



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Estudio del síndrome metabólico y daño hepático generados en un modelo experimental de dieta hipercalórica y el papel de un derivado de adenosina en su regulación.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

B. E. Alejandro Rusbel Aparicio Cadena

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas. IFC, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia. IFC, UNAM

Dr. Armando Roberto Tovar Palacios. INCMNSZ

Ciudad Universitaria, CD. MX., noviembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**Aparicio Cadena Alejandro Rusbel**  
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas  
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 19 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Estudio del síndrome metabólico y daño hepático generados en un modelo experimental de dieta hipercalórica y el papel de un derivado de adenosina en su regulación**", dirigida por el/la Dr(a). Chagoya Hazas Victoria Eugenia.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Díaz Muñoz Mauricio
VOCAL	Velasco Torres Myriam
VOCAL	Torres y Torres Nimbe
VOCAL	Rojas del Castillo Emilio
SECRETARIO	Jaimes Hoy Elizabeth Lorraine

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarte un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de octubre de 2020

**Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**  
Coordinadora

## **Agradecimientos académicos.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

A la Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas, tutora.

Al comité tutorial: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dr. Armando Roberto Tovar Palacios.

A los miembros del jurado evaluador.

Al Instituto de Fisiología Celular: A los miembros de las unidades de imagenología, histología y bioterio.

A los miembros del laboratorio 305-Sur del edificio de ciencias básicas:

-Técnicos académicos: Dr. Enrique Chávez Jiménez, Dra. Nora Gabriela Velasco Loyden, Dra. Mariana Domínguez.

-Estudiantes: Dra. María Guadalupe Lozano Rosas, Biól. Mol. Amairani Cancino Bello.

-Personal de apoyo: Sra. Xóchitl Castrejón.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y a los miembros del departamento de fisiología de la nutrición: Dra. Nimbe Torres y Torres y Dr. Armando Roberto Tovar Palacios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para la participación en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.

## **Dedicatoria.**

A mis padres.

# Índice.

<b>Abreviaturas.</b> .....	7
<b>Resumen.</b> .....	9
<b>1. Introducción.</b> .....	10
<b>1.1. Definición y epidemiología del síndrome metabólico.</b> .....	10
<b>1.2. Fisiopatología del síndrome metabólico: generalidades.</b> .....	11
<b>1.3. Relación entre daño hepático y síndrome metabólico.</b> .....	13
<b>1.3.1. Inflamación.</b> .....	14
<b>1.3.2. Estrés oxidante.</b> .....	15
<b>2. Antecedentes.</b> .....	17
<b>2.1. Conceptualización del síndrome metabólico.</b> .....	17
<b>2.2. La adenosina y el papel hepatoprotector del compuesto IFC-305.</b> .....	18
<b>3. Hipótesis.</b> .....	21
<b>4. Objetivos.</b> .....	21
<b>4.1. Objetivo general.</b> .....	21
<b>4.2. Objetivos particulares.</b> .....	21
<b>5. Procedimientos.</b> .....	22
<b>5.1. Población de estudio y dietas.</b> .....	22
<b>5.2. Curva de crecimiento y parámetros de química sanguínea.</b> .....	24
<b>5.3. Análisis histológico hepático.</b> .....	25
<b>5.4. Análisis de lípidos hepáticos.</b> .....	25
<b>5.5. Perfil de citocinas en suero e hígado.</b> .....	26
<b>5.6. Medición de lipoperoxidación hepática.</b> .....	26
<b>5.7. Determinación de glutatión hepático.</b> .....	27
<b>5.8. Análisis estadístico.</b> .....	29

<b>6. Resultados</b> .....	30
<b>6.1. Parámetros de síndrome metabólico para la estandarización del modelo experimental y el efecto del IFC-305 sobre ellos</b> .....	30
6.1.1. Sobrepeso u obesidad.....	30
6.1.2. Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.....	31
6.1.3. Hiperinsulinemia.....	34
6.1.4. Dislipidemias.....	35
<b>6.2. Parámetros de daño hepático para la estandarización del modelo experimental y el efecto del IFC-305 sobre ellos</b> .....	36
6.2.1. Análisis histológico.....	36
6.2.2. Determinación cuantitativa de lípidos hepáticos.....	42
6.2.3. Inflamación sistémica y hepática.....	43
6.2.4. Estrés oxidante y respuesta antioxidante.....	45
<b>7. Discusión</b> .....	47
<b>8. Conclusiones</b> .....	55
<b>9. Referencias</b> .....	56
<b>10. Anexo</b> .....	64

## Abreviaturas.

4-HNE	4-Hidroxinonenal
A1	Receptor A1 de adenosina
A2A	Receptor A2A de adenosina
A2B	Receptor A2B de adenosina
A3	Receptor A3 de adenosina
AIN	American Institute of Nutrition
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
CHM	Cicloheximida
<i>Col1a1</i>	Gen de colágena tipo 1 alfa 1
CTE	Cadena transportadora de electrones
DEN	Dietilnitrosamina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ETG	Ensayo de tolerancia a la glucosa
FAO	Food and Agriculture Organization
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
H y E	Hematoxilina y eosina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HF	High fat
HFS	High fat and sucrose
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
IDF	International Diabetes Federation



IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferón gamma
IRS1	Sustrato 1 del receptor de insulina
JNK	Cinasa c- jun N- terminal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDA	Malondialdehído
MET	Microscopía electrónica de transmisión
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NCEP-ATP III	Tercer panel de tratamiento de adultos del Programa Nacional de Educación Sobre el Colesterol de Estados Unidos
NEM	N-etilmaleimida
NF $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
OMS	Organización mundial de la Salud
OPT	O-ftalaldehído
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
RE	Retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RIPA	Radioinmunoprecipitation assay buffer
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terbutil hidroquinona
TCA	Ácido tricloroacético
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

## Resumen.

El síndrome metabólico es una enfermedad multifactorial con alta prevalencia mundial, relacionada directamente con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y/o hepáticas, así como diabetes y cáncer. Alrededor del 80% de pacientes con síndrome metabólico cursan con un algún grado de daño al hígado.

El derivado de adenosina IFC-305 ha demostrado tener efectos protectores en distintos modelos de daño hepático, así como en elementos involucrados en el metabolismo central, por lo que se buscó evaluar su efecto en hígado graso asociado al síndrome metabólico inducido por una dieta hipercalórica, rica en grasas saturadas y sacarosa.

El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar un modelo experimental de síndrome metabólico y daño hepático inducidos por dieta hipercalórica y establecer los efectos del compuesto IFC-305 en parámetros bioquímicos, tisulares, inflamatorios y relacionados al estrés oxidante.

Se establecieron cuatro grupos experimentales con ratas macho de la cepa *Wistar*: 1. Control, dieta estándar; 2. Dieta alta en grasas y carbohidratos (HFS); 3. HFS+IFC-305, dosis 50 mg/kg; 4. Dieta estándar+IFC-305. Se realizaron pruebas de tolerancia a glucosa e insulina, se determinaron parámetros séricos bioquímicos, se realizaron análisis histológicos y celulares mediante hematoxilina y eosina y microscopía electrónica y se cuantificaron lípidos, marcadores de inflamación e indicadores de estrés oxidante y respuesta antioxidante en el tejido hepático.

