



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Modificaciones transcripcionales de moléculas involucradas en inflamación del hígado de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) generado por dieta enriquecida con ácido palmítico.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

SANTIAGO CRISTOBAL SIGRIST FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADOLFO RENE MÉNDEZ CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CD. MX. NOVIEMBRE, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/1102 /2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de agosto de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **SIGRIST FLORES SANTIAGO CRISTOBAL** con número de cuenta **405097577** con la tesis titulada "**Modificaciones transcripcionales de moléculas involucradas en inflamación del hígado de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) generado por dieta enriquecida con ácido palmítico**", realizada bajo la dirección del **DR. ADOLFO RENÉ MÉNDEZ CRUZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Vocal: DRA. BERTHA PRIETO GOMEZ
Secretario: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
Suplente: DRA. LAURA DEL BOSQUE PLATA
Suplente: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de octubre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO
Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca para cursar estudios de doctorado durante el periodo 2013-2017. Correspondiente a la Convocatoria 2012; 226880/347442.

Este proyecto fue financiado por el apoyo otorgado por DGAPA-PAPIIT-IN223113, al Dr. José Rafael Jiménez Flores.

Al Dr. Adolfo Rene Méndez Cruz, por la dirección del presente trabajo.

Al Dr. José Rafael Jiménez Flores y al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, por la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

Agradecimientos a título personal.

Agradezco de manera especial al Dr. Rafael Jiménez por su constante, estimulante y entusiasta, apoyo en la búsqueda de respuestas que requieren de empeño y dedicación, al igual agradezco las tardes de seminarios y pláticas, que fueron parte de mi formación académica.

A todos los integrantes del laboratorio 7 de la UMF, que fueron un apoyo en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Dieta hipercalórica un problema multifactorial.....	3
Sobrealimentación y salud	8
Lipotxicidad hepática	16
Tejido adiposo y alteraciones en hígado.....	22
Objetivos	26
Antecedentes	27
Metodología	28
Grupos experimentales y tratamientos	28
Evaluación histológica	29
Estandarización de oligonucleótidos.....	29
Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario (cDNA)	30
Evaluación de los productos mediante PCR punto final.	31
PCR de tiempo real.....	31
Análisis estadístico	32
Resultados	33
Evaluación de los parámetros bioquímicos.....	33
Alteraciones morfológicas asociadas a la dieta con ácido palmítico.	35
Diseño de oligonucleótidos y estandarización.....	37
Obtención del cDNA y su comprobación	40
Curvas de disociación	40
Expresión relativa.....	42
Discusión	46
Referencias	54
Anexos	64

Resumen

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la causa más común de enfermedad hepática crónica, esta enfermedad es fuertemente asociada con la obesidad y el síndrome metabólico, hay un grupo de pacientes que desarrollan esta patología en ausencia de obesidad, los mecanismos subyacentes son poco conocidos. Investigamos los eventos tempranos en la patogenia de EHGNA en ausencia de obesidad, analizando el impacto de la ingesta crónica (6 y 12 meses) de una dieta adicionada moderadamente (3%) con ácido palmítico (PA) y la ingesta aguda (20%) de PA por 3 meses, en la acumulación de lípidos hepáticos y su relación con inflamación. Se evaluó el peso corporal, parámetros bioquímicos y de función hepática. En tejido hepático se analizaron mediante histología la acumulación de lípidos y con RT-qPCR la expresión de los genes relacionados con la inflamación IL-1 β , IL-6, IL-10, IL13, IL-18, Cox-2, TNF α y TLR-4 y el gen relacionado con el estrés oxidativo Nrf-2. El consumo crónico de 3% de PA no generó cambios en los parámetros bioquímicos y de función hepática, pero induce acumulación de lípidos en el hígado que se relacionó con el desarrollo de inflamación de bajo grado caracterizada por la regulación al alza de TNF α , IL-13 e IL-18, seguida de la sobreexpresión de COX2 y TLR 4. La ingesta de 20% de PA indujo sobrepeso y alteraciones en los parámetros bioquímicos, acompañadas de inflamación mediada por IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α , TLR-4 y Cox-2 en un tiempo más corto. En ambos grupos, se indujo el factor de transcripción antioxidante Nrf-2. Demostramos que la ingesta crónica de cantidades moderadas de PA induce inflamación crónica y que la esteatosis hepática fue una consecuencia temprana, acompañada de una respuesta inmune mediada por IL-18, TNF α e IL-13, y la producción de Nrf2; estas respuestas tuvieron efectos protectores que impidieron el desarrollo de trastornos metabólicos como la obesidad y el síndrome metabólico. En la ingesta excesiva de PA, estos mecanismos fueron menos eficientes para retrasar el inicio de las alteraciones metabólicas. Los conejos alimentados con 3% o 20% de PA pueden usarse como modelos de EHGNA en grupos no obesos y obesos, especialmente en las etapas iniciales de la enfermedad.

Abstract

The nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease, this disease is strongly associated with obesity and metabolic syndrome, there is a group of patients who develop this pathology in the absence of obesity, the underlying mechanisms They are little known. We investigated the early events in the pathogenesis of NAFLD in the absence of obesity, analyzing the impact of chronic intake (6 and 12 months) of a moderately added diet (3%) with palmitic acid (PA) and acute intake (20%) of PA for 3 months, in the accumulation of liver lipids and its relationship with inflammation. Body weight, biochemical and liver function parameters were evaluated. In hepatic tissue, the lipid accumulation was analyzed by histology and with RT-qPCR the expression of the genes related to inflammation IL-1 β , IL-6, IL-10, IL13, IL-18, Cox-2, TNF α and TLR-4. and the gene related to oxidative stress Nrf-2. The chronic consumption of 3% of PA did not generate changes in the biochemical parameters and of liver function, but it induces accumulation of lipids in the liver that was related to the development of low-grade inflammation characterized by the upregulation of TNF α , IL- 13 and IL-18, followed by overexpression of COX2 and TLR 4. Intake of 20% of PA induced overweight and alterations in biochemical parameters, accompanied by inflammation mediated by IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α , TLR-4 and Cox-2 in a shorter time. In both groups, the antioxidant transcription factor Nrf-2 was induced. We show that chronic intake of moderate amounts of PA induces chronic inflammation and that hepatic steatosis was an early consequence, accompanied by an immune response mediated by IL-18, TNF α and IL-13, and the production of Nrf2; These responses had protective effects that prevented the development of metabolic disorders such as obesity and metabolic syndrome. In the excessive intake of PA, these mechanisms were less efficient to delay the onset of metabolic alterations. Rabbits fed 3% or 20% PA can be used as models of NAFLD in non-obese and obese groups, especially in the early stages of the disease.

Introducción

Dieta hipercalóricas un problema multifactorial

En los países desarrollados y en vías de desarrollo la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas (ECD), como: síndrome metabólico, obesidad, diabetes, hipertensión arterial y enfermedades cardiovasculares, representan la primera causa de morbi-mortalidad (Bhurosy & Jeewon, 2014) Estadísticas mundiales calculan que en 2014, había más de 1900 millones de adultos de 18 o más años con sobrepeso, de éstos, más de 600 millones eran obesos (OECD/EU, 2017). El aumento inusitado del peso excesivo en México, lo sitúa como uno de los países cuya población tienen alta prevalencias de estos trastornos de la alimentación. Con base a estadísticas de la OCDE, México ocupa el segundo lugar en peso excesivo en adultos y el cuarto lugar en niños (OECD/EU, 2017). Tomando en consideración datos recientes del IOTF y CDC nuestro país tiene el quinto lugar de población adulta obesa, bajo cualquier criterio, México enfrenta una creciente epidemia de sobrepeso y obesidad, su origen es multifactorial (Hruby & Hu, 2015; Thaker, 2017) pero destaca principalmente el desbalance energético entre el consumo de alimentos hipercalóricos y reducido gasto energético (Barquera, Campos-Nonato, Hernández-Barrera, Pedroza-Tobías, & Rivera-Dommarco, 2013; Cervera & Campos, 2010).

La obesidad es un problema social y de salud que ha llegado a niveles de pandemia (Bhurosy & Jeewon, 2014). Los gastos sociales y económicos de salud, en el manejo de la obesidad son muy altos. En países desarrollados la obesidad es la responsable de aproximadamente 30,000 muertes prematuras y el costo total estimado es de 93 billones de dólares por año por el manejo de complicaciones relacionadas con la obesidad (Cawley, Rizzo, & Haas, 2007; Sturm & An, 2014).

Opiniones de organizaciones internacionales y expertos en el tema, aceptan que la aparición y desarrollo de la obesidad es el resultado de la influencia genética, de factores ambientales y del comportamiento personal cotidiano. Cuando hacemos la relación entre la epidemia actual de la obesidad, la dieta y la actividad física no puede ser examinado de forma aislada y es obvio que, para entender "¿por qué comemos lo que comemos?" se requiere una comprensión e integración de diversos factores que conforman un ambiente obesogénico.

Boyd Swinburn lo definió como "la suma de influencia del entorno, oportunidades o condiciones de vida que tienen en la promoción de la obesidad en individuos o poblaciones" (B. Swinburn & Egger, 2002; Boyd Swinburn, Egger, & Raza, 1999). Con la finalidad de integrar, se puede expresar que, la obesidad es una enfermedad crónica que tiene como origen un conjunto de alteraciones metabólicas complejas, de etiología multifactorial, donde interactúan factores genéticos, sociales y ambientales, incluyendo el estilo de vida así como determinantes sociales y económicos, donde el modelo ecosocial sobre la influencia de factores ambientales en la conducta individual postula que, el individuo se encuentra inmerso en el sistema social, el cual ejerce influencia sobre su comportamiento y sus hábitos mediante diversos entornos o niveles de influencia (Figura. 1), que van del más distal al más proximal, este concepto muestra al individuo en el centro de una serie de círculos concéntricos que representan los diversos niveles de influencia (McLaren & Hawe, 2005). El sistema más inmediato, el microsistema o entorno familiar, que en México incluye frecuentemente no sólo a la familia nuclear, sino también a la familia ampliada, tiene una gran influencia en el comportamiento del individuo debido a que en este entorno destina generalmente una parte importante de su vida y en él se desarrollan las normas y hábitos; el siguiente nivel de influencia es el mesosistema o el entorno comunitario (el barrio, la vecindad, el círculo social cercano), el entorno escolar en los niños y adolescentes y el entorno laboral en los adultos, que también ejercen influencias mediante la cultura y normas locales. El nivel de influencia más distal, que permea tanto al microsistema como al mesosistema, es el macrosistema, el cual está conformado por los factores sociales, económicos, culturales, legales, normativos y las políticas públicas que moldean a una sociedad. En el pasado, el macrosistema tenía un carácter geográfico limitado (regional o nacional), pero actualmente, por efecto del fenómeno de la globalización, rebasa cualquier límite geográfico y expone cada vez más intensa y frecuentemente a las influencias internacionales (Martínez Espinosa, 2017; McLaren & Hawe, 2005).

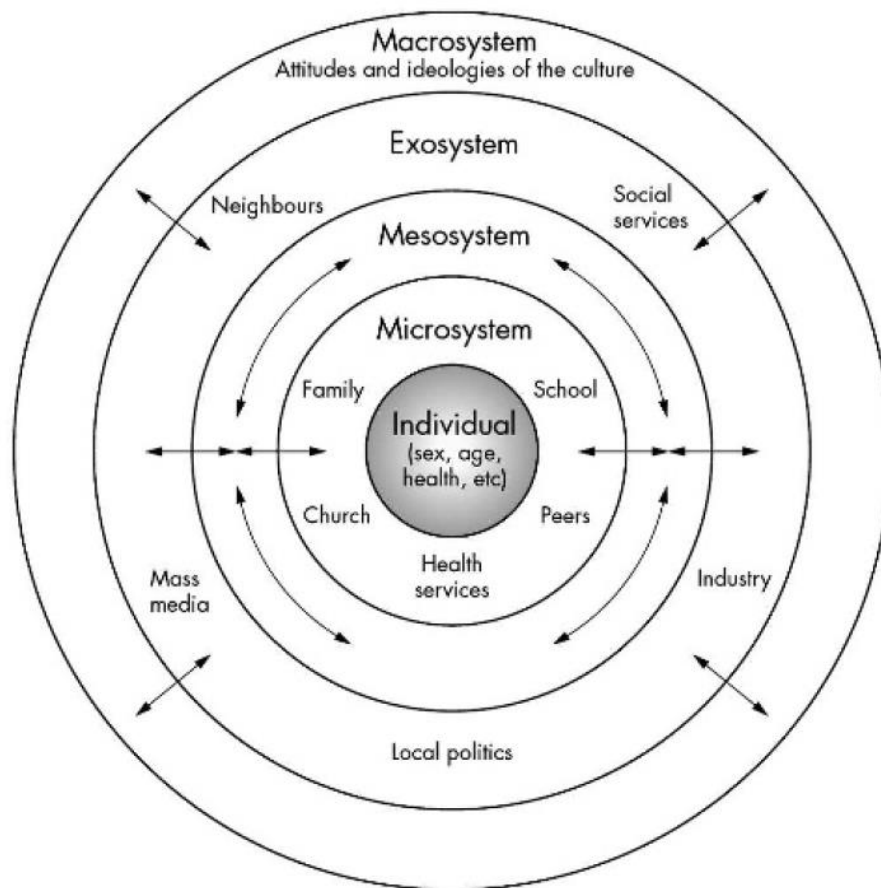


Figura 1. Modelo ecosocial sobre la influencia de factores ambientales en la conducta individual (McLaren L and Hawe P, 2005).

Las causas básicas están relacionadas con la transición nutricional que han experimentado los países de la región y son consecuencia de la industrialización, urbanización, globalización, el desarrollo en las telecomunicaciones y de cambios tecnológicos en la producción y procesamiento de alimentos, en el transporte, en el trabajo y las actividades recreativas, así como en las comunicaciones. En general, en la sociedad moderna se minimiza el gasto energético del organismo a expensas de aumentar el consumo de energía (Popkin, Adair, & Ng, 2012).

Entre las causas subyacentes que están generando estos cambios se encuentran la elevada disponibilidad, accesibilidad y alto consumo de alimentos densos en energía y pobres en micronutrientes y de bebidas con alto aporte calórico, lo cual es resultado de innovaciones tecnológicas que aumentan la productividad y abaratan su procesamiento, así como de las

estrategias de mercadeo y publicidad. En esta pérdida de la cultura alimentaria, también se pueden apreciar fenómenos como la disminución en el hábito de preparar platillos, el uso de mayores cantidades de grasas para cocinar, el consumo cada vez mayor de alimentos procesados, con menor contenido de granos enteros, fibra y con mayor contenido de harinas refinadas y azúcares, el consumo de alimentos en diferentes contextos sociales, por ejemplo comer durante el transporte, viendo televisión o durante actividades recreativas, la mayor frecuencia de tiempos de comida fuera del hogar, la mayor frecuencia en el consumo de alimentos, botanas y bebidas a lo largo del día, de esta manera el sistema alimentario y los determinantes de la frecuencia e intensidad de la actividad física son factores clave en la etiología de la obesidad, elementos que hacen aún más evidente la compleja interacción entre los factores que participan en el origen y desarrollo de esta alteración metabólica (Juan Rivera, Mauricio Hernández, Carlos Aguilar, Felipe Vadillo, 2013; B. A. Swinburn et al., 2011) (Figura. 2).

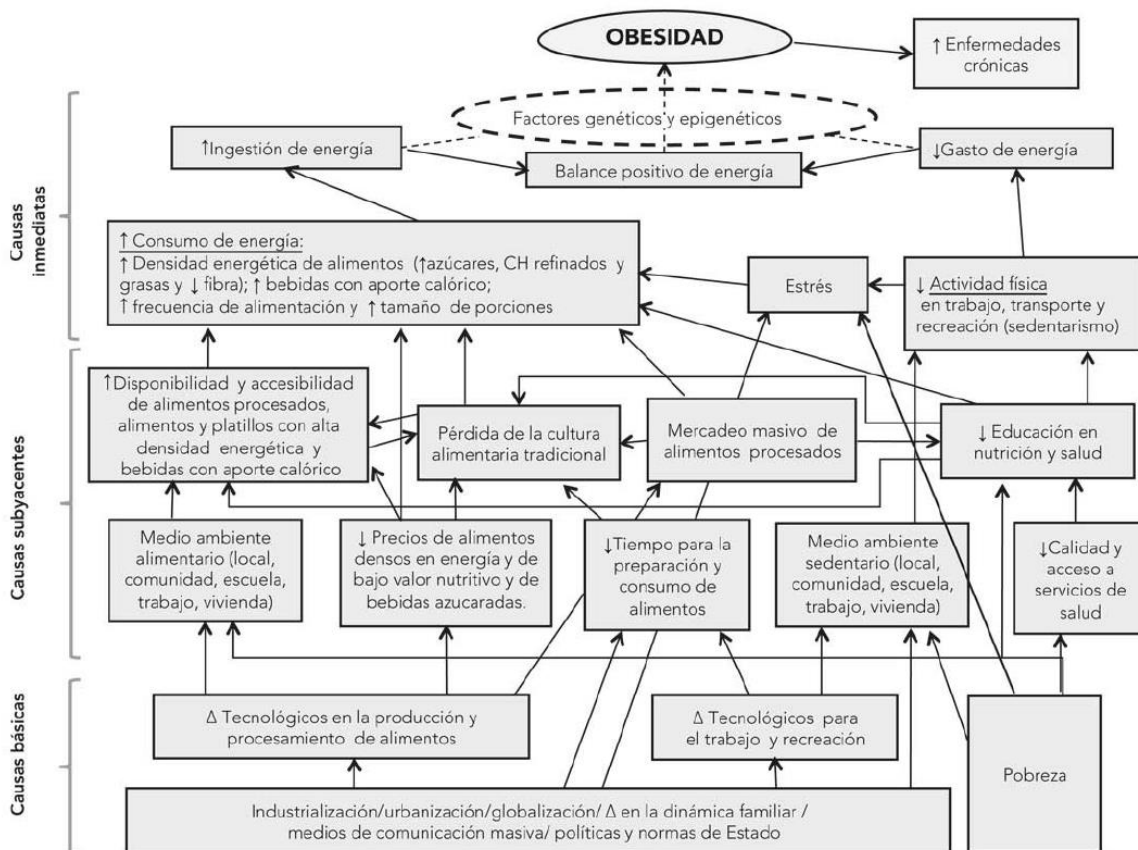


Figura 2. Modelo causal de obesidad propuesto por González-Cossío, 2011.

Las modificaciones ambientales, donde "engordar es la respuesta fisiológica normal a un ambiente anormal donde se producen volúmenes cada vez mayores de alimentos procesados, asequibles en todas partes y promovidos por sofisticados mecanismos de comercialización"(B. A. Swinburn et al., 2011). El ambiente obesogénico se puede analizar desde varios enfoques en los que están inmersos procesos de gran complejidad social, como por ejemplo el proceso de globalización que a traído como resultado la colocación de productos y marcas provenientes de mercados transnacionales en microambientes como hogares, escuelas y comunidades; estas influencias se agrupan en cuatro rubros (Maziak, Ward, & Stockton, 2008):

- a) Individuo-familia (estructura familiar, las percepciones, actitudes alimentarias de consumo originadas culturalmente y por estatus social).
- b) Escuela (educación para el consumo de alimentos, las actividades de recreación, el modelo educativo).
- c) Territorio (posibilidad de caminar por las calles, calles seguras, conductores respetuosos, acceso a comida rápida, repostería industrial, botanas y refrescos azucarados, disponibilidad de espacios para recreación y deporte).
- d) Sociedad (las influencias de la mercadotecnia, los grupos que producen alimentos y bebidas obesogénicas, y su contraparte en forma de políticas públicas y educación para la salud) (Figura 3). Estos 4 elementos (a, b, c, d) modulan los diferentes efectos relacionados con el incremento del índice de masa corporal (IMC) relacionado a obesidad, lo cual justifica un enfoque multidisciplinario para investigar este concepto de ambiente obesogénico.

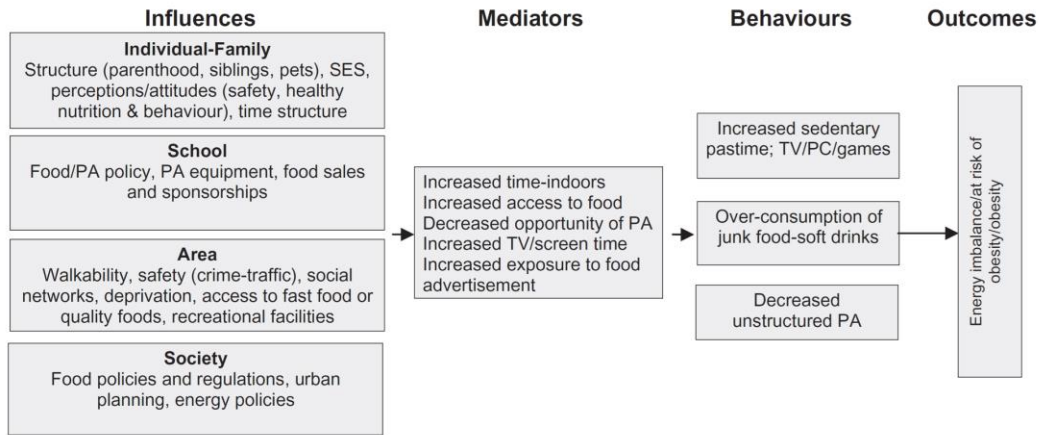


Figura 3. Factores relacionadas con el desarrollo de obesidad (Maziak, 2008).

El ambiente obesogénico no se limita a la educación familiar o escolar (donde la necesidad de los niños por socializar, así como la oferta de productos existente en tienditas y cooperativas, influye en la ingesta y actividad física de los infantes), sino que incluso se extiende a la ubicación de su hogar y a los trayectos que la familia debe hacer a la escuela o al lugar de trabajo, e incluso a la distancia que existe entre el hogar y los supermercados, lo que hace evidente que los procesos de urbanización impactan el desarrollo de la obesidad, de esta manera los entornos existentes dentro de un país por ejemplo: grado de urbanización, sistemas de transporte, oportunidades de recreación activa y cultura culinaria (Oliva Chávez & Fagoso Díaz, 2013; Yang, Jiang, Xu, Mzayek, & Levy, 2018).

Todos estos factores son de gran importancia, porque ayudan a explicar las diferencias en la prevalencia de obesidad entre las poblaciones, de tal manera que, al conocer el impacto de estos factores, se tiene la oportunidad de realizar intervenciones para hacer ambientes menos propicios para el desarrollo de obesidad. Intervenciones como el aumento de precios de alimentos y bebidas endulzadas hipercalóricas y poco nutritivas o disminuir el precio de alimentos saludables, este tipo de estrategias han recibido atención en los últimos años (Chan & Woo, 2010; Lobstein & Baur, 2005), sin embargo, la información sobre el impacto que tienen o podrían tener los cambios de los factores socioculturales determinantes, son escasos o nulos.

Sobrealimentación y salud

He mencionado que los factores más importantes que favorecen el desarrollo de sobrepeso y obesidad en los últimos 40 años, es la elevada disponibilidad, accesibilidad y alto consumo de alimentos densos en energía y bebidas con alto aporte calórico, la OMS estima que para el 2020 dos tercios del total de las enfermedades crónicas no transmisibles estarán asociadas con la dieta (Chopra, Galbraith, & Darnton-Hill, 2002). La transición nutricional hacia el consumo de alimentos refinados, de origen animal y ricos en grasas, juega un papel importante en la actual epidemia mundial de obesidad, diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Puede decirse que está relacionado con un estado de sobrenutrición, esta sobrealimentación se define como el consumo excesivo de nutrientes y alimentos hasta el punto en que, la salud se ve afectada negativamente por alimentos. Esta condición que ha adquirido importancia en los últimos años, ya había sido descrita en 1963 y vislumbrado sus complicaciones por el Profesor Stare, nutriólogo de la Universidad de Harvard, señalando que el disfrute de la comida, es un hecho que ayuda a “soothe a troubled soul,” (calmar a una alma atormentada), dicho relacionado con la sobrealimentación, además, se menciona la revolución industrial y al desarrollo electrónico como factores relacionados con la reducción de gasto de energía, en conjunto resulta el aumento de peso, mostrándose como un fenómeno de gran complejidad (Stare, 1963) (Figura 4).

