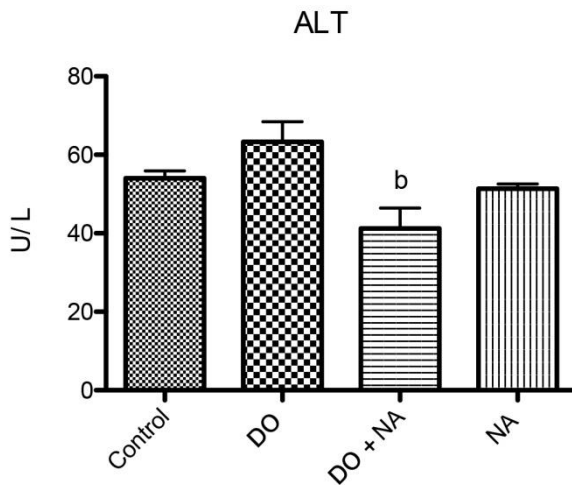
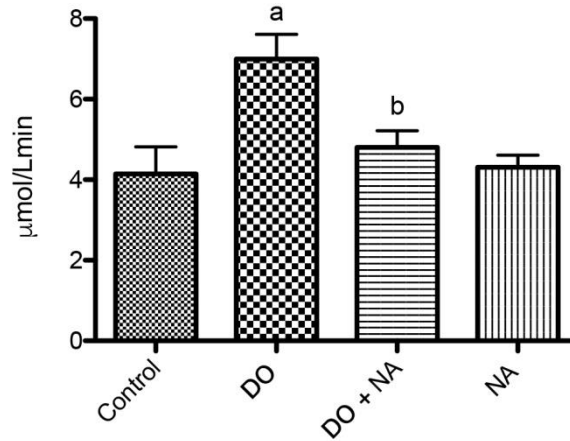


Fig. 4B γ -GTP



Figuras 4A y 4B. Actividad enzimática de la alanina aminotrasferasa, ALT y γ -glutamil transpeptidasa, γ -GTP.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$.

La **figura 4-B** muestra un aumento significativo en la actividad de la enzima γ -GTP en el grupo de daño DO en comparación con el grupo control, lo cual sugiere un posible daño colestásico causado por una dieta occidental. El grupo de daño DO + NA revela una disminución significativa en la actividad de esta enzima en comparación con el grupo DO. Esto nos demuestra un posible efecto hepatoprotector proporcionado por el fármaco al añadirse a una dieta occidental en nuestro modelo experimental. El grupo NA mostró niveles similares al grupo control.

Efectos en lípidos séricos

Las dislipidemias son componente del síndrome metabólico y son factor de riesgo en el establecimiento de hígado graso. El aumento de lípidos en sangre es un factor importante para el depósito de lípidos intrahepáticos en forma de triglicéridos. Un aumento en lípidos séricos nos lleva a un aumento en el depósito intrahepático y de lipotoxicidad en este órgano. Se analizaron los niveles de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL y LDL al finalizar el tratamiento. El colesterol total aumentó de manera

significativa en el grupo DO (**figura 5-A**) en comparación con el grupo control. El grupo DO+NA mostro una prevención total en el aumento de colesterol al mostrar una diferencia significativa con el grupo DO y al mostrar niveles similares al grupo control. El grupo niacina no mostro cambios significativos en los niveles de colesterol.

En la **figura 5-B** se muestran los niveles de triglicéridos séricos al finalizar las 18 semanas. Los triglicéridos aumentaron de manera significativa en el grupo de daño DO en comparación con el grupo control como resultado de una dieta alta en grasas. Interesantemente, la administración de niacina en conjunto a la dieta alta en grasas (grupo DO+NA) mostró una disminución significativa de los niveles de triglicéridos en comparación con el grupo DO, indicando una prevención parcial en el aumento de triglicéridos .

Fig. 5A

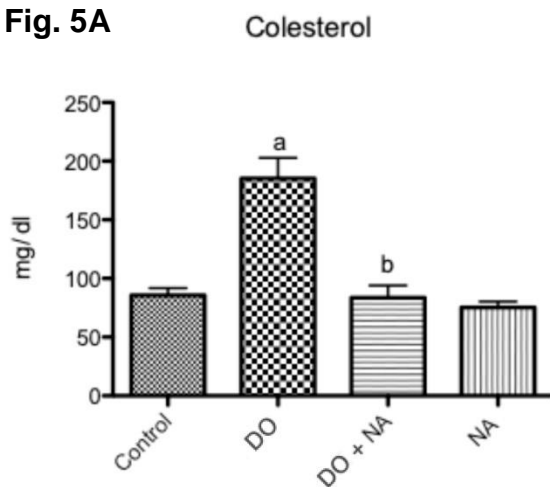
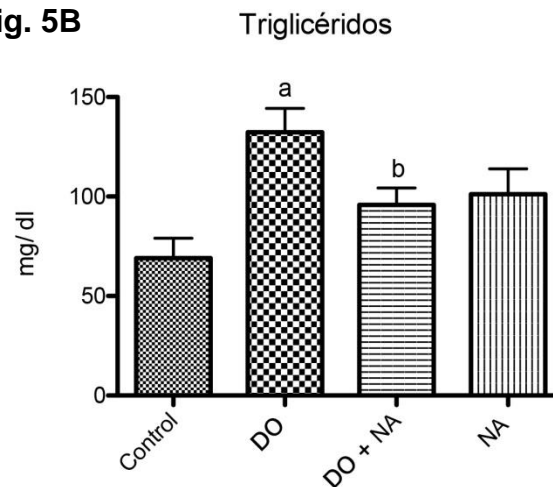


Fig. 5B

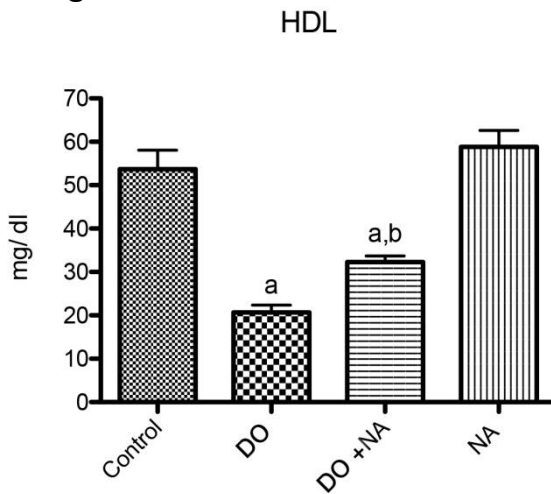
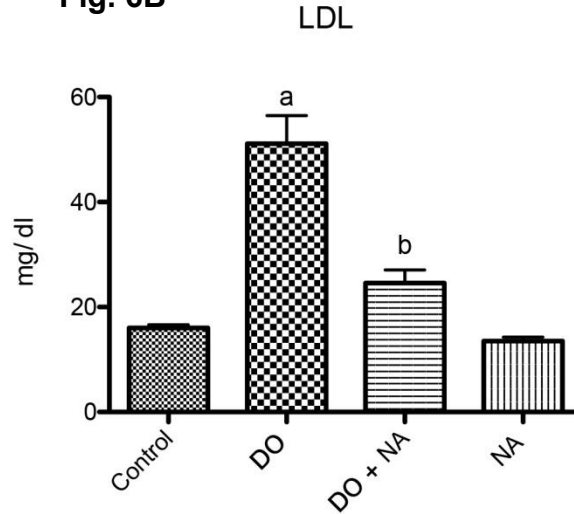


Figuras 5A y 5B. Determinación de Colesterol y Triglicéridos en suero.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$.