Al finalizar los tratamientos, los animales del grupo correspondiente a síndrome metabólico y daño hepático presentaron curvas anormales de tolerancia a glucosa e insulina, altos niveles séricos de lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL) así como de triglicéridos, insulina y citocinas proinflamatorias. En el hígado se hallaron modificaciones en la organización tisular y celular y en la concentración de lípidos. El tratamiento simultáneo con IFC-305 previno el desarrollo de distintos elementos relacionados al síndrome metabólico, además de conservar la estructura normal del tejido hepático, y evitar la inflamación.

## 1. Introducción.

### 1.1. Definición y epidemiología del síndrome metabólico.

El síndrome metabólico se ha definido como una patología multifactorial que puede incluir: obesidad central, dislipidemias, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hipertensión arterial; asociados directamente como factores de riesgo para el desarrollo de diabetes Mellitus tipo 2, enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) y enfermedad cardiovascular<sup>[1,2]</sup>.

De acuerdo con el concepto armonizado, se considera que una persona tiene síndrome metabólico cuando presenta al menos tres de los siguientes parámetros (con algunas variaciones en poblaciones específicas): circunferencia de la cintura de  $\geq 94$  cm en hombres y  $\geq 80$  cm en mujeres, niveles séricos de triglicéridos  $\geq 150$  mg/dl, o pacientes que están bajo prescripción de medicamentos para mantenerlos bajos; niveles bajos de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad):  $< 40$  mg/dl en hombres y  $< 50$  mg/dl para mujeres, presión arterial sistólica y diastólica de  $\geq 130$  mm Hg y  $\geq 85$  mm Hg respectivamente, o pacientes con tratamiento farmacológico antihipertensivo, y niveles de glucosa en sangre de  $\geq 100$  mg/dl bajo condiciones de ayuno<sup>[3]</sup>.

La incidencia y prevalencia de este síndrome no se determina como tal; sin embargo, se logra estimar a partir de los datos que se tienen acerca de sobrepeso u obesidad y demás asociados. Por ejemplo, según la encuesta global de obesidad, en 2015 para 195 países, este padecimiento ha incrementado al doble en 73 de ellos, mientras que en la mayoría de los restantes también aumentó. Además, 604 millones de adultos y 108 millones de niños eran obesos, donde el aumento en la prevalencia destacó en adultos jóvenes (de 25 a 29 años) y con bajo índice socioeconómico; mientras que su tasa global pasó de 1.1 a 3.85 % de 1980 a 2015<sup>[4]</sup>.

En el siguiente mapa (figura 1) se muestra la prevalencia de sobrepeso u obesidad de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2016. En este, se observa mayor prevalencia en países industrializados o en vías de desarrollo como Estados Unidos y México.

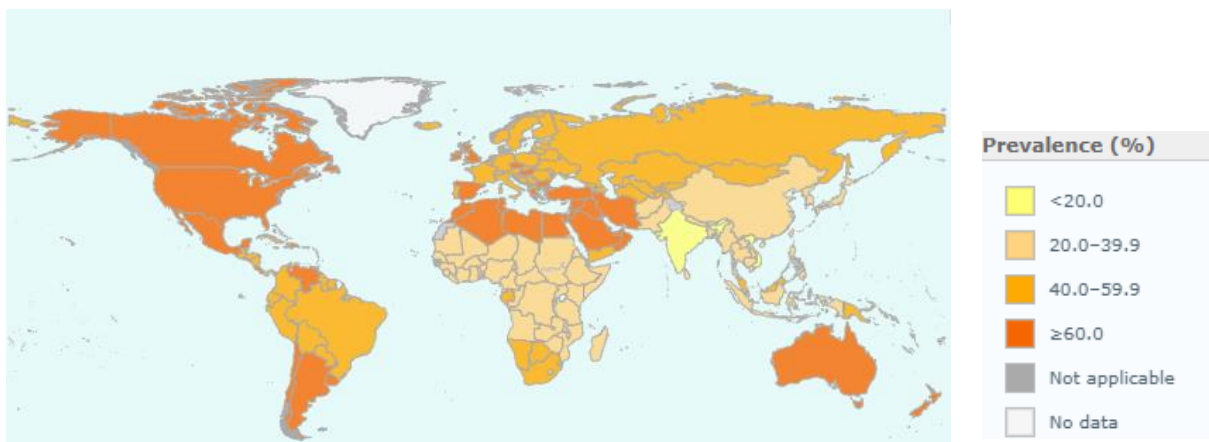


Figura 1. Prevalencia mundial de sobrepeso y obesidad (OMS, 2016).

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2018 dio a conocer que la prevalencia de estas enfermedades en personas de 20 años o más fue del 75.2 %, mismo que había sido de 71.3 en 2012.

La misma encuesta indicó que 15.2 millones de personas adultas tienen diagnóstico de hipertensión, donde la mayoría tiene 50 años o más.

## 1.2. Fisiopatología del síndrome metabólico: generalidades.

Varios autores determinan que el principal detonante del síndrome metabólico es el aumento anormal de peso, debido a un contenido dietético hipercalórico, principalmente por el consumo excesivo de grasas y azúcares<sup>[5,6]</sup>. Esta condición puede verse favorecida sumada a otros factores ambientales como un estilo de vida sedentario, nivel socioeconómico bajo y, en particular, a procesos bioquímicos implícitos como la reposición de nutrientes dietarios y utilización de ácidos grasos, tanto en tejido adiposo como en otros órganos<sup>[3]</sup>.

Otros mencionan que el estímulo inicial en el síndrome metabólico es la resistencia a la insulina, asociada a un estado de inflamación crónica de bajo grado<sup>[7]</sup>. Dicha resistencia es definida en la clínica como la incompetencia de la insulina para incrementar la utilización de glucosa, o la incapacidad de las células a responder a estímulos por la misma hormona<sup>[8]</sup>.

El estado inflamatorio mencionado puede promoverse y ser sostenido por la desregulación de moléculas como la adiponectina y la leptina. Esta última se ve implicada en el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo. Además, la producción de citocinas y otros mediadores de la inflamación en órganos como el tejido adiposo e hígado, contribuye de manera directa a la resistencia a la insulina<sup>[9]</sup>. La respuesta inmune también se llega a activar por otros componentes de este síndrome, como el exceso de lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sup>[10]</sup>.

Así pues, la fisiopatología en el síndrome metabólico es muy compleja dadas las respuestas e interacciones en diferentes órganos. En general, además de la inflamación, se habla de disfuncionalidad de los tejidos pancreático, muscular esquelético y cardíaco como consecuencia a la acumulación ectópica de grasa, así como esteatosis y resistencia a la insulina en el hígado<sup>[9]</sup>.

La intolerancia a la glucosa circulante puede tener efectos citotóxicos e inflamatorios. Por ejemplo, se ha estudiado el papel directo de la glucosa sobre la aterosclerosis en la diabetes, vía productos finales de glicación<sup>[9,11]</sup>.

También se han realizado investigaciones acerca del desequilibrio en concentración de lípidos, glucosa, insulina y citocinas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres<sup>[9,10]</sup>. Entre los fenómenos asociados a su sobreproducción, se han descrito, entre otros, disfunción mitocondrial y estrés de retículo endoplásmico (RE), tanto en tejido adiposo como hepático<sup>[9]</sup>. Lo último se ha relacionado directamente a la resistencia a la insulina, dada la activación de la vía de señalización de las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y la fosforilación en serina del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1)<sup>[9,12]</sup>.