El reciente aumento en la prevalencia del síndrome metabólico, históricamente, corresponde con el incremento del consumo de alimentos, particularmente con altas proporciones en lípidos. La preparación de alimentos, tradicionalmente considerada una tarea doméstica, fue transformándose en las sociedades modernas y se fueron desarrollando empresas comerciales procesadoras de alimentos, altamente rentables (M. C. Wang, Naidoo, Ferzacca, Reddy, & Van Dam, 2014; Zobel, Hansen, Rossing, & von Scholten, 2016).

En los últimos 50 años, tanto la composición como el contenido calórico de las comidas comercializadas cambiaron drásticamente, por ejemplo, para aumentar las ventas las estrategias de mercadotecnia fomentaron el consumo de porciones más grandes, descuentos y/o regalos, lo que provocó una caída en el costo de una caloría y en consecuencia un aumento de la ingesta calórica diaria *per cápita* (aumento de casi 500 kcal / día, llegando a un consumo entre 2789-3130 kcal/día) (Austin, Ogden, & Hill, 2011; Kearney, 2010; Ritchie, 2017).

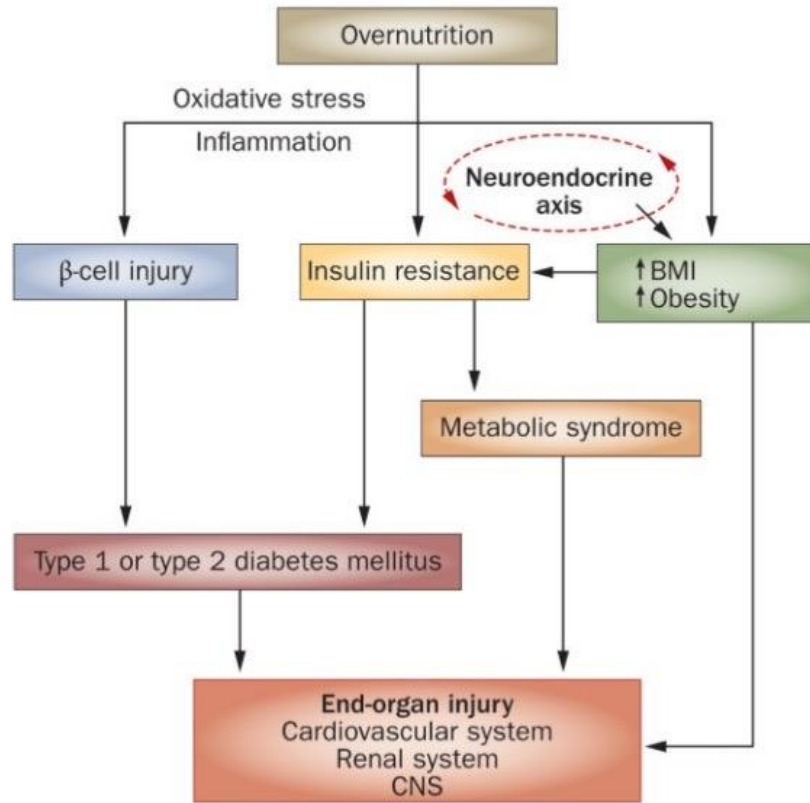


Figura 4. Efectos perjudiciales de la sobrealimentación (tomado de Vlassara and Striker, 2013).

En los EUA, existen aproximadamente 170,000 restaurantes de comida rápida y tres millones de máquinas expendedoras de bebidas gasificadas no alcohólicas que han cambiado los patrones de alimentación del país, lo mismo está sucediendo en otros países en mayor o menor grado (Nestle & Jacobson, 2000). Un reciente estudio realizado en los EUA encontró que sólo el 38% de las comidas consumidas, eran caseras; También se ha calculado que una comida promedio en un restaurante, proporciona 1000-2000 kcal, es decir, hasta el 100% de la ingesta diaria recomendada para la mayoría de los adultos (Chopra et al., 2002). En el Reino Unido, 75% de los adultos y el 91% de los niños consumen un alimento aperitivo por lo menos una vez al día, este comportamiento únicamente sería adecuado si la dieta es saludable y equilibrada al gasto energético, lamentablemente esto no es lo común. Además hay otros factores como; numerosos restaurantes de comida rápida, sitios públicos y escuelas en donde existen máquinas expendedoras de golosinas y bebidas gasificadas y endulzadas (Zobel et al., 2016).

En este sentido, durante las últimas décadas, ha aumentado la preocupación pública por la relación entre salud y nutrición, sabemos en particular, que la grasa es un macronutriente

esencial de la dieta humana y los aceites vegetales representan la grasa más consumida. Los efectos de una dieta rica en grasa, principalmente en ácidos grasos saturados (SFA), han sido relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV), así como enfermedades relacionadas con la obesidad (Briggs, Petersen, & Kris-Etherton, 2017).

La creciente demanda de aceites vegetales es un fenómeno mundial y el aceite de palma (PO) contribuye significativamente al suministro global de aceites comestibles. El PO es totalmente libre de transgénicos y produce hasta 10 veces más aceite por unidad de superficie que otros cultivos oleaginosos. En 2012, el PO representó el 32% de las grasas y aceites producidos en el mundo, hecho que lo ubica como el aceite vegetal más consumido del mundo (Mancini et al., 2015).

La palmera (*Elais guineensis*) es una planta tropical nativa de muchos países de África occidental, donde las poblaciones locales, tradicionalmente utilizan su aceite para cocinar y otros fines. Los cultivos de palma a gran escala se encuentran en las regiones tropicales. Malasia e Indonesia son los principales productores de PO, con el 86% de la producción mundial. Dos tipos de aceite se extraen de la fruta de la palma: aceite Kernel de palma (PKO) obtenido de las semillas y del mesocarpo de la planta se obtiene el PO (Mancini et al., 2015; Mba, Dumont, & Ngadi, 2015).

El aceite de palma crudo (CPO) también conocido como aceite de palma rojo, tiene diferentes compuestos, tales como: triacilglicérols (TAG), vitamina E, carotenoides, fitoesteroles, así como impurezas del tipo de los fosfolípidos, ácidos grasos libres (FFA), gomas y productos de oxidación de lípidos compuestos, que son eliminados mediante procesos de refinado, CPO representa la fuente natural más rica de carotenoides (500-700 ppm), tocoferoles y tocotrienoles (600-1200 ppm), éstos componentes contribuyen a su estabilidad y propiedades nutricionales (Mancini et al., 2015; Franca Marangoni et al., 2017).

También dispone de propiedades antioxidantes, que actúan principalmente contra las especies reactivas del oxígeno (ERO), que participan en el envejecimiento, en las enfermedades cardiovasculares y en la prevención del cáncer, además, se ha descrito que los tocotrienoles son inhibidores de la síntesis de colesterol. Sin embargo, a pesar de la buena calidad de CPO, las industrias de fabricación de alimentos requieren PO con un color suave y ligero, requiriendo de un paso obligatorio de refinación para adquirir las características señaladas. En este proceso se pierden los tocoferoles y tocotrienoles así como los

carotenoides, el PO refinado tiene baja cantidad de ácidos grasos libres (FFAs), bajo contenido de impurezas y con buen blanqueo, se le considera de alta calidad y es utilizado en la industria alimenticia (Mancini et al., 2015). Por otra parte, los aceites de baja calidad se utilizan en la industria no comestible, en la elaboración de biocombustibles, velas, cosméticos y la producción de jabón. PO de alta calidad está constituida por más de 95% de triglicéridos y menos de 0,5% FFAs.

PO y PKO tienen diferentes propiedades físicas y químicas ver tabla 1, la PKO contiene 85% de SFA, principalmente ácidos láurico y mirístico, mientras que PO contiene 50% de ácidos grasos saturados (SFA), principalmente ácido palmítico (PA, 44%).

Tabla 1. Composición de ácidos grasos del aceite de palma y el aceite kernel de palma (Mancini, *et al.* 2015).

Fatty Acid	Palm Oil	Palm Kernel Oil
Caproic acid (6:0)	-	0.2
Caprylic acid (8:0)	-	3.3
Capric acid (10:0)	-	3.5
Lauric acid (12:0)	0.2	47.8
Myristic acid (14:0)	1.1	16.3
Palmitic acid (16:0)	44.0	8.5
Stearic acid (18:0)	4.5	2.4
Oleic acid (18:1)	39.2	15.4
Linoleic acid (18:2)	10.1	2.4
Linolenic acid (18:3)	0.4	-
Arachidic acid (20:0)	0.1	0.1
Total SFAs	49.9	82.1
Total MUFAs	39.2	15.4
Total PUFAs	10.5	2.4

Data partially obtained and adapted from [7]. -: absent.

En las últimas décadas, la aplicación de PO en las industrias alimentarias ha crecido exponencialmente por sus características organolépticas que ofrece a los productos terminados. El aceite de palma se utiliza de diferentes maneras en la industria alimentaria: 1) como aceite de cocina para freír, debido a su alto punto de humo 230 ° C. 2) en la fabricación de margarinas, 3) mantecas, 4) aceites hidrogenados, 5) en la preparación de mayonesa, también se encuentra en 6) productos horneados, 7) dulces, pasteles y diferentes productos de repostería, 8) análogos de queso, 9) papas fritas, 10) chocolatería y confitería, 11) galletas diversas, 12) panadería 13) comidas congeladas y refrigeradas (tortitas, tartas, pizza, papas), 14) helados, 15) fideos y sopas instantáneas, 16) margarinas, aderezos para ensalada y aperitivos (snacks), 17) palomitas de maíz de microondas, 18) cremas no lácteas, 19) mantequilla de maní, 20) manteca vegetal (Foster, Williamson, & Lunn, 2009; May & Nesaretnam, 2014).

Los triglicéridos contenidos en el PO se constituyen principalmente de ácido oléico, situado predominantemente en la posición SN-2 y de PA localizados principalmente en las

posiciones SN-1 y SN-3 (Figura 5), esta conformación particular de los triglicéridos en el PO favorece una mayor absorción intestinal del PA, razón principal por lo que el consumo de alimentos elaborados con PO están relacionado a un alto consumo de ácido palmítico, elemento asociado positivamente con el incremento de lípidos en sangre y en consecuencia, el aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Mancini et al., 2015; F Marangoni et al., 2017; May & Nesaretnam, 2014; World Health Organization, 1990).

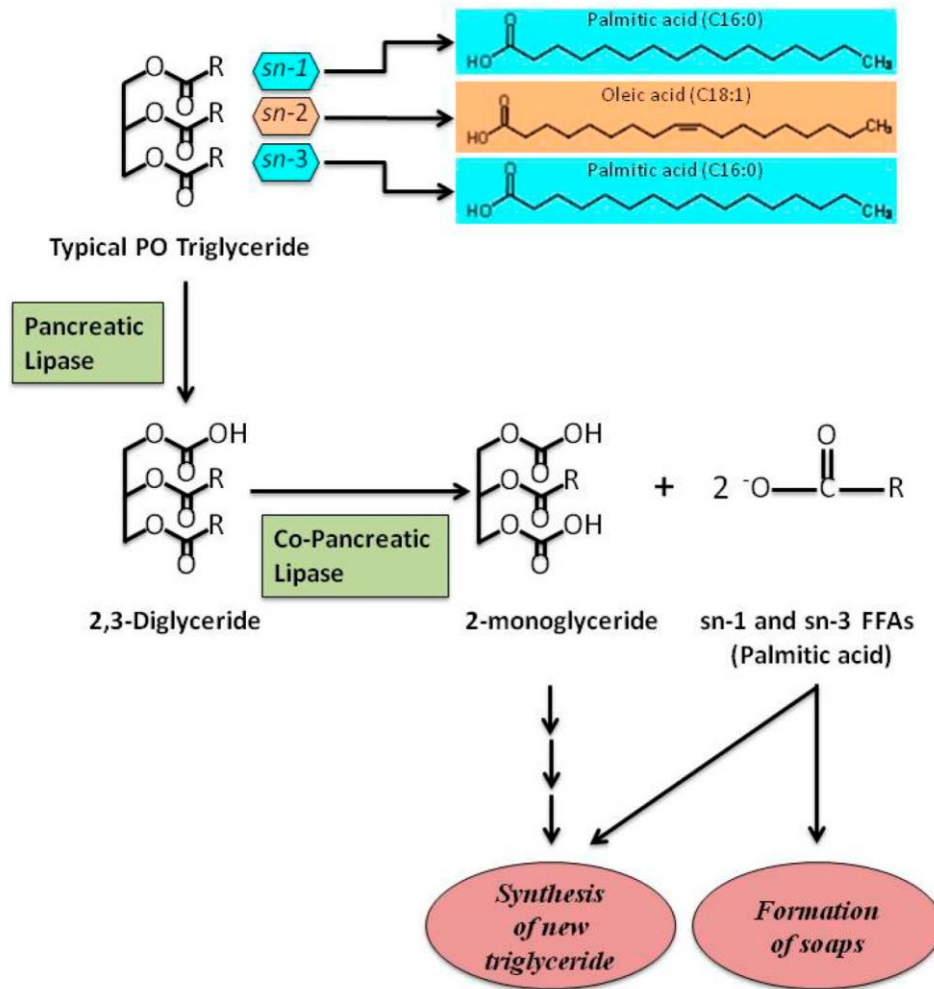


Figura 5. Representación de la hidrólisis de los triglicéridos del PO (Mancini, *et al.* 2015).

Los efectos adversos por el consumo elevado del PA proveniente del PO, se debe a que alrededor del 40% de la ingesta calórica (Carta, Murru, Banni, & Manca, 2017; Narayan, Miyashita, & Hosakawa, 2006), en una dieta se deriva de los lípidos principalmente en forma de triacilglicerolos (TAG), estos ácidos grasos presentes en los TGA son metabolizados para la producción de energía y la conversión de precursores biosintéticos, que se realiza predominantemente en el hígado. Estos ácidos grasos se encuentran libres en el citoplasma y necesitan ser transportados a través de la membrana mitocondrial interna para que, de una manera controlada, sean catabolizados mediante la β -oxidación generando dos compuestos aceptores de electrones: NAD^+ y FAD^+ estas moléculas tienen una función importante en el acarreo de electrones inherente a la cadena respiratoria mitocondrial (CRM); durante el transporte de electrones en la CRM puede ocurrir la pérdida de un electrón y este reaccionar con otros compuestos para formar subproductos, principalmente las denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO), siendo la mitocondria la principal fuente de ERO; en el hígado, el aumento en la cantidad de ácidos grasos está relacionado con la elevación en la concentración de las ERO (Satapati et al., 2015; Simões, Fontes, Pinton, Zischka, & Wieckowski, 2018). Existen controversias en la literatura sobre él o los procesos involucrados en el inicio de un estado proinflamatorio, que contribuya al desarrollo de resistencia a la insulina, sin embargo, se ha descrito que el aumento de las ERO está presente en ambas condiciones, aún sin saber cuál es primero. Resaltando que, las dietas ricas en SFAs, favorecen la alteración en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como un incremento en la síntesis de moléculas proinflamatorias, factores de crecimiento y diferenciación en vías de señalización que están relacionadas con el inicio y progresión de enfermedades crónico degenerativas como: cáncer, aterosclerosis, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Ly et al., 2017), hipertrofia cardíaca (Y. Wang et al., 2017) y en la disfunción metabólica (lipotoxicidad) (Nolan & Larter, 2009).

Lipotoxicidad hepática

El hígado desempeña un papel muy importante en el metabolismo de las materias primas, principalmente lípidos y carbohidratos. Éstos son procesados y utilizados o bien, directamente almacenados en forma de triglicéridos. Al referirnos a lípidos consideramos que en la literatura hay publicaciones demostrando que, el consumo elevado de ácidos grasos libres, contribuyen a las complicaciones provocadas por la obesidad y síndrome metabólico que promueven el depósito de lípidos en tejidos no adiposos como el hígado, generando esteatosis hepática (Rui, 2014). El hígado está compuesto de diferentes tipos celulares, además de los hepatocitos maduros, también lo constituyen células de diferentes linajes: estromales, progenitores hepáticos, endoteliales, troncales hematopoyéticas (HSCs), células asesinas naturales (NK) y un gran número de macrófagos tisulares, éstos macrófagos del hígado (Células de Kupffer) constituyen aproximadamente el 80 a 90% de macrófagos totales del cuerpo, las células de Kupffer son importantes productoras de citosinas y obviamente tienen la capacidad para sobreproducir citosinas proinflamatorias (Bieghs & Trautwein, 2013; Byun & Yi, 2017; Robinson, Harmon, & O'Farrelly, 2016).

El hígado difiere del tejido adiposo en la capacidad de almacenar cierta cantidad de lípidos, los adipocitos primero se hacen hipertróficos, después hiperplásicos, el hígado no puede realizar estas funciones y la acumulación de lípidos propicia alteraciones metabólicas variadas y complejas como la resistencia a la insulina, además de estimular a los macrófagos (células de Kupffer), estas células al ser activadas, liberan citoquinas proinflamatorias que activan el factor de transcripción NF- κ B (B. Chen, Zhao, Zhang, Wu, & Qi, 2012). El comienzo de estos procesos se vuelve redundante y multifactorial, de esta manera se explica la fuerte correlación entre obesidad y esteatosis hepática, de hecho, esta acumulación de lípidos en el hígado puede ser considerada como la manifestación hepática temprana del síndrome metabólico. La esteatosis hepática de manera clásica puede ser considerada como una afección esperada en ciertos casos de infecciones, sin embargo, si es secundario al consumo de dietas ricas en lípidos, representa un riesgo para el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis y la posibilidad de evolucionar a carcinoma hepatocelular (Byun

& Yi, 2017; Tarasenko & McGuire, 2017). Los mecanismos de progresión de la esteatosis hepática a la NASH han sido propuestos como un proceso de múltiples eventos, donde la esteatosis hepática representa el "primer evento", la continuidad subsecuente de este trastorno se considera desde el punto de vista fisiopatológico como una acumulación no fisiológica de lípidos, es decir la toxicidad lipídica, provoca la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la inflamación. Cuando esta estimulación se mantiene por tiempos prolongados, sus efectos van a ser evidenciados de manera crónica. Además, la ingesta de SFA Superior al 20% de la energía total necesaria, promueve resistencia a la insulina la cual desempeña un papel importante en la progresión alteraciones metabólicas, en las que se incluye la esteatosis al desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) (Figueiredo et al., 2017; Melanson, Astrup, & Donahoo, 2009; Weickert, 2012).

Varios estudios han revelado una asociación entre obesidad y progresión de EHGNA (Pettinelli, Obregon, & Videla, 2011). En los pacientes con esteatosis hepática, los adipocitos del tejido visceral muestran un incremento en su actividad lipolítica, promoviendo la liberación a la circulación sanguínea de ácidos grasos libres lo que predispone a los tejidos periféricos a un incremento en la captación de estos lípidos y en consecuencia los hepatocitos promueve un aumento de la lipogénesis *de novo*, cuando la relación entre la lipogénesis excede la velocidad de β -oxidación de ácidos grasos, la exportación de VLDL y la acumulación hepática de lípidos es favorecida. Por otro lado, la activación de quinasas intracelulares, tales como el inhibidor de Quinasa nuclear- κ B quinasa (IKK) y quinasa N-terminal de c-Jun (JNK), altera los sustratos de receptores de insulina y disminuye la sensibilidad a la propia hormona. Además, es importante tener en cuenta que la activación de los factores de transcripción como NF κ -B contribuye a la alteración en el metabolismo de lípidos por la expresión de citocinas proinflamatorias, tales como TNF-alfa e IL-6; con respecto a los mecanismos que han sido relacionados con la progresión de esteatosis a la esteatohepatitis, se encuentra una estrecha asociación con los adipocitos viscerales ya que favorecen un proceso inflamatorio celular, mediado por la sobreexpresión de una gran cantidad de moléculas (Berlanga, Guiu-Jurado, Porras, & Auguet, 2014; Cusi, 2012; Parker, 2018)(Figura 6). Como se mencionó con anterioridad la EHGNA está bien descrita como una causa común de enfermedad hepática crónica, principalmente en la población obesa. Se refiere a un espectro de enfermedad hepática crónica que comienza con esteatosis simple que

progresa a esteatohepatitis no alcohólica y cirrosis en pacientes sin consumo significativo de alcohol, por otro lado el EHGNA en la población no obesa se presenta cada vez con mayor frecuencia, donde la prevalencia de hígado graso no alcohólico en no obesos, se relaciona con un índice de masa corporal (IMC) de 25 kg/m^2 oscilando entre el 4.2% y el 27.5% (D. Kim & Kim, 2017), por otro lado utilizando los datos de la NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey III) recopilados entre 1988 y 1994, muestra una prevalencia de esteatosis hepática en pacientes estadounidenses no obesos con IMC inferior a 25 kg/m^2 fue del 21% (D. Kim & Kim, 2017). En un estudio comunitario en Hong Kong, la prevalencia de EHGNA fue del 19.3% y 60.5% en pacientes no obesos y pacientes obesos, respectivamente, con personas con un IMC de 25 kg/m^2 (Wei et al., 2015), estos valores son comparables con la prevalencia de hígado graso no alcohólico en obesos que, oscila entre el 6.3%-30% (Chalasanani, Younossi, Lavine, Diehl, & al., 2012). La patogénesis de la EHGNA en no obesos, no se entiende bien y se relaciona con la predisposición genética, con los componentes del síndrome metabólico y especialmente con los factores dietéticos y, específicamente, una dieta alta en fructosa y lípidos (Basaranoglu, Basaranoglu, & Bugianesi, 2015; Hernández et al., 2017), parecen desempeñar un papel importante en la acumulación intrahepática de triglicéridos y resistencia a la insulina (Hernández et al., 2017), por otro lado se ha sugerido la participación de un proceso inflamatorio en el desarrollo del EHGNA en no obesos (S. Kim, Choi, & Kim, 2013), sin embargo, en la actualidad se desconoce el impacto del proceso inflamatorio en esta enfermedad, se conoce que el hígado recibe nutrientes y endotoxinas del tracto gastrointestinal y que muchas células del sistema inmunológico están involucradas en la defensa del huésped eliminando patógenos y la presentación de antígenos a los linfocitos, las células inmunes hepáticas también están involucradas en la patogénesis de enfermedades hepáticas metabólicas, aproximadamente el 50% de los linfocitos hepáticos, células que participan en la respuesta inmune e incluyen NK, células NKT y células T $\gamma\delta$ (Gao, Jeong, & Tian, 2008; Jenne & Kubes, 2013), los macrófagos residentes de hígado, conocidos como células de Kupffer, representan el 20% de las células no parenquimatosas en el hígado por otro lado la infiltración de monocitos, representa aproximadamente el 5% de las células no parenquimatosas (Dixon, Barnes, Tang, Pritchard, & Nagy, 2013), en este sentido las dietas hipercalóricas ricas en lípidos y

carbohidratos alteran la composición de las células inmunes en el hígado (Choi & Diehl, 2005; Z. Li & Diehl, 2003; Z. Li, Soloski, & Diehl, 2005).

El incremento en la afluencia de ácidos grasos al hígado conduce a la esteatosis hepática pero también induce resistencia a la insulina a través de la acumulación de intermediarios lipídicos, en estas condiciones la mayoría de los efectos adversos están relacionados principalmente con la acumulación de los diacilgliceroles (DAG) y las ceramidas (Resistance et al., 2012).