Fig. 6A**Fig. 6B****Figuras 6A y 6B. Determinación de HDL y LDL en suero.**

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

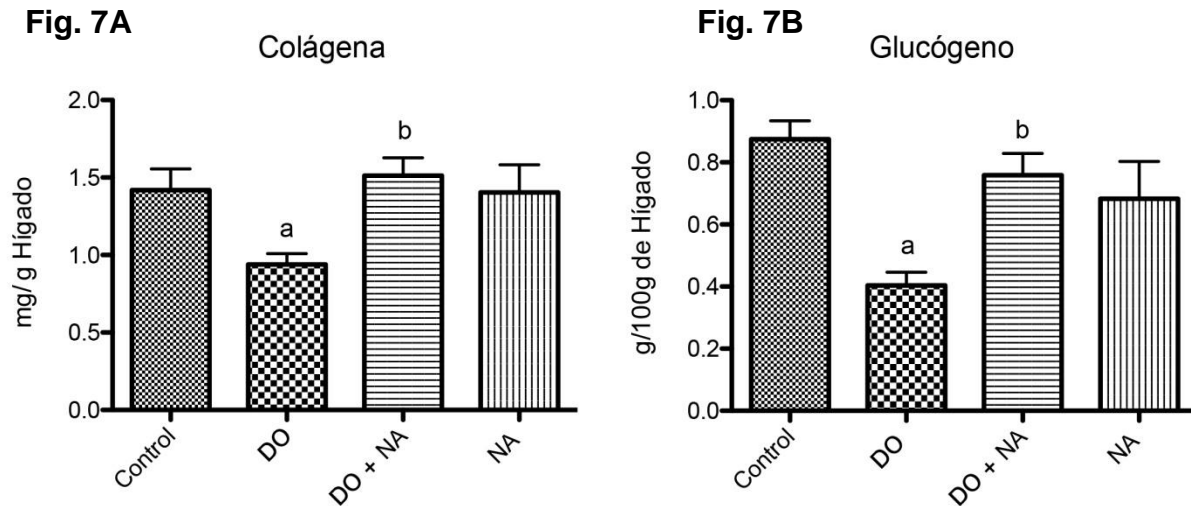
b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$.

Los niveles de colesterol HDL (**figura 6-A**) se encontraron drásticamente disminuidos en el grupo de DO con respecto al grupo control. A pesar de que el grupo DO + NA mostró niveles disminuidos de HDL en comparación con el grupo control, interesantemente, mostró niveles significativamente mayores en comparación con el grupo de daño DO lo que sugiere una prevención en la disminución de este tipo de colesterol. No hubo cambios significativos en comparación del grupo NA y control. En cuanto al colesterol LDL (**figura 6-B**), los niveles aumentaron de manera significativa en el grupo DO en comparación con el grupo control. Relevantemente se mostró una prevención total en la elevación de LDL en el grupo de DO + niacina lo que refleja la potente acción hipolipemiante del fármaco.

Contenido de glucógeno y colágena

La cuantificación de colágena es otro método útil para valorar daño hepático. La colágena se utiliza como marcador de proceso fibrótico. En la **figura 7-A** es posible apreciar una disminución significativa de colágeno en el grupo de daño DO en

comparación con el grupo control el cual se puede explicar por la característica única de reversibilidad al daño que tiene el órgano y al considerarse una fase temprana del daño hepático, donde son degradados componentes de la MEC. El grupo DO + NA mostró un aumento significativo con respecto al grupo DO, sin embargo no mostro cambios significativos en comparación con el grupo control lo que indica que la administración de niacina en conjunto con una dieta occidental no tuvo un efecto notable en el depósito de colágeno. El glucógeno hepático es indicador de la capacidad biosintética y funcional del hígado. En la **figura 7-B** se observa una importante y significativa disminución de glucógeno en el grupo DO en comparación con el grupo control lo cual se relaciona con la posible lesión hepática que causa una dieta occidental. Así mismo, de manera relevante, la administración de niacina en conjunto con una dieta occidental previene parcialmente y significativamente la disminución de glucógeno lo que refleja un efecto hepatoprotector.



Figuras 7A y 7B. Determinación de los niveles de colágena y glucógeno en hígado.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$

Análisis de estrés oxidativo

En las muestras de tejido hepático se llevó a cabo la búsqueda de marcadores de estrés oxidativo. La peroxidación lipídica es un proceso resultante de estrés oxidativo en la membrana lipídica, posible de medir mediante el marcador indirecto malondialdehído (MDA). En la **figura 8-A** se muestra como los niveles de MDA aumentaron de manera significativa en el grupo de DO en comparación con el grupo control, lo cual nos habla de estrés oxidativo a nivel hepático con una dieta occidental, posible evidencia de lipotoxicidad. Los niveles de MDA muestran una disminución significativa en el grupo HDF + NA en comparación con el grupo DO, mostrando niveles muy similares a los del grupo control, por lo que la adición de niacina a la dieta occidental fue capaz de prevenir el incremento de MDA. Los grupos controles se muestran similares sin mostrar un aumento en los niveles de MDA, posiblemente como resultado de la ausencia de una dieta occidental. En la **figura 8-B** se presentan los niveles de glutatión en hígado. El glutatión es una molécula con un rol importante en el estrés oxidativo ya que actúa como molécula antioxidante y capaz de prevenir la formación de radicales libres. Se puede apreciar una disminución con diferencia significativa en el grupo DO y de manera similar en el grupo DO + NA en comparación con el grupo control. Interessantemente, el grupo NA mostro una disminución significativa en comparación con el grupo control. Como conclusión, el fármaco no fue capaz de prevenir la pérdida de glutatión así como tampoco hay un aumento al añadir el fármaco a la dieta occidental.

Fig. 8A

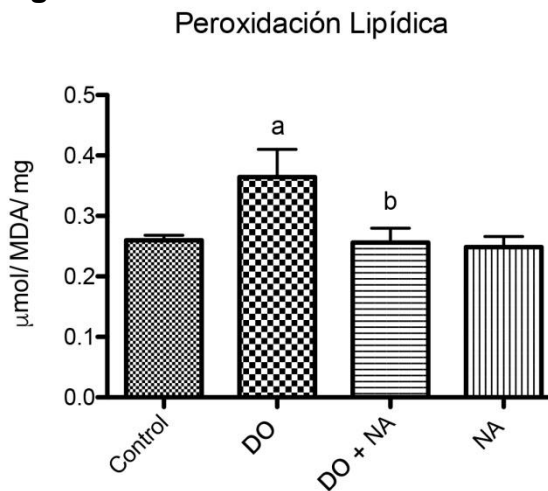
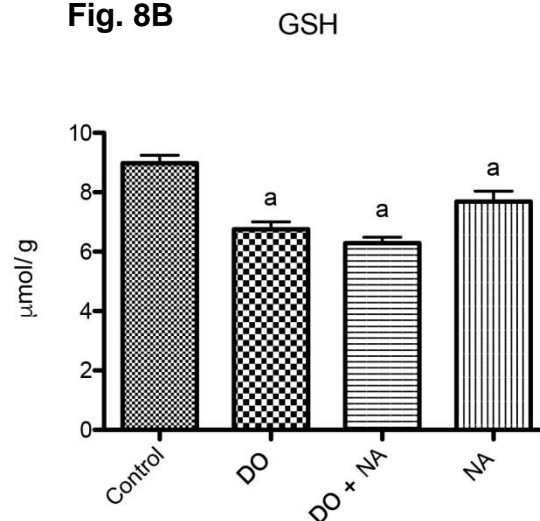


Fig. 8B



Figuras 8A y 8B. Determinación en hígado de los niveles de peroxidación lipídica y glutatión peroxidasa.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$.

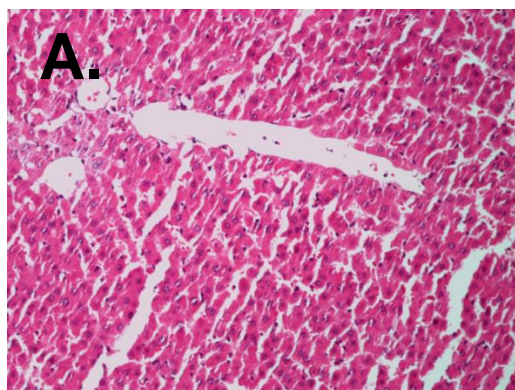
Análisis histológico

Para integrar los hallazgos macroscópicos y bioquímicos, se realizaron tinciones de las muestras de tejido hepático mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina (HyE). Este método es indicado para poder estadificar los hallazgos histopatológicos en el sistema de estadificación NAS (ref).