Por otro lado, en pacientes con esteatosis hepática causada por síndrome metabólico se ha encontrado mucha demanda mitocondrial en la oxidación de ácidos grasos, alta fuga de electrones de la cadena respiratoria y disfunción prolongada en sus complejos<sup>[13]</sup>.

### **1.3. Relación entre daño hepático y síndrome metabólico.**

Entre los cientos de funciones que realiza el hígado, se le ha descrito como un órgano esencial para la manutención de la homeostasis<sup>[14-16]</sup>. Su papel es crucial en el transporte y transformación química de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como en la detoxificación por el consumo de xenobióticos<sup>[16]</sup>.

Para que se lleve a cabo el metabolismo de estas macromoléculas es necesaria su obtención por medio de la dieta. Los lípidos son una fuente importante de energía para el metabolismo, teniendo un valor energético global de 9.5 kcal/g; mientras que los carbohidratos representan el tercer grupo de compuestos orgánicos más abundantes en el cuerpo animal, con un aporte energético de 4.1 kcal/g, después de las grasas y las proteínas<sup>[17]</sup>.

La mayoría de los carbohidratos que se obtienen de los alimentos se transforman en glucosa dentro del sistema digestivo. Su exceso se transporta de la sangre hacia los hepatocitos y se almacena en forma de glucógeno. Asimismo, estas células pueden captar ácidos grasos de los lípidos ingeridos<sup>[16]</sup>.

Se ha descrito que el consumo excesivo de grasas y azúcares puede inducir EHGNA<sup>[18,19]</sup>; cuya aparición es debida, en la mayoría de los casos, al establecimiento de síndrome metabólico, si bien algunos autores mencionan que puede ser bidireccional<sup>[20,21]</sup>.

Esta enfermedad abarca una serie de alteraciones histológicas que van desde la esteatosis simple, hasta el desarrollo progresivo de fibrosis, inclusive cirrosis hepática y hepatocarcinoma celular<sup>[22]</sup>. También se estima que el 25% de la población mundial cursa con algún grado de daño hepático<sup>[23]</sup>.

El daño en los hepatocitos (unidades funcionales del hígado) empieza por el exceso en la captura de ácidos grasos libres en circulación, como consecuencia de su ingesta elevada, así como por la disfunción y muerte del tejido adiposo. Dicha absorción de ácidos grasos se realiza mediante proteínas transportadoras como el receptor CD36, cuya síntesis se ha visto elevada durante la obesidad y que ha sido propuesto como indicador de progresión en la esteatosis<sup>[24,25]</sup>.

La acumulación hepática de ácidos grasos también promueve la síntesis de triglicéridos. Además, en el síndrome metabólico la síntesis de lípidos a partir de carbohidratos (lipogénesis *de novo*) aumenta, ya que las enzimas implicadas en estos procesos se regulan directamente por la glucosa e insulina<sup>[25]</sup>. Así pues, resistencia a la insulina en el músculo esquelético, tejido adiposo y el mismo hígado también contribuyen a la lipogénesis y consecuente esteatosis<sup>[26]</sup>.

La progresión de daño en la EHGNA se intenta explicar por la teoría de los dos golpes o “hits”, la cual establece que existe un segundo evento después de la esteatosis simple. Este se desencadena por la formación y acumulación de productos lipotóxicos que a su vez pueden provocar daño hepatocelular y estrés oxidante, estrés de RE y disfunción mitocondrial, inflamación y producción exacerbada de matriz extracelular; condición conocida como esteatohepatitis no alcohólica (NASH), la cual puede progresar hasta cáncer<sup>[21,27]</sup>.

### **1.3.1. Inflamación.**

La inflamación sistémica es propia del síndrome metabólico, mientras que, en el hígado, la inflamación puede promover un cuadro de NASH. Este es un estado crónico que se caracteriza por la producción y secreción de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6) y se ha ligado directamente a la pérdida de funcionalidad del tejido adiposo<sup>[28]</sup>, cuya respuesta inicia con el reconocimiento de señales que modifican la acción efectora de las células inmunitarias<sup>[29]</sup>.

Si bien no se ha dilucidado completamente el vínculo entre el síndrome metabólico y la inflamación, este se ha correlacionado al aumento en la cantidad de tejido adiposo blanco visceral y a su pérdida de sensibilidad a insulina<sup>[30]</sup>.

En el tejido adiposo existen células residentes del sistema inmune que contribuyen a la manutención de la homeostasis<sup>[31]</sup>. La subpoblación más abundante de leucocitos es la de macrófagos, que en condiciones normales constituye alrededor del 5 %, mientras que en la obesidad puede aumentar hasta 10 veces<sup>[32]</sup>. Esto va acompañado de un cambio fenotípico de los macrófagos (polarización), que pasan

del tipo denominado M2, que generalmente expresa genes que codifican para citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-33 e IL-13, al M1, que expresa genes que codifican para citocinas que favorecen la inflamación<sup>[31-34]</sup>. Cuando la secreción de estos mediadores se disemina y distribuye por el torrente sanguíneo, se produce una activación celular generalizada o sistémica<sup>[29]</sup>.

En el hígado, los efectores que generalmente se asocian a la inflamación son los macrófagos residentes (células de Kupffer) y los que se reclutan hacia este órgano, provenientes de la circulación o del tejido adiposo, no obstante, el papel importante de linfocitos T<sup>[25]</sup>. Se han estudiado vías de señalización implicadas en estos procesos. Por ejemplo, la hiperactividad de la vía del factor nuclear kappa b (NF- $\kappa$ B) promueve la secreción de citocinas proinflamatorias, además de que también se involucra en fibrogénesis, al ser señal de supervivencia para células estelares hepáticas, cuyas funciones son la producción de componentes de matriz extracelular y el almacenamiento de lípidos <sup>[35,36]</sup>.

Recientemente se ha abordado el papel de la microbiota en el síndrome metabólico, enfermedades hepáticas e inflamación<sup>[37]</sup>. En la NASH, la permeabilidad del intestino aumenta debido al sobrecrecimiento bacteriano o cambios en el microbioma residente, así como daño en las uniones estrechas de los enterocitos. Como consecuencia aumentan los niveles plasmáticos de lipopolisacárido - endotoxina bacteriana- (LPS), que puede funcionar como ligando para receptores tipo Toll (TLR) y desencadenar una respuesta inmune por la hipersecreción de citocinas y quimiocinas. También se ha descrito que los ácidos grasos libres son capaces de activar a los TLR hepáticos<sup>[25,37,38]</sup>.

### **1.3.2. Estrés oxidante.**

Dentro de la progresión del daño en la enfermedad hepática y en específico en la esteatohepatitis, se promueve estrés oxidante, el cual se refiere a un desbalance en la producción de especies químicas pro- y antioxidantes en favor de las primeras, lo que conlleva a la pérdida de la homeostasis del estado de óxido-reducción y daño a biomoléculas y organelos, por consecuencia<sup>[39]</sup>.