El hígado procesa los lípidos, donde los triglicéridos almacenados en gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos representa la fuente de ácidos grasos libres (AGL) necesarios para mantener las tasas de β -oxidación mitocondrial para la generación de ATP, el procesamiento de los ácidos grasos, también ocurre en los peroxisomas (β -oxidación) y en el retículo endoplasmático (ω -oxidación), cuando la entrada de ácidos grasos supera la capacidad de β -oxidación, la acumulación de acil-CoA que es derivada a la síntesis de triglicéridos, fenómeno que conduce a la acumulación suprafisiológica de lípidos en los hepatocitos (K. Liu & Czaja, 2013; Zámbo et al., 2013) y a un aumento de la β -oxidación AGL resultando en mayores tasas de fuga de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas, lo que resulta en una mayor formación de radicales libres y de ERO, moléculas que afectan el tráfico de los componentes de señalización de la insulina, lo que conduce a la resistencia a la insulina (Cleasby, Reinten, Cooney, James, & Kraegen, 2007), en este sentido los hepatocitos están equipados con múltiples sistemas de defensa que aseguran protección contra los efectos tóxicos de oxidantes endógenos y exógenos; es importante destacar que muchas de estas enzimas citoprotectoras están codificadas por genes que contienen elementos de respuesta antioxidante (ARE), la activación transcripcional depende del estado redox celular, es decir, un aumento en la producción de ERO (Chambel, Santos-Gonçalves, & Duarte, 2015). El factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un factor de transcripción que participa en las respuestas adaptativas al estrés oxidativo mediante la interacción con los elementos ARE de genes antioxidantes y citoprotectores (Kaspar, Niture, & Jaiswal, 2009; Tang, Jiang, Ponnusamy, & Diallo, 2014), donde Nrf2 es considerado el principal mediador de la adaptación celular al estrés redox (W. Li & Kong, 2009; Motohashi & Yamamoto,

2004). Nrf2 parece proteger el hígado contra la esteatosis mediante la inhibición de la lipogénesis, así como la oxidación de los ácidos grasos (Kitteringham et al., 2010), esto puede explicarse por la activación de los factores de transcripción que contienen ARE que regulan la diferenciación de los adipocitos y adipogénesis (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). En resumen, el consumo de dieta ricas en lípidos, especialmente ácidos grasos saturados produce incremento en la generación de ERO, fenómeno que aumenta la peroxidación lipídica, daño en el DNA, en proteínas y sobre diferentes eventos que se traducen en conjunto como alteración en la función mitocondrial, en el retículo endoplásmico, alteraciones que están relacionadas con el inicio y desarrollo del EHGNA.

Como se mencionó previamente el hígado es un órgano con una actividad inmunológica muy compleja, en el hígado sano, la actividad de remodelación metabólica y tisular que esta en constante cambio, combinada con la exposición constante a productos microbianos, produce una inflamación persistente y regulada (Robinson et al., 2016), los hepatocitos desempeñan varias funciones inmunológicas importantes, además de sus funciones metabólicas esenciales. Estos incluyen: la producción de proteínas plasmáticas tales como factores de coagulación, proteínas del sistema del complemento y proteínas antimicrobianas; la producción de numerosas proteínas de fase aguda frente a infecciones locales o sistémicas (Choi & Diehl, 2005). Dado a las características de la circulación, el microambiente hepático está además influenciado por los altos niveles de grasas y carbohidrato, por lo que es importante destacar que estos procesos metabólicos están íntimamente relacionados con la inflamación hepática a través de los efectos inflamatorios de metabolitos de los carbohidratos, triglicéridos y colesterol, que promueven la señalización a los TLR y la activación del inflamasoma (Tilg & Moschen, 2010), en este sentido la obesidad, que a menudo se asocia con resistencia a la insulina, representa un estado inflamatorio crónico de bajo grado, caracterizado por niveles circulantes elevados de citocinas y activación de vías de señalización proinflamatorias (S. E. Shoelson, 2006; S. Shoelson, Herrero, & Naaz, 2007).

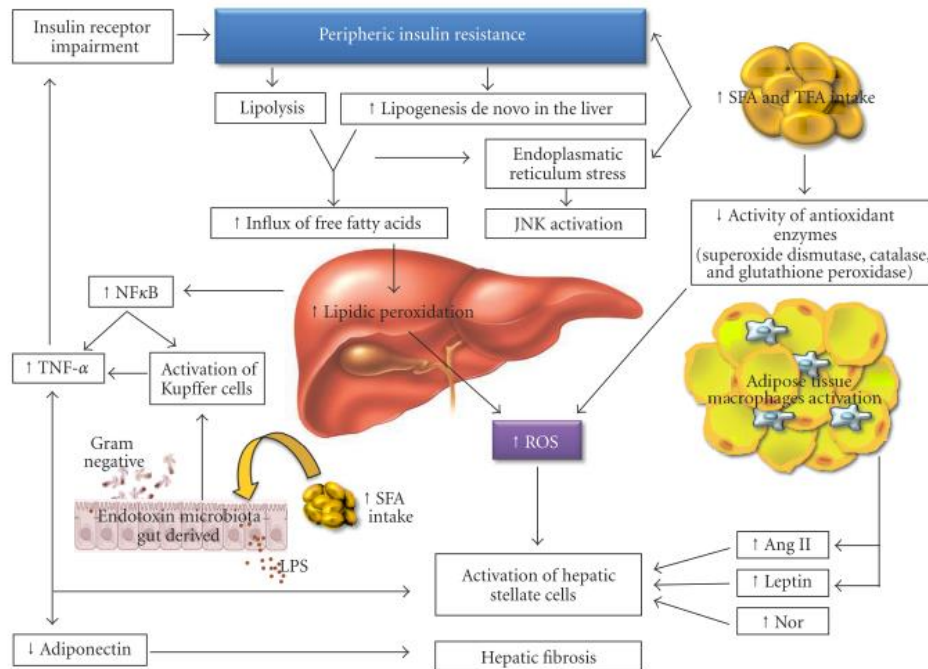


Figura 6. Representación esquemática de efecto en la ingestión excesiva de ácidos grasos saturados (SFA) y ácidos grasos trans (TFA) en el metabolismo hepático (Estadella D, *et al.* 2013)

Otros elementos que participan en acentuar el proceso inflamatorio crónico de bajo grado que subyace en la esteatosis y participan en la progresión a fibrosis, son numerosas adipocitocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , factores de crecimiento y diferenciación que actúan sobre fibroblastos, otras citosinas tales como adiponectina, leptina y resistina son secretadas por adipocitos y células inflamatorias (macrófagos principalmente) infiltradas en el tejido adiposo visceral, que participan regulando el ciclo hambre-saciedad. Todas estas moléculas establecen un cross-talk entre el tejido adiposo, músculo e hígado, participando en funciones metabólicas e inmunológicas, particularmente a través de TNF- α , IL-1 β e IL-6, moléculas involucradas en la activación de células de Kupffer y HSC hepáticas, quienes contribuyen en la progresión a esteatosis (Tarantino, Savastano, & Colao, 2010). Papandreou *et al.*, demostraron que la ingesta de SFA es directamente proporcional al grado de esteatosis hepática (Papandreou *et al.*, 2008), además que el PA activa a receptores TLR-4, en consecuencia se presenta la translocación al núcleo de NF- κ B y obviamente el incremento de TNF- α e IL-6. Además se ha demostrado que los ácidos grasos saturados inducen la expresión de TNF- α en macrófagos por la activación de MyD88 independiente de la vía de TLR-4 (Estadella *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2006).

La disfunción hepática secundaria a la ingesta de ácidos grasos, también se presenta por un aumento en la producción de ERO. Otro mecanismo de daño muy importante en lipotoxicidad por SFA del hígado, es el efecto de estas especies reactivas de oxígeno, sobre las enzimas antioxidantes hepáticas, de tal manera que, las dietas altas en grasas causan la formación de productos tóxicos intermedios, inhiben la actividad de enzimas antioxidantes, resultando en la acumulación de radicales O_2 y H_2O_2 , para posteriormente formar radicales hidroxilo.

Tejido adiposo y alteraciones en hígado

El tejido adiposo tradicionalmente se ha considerado como órgano de almacenamiento de energía, en forma de triglicéridos, estas células responden a estímulos metabólicos y endocrinos, realizan lipogénesis (acumulación de grasa) y lipólisis (degradación). En las últimas décadas ha cambiado este concepto y ahora se considera un órgano endocrino, debido a que se reconoce que el tejido adiposo produce múltiples péptidos bioactivos, denominados adipocitocinas, que no sólo influyen en la función de los adipocitos de forma autocrina y paracrina dentro del propio tejido, además tienen efectos en la función de órganos distantes, como los músculos, páncreas, hígado y cerebro, estas adipocinas están involucradas en la regulación fisiológica del desarrollo de los adipocitos y el almacenamiento de grasa, homeostasis de la glucosa, metabolismo de los lípidos, conducta alimentaria, inflamación y el tono vascular; además, se han descrito diferentes tipos de tejido adiposo, los cuales realizan diferentes funciones homeostáticas. En los mamíferos, se describen: 1) tejido adiposo blanco (TAB), cuya función primordial es almacenar lípidos, esta función se comparte en otras especies. 2) tejido adiposo marrón (TAM) en éste tejido se metaboliza la glucosa y lípidos para mantener la homeostasis térmica, el crosstalk entre los diferentes adipocitos y la interacción con las células residentes en el tejido adiposo, está estrechamente relacionado con el mantenimiento de la homeostasis inmunometabólica (Coelho, Oliveira, & Fernandes, 2013; Grant & Dixit, 2015; Kershaw & Flier, 2004).

Otra célula abundante en el tejido adiposo y que está estrechamente relacionada con la respuesta inmune es el macrófago, éstas células son responsables de la secreción de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , IL-6, la IL-8 y la IL-1 β , las cuales favorecen un proceso inflamatorio en la obesidad, en el mismo sentido es importante mencionar que se ha descrito que los preadipocitos procedentes del TAB, al igual que los procedentes de líneas inmortales como las células 3T3-L1, tienen capacidad para diferenciarse a macrófagos, ambos tipos celulares (preadipocitos y macrófagos) presentan características comunes, como la capacidad de secreción de citosinas. Esta característica de los preadipocitos, plantea la idea de que quizá los macrófagos presentes en el TAB son derivados de preadipocitos. Sin embargo, hay datos que apoyan la hipótesis de que los macrófagos del TAB provienen de los monocitos circulantes, donde, la síntesis de quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) por los adipocitos en respuesta a la cantidad de TAB, induce un incremento de monocitos circulantes en el TAB, este proceso infiltrativo está favorecido por diferentes productos de secreción de los propios adipocitos, entre ellos la leptina, que incrementa la síntesis de proteínas de adhesión (ICAM-1) por las células endoteliales (Gómez-Hernández, Perdomo, Escribano, & Benito, 2013).

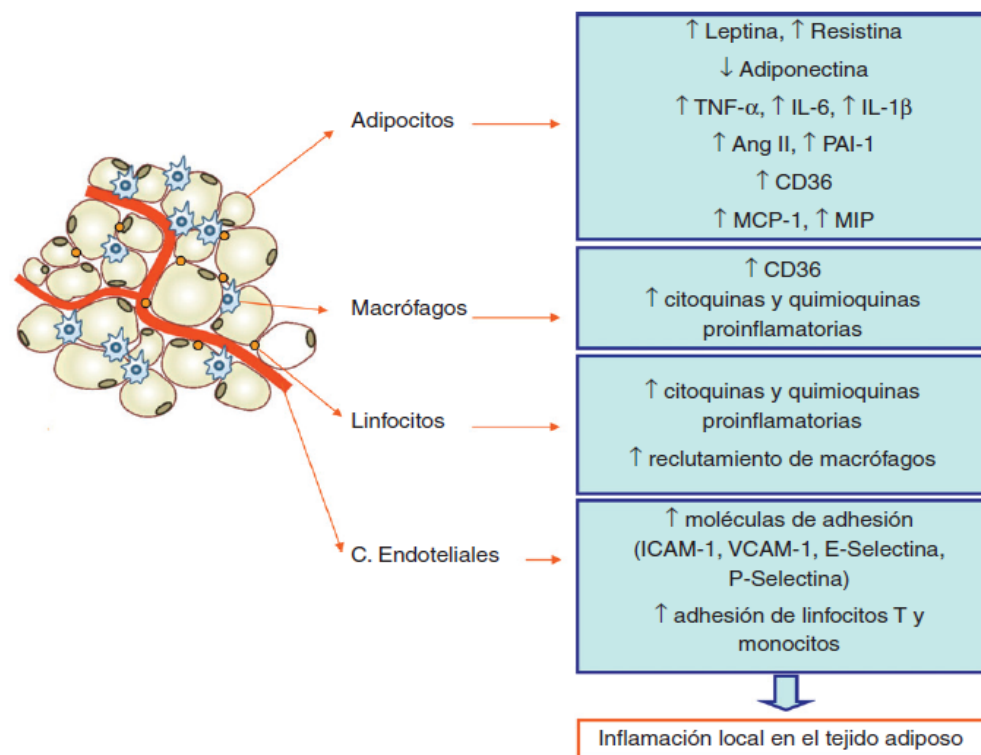


Figura 7.- Principales células involucradas en la inflamación del tejido adiposo (Gomez-Hernandez.2013)

La secreción del factor estimulador de colonias-1 (CSF-1) por adipocitos, proporciona un microambiente favorable para que los monocitos se diferencien y se establezcan como macrófagos maduros; de esta manera estos macrófagos son parte de la homeostasis del TAB, dichos macrófagos pueden mostrar un perfil proinflamatorio o antiinflamatorio según sean estimulados por diferentes citosinas (Guzik, Skiba, Touyz, & Harrison, 2017), la activación clásica del macrófago es promovida por la secreción de moléculas producidas por linfocitos T helper-1, en particular el $IFN\gamma$, en respuesta a un daño o infección, los macrófagos así activados se denominan tipo 1 (M1) y se relacionan con procesos inflamatorios. Los macrófagos también pueden activarse de forma alternativa (M2) en respuesta a las interleucinas IL-4 y/o IL-13 (perfil M2), secretadas entre otros tipos celulares por los adipocitos, el perfil M2 muestra un programa de expresión génica antiinflamatorio y contribuye activamente a la resolución de la inflamación, se ha descrito que el fenotipo de macrófagos en TAB de organismos delgados corresponde al perfil M2, mientras que el perfil de adipocinas secretadas por el TAB de animales obesos corresponde a macrófagos M (Dixit, 2013).

La Obesidad causa profundos cambios en la función del tejido adiposo, existe una relación directa entre el flujo de AGL del tejido adiposo al hígado y el grado de esteatosis de hepatocitos (Bril et al., 2017), este aumento de la captación de AGL afecta la sensibilidad a la insulina en el hígado, lo que estimula la transcripción de la proteína de unión al elemento sensible del estero 1c (SREBP-1c) y a la lipogénesis de novo, dicho fenómeno contribuye aún más a la esteatosis hepática (Ji, Chan, & Kaplowitz, 2006). Además de estos cambios metabólicos, Los AGL son capaces de estimular la función del NF- κ B (Boden et al., 2005).

Este proceso es característico de la mayoría de los sujetos con obesidad, sin embargo, no todas las personas obesas desarrollan alteraciones metabólicas, posiblemente debido a una preservación normal de la función y distribución del tejido adiposo (Blüher, 2010), pero un porcentaje de sujetos con obesidad, muestran alteraciones en la función del tejido adiposo, la disfunción de este tejido se puede considerar como la causa de la acumulación de grasa ectópica en hígado, músculo y corazón (Castro, Macedo-de la Concha, & Pantoja-Meléndez, 2017; Cleasby et al., 2007; Saponaro, Gaggini, Carli, & Gastaldelli, 2015; Weinberg, 2006), esta disfunción del tejido adiposo puede inducir inflamación crónica de bajo grado por la

constante producción de citosinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (C.E. & J.E., 2004; R. Monteiro & Azevedo, 2010), se sabe que el hígado es la principal fuente de la proteína-C reactiva (CRP), sin embargo, se ha sugerido que el tejido adiposo también puede ser una fuente de CRP (R. Monteiro & Azevedo, 2010), lo que tiene como consecuencia que en pacientes con alteraciones en la función del tejido adiposo se favorezca un **incremento** en los niveles circulantes de CRP, lo que hace denotar que la distribución de la grasa corporal puede ser un elemento en el desarrollo de esteatosis hepática, en este sentido se ha demostrado que la obesidad central está asociada con la EGNHA en individuos con peso normal, obesos y diabéticos (C.E. & J.E., 2004).

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar las modificaciones morfológicas y la expresión transcripcional de IL-18, IL-13, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX2, TLR4 y Nrf2, en hígado de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) alimentados con una dieta adicionada con 3% y 20% de ácido palmítico.

Objetivos particulares:

- Analizar marcadores bioquímicos séricos: colesterol total (Chol), colesterol HDL (HDL), colesterol LDL (LDL), triglicéridos (TG) y glucosa (Glu); Enzimas de función hepática: aparato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), gamma-glutamyl transferasa (GGT) y peso corporal.
- Analizar los cambios histológicos hepáticos mediante tinciones con hematoxilina y eosina (H&E).
- Analizar mediante Q-rtPCR (tiempo real) la expresión transcripcional de IL-18, IL-13, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX2, TLR4 y Nrf2, en hígados de conejo tratados durante 6 y 12 meses con una dieta enriquecida con 3% de ácido palmítico.
- Analizar mediante Q-rtPCR (tiempo real) la expresión transcripcional de IL-18, IL-13, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX2, TLR4 y Nrf2, en hígados de conejo tratados durante 3 meses con una dieta enriquecida con 20% ácido palmítico.
- Comparar la expresión transcripcional de IL-18, IL-13, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX2, TLR4 y Nrf2, entre los animales tratados y no tratados.

Antecedentes

Lo anteriormente descrito tiene como objetivo precisar que los trastornos nutricionales son muy diversos y originan un conjunto de alteraciones metabólicas complejas, de etiología multifactorial, donde interactúan factores genéticos, sociales y ambientales, que incluyen un estilo de vida sedentaria, y requieren una dieta hipercalórica, que genera una progresiva ganancia de peso, hasta la obesidad y sus complicaciones. Es notoria la escasa información sobre la fase inicial de todos estos trastornos y particularmente de la cantidad mínima necesaria de lípidos para desarrollar los disturbios metabólicos anteriormente señalados. Con fundamento en estas premisas se adicionó con un 3 % de PA a una dieta habitual del conejo (conejina Purina-FES Cuautitlan) que contiene 2% lípidos, dieta que fue ministrada por 6 y 12 meses, teniendo como objetivo simular un consumo crónico pero no excesivo de PA, situación frecuente y característica de muchas dietas, las consecuencias del proceso de industrialización de los alimentos de consumo diario ya han sido comentadas; En éste trabajo proponemos extrapolar las condiciones nutrimentales del modelo experimental (conejos) con un consumo moderado de grasas en humanos. Es importante mencionar que los conejos como animales herbívoros son muy sensibles a las dietas grasas, tienen una característica importante del metabolismo de las lipoproteínas, que es la presencia de proteína de transferencia de esteres de colesterol CETP, un importante regulador del metabolismo del colesterol, característica que no se comparte con ratas y ratones (X. Li et al., 2011; Tall, 1986; Van Herck, Vonghia, & Francque, 2017). Por otra parte, para utilizar de referente y a manera de control positivo, se implementó, otro modelo de la misma especie, pero con una dieta adicionada con 20% PA, esta dieta hipercalórica podrá evidenciar las alteraciones causadas por el consumo alto de ácido palmítico de manera aguda.

Metodología

Grupos experimentales y tratamientos

Se utilizaron hígados de 18 conejos macho de la cepa Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*, NZW) tratados y mantenidos previamente como se describe a continuación.

Los conejos seleccionados contaban con 30 días de nacidos y 300 ± 30 gr de peso, provenientes de la granja de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los animales se mantuvieron a 23 ± 5 °C en un ciclo de 12 h de oscuridad y 12 h de luz en el bioterio de la F.E.S. Iztacala recibiendo alimento y agua a libre acceso.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos de 3 conejos cada uno como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos experimentales. N=6

Grupo	Nombre del grupo	Descripción del Tratamiento	Tiempo de tratamiento
CN 6 (n=6)	Control 6	Alimento convencional y agua a libre acceso	6 meses
FAT 6 (n=6)	Grasa 6	Alimento convencional adicionado con 3% de ácido palmítico.	
CN 12 (n=6)	Control 12	Alimento convencional y agua a libre acceso	12 meses
FAT 12 (n=6)	Grasa 12	Alimento convencional adicionado con 3% de ácido palmítico.	
CN 3 (n=6)	Control 3	Alimento convencional y agua a libre acceso	3 meses
FAT 3 (n=6)	Grasa 3	Alimento convencional adicionado con 20% de ácido palmítico.	

Transcurrido el tiempo proyectado (3, 6 y 12 meses) los animales fueron sacrificados por dosis letal intraperitoneal de pentobarbital sódico (63mg/2.5kg de peso). Logrando el efecto anestésico profundo, se les extirpó el hígado, un segmento fue lavado con PBS 1x y puesto en solución de PFA 4% en PBS 1X para su posterior uso en técnicas histológicas, otro segmento fue congelado con nitrógeno líquido y mantenido a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización; Previo a la anestesia general por punción de la vena marginal de la oreja se les extrajo una muestra sanguínea, se obtuvo el suero por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos, a los sueros obtenidos se les realizó la cuantificación de glucosa, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL y triglicéridos, así como cuantificación de las enzimas hepáticas: aspartato transferasa (AST), alanino transferasa (ALT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP), éstas valoraciones fueron realizadas por un laboratorio de referencia internacional (CARPERMOR, S.A. de C.V.)

Evaluación histológica

Las muestras de hígado se lavaron 3 veces con PBS 1x y se fijaron en paraformaldehído al 4%, se procesaron por la técnica histológica de rutina y se incluyeron en bloques de parafina (Apéndice A). La evaluación histológica se realizó en cortes de $5\mu\text{m}$. A todas las muestras se les realizó la tinción de HyE (Apéndice A) con el fin de observar la histología general de los órganos e identificar posibles cambios. Los análisis histopatológicos del hígado se realizaron utilizando 8 campos aleatorios para determinar el porcentaje de hepatocitos con vacuolas lipídicas.

Estandarización de oligonucleótidos

En el laboratorio de Inmunología, UMF se diseñaron oligonucleótidos específicos para el RNAm de cada una de las moléculas a evaluar. Las secuencias de los genes de interés IL-18, IL-13, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX2, TLR4 y Nrf2, así como del gen control interno (GAPDH) se buscaron en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Utilizando el algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se realizó la comprobación teórica del funcionamiento de los oligos, su especificidad, así como la obtención de la longitud del producto para rt-PCR.

Posteriormente, para evaluar la viabilidad y especificidad de los oligonucleótidos se realizaron reacciones de PCR a dos temperaturas de disociación (58 y 60 °C) sobre RNA de un organismo control. El control positivo de la reacción empleado en la reacción en cadena de polimerasa fue GAPDH con sus oligonucleótidos respectivos diseñados previamente en el laboratorio.

Para observar los resultados de la PCR se hicieron migraciones electroforéticas en gel de agarosa al 2.5% utilizando el marcador molecular (Gene ruler) de 50 pb y GAPDH como control.

Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se descongeló aproximadamente 1 cm³ de hígado de tres organismos de cada grupo experimental (Tabla 2) para extraer el RNA mediante un protocolo con fenol ácido y buffer AE (Apendice B).

A continuación, se midió la absorbancia del RNA obtenido por espectrofotometría, empleando una longitud de onda de 260 nm. y para calcular su concentración mediante la siguiente fórmula

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{absorbancia}) (\text{dilución}) (\text{constante } (0.040))$$

El RNA extraído de cada uno de los tejidos, se utilizó como molde para la síntesis de DNA complementario (DNAc) utilizando transcripción reversa (rT PCR) bajo las siguientes condiciones:

- a) Desnaturalización del RNA a 65°C por 5 minutos con las concentraciones: RNA 1 µg, Random hexamers 1 µl, dNTP's 1 µl, H₂O DEPC cbp 5µl.
- b) Amplificación a 50°C por 90 minutos conteniendo buffer 5x, DTT 1 µl, RNAsa OUT 1 µl, Enzima reverso transcriptasa 1 µl y H₂O DEPC cbp 20 µl.

Evaluación de los productos mediante PCR punto final.

Una vez obtenido el cDNA se amplificaron las secuencias de las moléculas a evaluar (IL-18, IL-13, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX2, TLR4 y Nrf2, así como del gen control interno (GAPDH)) mediante PCR empleando Buffer 10x, MgCl₂ 1 μ l, dNTP's 1 μ l, 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos específicos (Fw y Rv como se muestra en la tabla 3), H₂O DEPC cbp 20 μ l, Taq polimerasa 1 unidad y 1 μ l de cDNA, bajo las siguientes condiciones:

A) Desnaturalización inicial a 94°C por dos minutos, B) 35 ciclos comprendiendo una desnaturalización a 94°C por treinta segundos, seguido de 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72°C, C) Extensión final a 72°C 5 minutos.

Para registrar la correcta síntesis de DNAc y su amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % utilizando la escalera molecular de 1kb.