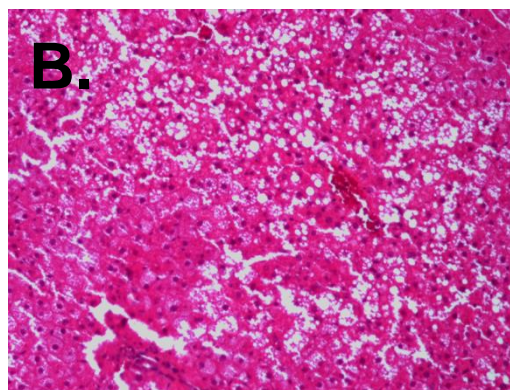
En la Figura 8 el panel **A** corresponde a una imagen representativa del grupo control (C). El diagnóstico otorgado por el patólogo fue de "Hígado normal". Se observó una arquitectura normal por lo que se describió sin alteraciones patológicas. No hay evidencia de esteatosis, inflamación o fibrosis. Por el contrario el panel **B** muestra una imagen representativa del grupo dieta occidental (DO) en la cual se observa claramente parénquima hepático con pérdida de su patrón trabecular. Hay esteatosis microvesicular que predomina en la zona 3 y afecta aproximadamente el 60% del parénquima. Se observan de 0-1 focos de infiltrado inflamatorio lobulillar formado por linfocitos. No hay degeneración balonoide y no se observa fibrosis. Estos hallazgos son compatibles con EHGNA y se le otorgó un puntaje NAS 3. El panel **C**, muestra un acercamiento a la imagen B que muestra esteatosis manifiesta. En panel **D**, se muestra la histología representativa del grupo DO+NA. Se muestra el parénquima hepático con pérdida de su patrón trabecular. Hay esteatosis microvesicular que predomina en la zona 3 y afecta aproximadamente el 15% del parénquima. Se observan de 0-1 fotos de infiltrado inflamatorio lobulillar formado por linfocitos, no hay degeneración balonoide ni fibrosis. Se otorgó el diagnóstico de EHGNA con un puntaje NAS 2.

El análisis histológico confirma los resultados obtenidos de peso hepático y los cambios macroscópicos observados en el hígado perteneciente al grupo de DO + NA en donde la niacina previene la acumulación de esteatosis en hígado.

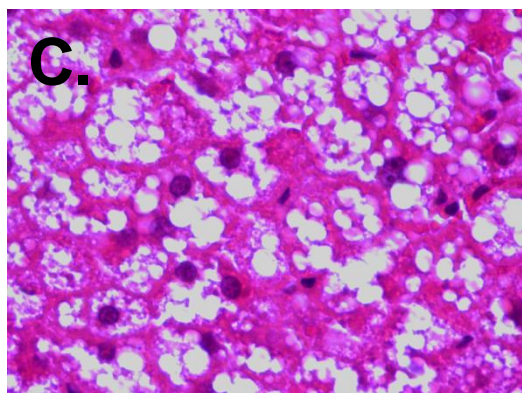
Fig. 8. Histologías, tinción H y E



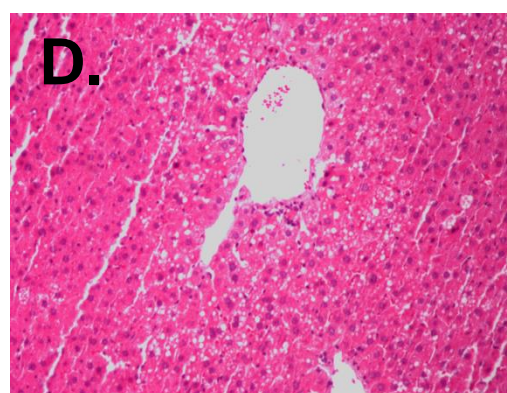
Control (C)



Dieta occidental (DO)



**Dieta occidental (DO)
(acercamiento)**



Dieta Occidental + niacina (DO + NA)

Figura 8. La administración simultánea de niacina con una dieta occidental muestra una prevención en el desarrollo de esteatosis como se muestra en las imágenes histológicas representativas de cortes de muestras hepáticas teñidas con hematoxilina y eosina (HyE) de los diferentes grupos al finalizar las 18 semanas. **A.** Ratas control con dieta regular (200x). **B.** Ratas con dieta occidental (200x). **C.** acercamiento a B. (400x) **D.** Ratas con dieta occidental + niacina (200x)

Análisis molecular

Mediante la técnica Western Blot de la citocina TGF- β , pudimos observar que la alimentación de una dieta occidental por 18 semanas en nuestro modelo experimental

incrementó significativamente la expresión de TGF- β con respecto al grupo control. La administración conjunta de niacina y una DO logró prevenir significativamente el aumento de la expresión de TGF- β con respecto al grupo DO (**figura 9**).

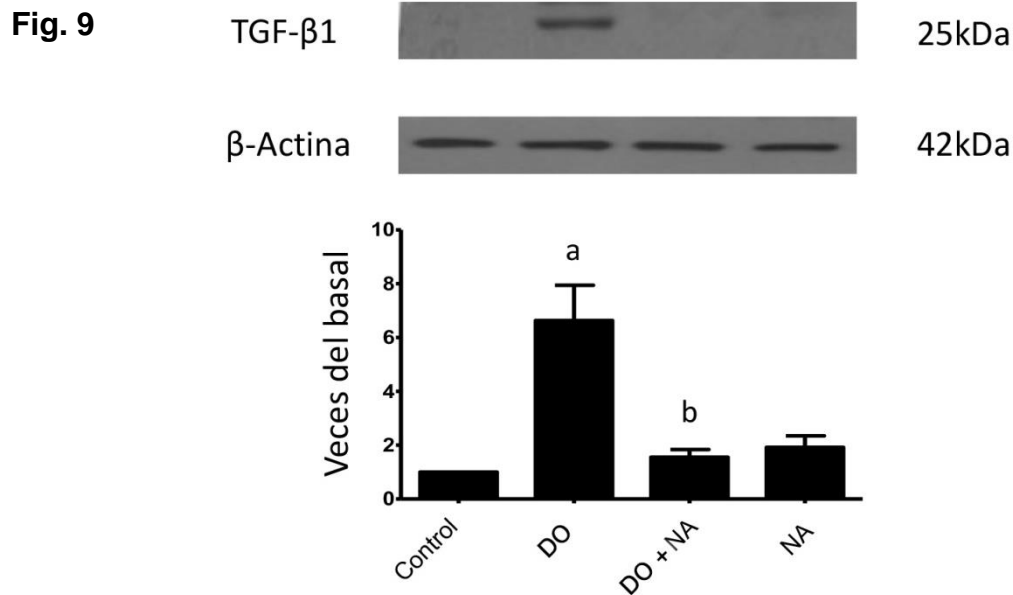


Figura 9. Análisis por Western Blot de TGF- β .

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control =1). Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar. Se muestra el control de carga β -actina.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de DO $p < 0.05$.

13. DISCUSIÓN

Entre las principales causas de enfermedad hepática crónica se encuentran la infección por el virus de la hepatitis B y C, el abuso en el consumo de alcohol (Udompap, P. 2016) (Kim, D. 2018) y actualmente, se le ha atribuido a la EHGNA como la enfermedad hepática crónica más común a nivel mundial (Younossi, Z. 2019). Esta enfermedad afecta a una gran variedad de grupos etarios e interesantemente, se ha demostrado que la presencia de EHGNA es el principal factor etiológico para el

desarrollo de CHC (Sanyal, A., 2010), posicionándose como una de las principales indicaciones para trasplante hepático en los Estados Unidos (Cholankeril, G. 2018).

La EHGNA es considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico (SM) por su constante presencia en este síndrome así como su implicación en las alteraciones del metabolismo lipídico y su asociación con el aumento en la prevalencia de obesidad.

México ocupa el primer lugar en sobrepeso y obesidad infantil en América (FAO, 2013) (OECD, 2017). México tiene una población que reúne factores genéticos como no-genéticos, asociados a hábitos nutricionales y al estilo de vida, para presentar EHGNA desde una temprana edad, lo que aumenta el tiempo de evolución y manifestación de esta enfermedad. Desafortunadamente la EHGNA aún se encuentra subdiagnosticada dado a la naturaleza asintomática de la enfermedad además de que la mayoría de los médicos no realizan regularmente la biopsia hepática para confirmar el diagnóstico, por los riesgos de complicación asociados, ya que se considera un procedimiento invasivo, mostrando un pobre apego a las guías de práctica establecidas (Rinella, M.E., 2016).