Las moléculas implicadas en este desbalance son ERO (peróxido de hidrógeno, lipoperóxidos...), ERN (especies reactivas de nitrógeno: óxido nítrico, peroxinitrito, etc.) y radicales libres como los radicales hidroxilo y superóxido; cuya producción se exagera, mientras que se pierde la actividad de sistemas antioxidantes enzimáticos como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) y no enzimáticos como el glutatión y las vitaminas C y E<sup>[39]</sup>.

En la NASH implicada en el síndrome metabólico hay distintas vías para llegar al estrés oxidante<sup>[40]</sup>. La sobrecarga de ácidos grasos hepáticos y la alta demanda de su oxidación suele ser la principal fuente de equivalentes reductores que promueven la producción de ERO. Dicha producción puede verse acentuada por moléculas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , que además logran inhibir la cadena transportadora de electrones (CTE) en la mitocondria. Los productos de la lipoperoxidación también llegan a tener el mismo efecto sobre la función mitocondrial<sup>[39]</sup>.

Se ha detectado pérdida de las funciones mitocondriales en pacientes con esteatosis, NASH, resistencia a la insulina, obesidad y otros padecimientos relacionados al síndrome metabólico. Dicha disfunción puede provocar una alta formación de ERO mediante la fuga de electrones de la CTE y contribuir al estrés oxidante<sup>[13,41,42]</sup>.

Generalmente, los electrones donados a la cadena respiratoria mitocondrial reaccionan con los protones y el oxígeno hasta la formación de agua en el complejo IV (citocromo c oxidasa), con una fuga basal. En la enfermedad hepática este escape de electrones aumenta y estos reaccionan en mayor medida con el oxígeno a nivel de los complejos I y III, lo que promueve la formación del radical anión superóxido, e incluso hasta su conversión a radical hidroxilo<sup>[41]</sup>.

Por otra parte, se sabe que los ácidos grasos libres en el hígado pueden actuar como ligandos de factores de transcripción como el receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa (PPAR- $\alpha$ ), cuya activación conduce a la expresión de genes cuyos productos participan en el transporte y oxidación de lípidos<sup>[43]</sup>. La supresión o inactividad de este receptor se involucra directamente en la EHGNA y

el desarrollo de hiperglucemia<sup>[44]</sup>. Sin embargo, en exceso, los productos oxidados de los ácidos grasos generan estrés oxidante y lipoperoxidación<sup>[43]</sup>.

Los productos de daño oxidante sobre lípidos que se encuentran con mayor frecuencia incluyen malondialdehído (MDA), peróxidos lipídicos, 8-isoprostano y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). También puede existir daño a otras biomoléculas, como las proteínas; cuya oxidación puede generar grupos carbonilo y modificaciones sobre aminoácidos<sup>[40]</sup>.

Las evidencias señalan que existen interacciones y vínculos directos entre inflamación y estrés oxidante, lo que conduce a microambientes más severos como la muerte celular y la fibrosis sostenida<sup>[43,45]</sup>.

## **2. Antecedentes.**

### **2.1. Conceptualización del síndrome metabólico.**

En 1988, Gerald Reaven propuso el concepto de síndrome X a la presencia simultánea de factores de riesgo cardiovascular en los que el incluía: intolerancia a la glucosa, dislipidemia e hipertensión arterial. Este conjunto de patologías fue denominado después como síndrome de resistencia a insulina y finalmente como síndrome metabólico<sup>[46]</sup>. Hacia 1999 la OMS dio a conocer los primeros criterios diagnósticos para síndrome metabólico, en los que el principal era la resistencia a insulina. Más adelante, el tercer panel de tratamiento de adultos del Programa Nacional de Educación Sobre el Colesterol de Estados Unidos (NCEP- ATPIII) actualizó los criterios bajo el planteamiento de que no se requería estrictamente la resistencia a insulina para el establecimiento del síndrome, e incorporando al diagnóstico la obesidad abdominal, además de al menos dos de las alteraciones ya mencionadas: intolerancia a la glucosa, dislipidemias y/o hipertensión<sup>[47,48]</sup>.

Para 2005, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) emitió sus criterios diagnósticos. Para estos, es necesario que primero se establezca la obesidad abdominal y después tener al menos dos alteraciones más (intolerancia a la glucosa, dislipidemias, hipertensión o resistencia a insulina)<sup>[49]</sup>.

Actualmente se ha desarrollado una definición armonizada de síndrome metabólico, la cual abarca los puntos que han sido acordados en los diferentes criterios internacionales previos, con puntos de corte particulares para sexo y grupos étnicos, cuya finalidad es ser una herramienta diagnóstica global, además de ser una plataforma útil para la evolución de este concepto<sup>[50]</sup>.

## **2.2. La adenosina y el papel hepatoprotector del compuesto IFC-305.**

La adenosina es un nucleósido derivado del metabolismo del adenosín trifosfato (ATP), cuyos efectos se llevan a cabo a través de la interacción con cuatro receptores acoplados a proteínas G: A1, A2A, A2B, A3. Su señalización, autocrina o paracrina, es importante para la manutención del equilibrio energético en las células; sobre todo, en los órganos con alta demanda de energía, como el corazón, el músculo esquelético y el hígado. Entre las funciones de la adenosina se han descrito la modulación del metabolismo de lípidos y la regulación del estado inflamatorio sistémico<sup>[51-53]</sup>.

En México, en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se ha formulado un derivado a partir de este nucleósido (IFC-305) con efectos favorables ante la cirrosis y el carcinoma hepatocelular<sup>[54,55]</sup>.

La adenosina ha demostrado dar protección hepática, al prevenir y revertir parcialmente la cirrosis establecida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), así como el daño agudo inducido por etanol o cicloheximida (CHM). Previene la acumulación de fibras de colágena, normaliza parámetros implicados en la función hepática y evita necrosis e infiltración lipídica hacia este órgano<sup>[56-59]</sup>.

El derivado IFC-305 reproduce los efectos de la adenosina en una concentración menor, además de tener una mayor absorción respecto al tiempo. Este compuesto es una sal de aspartato y se ha demostrado que no es tóxico en las condiciones y dosis usadas, no es genotóxico ni teratogénico<sup>[60]</sup> (estudios preclínicos Dr. Javier Espinoza IIB, UNAM, Dr. Germán Chamorro, ENCB, IPN, Dr. Efraín Campos FM, UNAM).

Además de estos descubrimientos, se encontró que el IFC-305 normaliza parcialmente la expresión de alrededor de 400 genes alterados en muestras cirróticas, entre los que destacan genes fibrogénicos como *Col1a1* y *Tgfβ1*, que se encontraron al alza, así como *Pparγ*, que se vio a la baja; el cual, dado su papel adipogénico y de diferenciación, puede involucrarse directamente con un cambio de fenotipo en las células estelares<sup>[54,60,61]</sup>.

Otra respuesta de mismo compuesto es la modulación de la inflamación en la cirrosis<sup>[62]</sup>.

El IFC-305 también ha sido evaluado en hepatocarcinoma celular, en un modelo experimental de daño hepático inducido por dietilnitrosamina (DEN). Entre sus efectos destaca la disminución en número y tamaño de nódulos tumorales, que se ha vinculado con la regulación de genes implicados en la progresión del ciclo celular<sup>[55]</sup>. Además, se observó que la función mitocondrial hepática es deteriorada en la progresión del cáncer y el derivado de adenosina en cuestión, la recupera<sup>[63]</sup>.