PCR de tiempo real

Una vez obtenido el DNAc de cada uno los 6 grupos experimentales (N=3) se mantuvieron en refrigeración a -20°C hasta su utilización como templado en las reacciones de PCR en tiempo real o qPCR (*quantitative PCR*, por sus siglas en inglés). Cada muestra se trabajó por triplicado.

Antes de procesar las muestras experimentales se realizó una curva de disociación desde los 60 hasta los 95°C a intervalos de 3°C para determinar Ct a la cual comienzan a observarse los amplificadores deseados y con especificidad.

Para todos los casos se empleó una Master Mix 2x que contenía Sybr Green, Taq pol y MgCl₂ (Invitrogen), oligonucleótidos Fw y Rv 0.5 μ l de cada uno, cDNA 1 μ l y H₂O DEPC cbp 15 μ l según las especificaciones del fabricante.

Las condiciones de amplificación inicial fueron iguales para todas las moléculas: paso inicial de 15 min a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, seguidos por 1 min a 60°C,

para: IL-6, IL-18, Nrf2, Cox-2, Il-1 β , TLR-4, TNF- α y el control (GAPDH), mientras que IL-10 e IL-13 utilizaron una temperatura de elongación de 58 °C.

El análisis de la expresión génica relativa se realizó con los valores de Ct obtenidos de cada uno de los genes y de GAPDH como control interno (gen constitutivo) mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

Análisis estadístico

Después de la normalización de datos se utilizó el programa Graph Pad Prisma 6.0 para analizar la expresión relativa de los genes mediante el estadístico ANOVA de una entrada y la prueba de T; el valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

Evaluación de los parámetros bioquímicos

La adición de PA al 3% en la dieta durante 6 y 12 meses no modificó el peso corporal entre los grupos experimentales comparados con sus controles (Fig. 8), tampoco se modificaron significativamente los parámetros bioquímicos (Fig. 9) ni se identificaron cambios de lípidos (colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y LDL) tampoco en la glucemia (Figura 9a), efecto opuesto en el grupo con una dieta adicionada con 20% de PA, donde se observó un incremento significativo en el peso desde el segundo mes, así como un aumento significativo en las concentraciones séricas de colesterol LDL y triglicéridos (Figura 10a); con respecto a la cuantificación sérica de enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT y ALP) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas que establecieran evidencias de daño hepático (Figura 9b y 10b).

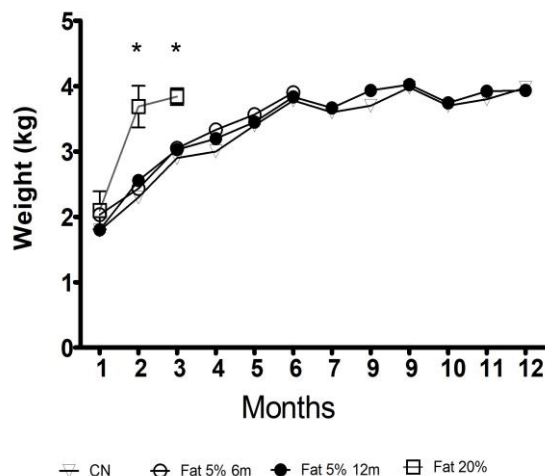


Figura 8. Registro de peso de los conejos sometidos a diferentes dietas. El peso corporal se midió mensualmente en los distintos grupos. Los datos se expresan como media \pm SD de 6 conejos por grupo.

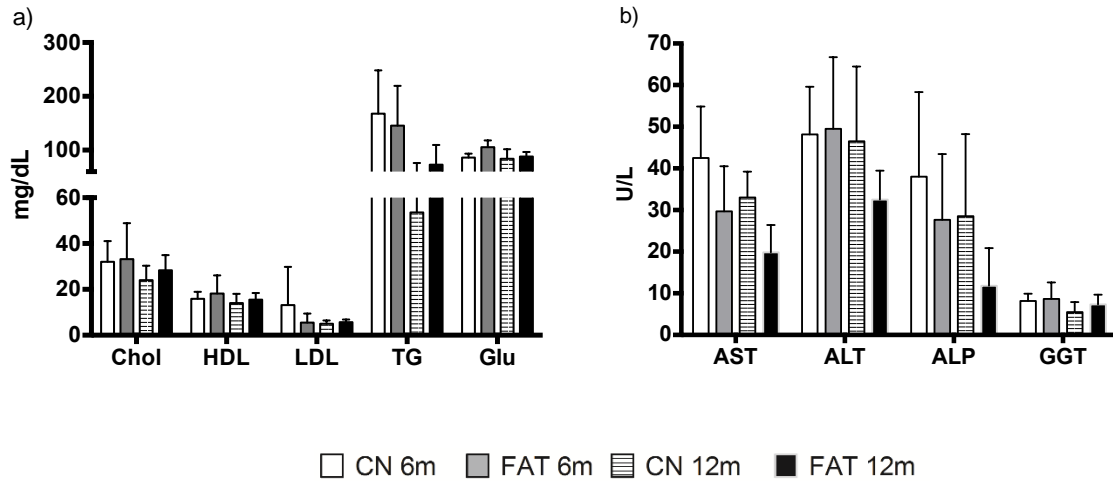


Figura 9. Parámetros bioquímicos en sangre de conejo con dieta adicionada con 3% de PA. Se analizaron en suero de animales a los 6 y 12 meses. a) Marcadores bioquímicos: colesterol total (Chol), colesterol HDL (HDL), colesterol LDL (LDL), triglicéridos (TG) y glucosa (Glu); b) Enzimas de daño hepático: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y gamma-glutamyl transferasa (GGT). Los datos se muestran como media \pm SD, $p > 0,05$ para todas las comparaciones CN vs FAT y 6m vs 12m.

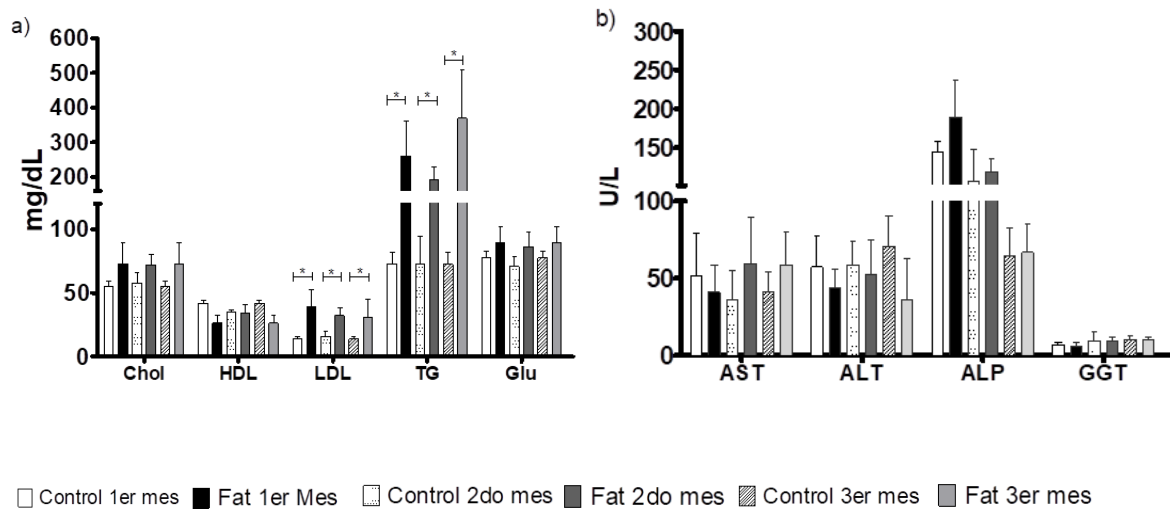


Figura 10. Parámetros bioquímicos en sangre de conejo con dieta adicionada con 20% de PA. Se analizaron en suero de animales durante 3 meses. a) Marcadores bioquímicos: colesterol total (Chol), colesterol HDL (HDL), colesterol LDL (LDL), triglicéridos (TG) y glucosa (Glu); b) Enzimas de daño hepático: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y gamma-glutamyl transferasa (GGT). Los datos se muestran como media \pm SD, $p > 0,05$.

Alteraciones morfológicas asociadas a la dieta con ácido palmítico.

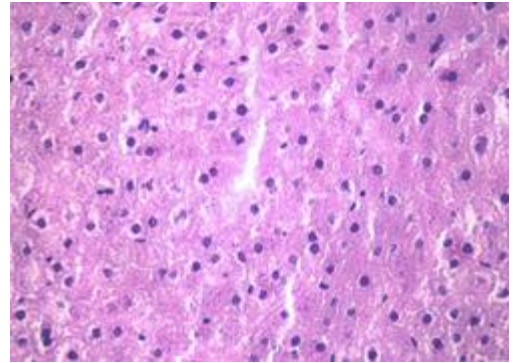
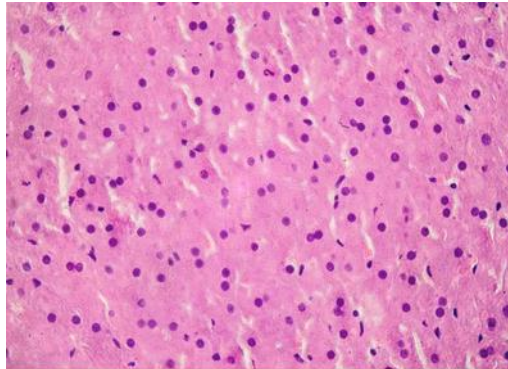
La infiltración grasa del hígado es una consecuencia frecuente de dietas con alto contenido de lípidos (más del 30% de lípidos)(AISF, 2017; Targher, Lonardo, & Byrne, 2017) una alteración que está relacionada con el desarrollo del hígado graso no alcohólico. Sin embargo, es importante señalar que se observaron alteraciones hepáticas mínimas con una dieta que se enriqueció con el 3% de la grasa total. A los 6 meses los cambios sugieren la presencia de lípidos en el citoplasma de células hepáticas, sin embargo, a los 12 meses se hace más evidente la presencia de hepatocitos con vacuolas grasas en su citoplasma, de conejos alimentados con dieta enriquecida en grasa (flechas en la figura 11).

Dieta adicionada con 3% de PA

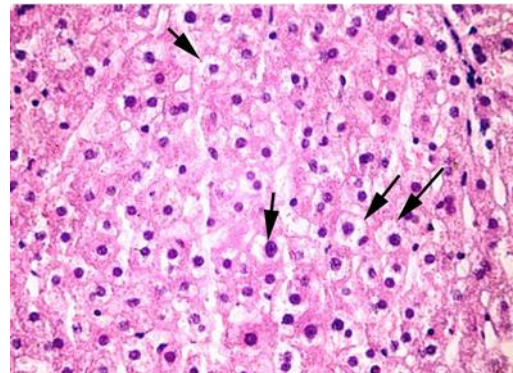
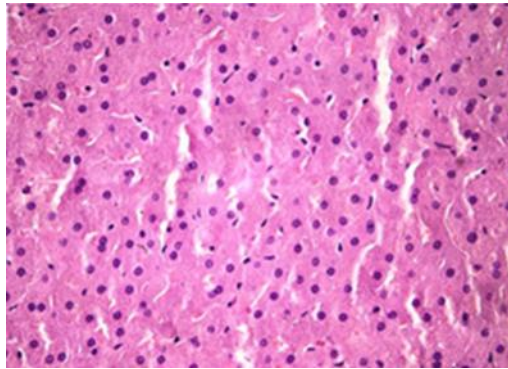
CN

FAT

6 meses



12 meses



Dieta adicionada con 20% de PA

3 meses

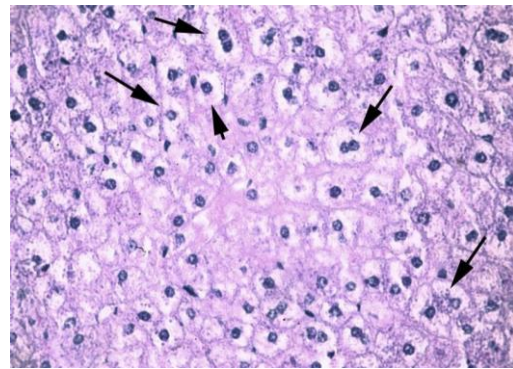
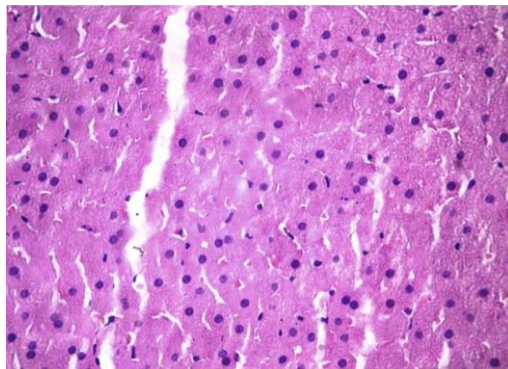


Figura 11. Morfología del hígado de conejo a los 6 y 12 meses con dieta adiciona con 3% de PA y 3 meses con dieta adiciona con 20% de PA. Los cortes de hígado del grupo de dieta regular de control (CN) y del grupo de dieta enriquecida con grasas (FAT) a los 6 y 12 meses, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las flechas indican hepatocitos con vacuolas intracelulares de lípidos, aumento de 40 X.

No hubo infiltración linfo-monocitaria evidente en los hígados de los diferentes grupos experimentales. Curiosamente, la única alteración observada después de un año de consumo de la dieta enriquecida en grasa fue la acumulación intracitoplasmática de lípidos en los hepatocitos, lo que indica que es una de las primeras alteraciones inducidas por un consumo moderado de grasa y se produjo antes de cualquier otra alteración metabólica. El porcentaje de hepatocitos con vacuolas de lípidos fue $13.8 \pm 3.8\%$ en FAT con 3% de PA animales en comparación con $4.6 \pm 1.0\%$ en el grupo de control (Figura 4, $p = 0.018$, prueba de t, con corrección de Welch). En el grupo de conejos con una dieta adicionada con 20% de PA, la cantidad de hepatocitos con gotas de lípidos fue más alta, alcanzando una media de $30.1 \pm 9.1\%$ frente a $3.0 \pm 3.0\%$ del grupo de control ($p = 0.0012$, prueba t) (Figura 12).

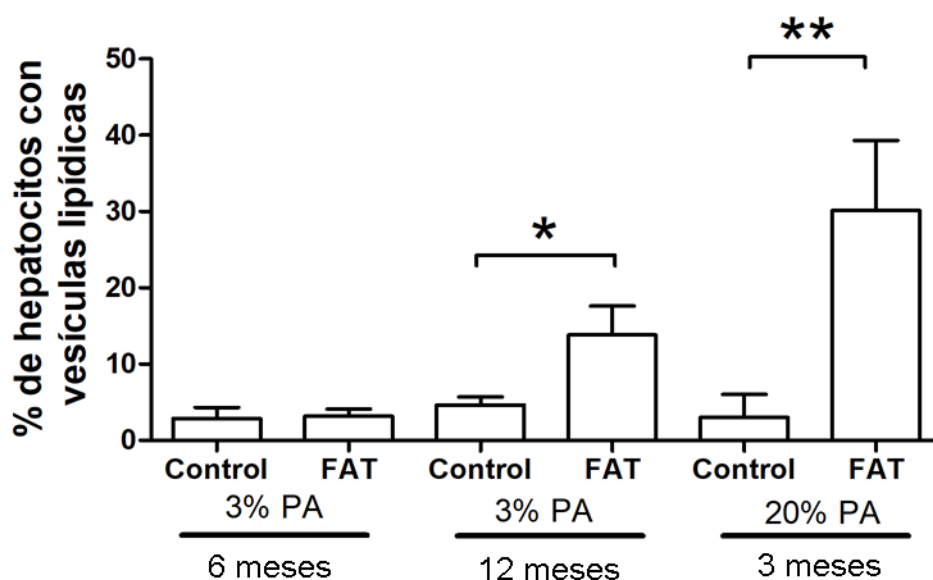


Figura 12. Porcentajes de hepatocitos con vacuolas lipídicas. Las secciones de hígado teñidas con hematoxilina y eosina se analizaron para determinar el porcentaje de hepatocitos con gotas de lípidos (flechas). Las diferencias se analizaron mediante la prueba t (* $p < 0.05$ y, ** $p < 0.01$).

Diseño de oligonucleótidos y estandarización.

Una vez encontradas las secuencias de los oligonucleótidos específicos (Tabla 3), se buscó su comprobación teórica en el algoritmo BLAST como se mencionó anteriormente. Ya que resultaron idóneas se procedió a solicitar su síntesis (Sigma-Aldrich).

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas.

Gen		Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
TNF- α	Forward	AGGTTGTCTCACTAATGCTGA	118
	Reverse	AGTCTTTATTTCTCGCCACTG	
IL-6	Forward	GACCTGCCTGCTGAGAATC	105
	Reverse	ATGCTGACCCTGGTGTTTTC	
IL-13	Forward	CATTGCTGTGACCTGCCTT	139
	Reverse	CTGGTTGTGTGTGATGTTGA	
IL-18	Forward	CCTCTCTGTGAAGTGTAAGAA	133
	Reverse	AAGTATCCGTCATACAATGAAG	
IL-1 β	Forward	TTGAAGAAGAACCCGTCCTCTG	128
	Reverse	CTCATACGTGCCAGACAACACC	
COX-2	Forward	TTGACCAGTACAAGTGCGAC	132
	Reverse	AGTGCGTAAGGATGTAGTGC	
IL-10	Forward	CTCCCCTGTGAAAACAAGAG	185
	Reverse	TCCTAGACTCTAGCCGAGTT	
TLR-4	Forward	GTGGTATCTTTTGCTGTAGTT	124
	Reverse	TTCTCACCCAGTCCTCATCC	
Nrf2	Forward	AGATGAAGAGACAGGTGAAAT	139
	Reverse	GGCTGGGAGTATCAGGAAC	
GAPDH	Forward	CCATGACTGCCACCCAGAAA	109
	Reverse	GGGATCGTCGTGACCACGTC	

Para demostrar que el diseño de los oligonucleótidos era el correcto y capaz de identificar los genes que codifican moléculas promotoras de inflamación de interés en el presente proyecto, fue necesario implementar un modelo inflamatorio agudo. A un conejo de 2 kg de peso, se le administro por vía subcutánea una dosis de lipopolisacarido (LPS) a una concentración de 0.1mg/kg de peso (Masaki 2004). Pasadas 6 hrs se procedió a la aplicación intraperitoneal de una dosis para anestesia profunda de pentobarbital sódico, para la extirpación del hígado, la extracción del RNA y síntesis de DNAc. Posteriormente, con el DNAc obtenido, se realizó la PCR-punto final para estandarizar la temperatura de alineación y se encontró que las moléculas: IL-6, IL-18, Nrf2, Cox-2, IL-1 β , TLR-4 y TNF- α requieren una temperatura de alineación de 60 °C, mientras que para IL-10 e IL-13, se utilizaron 58 °C y por migración electroforética en gel de agarosa al 2.5% se comprobaron los resultados, demostrando que los oligonucleótidos diseñados amplificaron un solo producto, con ausencia de fragmentos inespecíficos. De esta forma se demostró la especificidad para cada uno de los genes de interés (Figura 13).

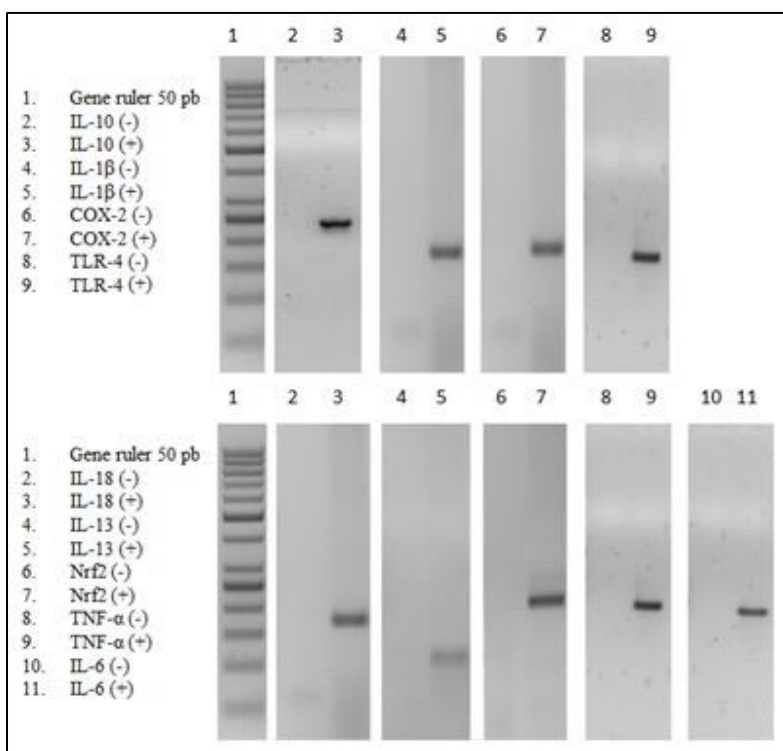


Figura 13. Validación de la amplificación específica de los oligonucleótidos mediante PCR punto final en gel de agarosa al 2.5%.

Obtención del DNAc y su comprobación

Una vez concluido el diseño y validación de los oligonucleótidos planeados para este proyecto, se procedió a realizar la extracción y cuantificación de RNA para realizar la síntesis del DNAc por transcripción reversa y amplificación del gen control GAPDH por PCR punto final de todos los tejidos de grupos controles y experimentales, esto para demostrar que los proceso de retrotranscripción fue correcto (Figura 14). Una vez demostrada la especificidad de la reacción, el DNAc se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso para las pruebas de PCR en tiempo real.

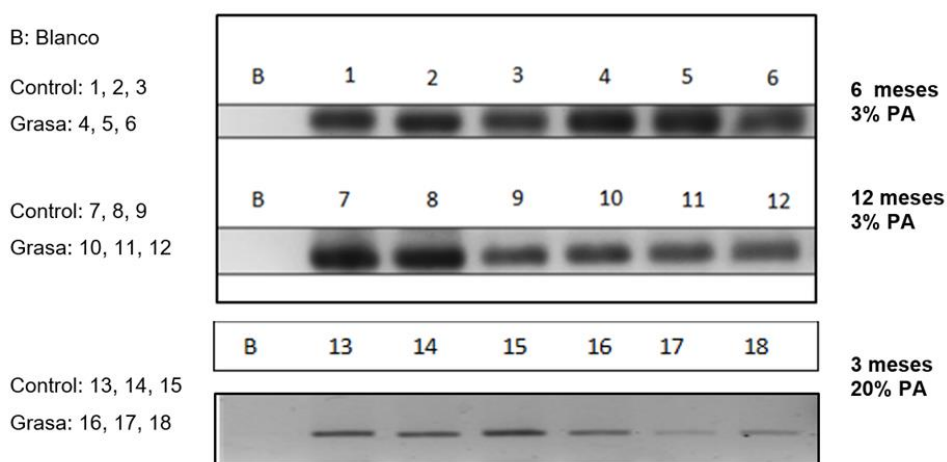


Figura 14. Validación de la síntesis de DNAc, mediante la amplificación del gen control GAPDH por PCR punto final en gel de agarosa al 2.5%.

Curvas de disociación

Se realizaron las curvas de disociación en intervalos de 3 unidades desde los 60 hasta los 95°C de los oligonucleótidos diseñados para IL-10, IL-1 β , COX2, TLR-4, IL-18, IL-13, Nrf2, TNF- α e IL-6, así como del gen control interno GAPDH, se identificaron los fragmentos amplificados del DNAc partiendo de la temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés melting temperature), que es específica para el fragmento amplificado que se está buscando; estos resultados se obtienen a partir de las curvas de disociación (Figura 15), donde se observa un solo pico de disociación, así como la ausencia de picos secundarios que pudieran corresponder a dímeros de los oligonucleótidos o fragmentos inespecíficos para cada par de oligonucleótidos. Haber conseguido estos resultados, significa que la amplificación del producto es específica.