La EHGNA es un trastorno metabólico que comprende un espectro de variables presentaciones las cuales se pueden clasificar en 2: Hígado graso (HGNA), que se caracteriza por una infiltración excesiva de lípidos en el hígado, o esteatohepatitis (EHNA) ante presencia de datos de inflamación. El depósito de grasas persistente en el HGNA tiene el potencial de progresar a EHNA, facilitando el desarrollo a fibrosis por cambios importantes en la composición de la MEC. De continuar la evolución, se desarrolla cirrosis, donde el tejido hepático es sustituido por tejido cicatricial incapacitando al hígado para ejercer sus funciones fisiológicas.

Los resultados de este trabajo demuestran los efectos de la niacina en un modelo de HGNA experimental el cual fue establecido exitosamente en un periodo de 18 semanas. Se observó una prevención en el desarrollo de esteatosis y daño hepático con la administración de niacina asociado a una dieta occidental.

Optamos por un modelo animal murino dado al ventajoso tamaño del animal y su costo de mantenimiento relativamente bajo. Además existe una extensa cantidad de base de datos con el uso de la rata en el área que nos compete. Utilizamos específicamente a la cepa Wistar, que se caracteriza por ser dócil, lo cual sería beneficioso ante la manipulación diaria a la que se sometería el animal. Así mismo, al igual que las cepas C57BL/6 y Sprague Dawley, esta cepa se encuentra predispuesta intrínsecamente a desarrollar DMII, obesidad y EHGNA (Van Herck, M.A., 2017). Se optó por el uso de ratas macho ya que se ha mostrado una mayor susceptibilidad al desarrollo de esteatosis en este sexo a una temprana edad (Lee, Y. et al.. 2016) lo cual corresponde a lo observado en humanos (Pramfalk, C., et al.. 2015) (Ballestri, S., et al., 2017) además de evitar el posible efecto de las fluctuaciones hormonales observado en ratas hembra.

Nuestro modelo tuvo una duración de 18 semanas ya que múltiples referencias establecen este tiempo como suficiente para el desarrollo de esteatosis hepática (Xu, Z.J., 2010) (Van Herck, M.A., 2017).

La EHGNA al ser una enfermedad hepática crónica, requiere de muchos años para su evolución. 1 mes de vida de la rata es comparable con 3 años humanos (Sengupta, P., 2013); 18 semanas (la duración de nuestro modelo) equivalen a 13.5 años humanos al tomar como referencia el dato anterior. Se ha demostrado mediante un estudio que la tasa de progresión a fibrosis es más rápida en la EHNA, mediante el cálculo de la tasa anual de progresión para la fibrosis. El HGNA sin fibrosis inicial requiere de 14.3 años para la progresión a 1 estadio de fibrosis. En comparación, la EHNA mostró una tasa anual de progresión que corresponde a 7.1 años para alcanzar el mismo estadio (Singh, S., 2015). Esta fue otra razón por lo que el tiempo de este modelo (18 semanas) fue considerado como suficiente por nosotros para establecer esteatosis, el estadio de nuestro principal interés.

Escogimos un modelo que aumentara el aporte de energía mediante una dieta hipercalórica (dieta occidental) asociado a un ambiente sedentario para el desarrollo de sobrepeso, hiperlipidemia y esteatosis hepática, por lo que nuestros animales

permanecieron dentro de sus cajas durante el tiempo previamente establecido, sin ningún objeto añadido para prevenir el juego o ejercicio.

La dieta occidental (del inglés “Western diet”) se caracteriza por una dieta alta en grasas saturadas y azúcar y se considera como factor de riesgo para el desarrollo de SM y EHGNA. Esto se debe a que la combinación de azúcares con una dieta alta en grasas muestra un efecto aditivo con un desarrollo rápidamente progresivo de la esteatosis hepática y esteatohepatitis (Ishimoto, T., 2013).

La fructosa se ha utilizado como el componente “azucarado” en una dieta alta en grasas para replicar el SM e inducir hígado graso en múltiples estudios y modelos animales (Ishimoto, T., 2013). Nosotros nos basamos en un modelo de dieta alta en grasas con la distribución calórica siguiente: 20% proteínas, 30% grasas y 50% hidratos de carbono (Xu, Z.J., et al., 2010). Cabe mencionar que las fuentes de energía de una dieta normal son: 23% proteína, 10% grasa y 67% carbohidratos. Este modelo reporta que se logró manifestar un aumento de peso y esteatosis hepática de primer grado a partir de la 4ta semana, estableciéndose HGNA en la 8va semana y un aumento en colesterol total y enzimas hepáticas a partir de la 12da semana (Xu, Z.J., et al., 2010). Adicionalmente, nosotros administramos en combinación una bebida de fructosa al 20% *ad libitum* ya que en un modelo de inducción de SM en ratas Wistar, donde se compararon bebidas a base de fructosa en 2 concentraciones diferentes (20% y 25%), la bebida de fructosa al 20% mostró ser más fácilmente bebible por las ratas, por lo que la ingesta de calorías fue significativamente mayor en comparación con 25%, resultando en una obesidad mayor (Mamikutty, N., 2014).

En nuestro modelo experimental se observó un aumento de peso corporal estadísticamente significativo en el grupo de DO en comparación con el grupo control. Interesantemente, se mostró una menor ganancia de peso por el grupo NA en comparación con el grupo control. Se han reportado datos similares en un modelo parecido (Fang, H., et al., 2020), en el cual se utilizaron ratones B6129 y donde la administración de niacina en grupos control mostró una disminución en la ganancia de peso sin cambios significativos en la ingesta de alimentos entre grupos, atribuyéndose como causa el aumento de gasto energético. No se han reportado propiedades

anorexigénicas o de disminución de peso en humanos con el uso de esta vitamina; sin embargo algunos de los efectos adversos se manifiestan en el sistema gastrointestinal tales como náusea, vomito, dispepsia y dolor abdominal y aunque podrían explicar los hallazgos en nuestro modelo, no fue evidente ninguno de estos síntomas en los animales, ni algún cambio en las heces en comparación con el grupo control. Fueron evidentes algunas huellas de rascado lo cual fue predecible ya que el prurito es el efecto adverso más significativo y común de la niacina (Dunbar, R.L., 2010). Este fenómeno denominado “*flushing*” se observa en dosis de 50-100 mg y es atribuido a una vasodilatación cutánea mediada por prostaglandinas, por lo que se recomienda la administración previa de ácido acetilsalicílico para aminorar este efecto. Así mismo se observó que el grupo NA asociada a DO, previno de manera significativa la ganancia de peso en comparación con una DO por sí sola. Un modelo murino de EHGNA similar al nuestro ha sido reportado por Ganji, S.H et al.. (2014) en donde se empleó una dieta occidental complementada con niacina en concentraciones de 0.5% y 1.0%. La adición de niacina a una dieta occidental no mostró cambios significativos en el peso corporal, al comparar con las ratas alimentadas con una dieta occidental por sí sola.

Actualmente no hay guías que establezcan el uso de niacina como suplemento alimenticio o que sugieran una dieta alta en niacina para la prevención de la ganancia de peso o tratamiento en sobrepeso u obesidad, lo cual podría ser de interés.

Los cambios morfológicos del hígado al final del tratamiento revelaron cambios en la textura, coloración y una notoria hepatomegalia secundaria al depósito de lípidos intrahepáticos en el grupo de DO, mostrando un peso de hígado promedio de 29.72 g en comparación a los hígados de DO asociado a NA los cuales mostraron menores cambios en coloración, menor friabilidad y un peso de hígado promedio de 20.98 g, lo cual nos indica que la asociación de niacina a una dieta occidental previene cambios macroscópicos y el aumento de peso total del hígado secundario al depósito de lípidos intrahepáticos. Esto se comprobó una vez más en el análisis histológico, donde el hígado representativo del grupo DO mostró esteatosis microvesicular afectando el 60% del parénquima hepático. Al asociar NA a una DO se mostró un parénquima hepático con esteatosis microvesicular de aproximadamente el 15% del parénquima hepático.

Estos hallazgos los atribuimos a la disminución de depósitos intrahepáticos de triglicéridos secundario al mecanismo de acción de la niacina, particularmente la inhibición de la expresión de DGAT2, enzima limitante involucrada en la síntesis de triglicéridos.