Dados los descubrimientos anteriores sobre el IFC-305, como primera aproximación se montó un modelo *in vivo* de síndrome metabólico y daño hepático en ratas de la cepa *Sprague-Dawley*, descrito anteriormente<sup>[64]</sup> y mostrado en el anexo del presente trabajo.

Los animales presentaron niveles altos de glucosa en ayuno sin llegar a la hiperglicemia, respecto a su grupo control, así como hiperinsulinemia, sobrepeso, altos niveles séricos de triglicéridos y colesterol, esteatosis y principios de fibrosis. La administración simultánea del compuesto IFC-305 tuvo respuestas favorables. Se observó una disminución en los niveles séricos de insulina, así como de colesterol, decremento parcial en esteatosis y fibrosis y el estímulo de la síntesis de glutatión como respuesta antioxidante (datos no publicados).

Estos resultados dieron pauta a explorar a este derivado de adenosina como una posible alternativa terapéutica. Sin embargo, el modelo fue difícilmente reproducible (ver anexo), por lo que se optó sustituirlo con una dieta sólida (no emulsión) modificada de acuerdo con lo dicho por el American Institute of Nutrition Rodent

Diets, (dieta AIN-93), enriquecida con 17% de manteca de cerdo, así como una solución de sacarosa al 10%<sup>[65,66]</sup>.

### **3. Hipótesis.**

El compuesto IFC-305 tendrá efectos preventivos y hepatoprotectores en un modelo experimental de síndrome metabólico y daño hepático establecidos por una dieta hipercalórica.

### **4. Objetivos.**

#### **4.1. Objetivo general.**

Estandarizar un modelo experimental de síndrome metabólico y daño hepático inducidos por una dieta hipercalórica, y establecer los efectos de un derivado de adenosina en su regulación.

#### **4.2. Objetivos particulares.**

1. Estandarizar un modelo *in vivo* de síndrome metabólico y daño hepático inducidos por una dieta rica en grasas saturadas y sacarosa, mediante análisis bioquímicos básicos séricos y hepáticos, así como histológicos.
2. Demostrar si el derivado de adenosina IFC-305 tiene efectos sobre los parámetros bioquímicos e histológicos de estandarización del modelo.
3. Determinar el estado inflamatorio en el modelo, a través de la evaluación de citocinas en circulación y en el hígado, así como el efecto del IFC-305 en él.
4. Cuantificar sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como productos de la lipoperoxidación hepática y evaluar al glutatión como sistema antioxidante, así como los efectos del IFC-305 sobre los mismos.

## 5. Procedimientos.

### 5.1. Población de estudio y dietas.

Se emplearon 44 ratas macho de la cepa *Wistar* de 180 a 220 gramos de masa corporal; fueron mantenidas a temperatura ambiente a un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad con temperatura y humedad controladas, en el vivario del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y tratadas de acuerdo con el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del mismo instituto.

Los animales se dividieron en cuatro grupos, como se señala a continuación:

**Tabla 1.** Grupos experimentales.

<b>Grupos</b>	<b>Tratamientos</b>
Control (C). n= 8	Dieta estándar (AIN-93) + agua pura para beber + solución salina vía intraperitoneal (i.p.).
Dieta alta en grasas + sacarosa (HFS). n= 16	Dieta estándar modificada, suplementada con grasas de origen animal (HF) + solución de sacarosa 10 % (S) + solución salina vía i.p.
Dieta alta en grasas + sacarosa +IFC-305 (HFS+IFC). n= 16	Dieta HF + solución de sacarosa 10 % + IFC-305 vía i.p., dosis 50 mg/kg.
Control + IFC-305 (IFC). n= 4	Dieta estándar + agua pura para beber + IFC-305 vía i.p., dosis 50 mg/kg.

Se dieron dos tipos de dieta, según fue el grupo a tratar. Para los grupos control (C) e IFC se manejó una dieta estándar de acuerdo con las recomendaciones del

American Institute of Nutrition (AIN-93) (tabla 2) y agua pura para beber, *ad libitum*. El grupo HFS consumió la dieta estándar modificada, suplementada con grasas de origen animal, además de una solución de sacarosa al 10% en lugar de agua pura para beber. El grupo HFS+IFC también recibió la misma dieta modificada y la solución azucarada. Estas fueron implementadas durante 18 semanas, desde el inicio hasta el punto final de los tratamientos.

A continuación, se muestran las especificaciones sobre el contenido alimenticio.

**Tabla 2.** Componentes de dieta AIN-93 y modificaciones para HF.

	AIN-93 C	AIN-93 M	HF
Ingrediente	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
Caseína	200	140	240
L-Cistina	3	1.8	3
Almidón	397	465.692	239.03
Maltodextrina	132	155	102.67
Sacarosa	100	100	77.783
Aceite de soya	70	40	70
Celulosa	50	50	50
Mezcla de minerales	35	35	35
Mezcla de vitaminas	10	10	10
Colina	2.5	2.5	2.5
Manteca	0	0	170
TBHQ	0.013	0.013	0.013



El porcentaje calórico de carbohidratos y grasas en las dietas fue el siguiente:

AIN-93 C: 64 % carbohidratos y 16.7 % grasas.

AIN-93 M: 75.9 % carbohidratos y 10 % grasas.

HFS: 37 % carbohidratos y 45 % grasas más 410 cal/l en el agua para beber.

Las ratas C e IFC consumieron la dieta AIN-93 C (de crecimiento) desde el inicio de los tratamientos hasta que alcanzaron los 250 g de masa corporal. Entonces, esta fue sustituida por la de mantenimiento: AIN-93 M. Las ratas de los grupos HFS y HFS+IFC siempre consumieron la dieta HF y la solución azucarada (S).

El fármaco IFC-305 se preparó como sal de aspartato en solución salina (NaCl 0.9%) de acuerdo con lo descrito en la patente UNAM No 207422. Fue administrado diariamente durante las 18 semanas en la dosis mencionada en la tabla 1 y de la que ya se había reportado su eficacia en trabajos anteriores en enfermedades hepáticas.

En sustitución al IFC-305 a los animales del grupo control y HFS se les administró diariamente solución salina en un volumen equivalente.

## **5.2. Curva de crecimiento y parámetros de química sanguínea.**

- A) La ganancia de peso de cada rata se evaluó dos veces por semana durante las 18 semanas de tratamiento.
- B) Los niveles sanguíneos de glucosa fueron determinados en mg/dl con un glucómetro, mediante la obtención de una muestra de sangre por punción en el extremo caudal, al final de los tratamientos, después de haber sido ayunadas una noche anterior, mantenidas solamente con agua pura para beber.
- C) También se elaboraron curvas de tolerancia a la glucosa e insulina. Para la primera, se midió la concentración de glucosa en sangre antes y a los 15, 30, 60, 120 y 150 minutos después de haber administrado mediante vía intragástrica (i.g.) mediante una cánula, una solución de glucosa (3g/kg) en

3 ml de agua. La curva de tolerancia a insulina se llevó a cabo mediante la administración vía i.p. de insulina de acción rápida (100 UI/ml) a una dosis de 0.2 UI/kg con las mismas condiciones de ayuno y la posterior medición de glucosa en sangre en los mismos intervalos hasta los 120 minutos.