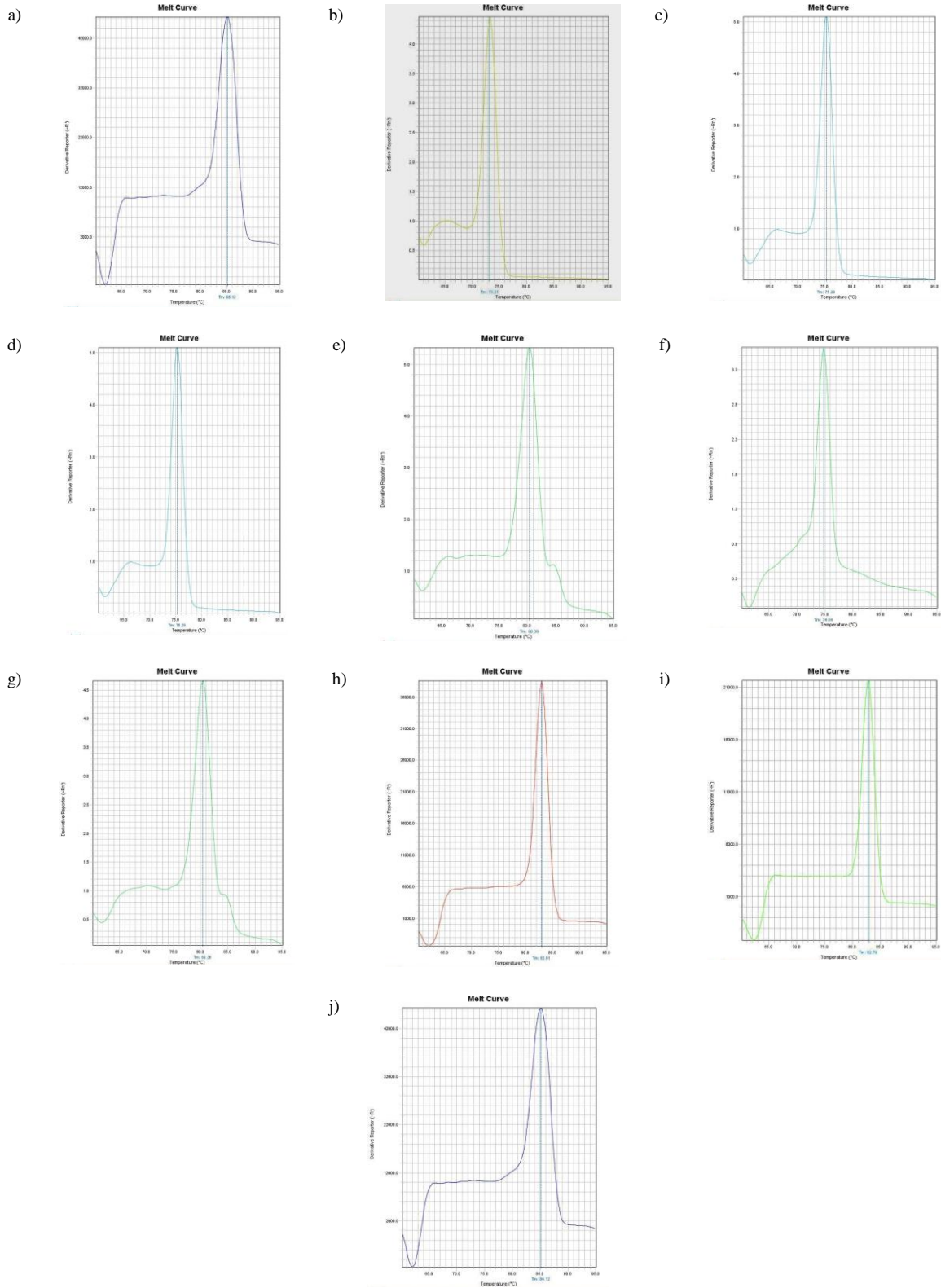


Figura 15. Curva de disociación o *melt curve*. a) IL-10, b) IL-1 β , c) COX-2, d) TLR-4, e) IL-18, f) IL-13, g) Nrf2, h) TNF- α , i) IL-6 y j) GAPDH.

Expresión relativa

Comprobada la especificidad y la temperatura de disociación se utilizó el DNAc de todos los grupos experimentales, para evaluar la expresión relativa de IL-10, IL-1 β , COX2, TLR4, IL-18, IL-13, Nrf2, TNF- α e IL-6, comparados con la expresión del gen de control GAPDH, mediante RT-qPCR.

Antes de realizar el análisis estadístico, todos los resultados se normalizaron con los datos de cada uno de los genes por separado, utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen, 2008) como se indica en la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_g - \Delta Ct_c$$
$$\Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{GAPDH})$$

En donde: *g*, es el grupo con el tratamiento de *grasa*. *c*, es el control. *gen*, cualquiera de los genes en estudio. *GAPDH*, gen constitutivo utilizado como control interno. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar.

La expresión de IL-13, IL-18, TNF- α , y Nrf2 a los 6 meses de tratamiento con dieta adicionada con 3% de PA (figura 16 a y b) muestran un notable incremento en su expresión. Este fenómeno cambia significativamente a los 12 meses de tratamiento, en particular con las moléculas IL-18, Nrf2 y TNF- α , en las cuales se observa una disminución estadísticamente diferente, tendencia que no fue observada con la IL-13, ya que esta mantuvo sus niveles de expresión sin cambios. Curiosamente la expresión de IL-1 β , TLR-4, COX-2, así como, de IL-6 e IL10 no mostraron incremento en su expresión a los 6 meses de tratamiento, sin embargo en TLR-4 y COX-2 se observó un aumento significativo a los 12 meses de tratamiento (figura 16 b).

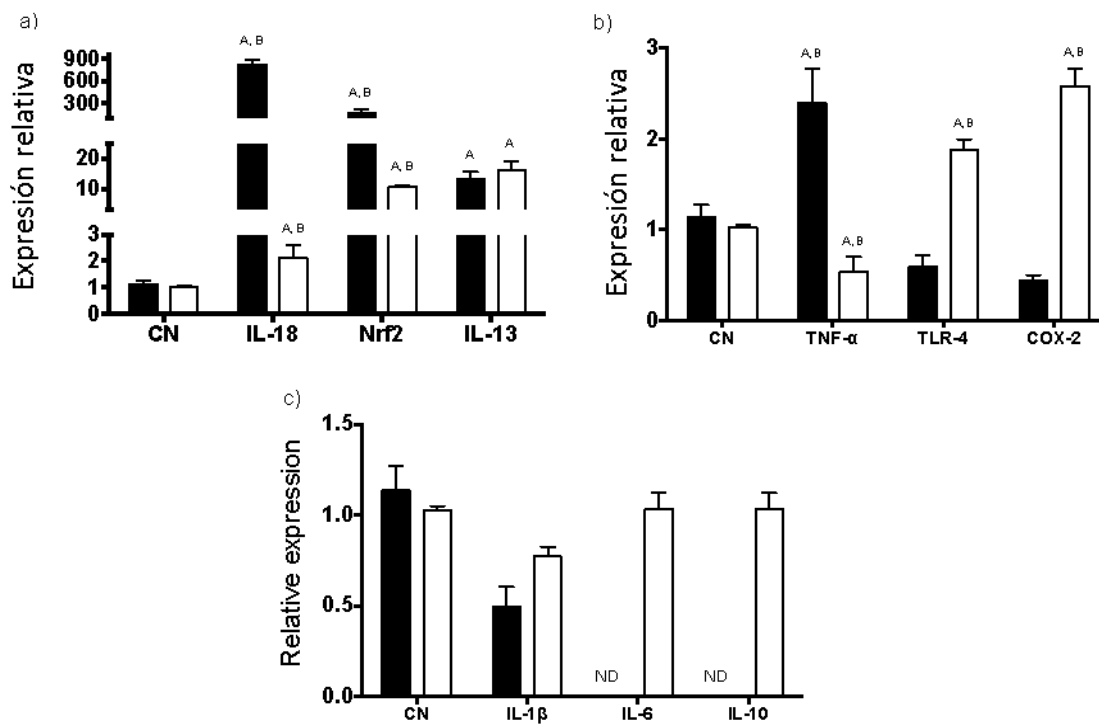


Figura 16. Expresión relativa del mRNA. Los resultados se agruparon intentando respetar una lógica biológica: a) Moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio / oxidativo; b) y c) moléculas relacionadas con el desarrollo de inflamación secundaria al consumo de PA. Todos los resultados se normalizaron a GAPDH y se expresaron como unidades arbitrarias. Los datos se muestran como media \pm SD. Grupo de 6 meses (barras negras), 12 meses (barras blancas), A: $p < 0,05$ Control (CN) versus Moléculas, B: $p < 0,05$, 6 meses vs 12 meses y ND: no detectable.

Con relación al modelo que recibió dieta adicionada con 20% de PA (Figura 17), se observa incremento estadísticamente significativo de IL-18, Nrf2, TLR-4, COX-2, TNF- α , IL-1 β e IL-6 tras el tratamiento por 3 meses, tendencia que no se observó en IL-13 e IL-10.

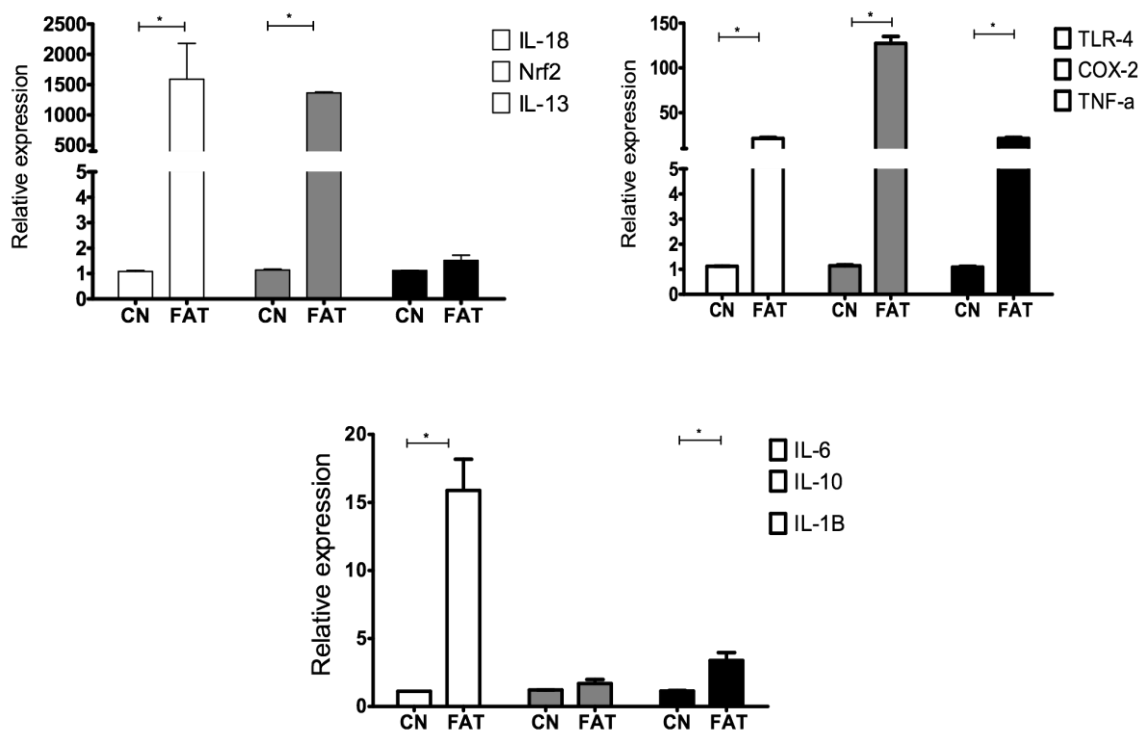


Figura 17. Expresión relativa del mRNA. Los resultados se agruparon intentando respetar una lógica biológica: a) Moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio / oxidativo; b), c) moléculas relacionadas con el desarrollo de inflamación secundaria al consumo de PA. Todos los resultados se normalizaron a GAPDH y se expresaron como unidades arbitrarias. Los datos se muestran como media \pm SD. CN= Control vs FAT= Dieta Adicionada 20% con PA, *: p < 0,05.

Finalmente, en un intento de resumir nuestros resultados (Figura 15), se construyó un gráfico que ilustra la relación entre la expresión génica del hígado y la duración de la dieta, con el fin de visualizar diferentes ópticas y sus posibles interacciones entre el proceso oxidativo/inflamatorio, causado por el consumo crónico de PA.

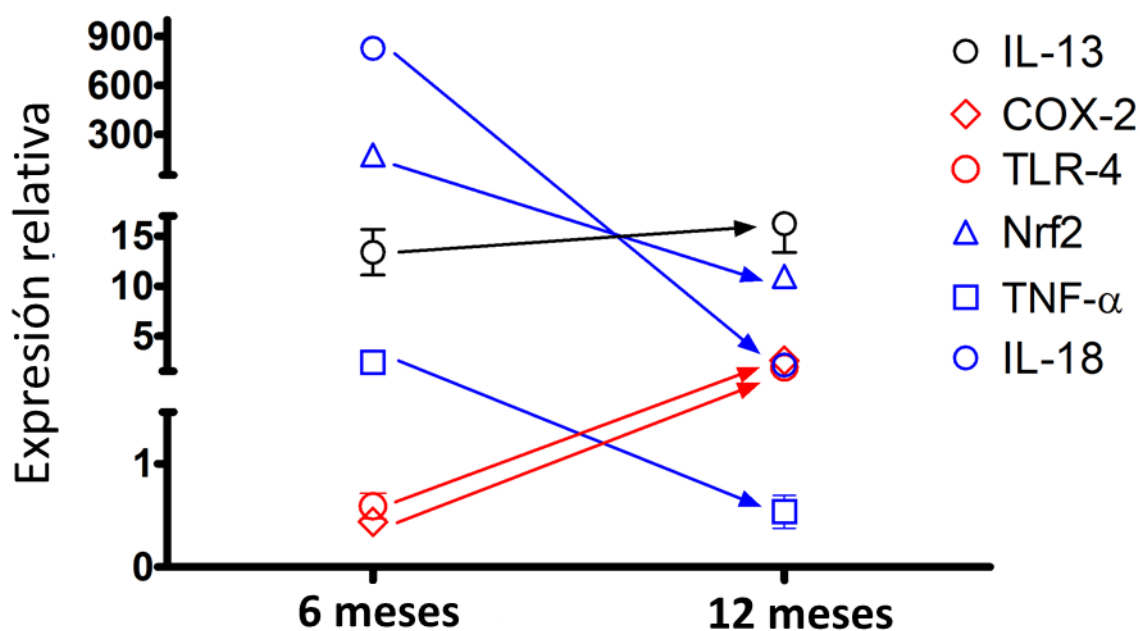


Figura 18. Cambio en la expresión relativa de mRNA de las moléculas proinflamatorias a los 6 y 12 meses de dieta enriquecida con PA. Las flechas rojas indican una mayor expresión (TLR-4 y COX-2), la flecha azul indica una disminución (IL-18, TNF- α y Nrf2) y la flecha negra no cambia. Las comparaciones son de cambios entre 6 vs 12 meses de dieta

Discusión

El modelo experimental de este proyecto tuvo como objetivo principal, evaluar los efectos sobre el hígado por el consumo crónico de una dieta adicionada con 3% de ácido palmítico, elemento que consideramos forma parte importante en el complejo y progresivo fenómeno inflamatorio hepático, órgano clave del metabolismo de lípidos y la respuesta inmunológica; éste, se ve afectado principalmente por el depósito ectópico de grasa. Adicionalmente y en paralelo, se decidió trabajar otro grupo de conejos, midiendo los mismos parámetros, pero adicionando a la dieta 20% de ácido palmítico, de esta manera comparamos y verificamos nuestros hallazgos, es decir, el consumo agudo de PA causó un aumento en el peso corporal, hipertrigliceridemia, esteatosis hepática, estado proinflamatorio y alteraciones en el estado redox.

Diferentes estudios relacionan las dietas ricas en lípidos con el incremento del tejido adiposo, el desarrollo de sobrepeso y obesidad, condiciones que producen en sangre; la elevación de triglicéridos, disminución de colesterol HDL, elevación de colesterol LDL y elevación de la glucosa; el sobrepeso es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Estas enfermedades crónicas, resultan de una intrincada combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales, el común denominador que provoca estos trastornos son dietas hipercalóricas con disminución del gasto de la energía que proporcionan. Las consecuencias lamentables son las defunciones de 40 millones de personas cada año, lo que equivale al 70% de las muertes que se producen en el mundo; Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las muertes por ECNT (17,7 millones cada año), seguidas del cáncer (8,8 millones), las enfermedades respiratorias (3,9 millones) y la diabetes (1,6 millones), estos cuatro grupos de enfermedades son responsables de más del 80% de todas las muertes prematuras asociadas con ECNT. Se ha encontrado que las personas obesas mueren antes que los individuos de peso normal, al igual que los fumadores y los no fumadores, respectivamente (OMS, 2018).

En este sentido, EHGNA es la causa más común de enfermedad hepática crónica en todo el mundo; algunos factores asociados a estas condiciones son: la composición dietética, la obesidad, la resistencia a la insulina, la predisposición genética y el estilo de vida sedentario

((AISF), 2017; Berlanga et al., 2014; C.E. & J.E., 2004). A pesar de que EHGNA está fuertemente asociado con la obesidad y el síndrome metabólico, hay una proporción de pacientes que no son obesos y aun así, desarrollan esta enfermedad. Este grupo de individuos no se identifica fácilmente porque, además de no tener obesidad, la mayoría de los pacientes son asintomáticos o tienen manifestaciones clínicas inespecíficas. Hay algunos factores que se han asociados con el riesgo de desarrollar EHGNA en no obesos; sin embargo, los mecanismos fisiopatogénicos del desarrollo y progresión de la enfermedad aún no están claros. Destaca el nivel sérico elevado de triacilglicerol como único analíto asociado con la gravedad de la enfermedad en pacientes no obesos (Leung et al., 2017). Este proyecto propuso estudiar el impacto de la ingesta crónica de dieta rica en grasa, utilizando un modelo experimental con conejos, el empleo de conejo se debe a que, éste animal presenta un perfil de lípidos muy semejante al de los humanos, inclusive ha sido propuesto como un modelo de estudio para la aterosclerosis y EHGNA (X. Li et al., 2011; Van Herck et al., 2017). Como se mencionó anteriormente, hoy en día, la industria hace uso del ácido palmítico en la preparación de una gran cantidad de alimentos, por lo que es difícil conocer la cantidad de consumo diario de este ácido graso, en este sentido, nuestra propuesta consiste en conocer y mostrar los cambios de consumo crónico de una dieta enriquecida con dosis bajas de ácido palmítico. En nuestro modelo el consumo crónico (12 meses) de una dieta adicionada con PA no produjo alteraciones en el peso, función hepática o parámetros bioquímicos como colesterol-HDL, colesterol-LDL, TG y Glu. Sin embargo, encontramos una acumulación de TG en el hígado, lo que indica la inducción de hígado graso, difícil de precisar por estar en la etapa inicial. Sin embargo, el porcentaje de hepatocitos (13.8%) con gotas de lípidos evidentes corresponde a esteatosis de grado incipiente (J. M. Monteiro, Monteiro, Caroli-Bottino, & Pannain, 2014). En comparación, los conejos con una mayor ingesta de grasa (20%) desarrollaron hígado graso mucho antes, mayor esteatosis y algunas alteraciones metabólicas como niveles elevados de TG y colesterol-LDL, lo que indica que la cantidad de grasa ingerida se relacionó con la cantidad de gotas de lípidos en el hígado además de otras alteraciones metabólicas. Con todos estos criterios podría concluirse que la adición de 3% de PA a la conejina empleada en este proyecto no produce alteraciones e inclusive, coincide con las cantidades recomendadas por la OMS y otras organizaciones internacionales de salud para el consumo humano (menos del 10% de la ingesta diaria de energía y menos del 7%

para los grupos de alto riesgo) (World Health Organization, 1990), sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que no es necesario esperar que la dieta genere sobrepeso, tampoco modificaciones en pruebas bioquímicas de lípidos, glucosa ni daño hepático, ya que sí existen alteraciones histológicas, lo que nos indica que el hígado graso parece ser una de las primeras alteraciones observadas en dietas ricas en grasa, ya que los conejos alimentados con 3% de PA presentaron esteatosis hepática incipiente a los 12 meses, sin evidencia de infiltración linfocitaria o fibrosis.

La hipótesis de esta tesis doctoral y el planteamiento de los objetivos, son congruentes con la metodología experimental diseñada, para estudiar los cambios moleculares involucrados del fenómeno inflamatorio, es obvio que la investigación de trastornos metabólicos complejos como se considera a la inflamación provocada por ingesta de dieta hipercalórica, que motiva el presente trabajo, requiere de una investigación continua para entender con mayor precisión los fenómenos relacionados en con su origen y desarrollo. La interpretación, análisis y conclusiones que a continuación describo, son resultado de documentación, discusiones y reflexiones de los resultados sobre los cuales seguramente habrá opiniones pendientes por incluir.

En la figura 16 se muestran las cuantificaciones de los transcritos, de las 9 moléculas estudiadas a los 6 y 12 meses de estudio. La manera de agrupar las moléculas de cada gráfico permite referirse a cada molécula de manera aislada o en cualquier momento asociarlas entre sí, o bien proponer diferencias con los tiempos e inclusive elaborar una o más propuestas que explique los posibles mecanismos fisiopatogénicos.

Interleucina 18 (IL-18) es una pleiotrópica y peculiar citocina, potente inductora de inflamación, su expresión regula la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12. La IL-18 la producen células del sistema inmune (LT, LB, Macrófago, células dendríticas, células de Kupffer) o en células no inmunes (hepatocitos, queratinocitos y osteoblastos entre otras). La capacidad pleiotrópica de la citocina se presenta cuando estimula a linfocitos T vírgenes (TH0), ya que puede dirigir la diferenciación hacia TH1 o TH2, en ambos casos el resultado final es inflamación con daño tisular, aunque el mecanismo de esta dualidad, no esté completamente descrito y nuestros resultados no nos permiten esbozar una hipótesis de que tipo de respuesta presentaron los conejos TH1 o TH2 (Nakanishi, Yoshimoto, Tsutsui, & Okamura, 2001). Lo cierto es que, en el gráfico a) de la figura 16 se muestra el incremento del transcrito de IL-

18, en 827 veces mayor que el control, ésta enorme diferencia probablemente se deba a que participen diferentes poblaciones celulares capaces de producir la citocina, o que la cronicidad del estímulo que la genera se mantiene. En mi opinión, el factor que determina estas modificaciones es la dieta adicionada de PA durante 6 meses. Para recordar, todos los valores de los transcritos son expresados como la media \pm SD de 3 organismos y verificados en experimentos por triplicado. Mi propuesta siguiente es, considerar el componente b) de la figura 16 en donde, se destaca el incremento del transcrito de TNF- α a 2.3 unidades, es decir solo 1.3 veces más que el control y que probablemente se deba a la actividad proinflamatoria de IL-18, llama la atención que la cantidad de transcrito de IL-1 β disminuya a la mitad y que la IL-6 e IL-10 ni siquiera son detectables, las citocinas 1- β y 6 se esperaría que estuvieran aumentadas, como una respuesta ante la inflamación. Respecto a Nrf2 es la molécula que presenta la segunda mayor modificación en ésta investigación, sus transcritos están 174 veces mayor que su control, retomando la lógica biológica, la cantidad de moléculas producidas debe estar asociada a la importancia de participación en el proceso biológico en curso, sí consideramos que en éste modelo experimental, el único parámetro con variabilidad es la dieta, su temporalidad (6 y 12 meses) y magnitud (adición de 3% PA Vs. 20%) los resultados deben tener correlación. En éste contexto, reconocemos a Nrf-2 como regulador central de la respuesta adaptativa contra el estrés oxidativo e inflamatorio porque interactúa con el elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; W. Li & Kong, 2009). En condiciones fisiológicas las células deben desarrollar programas dinámicos que les permitan contender contra los diferentes citotóxicos, por ejemplo, ERO, ERN (Especies Reactivas de Oxígeno, Nitrogeno) o numerosas enzimas derivadas de la familia de citocromos P450, los procesos oxidativos y reductores son muy complejos, tanto como para haber involucrado los productos de más de 100 genes (Königsberg Fainstein, 2007).