Nuestros resultados son similares a los observados por Ganji, S.H et al.. en el modelo murino antes mencionado; a pesar de que las ratas utilizadas fueron de raza Sprague Dawley, se observó una prevención total en el aumento de peso hepático al combinar niacina con una dieta occidental (Ganji, S.H., et al., 2014).

La cuantificación de enzimas hepáticas se utiliza ampliamente para la valoración de daño hepático y la aproximación al diagnóstico clínico de EHGNA. Las enzimas hepáticas (ALT y γ -GTP) se manifestaron aumentadas en los perfiles séricos del grupo DO lo cual revela un daño hepático probablemente secundario a la lipotoxicidad en el órgano. El grupo DO + NA mostró una prevención del incremento de estas enzimas en comparación con el grupo DO, mostrando un efecto hepatoprotector. Además el grupo NA no mostró cambios en estas enzimas lo que demuestra que las dosis utilizadas de NA no fueron hepatotóxicas, ya que se ha reportado hepatotoxicidad como efecto adverso de la niacina a dosis altas (> 3g/día) (DiPalma, J.R.,1991).

Respecto a otros hallazgos en el análisis bioquímico, el grupo sometido a una DO logró desarrollar una dislipidemia que fue manifestada por el aumento significativo en los parámetros del perfil lipídico tales como colesterol total, triglicéridos, c-LDL y disminución de c-HDL, lo cual replica lo observado en humanos. Atribuimos estos cambios principalmente a la ingesta excesiva de grasas en la dieta, sin embargo, se ha demostrado que el tejido adiposo es una fuente importante en el origen de estos lípidos séricos. Es conocido que la expansión del tejido adiposo en la obesidad resulta en hipertrofia de adipocitos y esto determina la tasa de lipólisis; los adipocitos de mayor tamaño tienen una capacidad lipolítica aumentada (Wueest, S. et al.. 2009) (Laurencikiene, J., 2011) liberando ácidos grasos y triglicéridos en el torrente sanguíneo, contribuyendo así al depósito ectópico de grasas. En apoyo a esto, Donnelly y colaboradores en 2005 definieron las fuentes de ácidos grasos y triglicéridos almacenados en el hígado de pacientes obesos con EHGNA. Se demostró que más de

la mitad (59%) de los triglicéridos y ácidos grasos son provenientes de la lipólisis del tejido adiposo (el resto proviene de síntesis *de novo* en hígado (26%) y de la dieta (15%)). Interesantemente en nuestro modelo la administración conjunta de niacina a una DO previno todos estos cambios. Hay que recordar que uno de los mecanismos de acción de la niacina es la inhibición de la lipólisis en tejido adiposo haciéndolo un fármaco atractivo para la prevención de esta enfermedad, además de que los efectos benéficos observados en el perfil lipídico podrían correlacionarse con una disminución en el riesgo cardiovascular observado en estos pacientes (D'Andrea, E., 2019).

Las enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por un sistema antioxidante deficiente. Estudios recientes han demostrado que la niacina posee propiedades antioxidantes significativas, previniendo el daño oxidativo al neutralizar los efectos de las EROS que conforman uno de los insultos del “2do golpe” que intenta explicar la patogénesis de la enfermedad. Se mostró un aumento significativo en los niveles de MDA en el grupo de DO, efecto que se esperaba como resultado de una dieta occidental y los efectos tóxicos de los lípidos. Interesantemente, la asociación de niacina a una DO mostró un efecto antioxidante al prevenir de manera total la lipoperoxidación lipídica. Así mismo determinamos los niveles de GSH, molécula antioxidante. El grupo de DO presentó un estado de estrés oxidativo al mostrar una disminución en los niveles de GSH. Al asociar niacina, no obstante, no se mostró una prevención en la pérdida de GSH.

TGF- β es la citocina profibrogénica por excelencia. A pesar de que nuestro modelo no representa un modelo de fibrosis, fue importante analizar el efecto de la niacina sobre esta citocina en la fase de esteatosis. Se demostró que la administración conjunta de niacina y una DO logró prevenir significativamente el aumento de la expresión de TGF- β producida por el consumo de una DO. Este efecto “antifibrogénico” por la niacina se ha reportado anteriormente (Arauz, J., 2015). La TGF- β activa a la célula estelar la cual induce cambios en la composición de la MEC.

La cuantificación de colágeno es un método útil para la valoración de los cambios en la MEC, así como para valorar el daño hepático. En el grupo de DO se mostró una disminución significativa de colágeno en comparación con el grupo control.

Esto fue visible macroscópicamente al observar un hígado friable. Al administrar niacina con una DO se previno la pérdida de colágeno. La disminución de los niveles de colágeno se puede explicar ya que la lesión hepática temprana se caracteriza por degradación de componentes de la MEC, que interrumpe la homeostasis hepática. Esto se puede corroborar por las alteraciones en enzimas hepáticas observadas en este grupo. Es importante recordar la característica única de reversibilidad al daño que posee el hígado. En la lesión hepática temprana, las células estelares activadas, además de ser la principal fuente de colágeno, secretan TIMPs y MMPs en diferentes marcos de tiempo que provocan remodelamiento de la arquitectura hepática. Las MMPs con actividad contra colágeno tipo IV (MMP-2) degradan la membrana basal presente en el espacio subendotelial (Friedman, S.L., et al., 2008). Así mismo, los macrófagos reclutados al hígado secretan MMPs (MMP9 y MMP12) que ayudan a degradar y fagocitar componentes de la MEC, disminuyendo la formación de fibrosis (Zhang, C.Y. et al. 2016)(Sun, M., y Kisseleva, T. 2015). Nuestro modelo de daño representa daño hepático en una fase temprana de la enfermedad, ya que en el estadio de esteatosis no hay datos de fibrosis.

Interesantemente, no se ha observado este efecto en otros modelos animales similares de EHGNA. Uno de ellos utilizó una dieta deficiente en metionina-colina ("MCD" por sus siglas en inglés) en ratas Wistar que mostró un aumento significativo en la expresión de mRNA para colágeno tipo 1 en un periodo de 8 semanas (Feng, Y., et al., 2019). Otro modelo en ratas C57BL/6NHsd utilizó una dieta occidental por 12 semanas y demostró un aumento en la expresión de genes codificantes para colágeno tipo 1 (Luo, Y., 2016). Estas disparidades pueden deberse a las diferencias entre cepas animales, así como las diferencias en las composiciones dietéticas, pues la dieta MCD y la dieta occidental utilizada en el modelo previamente mencionado tienen un efecto más agresivo en la progresión de la EHGNA, así como un mayor porcentaje de grasa y de concentración en la bebida azucarada.

Es probable que los niveles de colágeno cambien conforme avanza la enfermedad en nuestro modelo, pues se espera que la expresión aumentada y sostenida de TIMPs inhiban más adelante las MMPs y permitan así la síntesis y

depósito de colágeno tipo I, provocando el avance y progresión de la enfermedad a un hígado fibrótico. Se necesitan más estudios sobre el comportamiento de colágeno en la historia natural de la enfermedad de EHGNA.

14. CONCLUSIONES

La EHGNA es un problema de salud pública importante a pesar de la lenta naturaleza en la progresión de la enfermedad. La complejidad en la patogénesis permite un amplio abordaje de estudio y ofrece múltiples blancos terapéuticos. No obstante, el estrés oxidativo y la inflamación son 2 procesos que evidentemente promueven el daño hepático desde el inicio de la enfermedad. Es indudable que los hábitos en el estilo de vida, como la alimentación, son factores de riesgo fundamentales para el desarrollo de obesidad, SM y EHGNA.

La acumulación ectópica de lípidos en el hígado es un evento primordial en la patogénesis de la EHGNA, por lo que el abordaje temprano y de carácter preventivo parece ser una estrategia prometedora para combatir la enfermedad. Actualmente no existe un tratamiento farmacológico para la EHGNA, ni particularmente para el HGNA.

Los resultados de este estudio muestran un rol hepatoprotector de la niacina en nuestro modelo de HGNA inducido por una dieta occidental mediante propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Se comprueba a lo largo del experimento el mecanismo de acción del fármaco así como el potente efecto hipolipemiante e interesantemente la reducción de la citocina TGF- β , la cual se caracteriza por desempeñar una acción profibrogénica y proinflamatoria en los procesos de daño hepático crónico.