D) Los niveles séricos de insulina, triglicéridos y colesterol-LDL fueron cuantificados mediante ensayos colorimétricos espectrofotométricos comerciales. Las muestras se obtuvieron como sobrenadante de la centrifugación de sangre a 10,000 rpm/15 minutos a 4°C, extraída mediante punción cardíaca posterior a la administración intraperitoneal de pentobarbital monosódico (3 ml/kg) como método de eutanasia de las unidades experimentales, mantenidas en ayuno durante la noche inmediata anterior, suplementadas únicamente con agua para beber.

### **5.3. Análisis histológico hepático.**

Inmediatamente después de la eutanasia, el hígado fue extraído y pesado. Se tomaron secciones hepáticas de aproximadamente un cm<sup>3</sup> y fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante tres días. Posteriormente se deshidrataron en alcohol e incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 µm con micrótopo y fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H y E)<sup>[67,68]</sup>. Finalmente, las muestras fueron puestas al microscopio de luz (óptico) para su análisis detallado. Otras secciones de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup> fueron fijadas con glutaraldehído y tetraóxido de osmio, y deshidratadas para su inclusión en resina, corte con ultramicrotopo y montaje en rejillas para su análisis en microscopio electrónico de transmisión (MET).

### **5.4. Análisis de lípidos hepáticos.**

Se realizaron homogenados de secciones hepáticas en isopropanol en una relación de 50 mg/ml. Las muestras se centrifugaron a 4°C, a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes en la fase orgánica (isopropanol) y se

determinó su concentración de triglicéridos y colesterol mediante ensayos colorimétricos en un lector de placas.

### **5.5. Perfil de citocinas en suero e hígado.**

Mediante un ensayo de ELISA se cuantificaron las citocinas y quimocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, VEGF, IL-2, INF- $\gamma$ , así como IL-10 como citocina antiinflamatoria en suero, en un lector de microplaca, así como en extractos proteínicos de hígado obtenidos mediante la solución amortiguadora RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

### **5.6. Medición de lipoperoxidación hepática.**

Se homogenizaron 500 mg de tejido hepático en agua previamente sonicada, para determinar TBARS.

Se tomaron 300  $\mu$ l de homogenado y se añadieron 700  $\mu$ l de Tris HCl, 150 mM, para completar 1 ml. Se realizó una incubación a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se agregaron 2 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375 % disuelto en ácido tricloroacético (TCA) al 15 %.

Después de agitar lentamente, las muestras se pusieron en baño maría a punto de ebullición durante 45 minutos para centrifugarse a 3000 rpm por 10 minutos.

Por último, se hizo la lectura del sobrenadante en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm. Una parte de sobrenadante fue separada y diluida para cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.

La cantidad de TBARS fue obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$C = A/\epsilon l$$

Donde:

A Es la absorbancia de la muestra

l Es la longitud de la celda

$\epsilon$  Es el coeficiente de extinción del MDA ( $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ).

El MDA es la principal especie que reacciona al TBA, por lo que es considerado su coeficiente de extinción molar; sin embargo la técnica no es específica para este. Pueden verse involucrados otros productos de oxidación, como aldehídos no saturados.

El resultado fue expresado como nmoles de TBARS (MDA) sobre mg de proteína.

### **5.7. Determinación de glutatión hepático.**

Se emplearon 250 mg de tejido. Se homogenizaron con 3.75 ml de FEDTA (buffer de fosfatos-EDTA: fosfato de sodio monobásico 0.1M + EDTA 0.005M, pH 8.0) + 1 ml de ácido fosfórico al 25% y posteriormente fueron centrifugados a 12,000 rpm por 30 minutos a 4°C.

Los sobrenadantes se separaron y se utilizaron para la determinación de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) de manera independiente.

Para medir la concentración de GSH se agregaron 4.5 ml de FEDTA a 0.5 ml de sobrenadante.

Después de agitar suavemente, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla anterior y se le añadieron 1.8 ml de FEDTA y 100  $\mu\text{l}$  de O-ftalaldehído (OPT) (1 mg/ml disuelto en metanol absoluto). A continuación, se realizó una incubación de 15 min a temperatura ambiente, en oscuridad.

Las muestras fueron cargadas sobre una microplaca oscura y se leyó su fluorescencia a 420 y 350 nm de emisión y excitación, respectivamente.

Para el caso del GSSG, se tomaron 0.5 ml del sobrenadante original y se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de N-etilmaleimida (NEM) 0.04 M. Se realizó una incubación de 30 min a temperatura ambiente y después se agregaron 4.3 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N.

Se agitó la mezcla anterior y se tomaron de ella 100  $\mu$ l, a los cuales se añadió 1.8 ml de NaOH y 100  $\mu$ l de OPT. Se hicieron lecturas de emisión y excitación iguales a las realizadas para GSH, después de haber agitado e incubado las muestras 15 minutos en oscuridad.

Los resultados fueron expresados como  $\mu$ moles de glutatión (GSH o GSSG) sobre g de tejido. Para ello, se realizaron curvas de concentración para GSH y GSSG (tablas 3 y 4, respectivamente).

**Tabla 3.** Esquema de adición para curva de GSH.

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
GSH ( $\mu$ g)	0	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.1	1.3	1.4
GSH ( $\mu$ l)	0	20	25	30	35	40	45	55	65	70
FEDTA (ml)	1.90	1.88	1.875	1.87	1.865	1.86	1.855	1.845	1.835	1.83
OPT ( $\mu$ l)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezclar bien y dejar a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos.										
Obtener la intensidad de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión.										

El estándar de GSH fue preparado en FEDTA a una concentración de 20  $\mu$ g/ml.

**Tabla 4.** Esquema de adición para curva de GSSG.

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
GSSG ( $\mu\text{g}$ )	0	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.1	1.3	1.4
GSSG ( $\mu\text{l}$ )	0	20	30	40	50	60	70	80	90	100
NaOH (ml)	1.90	1.88	1.87	1.86	1.85	1.84	1.83	1.82	1.81	1.80
OPT ( $\mu\text{l}$ )	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezclar bien y dejar a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos.										
Obtener la intensidad de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión.										

El estándar de GSSG fue preparado en NaOH 0.1 N a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