En nuestro modelo, encontramos un aumento significativo en la expresión de Nrf-2 después de 6 y 12 meses de administración de la dieta adicionada con 3% de PA. Estos resultados sugieren que la ingesta moderada de PA induce estrés oxidativo en el tejido hepático. Además, Nrf-2 participa en el metabolismo de los ácidos grasos hepáticos, reprimiendo la expresión de enzimas clave implicadas en la síntesis de ácidos grasos (Chambel et al., 2015; Tang et al., 2014). Por lo tanto, Nrf-2 parece proteger al hígado contra la esteatosis al inhibir la lipogénesis y junto con IL-13 e IL-18, disminuyen las alteraciones metabólicas inducidas

por la dieta con 3% de PA. Estos mecanismos que podrían ser identificados como “de protección”, se modifican radicalmente o tienen una función diferente, ya que en los conejos alimentados con 20% de PA se observa, el desarrollo de obesidad y criterios del síndrome metabólico.

TNF- α se identifica como la cuarta molécula que presenta modificaciones con significancia estadística, 1.3 veces mayor cantidad de transcritos que su control a los 6 meses, en teoría habría de tener mayor expresión e inclusive al año disminuyen los transcritos debajo de su control (0.5), sin embargo no hay duda de que participa en el fenómeno inflamatorio, cuando observamos el modelo que recibió 20% de PA durante 3 meses, el incremento de los transcritos de TNF- α , es 20 veces mayor que el control, resulta obvio que la cantidad de grasa ingerida genera la expresión de la molécula.

La tercera molécula en importancia por su cantidad de transcritos identificados es IL-13, esta citocina producida por LT y otras células que participan tanto en su producción como en sus acciones biológicas efectoras; (eosinófilo, basófilo, mastocito, célula epitelial, muscular lisa, fibroblasto y macrófago tisular). La producción de IL-13 requiere de una intrincada y armónica red funcional de citocinas (IL-4, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α y TGF- β), clásicamente se reconoce por su actividad sobre LB y monocitos, donde dirige la sobreexpresión de moléculas HLA-II, sin lugar a dudas es la molécula con la mayor capacidad para disminuir la expresión de moléculas proinflamatoria (Wynn, 2003) y probablemente explique la disminución de IL-1 β , IL-6, TLR4, Cox-2 del lote de animales de 6 meses con 3% de PA e inclusive la discreta elevación de IL-1 β del modelo con 20% de PA. Destacamos que IL-13 participa estrechamente en la síntesis de IgE y obviamente en humanos las enfermedades alérgicas del tubo digestivo y vías respiratorias, también en los mecanismos protectores frente a parásitos intestinales, en nuestro modelo no hay manera de establecer correlaciones. Con respecto al comportamiento de los transcritos de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en ambos tiempos con la dieta adicionada de 3% de PA, prácticamente no hay cambios significativos. En los organismos que recibieron 20% de PA, a pesar de que, solo se les proporcionó durante 3 meses, el incremento de IL-18 es 1,588 veces mayor a su control, de Nrf2 son 1,362 veces mayor y de TNF- α son 20 veces mayor, estas tres citocinas pueden explicar la inflamación que traducen el incremento de 15 veces la IL-6, 20 veces TLR-4 y

126 veces la Cox-2, de esta manera se organiza la perpetuación y retroalimentación de la inflamación en el hígado que llevará a mayor daño tisular.

En la literatura se reportan datos utilizando diferentes modelos experimentales (nock-out) y algunos de sus resultados pueden ser extrapolados para fortalecer nuestros hallazgos, por ejemplo: a) ratones que carecían de IL-18 desarrollaron obesidad y síndrome metabólico (Netea et al., 2006). b) ratones con dieta rica en grasas, se activa el inflammasoma NLRP1, aumentando la producción de IL-18 y previniendo la obesidad y el síndrome metabólico (Murphy et al., 2016), por lo tanto la regulación al alza en la expresión de IL-18 en nuestro modelo podría ser una respuesta protectora desencadenada por el aumento en la absorción de energía, a fin de mantener la homeóstasis metabólica. En nuestras manos la disminución de expresión de IL-18 después de un año con dieta enriquecida 3% en grasa, podría ser un mecanismo de regulación inmune para evitar efectos citotóxicos de ésta citocina sobre hepatocitos (Finotto et al., 2004). Sin embargo cuando analizamos el modelo que recibe 20% de PA, el incremento de IL-18 hasta 1588 veces, no impide que desarrollen dislipidemia (altos niveles de TG y colesterol LDL) ni tampoco evita aumento del peso corporal, en éstas condiciones el mecanismo regulatorio de Nrf2 con todo y las 1362 veces mayor de transcritos, no logra contener la inflamación y aumentan TLR-4, Cox2, TNF- α e IL-6 y en histología se hace más evidente la esteatosis hepática.

También se reporta que IL-18 aumenta la expresión de TNF α e IL-13 en hígado y leucocitos, en ratones deficientes en IL-18 tenían niveles reducidos de ambas citocinas en hígado (Hoshino, Wiltout, & Young, 1999; Lana et al., 2016). Nosotros observamos en el modelo con 3% de PA, que en fase crónica (un año), IL-18 disminuyó 825 veces y la expresión de TNF- α también disminuyó cerca de los niveles basales, estos resultados nos muestran que no conocemos todos los mecanismos implicados en la expresión de TNF α . Sabemos que estimula acumulo de lípidos en el hígado y que ha sido propuesto como mediador en la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica en modelos de pacientes y animales (Haukeland et al., 2006; Kakino et al., 2017; Manco, Marcellini, Giannone, & Nobili, 2007), de acuerdo a nuestros resultados TNF α parece tener mayor congruencia con la cantidad de grasa en la dieta. TLR-4 tiene un comportamiento parecido a TNF α , sus modificaciones se hacen más evidentes en relación a la cantidad de grasa, pese a que, se ha informado que los

ratones KO en TLR-4 tienen menor cantidad de alteraciones hepáticas bajo dieta alta en grasas, en el inicio de EHGNA (Ferreira et al., 2015; J. Liu et al., 2014). Por otro lado, se sabe que el PA y otros ácidos grasos saturados estimulan respuestas proinflamatorias en las células inmunes humanas a través de TLR4 (Nicholas et al., 2017; Rogero & Calder, 2018), en este sentido es posible que la administración crónica favorezca el desarrollo de un fenómeno inflamatorio a través de TNF- α y ciclooxigenasa (COX-2). Además, el nivel de expresión de TLR-4 es significativamente mayor en sujetos con esteatohepatitis no alcohólica en comparación con hígado graso no alcohólico (Sharifnia et al., 2015). Se ha reportado que la activación de COX-2 es importante en el desarrollo de resistencia a insulina e hígado graso en obesidad inducida por alto consumo de grasa en ratas y ratones (Hsieh et al., 2009; Tsujimoto et al., 2016), aparentemente por el papel en la transición a EHGNA (J. Chen et al., 2011). En nuestro modelo la expresión de COX-2 por la ingesta crónica de 3% de PA tiene poco significado, pero cuando se compara contra los organismos con consumo elevado de PA (20%), se observa un incremento de 126 veces más que su control y muy probablemente refleja la actividad inflamatoria del hígado.

Conclusión

En conclusión, demostramos que la esteatosis hepática fue una consecuencia temprana del consumo crónico de ácido palmítico, y estuvo acompañada de una respuesta inmune mediada por IL-18, TNF α e IL-13, así como la producción de Nrf-2, esta respuesta parece tener efectos protectores que impiden el desarrollo de trastornos metabólicos como la obesidad y el síndrome metabólico. En la dieta adicionada con 20% de PA, estos mecanismos fueron menos eficientes para retrasar la aparición de alteraciones metabólicas, pero aún atenuaron la progresión del daño hepático. Los conejos alimentados con una dieta adicionada con 3% o 20% de PA pueden ser usados como modelos de EHGNA en grupos no obesos y obesos, respectivamente, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad.

Referencias

- (AISF). (2017). AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 49(5), 471–483. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2017.01.147>
- Austin, G. L., Ogden, L. G., & Hill, J. O. (2011). Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971–2006. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 836–843. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000141>
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., & Rivera-Dommarco, J. A. (2013). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Publica de Mexico*, 55(SUPPL.2), 151–160.
- Basaranoglu, M., Basaranoglu, G., & Bugianesi, E. (2015). Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 4(2), 109–116. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.05>
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porrás, J. A., & Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, Vol. 7, pp. 221–239. <https://doi.org/10.2147/CEG.S62831>
- Bhurosy, T., & Jeewon, R. (2014). Overweight and obesity epidemic in developing countries: a problem with diet, physical activity, or socioeconomic status? *TheScientificWorldJournal*, 2014, 964236. <https://doi.org/10.1155/2014/964236>
- Bieghs, V., & Trautwein, C. (2013). The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease. *Trends in Immunology*, Vol. 34, pp. 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.005>
- Blüher, M. (2010). The distinction of metabolically “healthy” from “unhealthy” obese individuals. *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 21, pp. 38–43. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283346ccc>
- Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., ... Ruderman, N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. *Diabetes*, 54(12), 3458–3465. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.12.3458>
- Briggs, M., Petersen, K., & Kris-Etherton, P. (2017). Saturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Replacements for Saturated Fat to Reduce Cardiovascular Risk. *Healthcare*, 5(2), 29. <https://doi.org/10.3390/healthcare5020029>
- Bril, F., Barb, D., Portillo-Sanchez, P., Biernacki, D., Lomonaco, R., Suman, A., ... Cusi, K. (2017). Metabolic and histological implications of intrahepatic triglyceride content in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 65(4), 1132–1144. <https://doi.org/10.1002/hep.28985>

- Byun, J. S., & Yi, H. S. (2017). Hepatic Immune Microenvironment in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6862439>
- C.E., R., & J.E., E. (2004). Epidemiology of nonalcoholic fatty liver. *Clinics in Liver Disease*, 8(3), 501–519. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.04.008>
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in Physiology*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>
- Castro, A. M., Macedo-de la Concha, L. E., & Pantoja-Meléndez, C. A. (2017). Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 80(2), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.06.011>
- Cawley, J., Rizzo, J. A., & Haas, K. (2007). Occupation-specific absenteeism costs associated with obesity and morbid obesity. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 49(12), 1317–1324. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e31815b56a0>
- Cervera, S., & Campos, I. (2010). Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. ... *Médica de México*, 397–407. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2010/gm106g.pdf>
- Chalasan, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., & al, et. (2012). ... disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.25762/full>
- Chambel, S. S., Santos-Gonçalves, A., & Duarte, T. L. (2015). The dual role of Nrf2 in nonalcoholic fatty liver disease: Regulation of antioxidant defenses and hepatic lipid metabolism. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/597134>
- Chan, R. S. M., & Woo, J. (2010). Prevention of overweight and obesity: How effective is the current public health approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 7, pp. 765–783. <https://doi.org/10.3390/ijerph7030765>
- Chen, B., Zhao, J., Zhang, S., Wu, W., & Qi, R. (2012). Aspirin inhibits the production of reactive oxygen species by downregulating Nox4 and inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 59(5), 405–412.
- Chen, J., Liu, D., Bai, Q., Song, J., Guan, J., Gao, J., ... Du, Y. (2011). Celecoxib attenuates liver steatosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis induced by high-fat diet in rats. *Molecular Medicine Reports*, 4(5), 811–816. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.501>
- Choi, S., & Diehl, A. M. (2005). Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Current Opinion in Gastroenterology*, Vol. 21, pp. 702–707. <https://doi.org/10.1097/O1.mog.0000182863.96421.47>
- Chopra, M., Galbraith, S., & Darnton-Hill, I. (2002). A global response to a global problem: The epidemic of overnutrition. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(12), 952–958. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.000412>

- Cleasby, M. E., Reinten, T. A., Cooney, G. J., James, D. E., & Kraegen, E. W. (2007). Functional Studies of Akt Isoform Specificity in Skeletal Muscle *in Vivo*; Maintained Insulin Sensitivity Despite Reduced Insulin Receptor Substrate-1 Expression. *Molecular Endocrinology*, *21*(1), 215–228. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0154>
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Archives of Medical Science*, Vol. 9, pp. 191–200. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>
- Cusi, K. (2012). Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*, Vol. 142. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.003>
- Dixit, V. D. (2013). Adipose tissue macrophages are innate to the immunological awareness of adipose tissue. *Diabetes*, Vol. 62, pp. 2656–2658. <https://doi.org/10.2337/db13-0608>
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*, *3*(2), 785–797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Estadella, D., Da Penha Oller Do Nascimento, C. M., Oyama, L. M., Ribeiro, E. B., Dâmaso, A. R., & De Piano, A. (2013). Lipotoxicity: Effects of dietary saturated and transfatty acids. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/137579>
- Ferreira, D. F., Fiamoncini, J., Prist, I. H., Ariga, S. K., De Souza, H. P., & De Lima, T. M. (2015). Novel role of TLR4 in NAFLD development: Modulation of metabolic enzymes expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1851*(10), 1353–1359. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.07.002>
- Figueiredo, P. S., Inada, A. C., Marcelino, G., Cardozo, C. M. L., Freitas, K. de C., Guimarães, R. de C. A., ... Hiane, P. A. (2017). Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3390/nu9101158>
- Finotto, S., Siebler, J., Hausding, M., Schipp, M., Wirtz, S., Klein, S., ... Neurath, M. F. (2004). Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: A key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo. *Gut*, *53*(3), 392–400. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.018572>
- Foster, R., Williamson, C. S., & Lunn, J. (2009). Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin*, *34*(1), 4–47. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2008.01738.x>
- Gao, B., Jeong, W. II, & Tian, Z. (2008). Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*, Vol. 47, pp. 729–736. <https://doi.org/10.1002/hep.22034>
- Gómez-Hernández, A., Perdomo, L., Escribano, Ó., & Benito, M. (2013). [Role of white adipose tissue in vascular complications due to obesity]. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis: Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*, *25*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2012.11.003>
- Grant, R. W., & Dixit, V. D. (2015). Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity*, *23*(3), 512–518. <https://doi.org/10.1002/oby.21003>
- Guzik, T. J., Skiba, D. S., Touyz, R. M., & Harrison, D. G. (2017). The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular Research*, Vol. 113, pp. 1009–1023.

<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx108>

- Haukeland, J. W., Damås, J. K., Konopski, Z., Løberg, E. M., Haaland, T., Goverud, I., ... Aukrust, P. (2006). Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.02.011>
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 39, pp. 199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
- Hernández, E. Á., Kahl, S., Seelig, A., Begovatz, P., Irmler, M., Kupriyanova, Y., ... Roden, M. (2017). Acute dietary fat intake initiates alterations in energy metabolism and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(12), 695–708. <https://doi.org/10.1172/JCI89444>
- Hoshino, T., Wiltrout, R. H., & Young, H. a. (1999). IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>
- Hsieh, P. S., Jin, J. S., Chiang, C. F., Chan, P. C., Chen, C. H., & Shih, K. C. (2009). COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity*. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.674>
- Jenne, C. N., & Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nature Immunology*, Vol. 14, pp. 996–1006. <https://doi.org/10.1038/ni.2691>
- Ji, C., Chan, C., & Kaplowitz, N. (2006). Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. *Journal of Hepatology*, 45(5), 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.05.009>
- Juan Rivera, Mauricio Hernández, Carlos Aguilar, Felipe Vadillo, C. M. (2013). Obesidad en México: Recomendaciones para una Política de Estado. *Unam*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kakino, S., Ohki, T., Nakayama, H., Yuan, X., Otabe, S., Hashinaga, T., ... Yamada, K. (2017). Pivotal Role of TNF- α in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. *Hormone and Metabolic Research*, 1. <https://doi.org/10.1055/s-0043-118666>
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 47, pp. 1304–1309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035>
- Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2793–2807. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0149>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kim, D., & Kim, W. R. (2017). Nonobese Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.08.028>

- Kim, S., Choi, J., & Kim, M. (2013). Insulin resistance, inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease in non-obese adults without metabolic syndrome components. *Hepatology International*, Vol. 7, pp. 586–591. <https://doi.org/10.1007/s12072-012-9412-1>
- Kitteringham, N. R., Abdullah, A., Walsh, J., Randle, L., Jenkins, R. E., Sison, R., ... Park, B. K. (2010). Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *Journal of Proteomics*, 73(8), 1612–1631. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.03.018>
- Königsberg Fainstein, M. (2007). Nrf2: LA HISTORIA DE UN NUEVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN QUE RESPONDE A ESTRÉS OXIDATIVO. *REB*.
- Lana, J. P., Martins, L. B., Oliveira, M. C. de, Menezes-Garcia, Z., Yamada, L. T. P., Vieira, L. Q., ... Ferreira, A. V. M. (2016). TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*, 41(12), 1295–1302. <https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0265>
- Leung, J. C.-F., Loong, T. C.-W., Wei, J. L., Wong, G. L.-H., Chan, A. W.-H., Choi, P. C.-L., ... Wong, V. W.-S. (2017). Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Hepatology*, 65(1). <https://doi.org/10.1002/hep.28697>
- Li, W., & Kong, A. N. (2009). Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular Carcinogenesis*, Vol. 48, pp. 91–104. <https://doi.org/10.1002/mc.20465>
- Li, X., Liu, Y., Zhang, H., Ren, L., Li, Q., & Li, N. (2011). Animal models for the atherosclerosis research: A review. *Protein and Cell*, Vol. 2, pp. 189–201. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1016-3>
- Li, Z., & Diehl, A. M. (2003). Innate immunity in the liver. *Current Opinion in Gastroenterology*, Vol. 19, pp. 565–571. <https://doi.org/10.1097/00001574-200311000-00009>
- Li, Z., Soloski, M. J., & Diehl, A. M. (2005). Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 42(4), 880–885. <https://doi.org/10.1002/hep.20826>
- Liu, J., Zhuang, Z. jie, Bian, D. xue, Ma, X. jie, Xun, Y. hao, Yang, W. jun, ... Shi, J. ping. (2014). Toll-like receptor-4 signalling in the progression of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-fructose diet in mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 41(7), 482–488. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12241>
- Liu, K., & Czaja, M. J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death and Differentiation*, Vol. 20, pp. 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.63>
- Lobstein, T., & Baur, L. A. (2005). Policies to prevent childhood obesity in the European Union. *European Journal of Public Health*, Vol. 15, pp. 576–579. <https://doi.org/10.1093/eurpub/cki068>
- Ly, L. D., Xu, S., Choi, S. K., Ha, C. M., Thoudam, T., Cha, S. K., ... Park, K. S. (2017). Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Experimental and Molecular Medicine*, Vol. 49. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.143>

- Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orru, S., & Buono, P. (2015). Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*, *20*(9), 17339–17361. <https://doi.org/10.3390/molecules200917339>
- Manco, M., Marcellini, M., Giannone, G., & Nobili, V. (2007). Correlation of serum TNF-?? levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Clinical Pathology*, *127*(6), 954–960. <https://doi.org/10.1309/6VJ4DWGYDU0XYJ8Q>
- Marangoni, F, Galli, C., Ghiselli, A., Lercker, G., La Vecchia, C., Maffei, C., ... Poli, A. (2017). Palm oil and human health. Meeting report of NFI: Nutrition Foundation of Italy symposium. *Int J Food Sci Nutr*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1278431>
- Marangoni, Franca, Galli, C., Ghiselli, A., Lercker, G., La Vecchia, C., Maffei, C., ... Poli, A. (2017). Palm oil and human health. Meeting report of NFI: Nutrition Foundation of Italy symposium. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *68*(6), 643–655. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1278431>
- Martínez Espinosa, A. (2017). La consolidación del ambiente obesogénico en México. *The Consolidation of the Obesogenic Environment in Mexico.*, *27*(50), 112–129. <https://doi.org/10.24836/es.v27i50.454>
- May, C. Y., & Nesaretnam, K. (2014). Research advancements in palm oil nutrition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *116*(10), 1301–1315. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400076>
- Maziak, W., Ward, K. D., & Stockton, M. B. (2008). Childhood obesity: Are we missing the big picture? *Obesity Reviews*, Vol. 9, pp. 35–42. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00376.x>
- Mba, O. I., Dumont, M.-J., & Ngadi, M. (2015). Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. *Food Bioscience*, *10*, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.01.003>
- McLaren, L., & Hawe, P. (2005). Ecological perspectives in health research. *Journal of Epidemiology and Community Health*, *59*(1), 6–14. <https://doi.org/10.1136/jech.2003.018044>
- Melanson, E. L., Astrup, A., & Donahoo, W. T. (2009). The relationship between dietary fat and fatty acid intake and body weight, diabetes, and the metabolic syndrome. *Annals of Nutrition & Metabolism*, *55*(1–3), 229–243. <https://doi.org/10.1159/000229004>
- Monteiro, J. M., Monteiro, G. M., Caroli-Bottino, A., & Pannain, V. L. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease: Different classifications concordance and relationship between degrees of morphological features and spectrum of the disease. *Analytical Cellular Pathology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/526979>
- Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/289645>
- Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 10, pp. 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003>
- Murphy, A. J., Kraakman, M. J., Kammoun, H. L., Dragoljevic, D., Lee, M. K. S., Lawlor, K. E., ...

- Masters, S. L. (2016). IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*, 23(1), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.024>
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., & Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.423>
- Narayan, B., Miyashita, K., & Hosakawa, M. (2006). Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - A review. *Food Reviews International*, 22(3), 291–307. <https://doi.org/10.1080/87559120600694622>
- Nestle, M., & Jacobson, M. F. (2000). Halting the obesity epidemic: a public health policy approach. *Public Health Reports*, 115(1), 12–24. <https://doi.org/10.1093/phr/115.1.12>
- Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Lewis, E., Jensen, D. R., Voshol, P. J., Kullberg, B. J., ... Van Der Meer, J. W. M. (2006). Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nature Medicine*, 12(6), 650–656. <https://doi.org/10.1038/nm1415>
- Nicholas, D. A., Zhang, K., Hung, C., Glasgow, S., Aruni, A. W., Unternaehrer, J., ... De Leon, M. (2017). Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β . *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176793>
- Nolan, C. J., & Larter, C. Z. (2009). Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 24(5), 703–706. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05823.x>
- OECD/EU. (2017). Obesity Update 2017. In *OECD update report*. <https://doi.org/10.1007/s11428-017-0241-7>
- Oliva Chávez, O. H., & Fagoso Díaz, S. (2013). Consumo de comida rápida y obesidad , el poder de la buena alimentación en la salud. *Revista Iberoamericana Para La Investigación y El Desarrollo Educativo*, 4(7), 176–199. Retrieved from <http://www.ride.org.mx/index.php/RIDE/article/view/93/409>
- OMS. (2018). Enfermedades no transmisibles. Retrieved July 21, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Papandreou, D., Rousso, I., Malindretos, P., Makedou, A., Moudiou, T., Pidonia, I., ... Mavromichalis, I. (2008). Are saturated fatty acids and insulin resistance associated with fatty liver in obese children? *Clinical Nutrition*, 27(2), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.11.003>
- Parker, R. (2018). The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Research*. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.02.002>
- Pettinelli, P., Obregon, A. M., & Videla, L. A. (2011). 1. Pettinelli P, Obregon AM, Videla LA. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp*. 2011;26(3):441–50. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutricion Hospitalaria : Organo Oficial de La Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, 26(3), 441–450. <https://doi.org/10.1590/S0212-16112011000300003>

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Popkin, B. M., Adair, L. S., & Ng, S. W. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, *70*(1), 3–21. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x>
- Resistance, H. I., Jornayvaz, F. R., Shulman, G. I., Resistance, H. I., Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2012). Diacylglycerol activation of protein kinase C ϵ and hepatic insulin resistance. *Cell Metabolism*, *15*(5), 574–584. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.005>
- Ritchie, M. R. and H. (2017). Food per Person. Retrieved from Published online at OurWorldInData.org. website: <https://ourworldindata.org/food-per-person>
- Robinson, M. W., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular and Molecular Immunology*, Vol. 13, pp. 267–276. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.3>
- Rogero, M., & Calder, P. (2018). Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, *10*(4), 432. <https://doi.org/10.3390/nu10040432>
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, *4*(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., & Gastaldelli, A. (2015). The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients*, Vol. 7, pp. 9453–9474. <https://doi.org/10.3390/nu7115475>
- Satapati, S., Kucejova, B., Duarte, J. A. G., Fletcher, J. A., Reynolds, L., Sunny, N. E., ... Burgess, S. C. (2015). Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J.Clin.Invest*, *125*(9), 1–16. <https://doi.org/10.1172/JCI82204.Introduction>
- Sharifnia, T., Antoun, J., Verriere, T. G. C., Suarez, G., Wattacheril, J., Wilson, K. T., ... Flynn, C. R. (2015). Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *309*(4), G270–G278. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00304.2014>
- Shi, H., Kokoeva, M. V, Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(11), 3015–3025. <https://doi.org/10.1172/JCI28898.TLRs>
- Shoelson, S. E. (2006). Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(7), 1793–1801. <https://doi.org/10.1172/JCI29069>
- Shoelson, S., Herrero, L., & Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, *132*(6), 2180, 2169. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.059>
- Simões, I. C. M., Fontes, A., Pinton, P., Zischka, H., & Wieckowski, M. R. (2018). Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 95, pp. 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.019>
- Stare, F. J. (1963). Overnutrition. *American Journal of Public Health*, *53*, 1975–1802.