Otro efecto hepatoprotector fue evidente a través de la prevención de lipoperoxidación, es decir, se mostró un efecto antioxidante que evita el daño celular y la iniciación de la cascada inflamatoria con progresión del daño. Estos efectos son sumamente benéficos para evitar el inicio y la progresión del daño en las enfermedades hepáticas crónicas.

Es necesario el estudio de compuestos faltantes para elucidar completamente el mecanismo antiinflamatorio y de disminución en la progresión de la enfermedad de la niacina en este modelo. Sería de interés estudiar el comportamiento de parámetros inflamatorios tales como IL-10, IL-6, o la citocina proinflamatoria TNF- α , la cual ha mostrado previamente en modelos similares un incremento entre las 12 y 16 semanas (Xu, Z.J., et al.. 2010).

Así mismo sería relevante analizar el efecto de la niacina en las adipocinas y en el metabolismo de la glucosa en este modelo, que complementaría aún más los hallazgos de la compleja patogénesis de la EHGNA y su presencia en el síndrome metabólico.

Por último, se requieren de más estudios pre-clínicos y clínicos para considerar la suplementación de niacina o una dieta alta en niacina en pacientes con una dieta occidental y/o que muestren pobre apego a los cambios en el estilo de vida para el abordaje temprano y la prevención del desarrollo de EHGNA, sin dejar de promover como tratamiento de primera línea los buenos hábitos de salud como una dieta balanceada y el ejercicio físico.

15. RECURSOS FINANCIEROS E INFRAESTRUCTURA

Este proyecto fue realizado en las instalaciones del laboratorio del departamento de farmacología y biología celular de la Facultad de Medicina campus Mexicali. Entre los materiales utilizados se encuentran: agitador orbital doble plataforma, agitador de plataforma, balanza de dos platos, balanza analítica, centrifuga marca Eppendorf, congelador de -20C, espectrofotómetro, fotodocumentador, fuentes de poder para cámaras de proteínas, horno de secado, homogeneizador, lector de microplacas, microscopio marca WILD, parrilla de calor y agitación, potenciómetro, purificador de agua Milli-Q Advantage, refrigeradorsistema de electroforesis para proteínas, sonicador, ultracongelador, Los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma (St. Louis, Missouri, USA): Acido Nicotínico $\geq 98\%$ (pyridine-3-carboxylic acid) y los siguientes anticuerpos: anti-B-actina, anti-IL1, anti-TGF- β (GeneTex).

El material y recursos necesarios para este proyecto fueron adquiridos mediante el apoyo PRODEP (Apoyo a la incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo completo) (UABC PTC 570).

16. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abner EL, Schmitt FA, Mendiondo MS, Marcum JL, Kryscio RJ. Vitamin E and all-cause mortality: a meta-analysis. *Curr Aging Sci*. 2011;4(2):158–170.

Akyuz, F., et al., *The effects of rosiglitazone, metformin, and diet with exercise in nonalcoholic fatty liver disease*. *Dig Dis Sci*, 2007. **52**(9): p. 2359-67.

Angulo, P., Machado, M. V., & Diehl, A. M. (2015). Fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease: mechanisms and clinical implications. *Seminars in liver disease*, *35*(2), 132–145.

Anfuso, B., Giraudi, P. J., Tiribelli, C., & Rosso, N. (2019). Silybin Modulates Collagen Turnover in an In Vitro Model of NASH. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(7), 1280.

Arab, Juan Pablo, clasificación histológica para hígado graso no alcohólico: NAFLD activity score, Clasificaciones en Gastroenterología, *Gastroenterol. Latinoam*. 2014; Vol 25 No. 4: 308-313

Arauz, J., Moreno, M. G., Cortés-Reynosa, P., Salazar, E. P., & Muriel, P. (2013). Coffee attenuates fibrosis by decreasing the expression of TGF- β and CTGF in a murine model of liver damage. *Journal of applied toxicology : JAT*, *33*(9), 970–979.

Arauz, J., Zarco, N., Segovia, J., Shibayama, M., Tsutsumi, V., & Muriel, P. (2014). Caffeine prevents experimental liver fibrosis by blocking the expression of TGF- β . *European journal of gastroenterology & hepatology*, *26*(2), 164–173.

Arauz, J., Rivera-Espinoza, Y., Shibayama, M., Favari, L., Flores-Beltrán, R. E., & Muriel, P. (2015). Nicotinic acid prevents experimental liver fibrosis by attenuating the prooxidant process. *International immunopharmacology*, *28*(1), 244–251.

Arauz, J., Ramos-Tovar, E., & Muriel, P. (2016). Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annals of hepatology*, *15*(2), 160–173.

Asano, T., Watanabe, K., Kubota, N., Gunji, T., Omata, M., Kadowaki, T., & Ohnishi, S. (2009). Adiponectin knockout mice on high fat diet develop fibrosing steatohepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *24*(10), 1669–1676.

ATP III: Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 *5* 16;285(19):2486–97.)

Ayonrinde OT, Olynyk JK, Beilin LJ, et al.. Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011;53(3):800–809.

Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* 2012;56(6):1384–1391.

Bahcecioglu, I. H., Yalniz, M., Ataseven, H., Ilhan, N., Ozercan, I. H., Seckin, D., & Sahin, K. (2005). Levels of serum hyaluronic acid, TNF-alpha and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepato-gastroenterology*, 52(65), 1549–1553.

Ballestri, S., Nascimbeni, F., Baldelli, E., Marrazzo, A., Romagnoli, D., & Lonardo, A. (2017). NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Advances in therapy*, 34(6), 1291–1326.

Balogun, K. A., & Cheema, S. K. (2016). Dietary Omega-3 Fatty Acids Prevented Adipocyte Hypertrophy by Downregulating DGAT-2 and FABP-4 in a Sex-Dependent Fashion. *Lipids*, 51(1), 25–38.

Baran, B. and F. Akyuz, *Non-alcoholic fatty liver disease: what has changed in the treatment since the beginning?* *World J Gastroenterol*, 2014. 20(39): p. 14219-29)

Barros, R. K., Cotrim, H. P., Daltro, C., Alves, E., de Freitas, L. A., Daltro, C., & Oliveira, Y. (2016). Nonalcoholic steatohepatitis in morbid obese patients: coffee consumption vs. disease severity. *Annals of hepatology*, 15(3), 350–355.

Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al.. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751–1759.

Berardis S, Sokal E. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: an increasing public health issue. *Eur J Pediatr.* 2014;173(2):131–139.

Bernal-Reyes R, et al.. Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista de Gastroenterología de México*. 2019.

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis [published correction appears in *JAMA*. 2008 Feb 20;299(7):765-6]. *JAMA*. 2007;297(8):842–857.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.

Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions*. *Am J Gastroenterol*, 1999. 94(9): p. 2467-74.

Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, et al.. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(6):3498–3504.

Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038–1048.

Castro, Gabriela S. F., Cardoso, João F. R., Vannucchi, Helio, Zucoloto, Sérgio, & Jordão, Alceu Afonso. (2011). Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 26(Suppl. 2), 45-50.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al.. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005–2023.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al.. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328–357.

Cholankeril, G., & Ahmed, A. (2018). Alcoholic Liver Disease Replaces Hepatitis C Virus Infection as the Leading Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 16(8), 1356–1358.

Clark, J.M., The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol*, 2006. 40 Suppl 1: p. S5-10.).

Cobbina, E., & Akhlaghi, F. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug metabolism reviews*, 49(2), 197–211.

Crescenzo, R., Bianco, F., Coppola, P., Mazzoli, A., Tussellino, M., Carotenuto, R., Liverini, G. and Iossa, S. (2014), Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. *Exp Physiol*, 99: 1203-1213.

D'Andrea E, Hey SP, Ramirez CL, Kesselheim AS. Assessment of the Role of Niacin in Managing Cardiovascular Disease Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2019 Apr 5;2(4):e192224.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology*. 1998;114(4):842–845.

Desterke C, Chiappini F. Lipid Related Genes Altered in NASH Connect Inflammation in Liver Pathogenesis Progression to HCC: A Canonical Pathway. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22):5594. Published 2019 Nov 8.

DiPalma, J R and Thayer W S. Use of Niacin as a drug. *Annual Review of Nutrition* 1991 11:1, 169-187

Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology [published correction appears in *Am J Pathol*. 2008 Dec;173(6):1929.