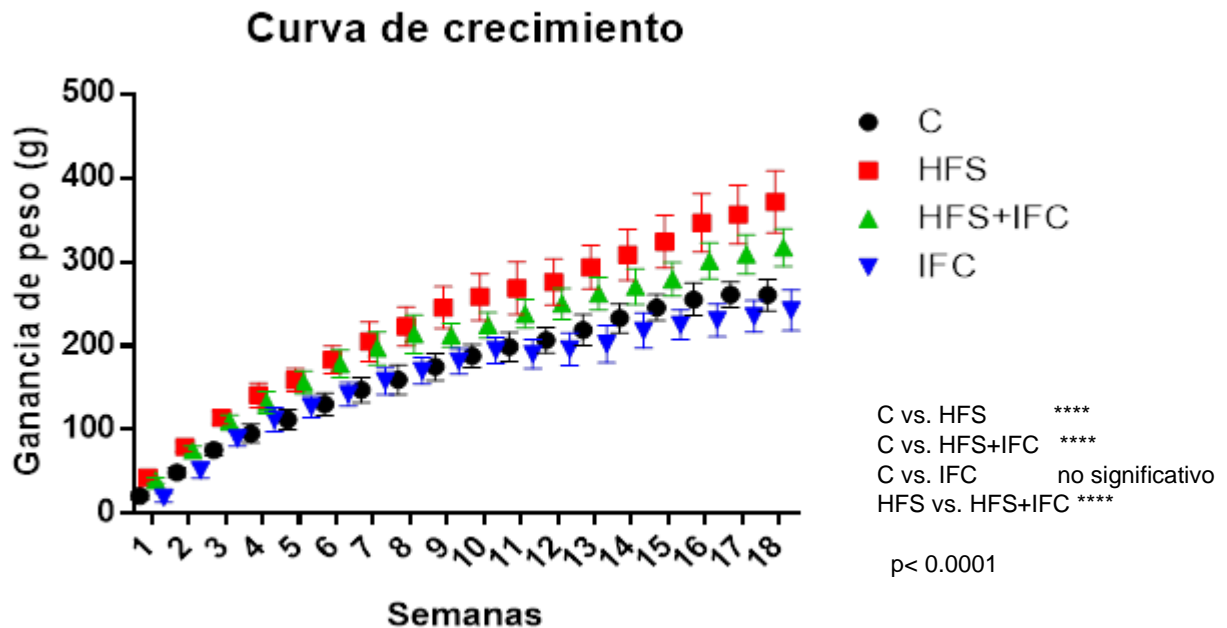
### **5.8. Análisis estadístico.**

Todos los datos fueron presentados como media  $\pm$  error estándar. La determinación de la existencia de diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples o análisis de Fisher, según fuera necesario. Se comparó el promedio y desviación estándar de cada grupo contra cada uno de los demás. Los resultados fueron expresados con la letra a cuando la diferencia encontrada fue respecto al grupo control; con b respecto al grupo HFS, con c y d contra los grupos HFS+IFC e IFC, respectivamente. Se consideró  $p < 0.05$  como diferencia estadísticamente significativa. Los análisis se realizaron con el programa Prism-GraphPad 6.

## 6. Resultados.

### 6.1. Parámetros de síndrome metabólico para la estandarización del modelo experimental y el efecto del IFC-305 sobre ellos.

#### 6.1.1. Sobrepeso u obesidad.

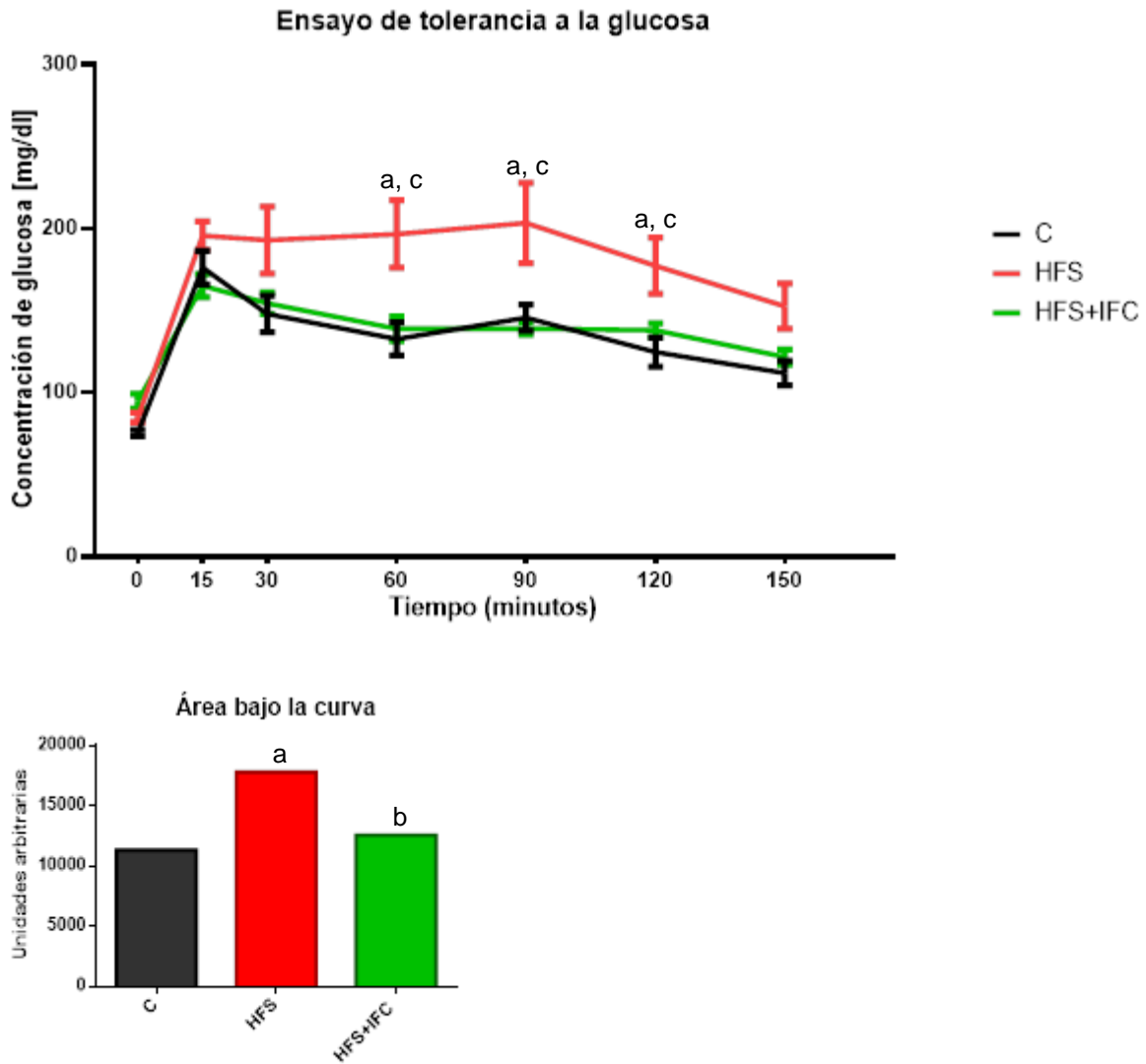


**Figura 2.** Curva de crecimiento. Se muestra la ganancia de peso durante las 18 semanas de tratamiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y prueba de Fisher sin correcciones.

Como parte de la caracterización de este modelo, se obtuvo que con la dieta alta en grasas y sacarosa las ratas desarrollaron obesidad. Estas ganaron cerca del doble de peso ( $\approx 75\%$ ) respecto a los grupos control y el que solamente tiene la administración de IFC-305. Estos cambios son diferentes estadísticamente.