- Sturm, R., & An, R. (2014). Obesity and economic environments. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(5), 337–350. <https://doi.org/10.3322/caac.21237>
- Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, 378(9793), 804–814. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1)
- Swinburn, B., & Egger, G. (2002). Preventive strategies against weight gain and obesity. *Obesity Reviews*, Vol. 3, pp. 289–301. <https://doi.org/10.1046/j.1467-789X.2002.00082.x>
- Swinburn, Boyd, Egger, G., & Raza, F. (1999). Dissecting obesogenic environments: The development and application of a framework for identifying and prioritizing environmental interventions for obesity. *Preventive Medicine*, 29(6 I), 563–570. <https://doi.org/10.1006/pmed.1999.0585>
- Tall, A. (1986). Plasma lipid transfer proteins. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.64.1.235>
- Tang, W., Jiang, Y. F., Ponnusamy, M., & Diallo, M. (2014). Role of Nrf2 in chronic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 20, pp. 13079–13087. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.13079>
- Tarantino, G., Savastano, S., & Colao, A. (2010). Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World Journal of Gastroenterology*, 16(38), 4773–4783. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i38.4773>
- Tarasenko, T. N., & McGuire, P. J. (2017). The liver is a metabolic and immunologic organ: A reconsideration of metabolic decompensation due to infection in inborn errors of metabolism (IEM). *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 121, pp. 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.06.010>
- Targher, G., Lonardo, A., & Byrne, C. D. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease and chronic vascular complications of diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.173>
- Thaker, V. V. (2017). GENETIC AND EPIGENETIC CAUSES OF OBESITY. *Adolescent Medicine: State of the Art Reviews*.
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(5), 1836–1846. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
- Tsujimoto, S., Kishina, M., Koda, M., Yamamoto, Y., Tanaka, K., Harada, Y., ... Hisatome, I. (2016). Nimesulide, a cyclooxygenase-2 selective inhibitor, suppresses obesity-related non-alcoholic fatty liver disease and hepatic insulin resistance through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor? *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2674>
- Van Herck, M. A., Vonghia, L., & Francque, S. M. (2017). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter’s guide. *Nutrients*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3390/nu9101072>
- Wang, M. C., Naidoo, N., Ferzacca, S., Reddy, G., & Van Dam, R. M. (2014). The Role of Women in

- Food Provision and Food Choice Decision-Making in Singapore: A Case Study. *Ecology of Food and Nutrition*, 53(6), 658–677. <https://doi.org/10.1080/03670244.2014.911178>
- Wang, Y., Qian, Y., Fang, Q., Zhong, P., Li, W., Wang, L., ... Liang, G. (2017). Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms13997>
- Wei, J., Leung, J., Loong, T., Wong, G., Yeung, D., Chan, R., ... Wong, V. (2015). Prevalence and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in {Non-Obese} Patients: A Population Study Using {Proton-Magnetic} Resonance Spectroscopy. *Am J Gastroenterology*, 110(9), 1306–1314. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.235>
- Weickert, M. O. (2012). Nutritional Modulation of Insulin Resistance. *Scientifica*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/424780>
- Weinberg, J. M. (2006). Lipotoxicity. *Kidney International*, 70(9), 1560–1566. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001834>
- World Health Organization. (1990). Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases. *Technical Report Series No.*, pp. 797 WHO, Geneva.
- Wynn, T. A. (2003). IL-13 EFFECTOR FUNCTIONS*. *Annual Review Immunology*. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>
- Yang, Y., Jiang, Y., Xu, Y., Mzayek, F., & Levy, M. (2018). A cross-sectional study of the influence of neighborhood environment on childhood overweight and obesity: Variation by age, gender, and environment characteristics. *Preventive Medicine*, 108, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2017.12.021>
- Zámbó, V., Simon-Szabó, L., Szelényi, P., Kereszturi, É., Bánhegyi, G., & Csala, M. (2013). Lipotoxicity in the liver. *World Journal of Hepatology*, Vol. 5, pp. 550–557. <https://doi.org/10.4254/wjh.v5.i10.550>
- Zobel, E. H., Hansen, T. W., Rossing, P., & von Scholten, B. J. (2016). Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. *Current Obesity Reports*, Vol. 5, pp. 449–455. <https://doi.org/10.1007/s13679-016-0233-8>

Anexos

Apéndice A

Técnica histológica

- Fijación:
- Paraformaldehído al 4%.
- Reactivos:
- Paraformaldehído 20 gr.
- Agua destilada 450 mL

Procedimiento:

- Calentar a 60°C por 30 minutos.
- Adicionar 50 mL de PBS 10X.
- Ajustar pH a 7.2 con un potenciómetro.
- Aforar a un volumen de 500 mL.

Técnica histológica

Reactivos:

- Etanol
- Xilol
- Parafina
- Agua destilada
- Obtener fragmentos de hígado, riñón y pulmón y sumergir en paraformaldehído al 4% mínimo 12 horas
- Lavar en agua corriente
- Deshidratar en alcoholes graduales
- Etanol al 60% 60 minutos
- Etanol al 70% 60 minutos

- Etanol al 80% 60 minutos
- Etanol al 96% 60 minutos
- Etanol al 96% 60 minutos
- Etanol absoluto 60 minutos
- Etanol absoluto 60 minutos
- Colocar los fragmentos en etanol-xilol 1:1 por 60 minutos
- Colocar los fragmentos en xilol 60 segundos
- Preincluir los fragmentos en parafina líquida a 60°C
- Inclusión definitiva de los fragmentos con parafina y dejar solidificar

Desparafinado de laminillas

- Colocar las laminillas con los cortes en la estufa a 60° C por 10 minutos
- Colocar los cortes en xilol por 5 minutos
- Pasar las laminillas a una mezcla de xilol-etanol por 5 minutos
- Transferir a etanol absoluto por 2 minutos
- Transferir a etanol de 96° por 2 minutos
- Enjuagar lento con agua destilada

Técnica de tinción con hematoxilina y eosina (HyE)

Reactivos:

- Xilol
- Etanol absoluto
- Agua destilada
- Hematoxilina de Gill *
- Agua destilada 730 mL Yodato de sodio 0.2 g
- Etilenglicol 250 mL Sulfato de aluminio 17.6 g
- Hematoxilina anhidra (polvo) 2.0 g

- Ácido acético glacial 2.0 mL
- Si está en cristales pesar 2.36 g
- Para preparar se debe seguir el orden, agitar a temperatura ambiente (TA) por 1 hr., filtrar la primera vez antes de usar
- Solución de alcohol-ácido
- Solución de agua amoniacal 1% v/v
- Etanol de 70° 99 mL Hidróxido de amonio 1 mL
- Ácido clorhídrico (HCl) 1 mL Agua destilada 99 mL
- Eosina (Solución stock):
- Eosina amarillenta 1.0 g
- Agua destilada 20 mL
- Etanol de 96° 80 mL
- Solución de trabajo:
- Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80 °C
- Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar

Procedimiento:

- Desparafinar los cortes con xilol por 5 minutos
- Hidratar con etanol-xilol por 5 minutos
- Hidratar con etanol absoluto y etanol de 96° por 2 minutos c/u
- Enjuagar lentamente con agua destilada
- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 minutos
- Enjuagar lentamente en agua de la llave (dos lavados)
- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (una inmersión)

- Enjuagar lentamente con agua de la llave (dos lavados)
- Sumergir rápidamente en agua amoniacal (dos inmersiones)
- Enjuagar lentamente con agua de la llave (dos lavados)
- Enjuagar lentamente con agua destilada
- Sumergir los cortes en eosina (seis inmersiones)
- Deshidratar con etanol de 96° (dos cambios) dos minutos c/u
- Sumergir en etanol absoluto (dos cambios) dos minutos c/u
- Sumergir en etanol-xilol tres minutos
- Sumergir en xilol (dos cambios) dos minutos c/u
- Montar con resina sintética

Apéndice B

Extracción de RNA con Fenol Ácido

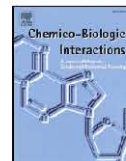
Reactivos

- Buffer AE (para 100mL)
- Acetato de Sodio 3M pH 5.2 à 1.67 mL
- EDTA 6.5 M pH 8 à 2 mL
- H₂O à 96.33 mL

Método:

- Lavar tejido con 500 µl de Buffer AE para remover excedente de sangre
- Picar tejido, adicionar 500 µl de buffer AE y transferir a un tubo limpio (tubo 1), adicionar 5 µl de carbonato de dietilo puro (DEPC)
- En un tubo (tubo2) poner 300 mg de perlas de vidrio con 400 µl de fenol ácido y 20 µl de SDS al 20% y colocar el tubo a 65° C (previamente al siguiente paso)
- Verter el contenido del tubo 1 en el tubo 2, mezclar en vortex 30 segundos y luego colocar a 65 °C durante 5 minutos (repetir este paso)
- Colocar los tubos a -70°C durante 5 minutos
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos Recuperar la fase acuosa en tubo eppendorf nuevo
- Segundo lavado de Fenol: agregar 400 µl de Fenol ácido
- Vortex 30 segundos centrifugar nuevamente a 13,000 rpm y recuperar fase acuosa-
- Agregar 250 µl de fenol ácido y 240 µl de solución Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
- Vortex 30 segundos

- Centrifugación 13,000 rpm durante 5 minutos Recuperar fase acuosa en eppendrof nuevo
- Agregar 500 µl de cloroformo/ alcohol isoamilico (24:1) vortex 30 s. y centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos
- Recuperar fase acuosa en tubo nuevo midiendo lo que se recupera
- Precipitar RNA con 0.1 volumen de Acetato de Sodio 3M y 2.5 volúmenes de Etanol 96 -100% grado biología molecular
- Poner a -70° C de 20- 30 minutos
- Centrifugar en frío 15 min a 13,000 rpm
- Desechar sobrenadante
- Lavar pellet con 500 µl de etanol 75% grado biología molecular
- Centrifugar en frío durante 3 minutos a 13000 rpm velocidad
- Desechar sobrenadante y dejar secar pellet durante 5 minutos
- Resuspender en agua DEPC a consideración (30 -100 µl) y guardar a -20°C



Chronic intake of moderate fat-enriched diet induces fatty liver and low-grade inflammation without obesity in rabbits

S.C. Sigrist-Flores^a, A. Ponciano-Gómez^a, A. Pedroza-González^{a,b}, I.A. Gallardo-Ortiz^b,
R. Villalobos-Molina^{b,c}, J.P. Pardo-Vázquez^d, A.D. Saucedo-Campos^a, R. Jiménez-Flores^{a,*},
A.R. Méndez-Cruz^{a,**}

^a Laboratorio de Inmunología, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México Tlalnepanitla, Estado de México, México

^b Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepanitla, Estado de México, México

^c Carrera de Enfermería, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México Tlalnepanitla, Estado de México, México

^d Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México



ARTICLE INFO

Keywords:

Fatty liver
Low-grade inflammation
Fat-enriched diet

ABSTRACT

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the cause of chronic liver disease. Even though NAFLD is strongly associated with obesity and metabolic syndrome, there is a proportion of patients who develop this condition in the absence of obesity and the underlying mechanisms are poorly understood. We investigated early events in the pathogenesis of non-obese NAFLD, analyzing the impact of the chronic intake of a moderate fat-enriched diet on hepatic lipid accumulation and their relationship with inflammation. Rabbits fed with a moderate Fatty-Acid-Enriched Diet 3% palmitic acid (FAED), were evaluated for body weight, biochemical parameters, and liver function. Liver samples were analyzed by histology and RT-qPCR to measure lipid accumulation, the expression of inflammation-related genes IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, COX-2, TNF- α , and TLR-4. Chronic consumption by 6-months of FAED did not generate metabolic changes, but it induced fatty liver. We also observed the development of low grade inflammation characterized by the up regulation of TNF α , IL 13 and IL 18. The consumption by 12-months of FAED caused the overexpression of IL-6, IL-10, IL-13, COX-2, and TLR-4. We show that hepatic steatosis is an early consequence of fat-enriched diets, and that it is accompanied by an immune response that exerts protective effects that prevent the development of metabolic disorders, such as overweight/obesity and metabolic syndrome. However, the excessive intake of fatty acids renders these mechanisms less efficient for delaying the start of metabolic alterations. Rabbits fed with FAED can be used as a model of NAFLD in non-obese and obese groups, especially at early stages of the disease.

1. Introduction

Excessive accumulation of triacylglycerols (TG) in the liver results in fatty liver, which appears when the TG content exceeds 5% of hepatic tissue [1]. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a condition in which fat builds up in the liver in absence of significant alcohol consumption [2]. NAFLD encompasses a spectrum of conditions, from simple fatty liver (steatosis), to more severe steatosis coupled with inflammation with or without fibrosis (Non-Alcoholic SteatoHepatitis [NASH]), to severe liver disease such as cirrhosis and potentially

hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. NAFLD is the most common cause of chronic liver disease worldwide and its incidence is still rising [3]. Obesity and metabolic syndrome are closely associated with the development of NAFLD; however, not all obese individuals develop this condition, and importantly, it can be found in non-obese subjects. The prevalence of non-obese NAFLD varies widely, ranging from 3 to 30% depending on the region [4]. Risk factors that have been associated with non-obese NAFLD are the excessive consumption of cholesterol and fructose [5–7], genetic factors, insulin resistance, and visceral fat [4,8]. Although the histology spectrum of non-obese NAFLD does not

* Corresponding author. Laboratorio de Inmunología, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios 1, Tlalnepanitla, 54090 Estado de México, México.

** Corresponding author. Laboratorio de Inmunología, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios 1, Tlalnepanitla, 54090 Estado de México, México.

E-mail addresses: jrf@unam.mx (R. Jiménez-Flores), renemen@gmail.com (A.R. Méndez-Cruz).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.004>

Received 17 September 2018; Received in revised form 6 December 2018; Accepted 2 January 2019

Available online 09 January 2019

0009-2797/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

differ greatly from obese NAFLD, the former group tends to have a less severe disease [9]. However, the proportions of patients with NASH and advanced fibrosis are similar between both groups. There are several commonalities between NAFLD in the obese and non-obese populations, but the pathogenesis of non-obese NAFLD is poorly understood. It is important to possess better knowledge of this disease to be able to identify individuals at risk because they lack the easily recognizable phenotype of obesity. Further research is needed for better understanding of the factors affecting the course of this specific condition. Interestingly, non-obese NAFLD in humans is characterized by hypertriglyceridemia, which is associated with the level of the disease [9]. Furthermore, these patients maintain increased levels of serum-free fatty acids after oral intake of fat, mainly due to the concentration of oleic and palmitic acids [10]. Of note, in animal models, high-fat diets induce triacylglycerol accumulation in the liver without significant inflammation [11]. In particular, rabbits as herbivores are very sensitive to dietary fat, also have a unique feature of lipoprotein metabolism as the presence of cholesteryl ester transfer protein (CETP), an important regulator of cholesterol metabolism, whereas mice as well as rats do not have CETP in the plasma. Additionally humans and rabbits present similitudes in the structure and metabolism of lipoproteins, a feature that is not shared with mice [12,13]. For these reasons we investigate the early events in the pathogenesis of non-obese NAFLD in a rabbit model. We analyzed the impact of chronic intake of a moderate fat-enriched diet on rabbit hepatic-lipid accumulation and their relationship with inflammation. These rabbits did not become obese or have metabolic alterations even after one year on such a diet, but they did develop fatty liver with low-grade liver inflammation.

2. Methods

2.1. Experimental animals

Twenty-four male New Zealand rabbits (30 days old and 1 kg \pm 150 g in body weight, at the beginning of the study) were obtained from the Department of Veterinary Sciences, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). All animals were maintained in individual cages at 23 \pm 5 °C under a 12-h:12-h dark/light cycle and with unrestricted access to food and water at the Animal Facility of Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM (FES-I, UNAM). Rabbits were divided into two groups that were fed with a standard diet that includes 2% of fat (Abin-Purina, México, Table 1) or a fatty acid enriched diet (FAED, standard diet with the addition of 3% of palmitic acid [PA]), and this was maintained for 6 or 12 months. An additional group of animals was fed with a high fatty acid enriched diet (HFAED) with the addition of 20% PA. Body weight was monitored monthly throughout the experiments. Animals were sacrificed by means of an overdose of sodium pentobarbital (63 mg/2.5 kg body weight). Animal protocols were approved by the Ethics Committee of FES-I, UNAM.

2.2. Biochemical tests

Prior to the sacrifice, blood samples were obtained in a fasting state (8–10 h) from the marginal vein of the ear with the help of restriction

Table 1
Composition of Abin-Purina.

Humidity	12%	Fiber	14.5%
Proteins	16.5%	Ash	10%
Fat	2%	^a E.L.N.	44%
Calcium	1%	Phosphorus	0.40%

^a E.L.N. (nitrogen-free extract). refers to the amount of carbohydrates contained in the food.

devices to facilitate access to the cars. Blood samples were centrifuged at 955 \times g for 10 min to obtain serum, which was sent to an international reference laboratory (CARPERMOR, S.A. de C.V.) for quantification of Glucose (Glu), total Cholesterol (Chol), HDL-cholesterol (HDL), LDL-cholesterol (LDL), triacylglycerols (TG), and aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), Gamma-glutamyltransferase (GGT), and alkaline phosphatase (ALP) activities.

2.3. Histological analysis of liver tissue

Samples of liver were fixed in 10% phosphate-buffered formaldehyde solution for 24 h; then, they were dehydrated and embedded in paraffin. Tissue sections of 5 μ m were stained with hematoxylin-eosin. The histopathological liver analyses were performed using eight random fields to determine the percentage of hepatocytes with lipid vacuoles.

2.4. RNA extraction and real-time PCR

Rabbits were sacrificed, and the livers were collected and snap-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from the frozen livers. Frozen livers were homogenized in a solution containing 40% of acid-phenol, 60 mM of sodium acetate, 25 mM of EDTA, 0.4% of SDS, and 0.5% of DEPC, followed by acid-phenol/chloroform extraction. Complementary DNA synthesis was performed with 2 μ g of total RNA using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Initial DNA denaturation was performed at 94 °C for 2 min, then 35 cycles comprising denaturing at 94 °C for 30 s, followed by 30 s at 60 °C and by 30 s at 72 °C, with a final extension at 72 °C of 5 min. The cDNA, specific primers, and maximal SYBR Green qPCR Master Mix (Invitrogen) amplification was carried out in a Step One thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the following thermal profile: 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 45 s and at 60 °C for 60 s, and finally, at 60 °C for 1 min. Relative messenger RNA (mRNA) levels were calculated by the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method [14] and normalized by GAPDH as reference gene and with control groups (regular diet). The oligonucleotide primer sequences utilized are listed in Table 2.

2.5. Statistical analysis

Data are presented as mean + Standard Deviation (SD). Data of multiple groups were analyzed by one-way ANalysis Of VAriance (ANOVA) or by Student's *t*-test with the GraphPad Prism ver. 5.00 statistical software (www.graphpad.com); values of *p* < 0.05 were considered statistically significant.

Table 2
Oligonucleotide sequences used in the study.

Gene name		Sequence (5'-3')	Size product (pb)
TNF- α	Forward	AGGTTGCTCACTAATGCTGA	118
	Reverse	AGTCTTTATTCTGGCCACTG	
IL-6	Forward	GACCTGCCCTGCTGAGAAATC	105
	Reverse	ATGCTGACCCCTGGTGTTC	
IL-13	Forward	CATTGCTGTGACCTGCTT	139
	Reverse	CTGGTCTGTGTGATGTTGA	
IL-18	Forward	CCTCTCTGTGAAGTGAAGAA	133
	Reverse	AAGTATCCGTCATACAATGAAG	
IL-1 β	Forward	TTGAAGAAGAACCCTGCTCTG	128
	Reverse	CTCATACGTCGAGACACACCT	
COX-2	Forward	TTGACCACTACAAGTCCGAC	132
	Reverse	AGTGGCGTAAGGATGTAGTGC	
IL-10	Forward	CTCCCTCTGAAAACAAGAG	185
	Reverse	TCCTAGACTTAGCCGAGTT	
TLR-4	Forward	GTGGTATCTTTTGTGTAGTT	124
	Reverse	TTCTGACCCAGTCTCTATCC	
GAPDH	Forward	CCATGACTGCCACCCAGAAA	109
	Reverse	GGGATCGTGGTACCACGTC	

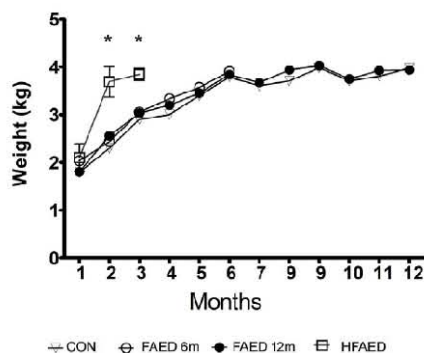


Fig. 1. Time-course of weight gain among rabbits subjected to different diets. Body weight was measured monthly in groups of rabbits with different diets. CON = Control Standard Diet; FAED = Fatty-Acid-Enriched Diet, and HFAED = High Fatty-Acid-Enriched Diet. Data are expressed as mean \pm Standard Deviation (SD) of six rabbits per group (* $p < 0.05$).

3. Results

3.1. Long-term FAED induce lipid accumulation in hepatocytes without metabolic alterations

Medium (6 months) or long-term (12 months) FAED did not show evident changes in the body weight of the experimental animals in comparison with those fed with the regular diet during the time analyzed (Fig. 1). As observed in Fig. 2, the blood biochemistry analysis demonstrated that HDL, LDL, total cholesterol, glucose, and TG had similar levels in both the regular-diet and the FAED groups (Fig. 2A). These observations indicate that consumption of moderate fat diet does not induce evident metabolic alterations in the parameters evaluated. In contrast, rabbits fed with HFAED showed increased body weight after 2 months on the diet, and they exhibited a considerable increase of TG and a slight increase of LDL-cholesterol after 1 month on the diet (Fig. 2C). The activity of the liver transaminase enzymes in serum was unaffected in all groups of rabbits with different diets (Fig. 2B and D).

Fatty infiltration in the liver is a frequent consequence of diets with a high lipid content (more than 30% fat), an alteration that is related to the development of NAFLD. However, it is noteworthy that minimal liver alterations were observed with FAED. At 6 months, there were no significant changes in the liver-tissue structure, but at 12 months, some hepatocytes contained lipid bodies in their cytoplasm (arrows in Fig. 3). The percentage of hepatocytes with lipid droplets was $13.8 \pm 3.8\%$ in FAED animals in comparison with $4.6 \pm 1.0\%$ in the control group (Fig. 4; $p = 0.018$, unpaired Student's *t*-test with the Welch correction). In the group of rabbits with HFAED, the number of hepatocytes with lipid droplets was higher, reaching a mean of $30.1 \pm 9.1\%$ vs. $3.0 \pm 3.0\%$ of the control group ($p = 0.0012$; unpaired Student's *t*-test). Because the percentage of hepatocytes with lipid vacuoles was not dramatically increased in the FAED group, we decided to analyze the triglyceride content by a biochemical method to confirm this moderate increase of liver lipids (figure supplementary number S1 or Fig. 4B). By the biochemical analysis we were able to detect significant differences even at 6 months of diet. At 12 months we observed a clear significant increase in the amount of liver fat confirming the result observed by histology.

Regarding the presence of fibrosis we did not observed evident liver damage at 6 or 12 months of FAED (figure supplementary S2).