Duarte N, Coelho IC, Patarrão RS, Almeida JI, Penha-Gonçalves C, Macedo MP. How Inflammation Impinges on NAFLD: A Role for Kupffer Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:984578.

Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol*. 2015 May-Jul;44-46:147-56.

Dunbar, R. L., & Gelfand, J. M. (2010). Seeing red: flushing out instigators of niacin-associated skin toxicity. *The Journal of clinical investigation*, 120(8), 2651–2655.

Duwaerts, C.C. and J.J. Maher, *Mechanisms of Liver Injury in Non-Alcoholic Steatohepatitis*. *Curr Hepatol Rep*. 2014 **13**(2): p. 119-129.

Ekataksin, W. and K. Kaneda, Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension, in *Semin Liver Dis*. 1999. p. 359-82.

Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006 Oct;44(4):865-73.

Erhardt A, Stahl W, Sies H, Lirussi F, Donner A, Häussinger D. Plasma levels of vitamin E and carotenoids are decreased in patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Eur J Med Res*. 2011;16(2):76–78.

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679–689.

Fang H, Li Z, Graff EC, McCafferty KJ, Judd RL. Niacin increases diet-induced hepatic steatosis in B6129 mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020 Sep;1865(9):158731.

Feng, Y., Chen, Y., Yang, B., Lan, Q., Wang, T., Cui, G., Ren, Z., Choi, I. C., Leung, G. P., Yan, F., Chen, D., Yu, H. H., & Lee, S. (2019). Hepatoprotective Effect of Jianpi Huoxue Formula on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Methionine-Choline-Deficient Diet in Rat. *BioMed research international*, 2019, 7465272.

Friedman, SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655–1669.

Fukui A, Kawabe N, Hashimoto S, et al.. Vitamin E reduces liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015;7(27):2749–2756.

Ganji, S. H., Tavintharan, S., Zhu, D., Xing, Y., Kamanna, V. S., & Kashyap, M. L. (2004). Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *Journal of lipid research*, 45(10), 1835–1845.

Ganji, S. H., Kukes, G. D., Lambrecht, N., Kashyap, M. L., & Kamanna, V. S. (2014). Therapeutic role of niacin in the prevention and regression of hepatic steatosis in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 306(4), G320–G327.

Ganji, S. H., Kashyap, M. L., & Kamanna, V. S. (2015). Niacin inhibits fat accumulation, oxidative stress, and inflammatory cytokine IL-8 in cultured hepatocytes: Impact on non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(9), 982–990.

Gatselis, N.K., Ntaios, G., Makaritsis, K. *et al.*. Adiponectin: a key playmaker adipocytokine in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Med* **14**, 121–131 (2014).

Gille, A., Bodor, E. T., Ahmed, K., & Offermanns, S. (2008). Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, 79–106.

Gluchowski, N. L., Gabriel, K. R., Chitraju, C., Bronson, R. T., Mejhert, N., Boland, S., Wang, K., Lai, Z. W., Farese, R. V., Jr, & Walther, T. C. (2019). Hepatocyte Deletion of Triglyceride-Synthesis Enzyme Acyl CoA: Diacylglycerol Acyltransferase 2 Reduces Steatosis Without Increasing Inflammation or Fibrosis in Mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 70(6), 1972–1985.

Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go?. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(7 Pt 1):1024–1035.

Gurujeyalakshmi, G., Iyer, S. N., Hollinger, M. A., & Giri, S. N. (1996). Procollagen gene expression is down-regulated by taurine and niacin at the transcriptional level in the bleomycin hamster model of lung fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 277(2), 1152–1157.

Gurujeyalakshmi, G., Wang, Y., & Giri, S. N. (2000). Suppression of bleomycin-induced nitric oxide production in mice by taurine and niacin. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 4(4), 399–411.

Gutiérrez JP, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012

Guturu, P. & Duchini, A. (2012) Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: role of obesity, insulin resistance and mechanisms of hepatotoxicity. *International Journal of hepatology*.

Hagström H, Höijer J, Ludvigsson JF, Bottai M, Ekbom A, Hultcrantz R, Stephansson O, Stokkeland K. Adverse outcomes of pregnancy in women with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2016 Feb;36(2):268-74.

Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. Prevalence of obesity among adults and youth: United States, 2015–2016. NCHS data brief, no 288. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2017

Hashimoto, E, Tokushige K, Ludwig J. Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Current concepts and remaining challenges. *Hepatol Res.* 2015;45(1):20–28.

Hu, M., Chu, W. C., Yamashita, S., Yeung, D. K., Shi, L., Wang, D., Masuda, D., Yang, Y., & Tomlinson, B. (2012). Liver fat reduction with niacin is influenced by DGAT-2 polymorphisms in hypertriglyceridemic patients. *Journal of lipid research*, 53(4), 802–809.

Iredale, J. P., Murphy, G., Hembry, R. F. M., Friedman, S. L., & Arthur, M. J. (1992). Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *The Journal of clinical investigation*, 90(1), 282–287.

Ishimoto T, Lanaspa MA, Rivard CJ, et al.. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology.* 2013;58(5):1632–1643.

Jegatheesan, P., & De Bandt, J. P. (2017). Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients*, 9(3), 230.

Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013;48(4):434–441.

Kim, D., Li, A. A., Gadiparthi, C., Khan, M. A., Cholankeril, G., Glenn, J. S., & Ahmed, A. (2018). Changing Trends in Etiology-Based Annual Mortality From Chronic Liver Disease, From 2007 Through 2016. *Gastroenterology*, 155(4), 1154–1163.e3.

Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.* *Hepatology*, 2005. 41(6): p. 1313-21.

Kucera, O., & Cervinkova, Z. (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World journal of gastroenterology*, 20(26), 8364–8376.

Koehler EM, Schouten JN, Hansen BE, van Rooij FJ, Hofman A, Stricker BH, Janssen HL. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: results from the Rotterdam study. *J Hepatol.* 2012

Lai GY, Weinstein SJ, Taylor PR, et al.. Effects of α -tocopherol and β -carotene supplementation on liver cancer incidence and chronic liver disease mortality in the ATBC study. *Br J Cancer.* 2014;111(12):2220–2223.

Lamon-Fava, S., Herrington, D. M., Reboussin, D. M., Sherman, M., Horvath, K. V., Cupples, L. A., White, C., Demissie, S., Schaefer, E. J., & Asztalos, B. F. (2008). Plasma levels of HDL subpopulations and remnant lipoproteins predict the extent of angiographically-defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(3), 575–579.

Laurencikiene J, Skurk T, Kulyté A, et al.. Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(12):E2045–E2049.

Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, et al.. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA.* 2011;305(16):1659–1668.

Le, T.A. and R. Loomba, *Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis.* J Clin Exp Hepatol, 2012. 2(2): p. 156-73.

Lee, Y. H., Kim, S. H., Kim, S. N., Kwon, H. J., Kim, J. D., Oh, J. Y., & Jung, Y. S. (2016). Sex-specific metabolic interactions between liver and adipose tissue in MCD diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget*, 7(30), 46959–46971.

Lin, S., Saxena, N. K., Ding, X., Stein, L. L., & Anania, F. A. (2006). Leptin increases tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) gene expression by a specificity protein 1/signal transducer and activator of transcription 3 mechanism. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(12), 3376–3388.

Linke, A., Sonnabend, M., Fasshauer, M., Höllriegel, R., Schuler, G., Niebauer, J., Stumvoll, M., & Blüher, M. (2009). Effects of extended-release niacin on lipid profile and adipocyte biology in patients with impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis*, 205(1), 207–213.

Liu, F., Wang, X., Wu, G., Chen, L., Hu, P., Ren, H., & Hu, H. (2015). Coffee Consumption Decreases Risks for Hepatic Fibrosis and Cirrhosis: A Meta-Analysis. *PloS one*, 10(11), e0142457.

Liu, L., Li, C., Fu, C., & Li, F. (2016). Dietary Niacin Supplementation Suppressed Hepatic Lipid Accumulation in Rabbits. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(12), 1748–1755.

Ludwig, J., et al., Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 1980. 55(7): p. 434-8.

Luo, Y., Burrington, C. M., Graff, E. C., Zhang, J., Judd, R. L., Suksaranjit, P., Kaewpoowat, Q., Davenport, S. K., O'Neill, A. M., & Greene, M. W. (2016). Metabolic phenotype and adipose and liver features in a high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 310(6), E418–E439.