3.2. Signs of inflammation were associated with fat-enriched diets

Because fatty liver is associated with chronic inflammation, we

analyzed the liver immune response under the different diets. By histological analysis, there was no evident lymphocytic infiltration in the livers of the different experimental groups (Fig. 3). However, the expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-18 was upregulated at 6 months in animals with FAED (Fig. 5A and B). Interestingly, their expression decreased at 12 months, nearly reaching their baseline levels. In addition, TLR-4, another inflammatory molecule, and Cyclooxygenase-2 (COX-2), increased their expression at 12 months of consumption of a fat-enriched diet (Fig. 5B).

Not only inflammatory molecules were upregulated: we also observed an increased expression of the Th2 cytokine IL-13 at 6 and 12 months (Fig. 5A). IL-6 and IL-10 were not detected at 6 months, but they were expressed at 12 months. In contrast, there were no changes in the expression of IL-1 β (Fig. 5C).

In animals fed with HFAED, the expression of inflammatory molecules occurred early, at 3 months on the diet, and while there were some similarities (Fig. 6), we found important differences. For example, with FAED, there was upregulation of IL-13, but with HFAED, this cytokine was not altered (Fig. 6A). Furthermore, IL-1 β was increased only with HFAED and no changes were observed for IL-10 (Fig. 6B).

4. Discussion

NAFLD is the most common cause of chronic liver disease worldwide; some factors associated with this conditions are insulin resistance, genetic predisposition, dietary composition, and sedentary lifestyle [15]. Even though NAFLD is strongly associated with obesity and the metabolic syndrome, there is a proportion of patients who are not obese and who develop this disease. This group of individuals is not easily identified because, in addition to the lack of obesity, the majority of patients with NAFLD are asymptomatic or have non-specific clinical manifestations. There are some factors that are associated with the risk of developing non-obese NAFLD; however, the mechanisms underlying disease development and progression remain unclear. Because the elevated serum-triacylglycerol level is the sole factor that has been associated with disease severity in non-obese patients [9], we aimed at analyzing the impact of the chronic intake of a fat-enriched diet using rabbits as a model. The normal energy supply of fat in rabbit diets according to the literature is around 7–11% [16–18]. Several rabbit models that analyzed coronary or metabolic diseases considered a high fat-enriched diet when the amount of fat has an average energy supply of 40%, with a minimum contribution of 20% [16,17,19]. In our model we have fed the animals with 2% (regular diet), 5% (moderate fat-enriched diet) or 20% (high fat-enriched diet) w/w of fat content, which supply 7, 15 and 46% of energy, respectively. Chronic consumption of moderate fat-enriched diet during 1 year did not produce alterations in the weight, liver function, or biochemical parameters such as HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, TG, and Glu. However, we found an accumulation of TG in the liver, indicating the induction of fatty liver, which appeared to be at the initial stage, because the percentage of hepatocytes (13.8%) with evident lipid droplets corresponds to grade-1 steatosis [20]. Fatty liver appears to be one of the first alterations observed under fat-enriched diets. Rabbits fed with FAED appear to model non-obese NAFLD at early stages, when only hepatic steatosis is observed.

The moderate fat-enriched diet, despite not generating changes in the parameters evaluated or significant TG accumulation in the liver along 6 months, was able to start an inflammatory process characterized by the upregulation of TNF- α and IL-18. Interestingly, it has been described that mice lacking IL-18 developed obesity and metabolic syndrome [21]. In line with this observation, another study revealed that a high fat-enriched diet in mice induced the activation of the NLRP1 inflammasome, increasing the production of IL-18 and preventing obesity and the metabolic syndrome [22]. Therefore, the up-regulation of IL-18 expression in our model could be a protective response triggered by the increase in energy uptake, in order to maintain

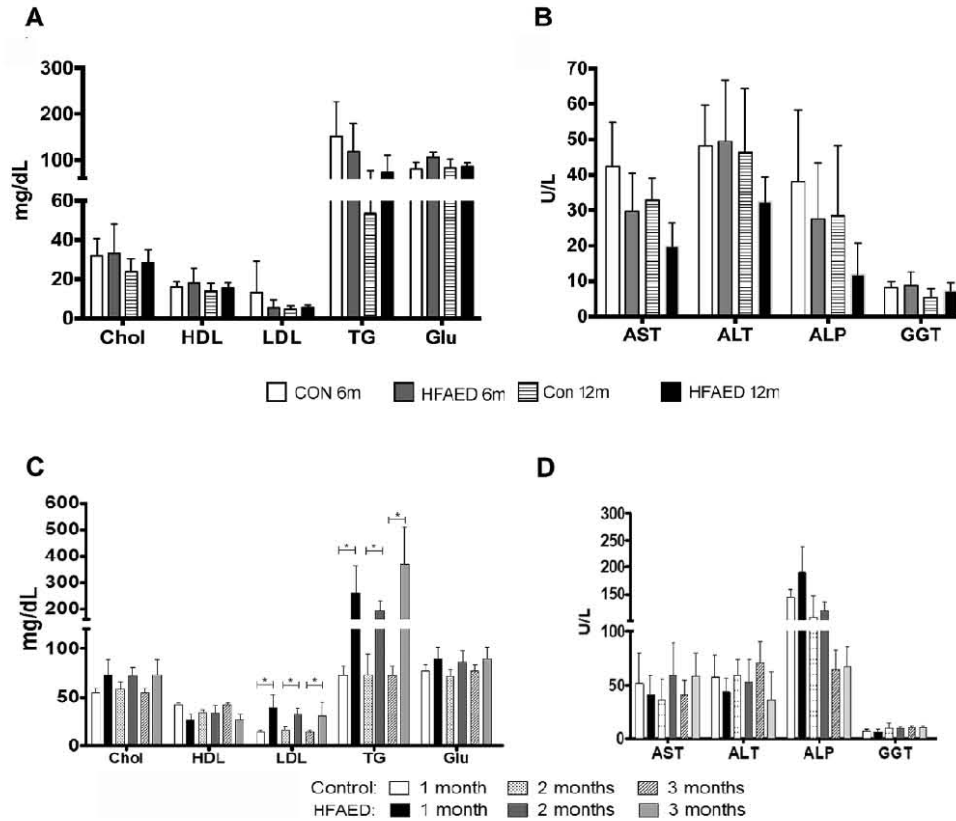


Fig. 2. Blood biochemistry profiles of rabbits under different diets. Serum samples obtained from animals with FAED at 6 and 12 months or with HFAED at 3 months were analyzed for biochemical markers (A and C, respectively), and enzymes of hepatic function (B and D, respectively). Data are expressed as mean \pm SD, of six rabbits per group ($p < 0.05$) for all comparisons.

metabolic homeostasis. The decreased expression of IL-18 after 1 year on the fat-enriched diet could be an immune-regulatory mechanism to avoid the cytotoxic effects of high levels of IL-18 on hepatocytes [23]. Importantly, this protective mechanism appears to be inefficient under excessive fat consumption because, despite the increase in IL-18 levels in rabbits fed with HFAED, they developed dyslipidemia (high levels of TG and LDL-cholesterol) and they also exhibited an increase in their body weight.

IL-18 could be responsible for the increased levels of TNF- α and IL-13. According to some reports, IL-18 induced the expression of these two cytokines in leukocytes, and IL-18-deficient mice had reduced levels of both cytokines in liver tissue [24,25]. In support of this hypothesis, we observed that, in the chronic phase, when IL-18 was decreased, the expression of TNF- α also decreased to nearly baseline levels, although we cannot exclude other mechanisms involved in the induction of TNF- α expression. TNF- α stimulates lipid accumulation in liver and has been implicated in the pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) in patients and animals models [26–28]. In agreement with this proposal, we show herein that TNF- α is also present at the initial stages of liver damage by means of fat accumulation in the hepatocytes.

Toll-Like Receptor-4 (TLR-4) was another inflammatory molecule that was upregulated at 12 months of a fat-enriched diet. Signaling through TLR-4 promotes pro-inflammatory conditions via TNF- α , IL-1 β , Nitric Oxide (NO), and COX-2 [29,30]. Notably, it has been reported that TLR-4 knock-out mice have a smaller amount of liver alterations

under a high-fat diet, indicating the critical role of this molecule in the onset of NAFLD [31,32]. Interestingly, the level of expression of TLR-4 is significantly increased in subjects with NASH compared with NAFLD [33], suggesting an important role in the progression of the disease. These observations suggest that the delayed expression of TLR-4 may be indicative of the onset of the progression of the hepatic disease. Related to TLR-4 overexpression, COX-2 was also upregulated in the long term, i.e., it has been reported that COX-2 activation is important in the development of insulin resistance and fatty liver in high-fat-induced obesity in rats and mice [34,35], especially playing a role in the transition to NASH [36]. The delayed synthesis of COX-2 during liver damage in our model can be explained as a result of the late induction of COX-2 by TLR-4. Taken together, these observations suggest that chronic intake of moderate fat-enriched diet (5% fat) induces a low inflammatory response during TG accumulation in liver tissue, characterized by the synthesis of TNF- α and IL-18, followed by a second phase mediated by TLR-4 and COX-2 signaling. This inflammatory response is presumptively performed by the innate immunity. Under an excessive consumption of fat, this response appeared early, probably due in part to the direct activation of TLR-4 by fatty acids [37], and it was less protective.

In addition to inflammatory mediators, we also detected the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-13 at 6 and 12 months. The expression of this cytokine can be induced by IL-18 and could comprise a compensatory mechanism to decrease the inflammatory response. Furthermore, it has been described that IL-13 administration

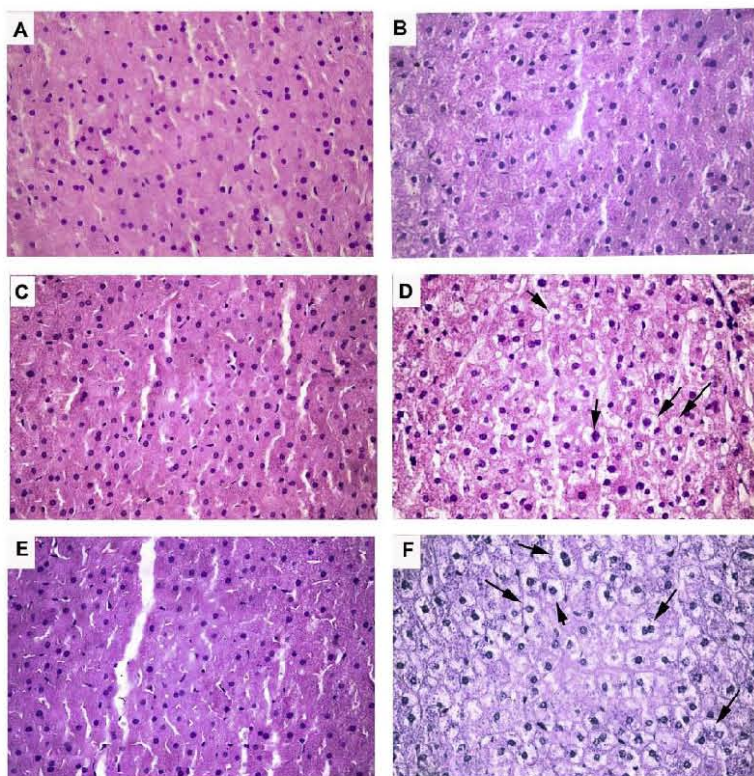


Fig. 3. Fat-enriched diet-induced lipid accumulation in hepatocytes. Liver sections of: A and C) control regular diet groups (CON); B and D) Fatty-Acid-Enriched Diet group (FAED) were stained at 6 and 12 months with hematoxylin and eosin. E and F correspond to rabbits fed with the High Fatty-Acid-Enriched diet (HFAED). Arrows indicate hepatocytes with intracellular lipid vacuoles, 400X magnification.

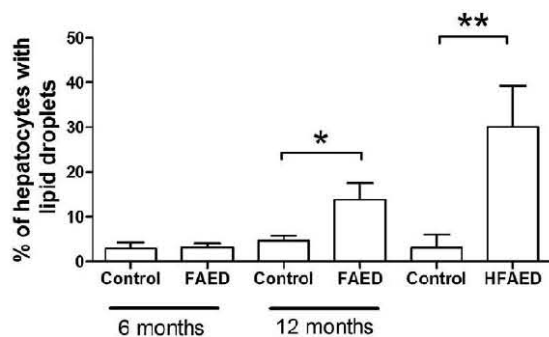


Fig. 4. Percentages of hepatocytes with lipid vacuoles. Liver sections stained with hematoxylin and eosin were analyzed to determine the percentage of hepatocytes with lipid droplets (arrows). Differences were analyzed by the Student's *t*-test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001).

alleviated the induction of fatty liver and insulin resistance in mice on a high-fat diet [38], reinforcing the hypothesis of the protective role of the initial inflammation.

The protective mechanisms observed with FAED by the overexpression of IL-18 and IL-13, become less efficient with a high consumption of fat, as observed in rabbits fed with HFAED, allowing the development of obesity and metabolic syndrome. Importantly, although there was a small increase in the degree of steatosis, we did not observe fibrosis, or any progression to liver damage such as NASH. Overall, our results showed that the chronic consumption of a fat-enriched diet does not generate metabolic changes in the parameters evaluated that

indicate alterations in blood biochemistry, hepatic function, and body weight, but it does favor TG accumulation in the liver, as well as the development of low-grade inflammation. But these mechanisms become less functional during chronic periods of fat consumption or during a high intake of HFAED diets. Further studies are warranted to better understand the mechanisms involved in the generation of NAFLD, especially in non-obese population.

In conclusion, we showed that hepatic steatosis was an early consequence of the chronic consumption of fat-enriched diets, and this was accompanied by an immune response mediated by IL-18, TNF- α , and IL-13. These responses possessed regulatory effects that prevented the development of metabolic disorders such as obesity and metabolic syndrome. However, under an excessive intake of FA, these mechanisms were less efficient for delaying the onset of metabolic alterations, but they continued to attenuate the progression of the hepatic damage. In summary, the initial immune response induced by the onset of fatty liver by moderate fat intake has effect in the overexpression of IL-18 and IL-13, with a possible function in the regulation of weight gain and metabolic alterations, but this effect can be overcome in the long term by the consumption of fatty acids or with high amounts of fat intake. Furthermore, rabbits fed with FAED or HFAED can be used as models of NAFLD in non-obese and obese groups, respectively, especially at early stages of the disease.

Abbreviations

PA: Palmitic Acid; FAED: Fatty Acid-Enriched Diet; HFAED: High Fatty-Acid-Enriched Diet; NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; NASH: Non-Alcoholic SteatoHepatitis; HCC: HepatoCellular Carcinoma; Chol: Total Cholesterol. HDL: HDL-cholesterol, LDL: LDL-cholesterol;

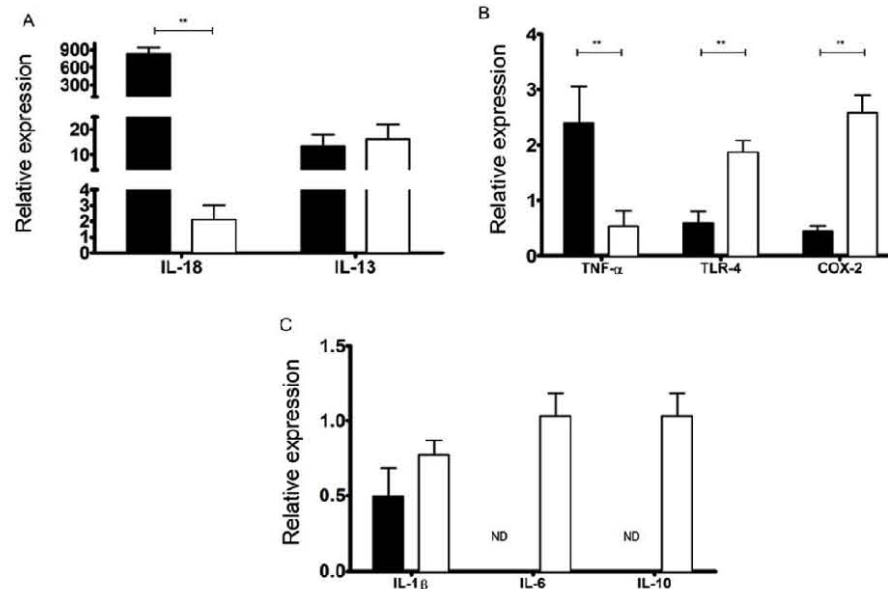


Fig. 5. Anti-obesity inflammatory molecules are triggered by chronic intake of moderate fat-enriched diet. Relative mRNA expression was analyzed in rabbits fed with regular diet and FAED. A) Relative expression of IL-13 and IL-18 were upregulated in rabbits with FAED. B) TNF- α inflammatory molecules increased at 6 months; meanwhile, TLR-4 and COX-2 underwent delayed overexpression. C) Levels of mRNA for IL-1 β , IL-6, and IL-10. All results were normalized to *GAPDH* (the reference gene) and control groups and expressed as arbitrary units. ND: Non Detectable. Data are shown as mean \pm SD. Group at 6 months (black bars), 12 months (white bars), A: $p < 0.05$ Control (CN) vs. Molecules, and B: $p < 0.05$, 6 months vs. 12 months.

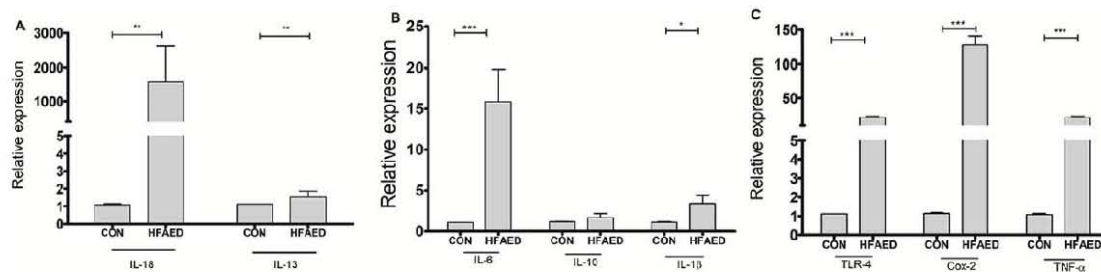


Fig. 6. High intake of fat-induced inflammation. Gene expression analysis in rabbits fed with HFAED exhibited an early expression of inflammatory molecules TLR 4 and COX 2, and the induction of IL 1 β and IL 6, but not of IL 13. All results were normalized to the *GAPDH* and control groups and expressed as arbitrary units. Data shown are the means \pm SD. Differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc comparison tests (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

TG: TriacylGlycerols; Glu: Glucose, AST: ASpartate aminoTransferase; ALT: ALanine aminoTransferase, ALP: ALKaline Phosphatase; GGT: Gamma-Glutamyl Transferase.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SCS-F and JRJ-F participated in the design and development of all experiments, as well as in the analysis and the revisions of this manuscript. JAP-G participated in the design of the experimental qPCR. ADS-C participated in the in the quantification of tissue triglycerides and histology. AP-G and SCS-F analyzed the results and wrote the manuscript. IAG-O and ARM-C were involved in the statistical analysis

and revision of the manuscript. RV-M and JPP-V participated in revisions of this manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

Santiago C. Sigrist-Flores was the recipient of a doctoral fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Fellowship 229880, CVU 347442), and acknowledges "Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM)" for the training received during his studies. This project was supported by DGAPA-PAPIIT-IN223113, UNAM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.004>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.004>.

References

- [1] C.J. Green, L. Hodson, The influence of dietary fat on liver fat accumulation, *Nutrients* 6 (11) (2014) 5018–5033.
- [2] A.M. Zivkovic, J.B. German, A.J. Sanyal, Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 86 (2) (2007) 285–300.
- [3] P. Dietrich, C. Hellerbrand, Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28 (4) (2014) 637–653.
- [4] D. Kim, W.R. Kim, Nonobese fatty liver disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (4) (2017) 474–485.
- [5] M. Kainuma, et al., Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis, *J. Gastroenterol.* 41 (10) (2006) 971–980.
- [6] A. Abid, et al., Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome, *J. Hepatol.* 51 (5) (2009) 918–924.
- [7] K. Yasuake, et al., Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol, *Scand. J. Gastroenterol.* 44 (4) (2009) 471–477.
- [8] D. van der Poorten, et al., Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease, *Hepatology* 48 (2) (2008) 449–457.
- [9] J.C. Leung, et al., Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients, *Hepatology* 65 (1) (2017) 54–64.
- [10] R. Gambino, et al., Different serum free fatty acid profiles in NAFLD subjects and healthy controls after oral fat load, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (4) (2016) 479.
- [11] G. Serviddio, et al., Effects of dietary fatty acids and cholesterol excess on liver injury: a lipidomic approach, *Redox Biol.* 9 (2016) 296–305.
- [12] J. Fan, et al., Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine, *Pharmacol. Ther.* 146 (2015) 104–119.
- [13] A.R. Tall, Plasma lipid transfer proteins, *J. Lipid Res.* 27 (4) (1986) 361–367.
- [14] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (9) (2001) e45.
- [15] S.W. Koppe, Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease, *Transl. Res.* 164 (4) (2014) 312–322.
- [16] X.J. Zhang, et al., Lipid metabolism in diet-induced obese rabbits is similar to that of obese humans, *J. Nutr.* 138 (3) (2008) 515–518.
- [17] O.J. Arias-Mutis, et al., Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit, *PLoS One* 12 (5) (2017) e0178315.
- [18] A.B. Waqar, et al., High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits, *Atherosclerosis* 213 (1) (2010) 148–155.
- [19] E. Birkofer, et al., Metabolic and antioxidative changes in liver steatosis induced by high-fat, low-carbohydrate diet in rabbits, *J. Physiol. Pharmacol.* 56 (Suppl 6) (2005) 45–58.
- [20] J.M. Monteiro, et al., Nonalcoholic fatty liver disease: different classifications concordance and relationship between degrees of morphological features and spectrum of the disease, *Anal. Cell Pathol.* 2014 (2014) 526979.
- [21] M.G. Netea, et al., Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance, *Nat. Med.* 12 (6) (2006) 650–656.
- [22] A.J. Murphy, et al., IL-18 production from the NLRP1 inflammasome prevents obesity and metabolic syndrome, *Cell Metab.* 23 (1) (2016) 155–164.
- [23] S. Finotto, et al., Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo, *Gut* 53 (3) (2004) 392–400.
- [24] T. Hoshino, R.II. Wiltrout, I.L.A. Young, IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response, *J. Immunol.* 162 (9) (1999) 5070–5077.
- [25] J.P. Lana, et al., TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 41 (12) (2016) 1295–1302.
- [26] J.W. Haukeland, et al., Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2, *J. Hepatol.* 44 (6) (2006) 1167–1174.
- [27] J.M. Hui, et al., Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 40 (1) (2004) 46–54.
- [28] M. Manco, et al., Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease, *Am. J. Clin. Pathol.* 127 (6) (2007) 954–960.
- [29] P.C. Norris, et al., Specificity of eicosanoid production depends on the TLR-4-stimulated macrophage phenotype, *J. Leukoc. Biol.* 90 (3) (2011) 563–574.
- [30] A.C. Konner, J.C. Bruning, Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism, *Trends Endocrinol. Metabol.* 22 (1) (2011) 16–23.
- [31] J. Liu, et al., Toll-like receptor-4 signalling in the progression of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-fructose diet in mice, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 41 (7) (2014) 482–488.
- [32] D.F. Ferreira, et al., Novel role of TLR4 in NAFLD development: modulation of metabolic enzymes expression, *Biochim. Biophys. Acta* 1851 (10) (2015) 1353–1359.
- [33] T. Sharifnia, et al., Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309 (4) (2015) G270–G278.
- [34] P.S. Fisiich, et al., COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver, *Obesity (Silver Spring)* 17 (6) (2009) 1150–1157.
- [35] S. Tsujimoto, et al., Nimesulide, a cyclooxygenase-2 selective inhibitor, suppresses obesity-related non-alcoholic fatty liver disease and hepatic insulin resistance through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *Int. J. Mol. Med.* 38 (3) (2016) 721–728.
- [36] J. Chen, et al., Celecoxib attenuates liver steatosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis induced by high-fat diet in rats, *Mol. Med. Rep.* 4 (5) (2011) 811–816.
- [37] S. Huang, et al., Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways, *J. Lipid Res.* 53 (9) (2012) 2002–2013.
- [38] P. Darghal, et al., Blocking high-fat diet-induced obesity, insulin resistance and fatty liver by overexpression of IL-13 gene in mice, *Int. J. Obes.* 39 (8) (2015) 1292–1299.