Malhi, H., et al., *Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis.* J Biol Chem, 2006. 281(17): p. 12093-101.

Malhi, H., & Gores, G. J. (2008). Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*, 134(6), 1641–1654.

Mamikutty, N., Thent, Z. C., Sapri, S. R., Sahrudin, N. N., Mohd Yusof, M. R., & Haji Suhaimi, F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed research international*, 2014, 263897.

McClain, C. J., Barve, S. & Deaciuc, I. Good fat/bad fat. *Hepatology* **45**, 1343–1346 (2007).

McKenney JM, Proctor JD. Safety and Side Effects of Sustained-Release Niacin-Reply. *JAMA*. 1994;272(7):514–515.

Meli, R., Raso, G. M. and Calignano, A., “Role of innate immune response in non-alcoholic fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools,” *Frontiers in Immunology*, vol. 5, article 177, 2014.)

Mencin AA, Lavine JE. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Clin North Am*. 2011;58(6):1375–x.

Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballería, J., Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas- mediated steatohepatitis. 2006. *Cell metabolism*.

Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver Regeneration. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;163(4):352-362.

Michalopoulos, George K. “Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas.” *The American journal of pathology* vol. 176,1 (2010): 2-13.

Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, Chu EC, Bederman IR, Gilge DA, et al.. Mice with a deletion in the gene for CAAT/Enhancer-binding protein b are protected against dietinduced obesity. *Diabetes* 2007;56:161–7.

Moreira R. K. (2007). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(11), 1728–1734.

Mota, M., Banini, B. A., Cazanave, S. C., & Sanyal, A. J. (2016). Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1049–1061.

Muriel, Pablo. *Liver pathophysiology therapies and antioxidants*. 2017. London: Academic Press.

Naim, A., Pan, Q., & Baig, M. S. (2017). Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 7(4), 367–372.

Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, et al.. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*.2010;140(3):338–48.

National Institute of alcohol abuse and alcoholism. "What Is A Standard Drink?". Recuperado de <https://www.niaaa.nih.gov/alcohols-effects-health/overview-alcohol-consumption/what-standard-drink>

OECD, *Health at a Glance 2017: OECD Indicators*, OECD Publishing, Paris)

Offermanns S. (2006). The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends in pharmacological sciences*, 27(7), 384–390.

Oliveira, C.P., et al., *Vitamin C and vitamin E in prevention of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in choline deficient diet fed rats*. *Nutr J*, 2003. 2: p. 9

OMS: Enfermedades no transmisibles. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>

Panchal, S. K., & Brown, L. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 351982

Peng H, Wisse E, Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016;13(3):328-336.

Perumpail, B. J., Khan, M. A., Yoo, E. R., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2017). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*, 23(47), 8263–8276.

Plaisance, E. P., Grandjean, P. W., Brunson, B. L., & Judd, R. L. (2008). Increased total and high-molecular weight adiponectin after extended-release niacin. *Metabolism: clinical and experimental*, 57(3), 404–409.

Plaisance, E. P., Lukasova, M., Offermanns, S., Zhang, Y., Cao, G., & Judd, R. L. (2009). Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 296(3), E549–E558.

Pramfalk, C., Pavlides, M., Banerjee, R., McNeil, C. A., Neubauer, S., Karpe, F., & Hodson, L. (2015). Sex-Specific Differences in Hepatic Fat Oxidation and Synthesis May Explain the Higher Propensity for NAFLD in Men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 100(12), 4425–4433.

Raederstorff D, Wyss A, Calder PC, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *Br J Nutr*. 2015;114(8):1113–1122.

Rappaport, A.M., et al., Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec*, 1954. 119(1): p. 11-33.

Rinella, M.E., et al., Practice patterns in NAFLD and NASH: real life differs from published guidelines. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016. 9(1): p. 4-12.

Rizki, G., et al., *Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(10): p. 2280-90.

Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al.. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;**362**: 1675–1685

Sanyal AJ, Poklepovic A, Moyneur E, et al.. Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Curr Med Res Opin*. 2010;**26**:2183

Satapathy, S. K., & Sanyal, A. J. (2015). Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in liver disease*, **35**(3), 221–235.

Sauve A. A. (2008). NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **324**(3), 883–893.

Saxena, R., N.D. Theise, and J.M. Crawford, Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology*, 1999. **30**(6): p. 1339-46.

Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology*. 2002;**35**(4):762–771.

Sebastiani, G., Gkouvatsos, K., & Pantopoulos, K. (2014). Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World journal of gastroenterology*, **20**(32), 11033–11053.

Sellmann, C., Prieb, J., Landmann, M., Degen, C., Engstler, A. J., Jin, C. J., Gärtner, S., Spruss, A., Huber, O., & Bergheim, I. (2015). Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *The Journal of nutritional biochemistry*, **26**(11), 1183–1192.

Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 2013;**4**(6):624-630

Singh, S., Allen, A. M., Wang, Z., Prokop, L. J., Murad, M. H., & Loomba, R. (2015). Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, **13**(4), 643–e40.

Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010; **18**:175–189.

Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roier M, et al.. CAAT/Enhancer-binding protein b deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in Lepr^{db/db} mice. *J Biol* 2007;**282**:15717–29.

Sozio MS, Liangpunsakul S, Crabb D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(4):378–390.

Stach, K., Zaddach, F., Nguyen, X. D., Elmas, E., Krlev, S., Weiss, C., Borggreffe, M., & Kälsch, T. (2012). Effects of nicotinic acid on endothelial cells and platelets. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 21(2), 89–95.

Starley, B.Q., Calcagno, C.J. and Harrison, S.A. (2010), Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. *Hepatology*, 51: 1820-1832.

Su, X. and N.A. Abumrad, *Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction.* Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(2): p. 72-7.

Sun, M., & Kisseleva, T. (2015). Reversibility of liver fibrosis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 39 Suppl 1(0 1), S60–S63.

Sunny, N. E., Parks, E. J., Browning, J. D., & Burgess, S. C. (2011). Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell metabolism*, 14(6), 804–810.

Thoma, C., C.P. Day, and M.I. Trenell, *Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review.* J Hepatol, 2012. **56**(1): p. 255-66.

Tiegs, G., & Lohse, A. W. (2010). Immune tolerance: what is unique about the liver. *Journal of autoimmunity*, 34(1), 1–6.

Traister, A., et al. (2005). Nicotinamide induces apoptosis and reduces collagen I and pro-inflammatory cytokines expression in rat hepatic stellate cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40, 1226–1234.

Udompap, P., Mannalithara, A., Heo, N. Y., Kim, D., & Kim, W. R. (2016). Increasing prevalence of cirrhosis among U.S. adults aware or unaware of their chronic hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*, 64(5), 1027–1032.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al.. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*.2000;287(5453):664–6.

van der Hoorn, J. W., de Haan, W., Berbée, J. F., Havekes, L. M., Jukema, J. W., Rensen, P. C., & Princen, H. M. (2008). Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE*3Leiden.CETP mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(11), 2016–2022.

VAN DER VIES J. (1954). Two methods for the determination of glycogen in liver. *The Biochemical journal*, 57(3), 410–416.

van Harmelen V, Skurk T, Röhrig K, et al.. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(8):889–895.

Van Herck, M. A., Vonghia, L., & Francque, S. M. (2017). Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients*, 9(10), 1072.

Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274–285.

Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827–839.

Wanders, D., Graff, E. C., White, B. D., & Judd, R. L. (2013). Niacin increases adiponectin and decreases adipose tissue inflammation in high fat diet-fed mice. *PLoS one*, 8(8), e71285.

Wisse, E. *Cell Tiss, Res*. 173, 423-435, 1976. The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood

Wueest S, Rapold RA, Rytka JM, Schoenle EJ, Konrad D. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 2009;52(3):541–546.

Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003;112(1):91–100.

Xu, Z. J., Fan, J. G., Ding, X. D., Qiao, L., & Wang, G. L. (2010). Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Digestive diseases and sciences*, 55(4), 931–940.

Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al.. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019;69(6):2672–2682.

Zhang, C. Y., Yuan, W. G., He, P., Lei, J. H., & Wang, C. X. (2016). Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World journal of gastroenterology*, 22(48), 10512–10522.

Zhou, W. C., Zhang, Q. B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology*, 20(23), 7312–7324.