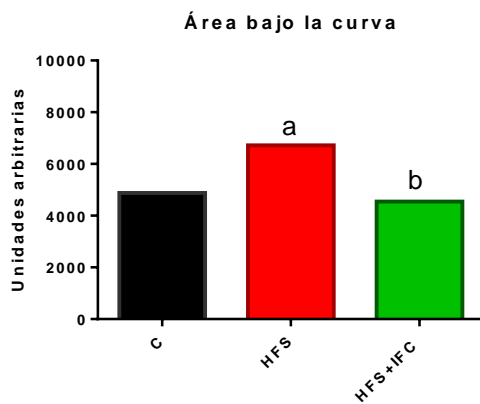
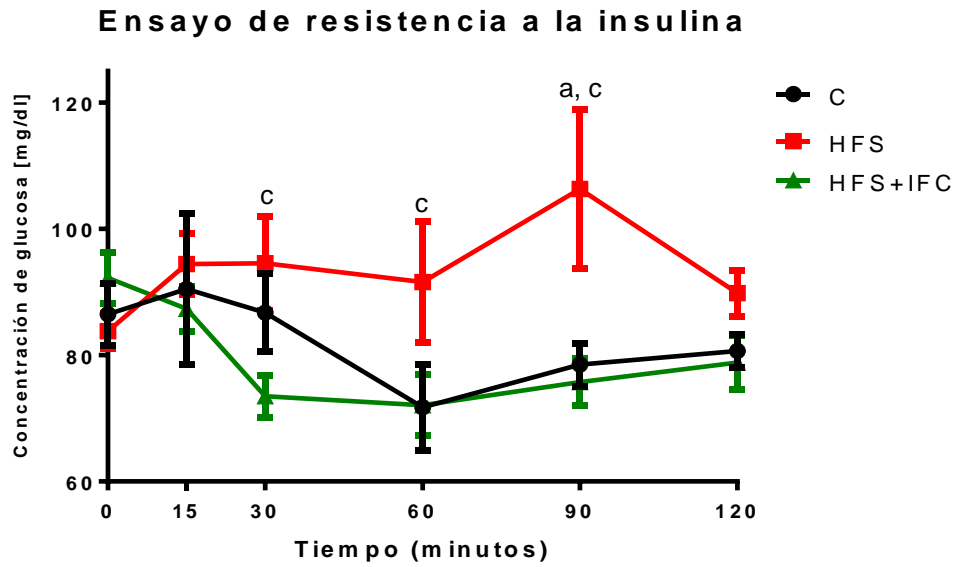
Por otro lado, el fármaco, al ser administrado de manera simultánea a la dieta, previno parcialmente el aumento de peso; lo que dio como resultado un estado intermedio entre los grupos controles y el de síndrome metabólico, corroborado mediante el análisis estadístico.

### 6.1.2. Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.



**Figura 3.** Ensayo de tolerancia a la glucosa (ETG). En el panel superior se observa la concentración de glucosa en sangre antes (0) y a los 15, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después de administrar glucosa vía i.g. como se muestra en los métodos. Las letras sobre los puntos representan diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos C (a), HFS (b) o HFS+IFC (c). En el panel inferior se grafica el área bajo la curva. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y pruebas posteriores de Fisher sin correcciones para determinar las diferencias en toda el área bajo la curva y de Tukey para mostrar las diferencias en los puntos específicos.  $P < 0.05$ .





**Figura 4.** Ensayo de tolerancia a la insulina. Se midió la glucosa en sangre antes (0) y a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de administrar insulina vía i.p. como se muestra en los métodos. Las letras sobre los puntos representan diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos C (a), HFS (b) o HFS+IFC (c). En el panel inferior se grafica el área bajo la curva para cada grupo. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y pruebas posteriores de Fisher sin correcciones para determinar las diferencias en toda el área bajo la curva y de Tukey para mostrar las diferencias en los puntos específicos.

Para continuar el análisis de elementos del síndrome metabólico, se realizaron los ensayos de tolerancia a glucosa e insulina (figuras 3 y 4). La respuesta esperada ante un estímulo con glucosa es el aumento de esta en circulación, en un lapso corto, y su retorno a los niveles basales conforme transcurre el tiempo. Esto se observa en los grupos C y HFS+ IFC (Figura 3, panel superior), así como en el que solo tuvo la administración del fármaco durante las 18 semanas (ensayo independiente, datos no mostrados). El grupo HFS muestra un efecto sostenido en el aumento de glucosa sanguínea. Dicho incremento fue aproximadamente al doble con el estímulo y en la última medición (150 min) la concentración de glucosa se mantuvo por arriba de los grupos C y HFS+IFC. No obstante, el análisis estadístico corroboró que las diferencias se dieron de los 60 a los 120 minutos.

El área bajo la curva fue estadísticamente mayor para el grupo HFS, respecto a los otros ya mencionados (Figura 3, panel inferior).

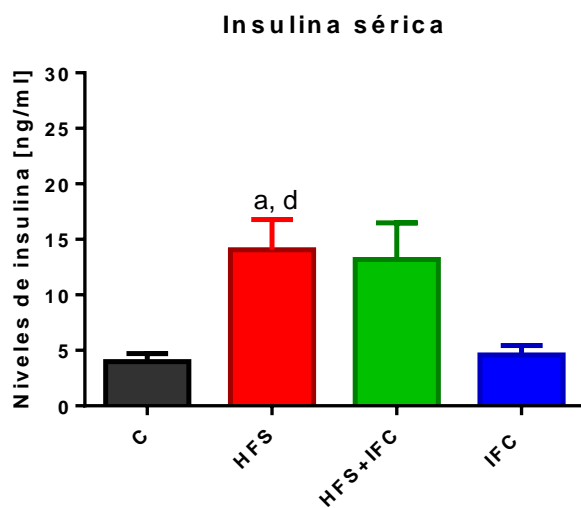
El efecto de la administración de insulina exógena sobre la glucosa en circulación es contrario. Conforme transcurre el tiempo hay disminución de la concentración original de glucosa y más tarde se recupera. Cuando existe resistencia a este efecto no se observa dicha tendencia. Este comportamiento se dio en el grupo HFS (Figura 4, panel superior). En la primera medición la pendiente fue positiva y después se sostuvo con pequeñas variaciones hasta el final del ensayo. Para el grupo C a los 15 minutos no hubo cambios en la concentración de glucosa, dada la dispersión de los datos. Posteriormente se notó el comportamiento esperado, teniendo el pico menor en el cuarto punto de la gráfica (60 min), para recuperarse lentamente en las mediciones posteriores.

El grupo HFS+IFC se comportó de manera similar al control. Al principio su pendiente es más negativa, lo que pareciera indicar que en este grupo hay mayor sensibilidad a la acción de la insulina y aunque el análisis estadístico no arroja diferencias entre estos grupos en ningún punto, respecto al grupo HFS se ven más diferencias (a los 30, 60 y 90 min) al comparar contra HFS+IFC que contra C, con diferencias solamente a los 90 min. A expensas de lo anterior, la prueba de Fisher

indica que el área bajo la curva (Figura 4, panel inferior) es igual entre los grupos C y HFS+IFC y diferente del grupo HFS.

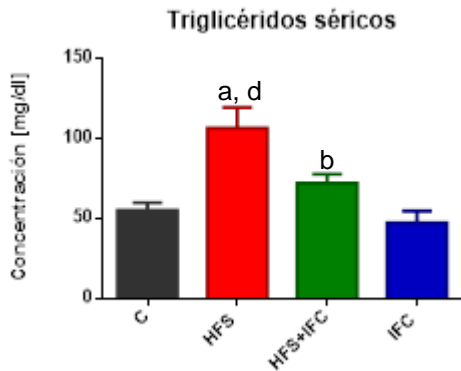
Hasta este momento se pudo concluir que los animales alimentados con la dieta hipercalórica presentaron aumento anormal de peso, intolerancia a glucosa exógena y resistencia a la acción de la insulina sobre la glucosa.

### 6.1.3. Hiperinsulinemia.

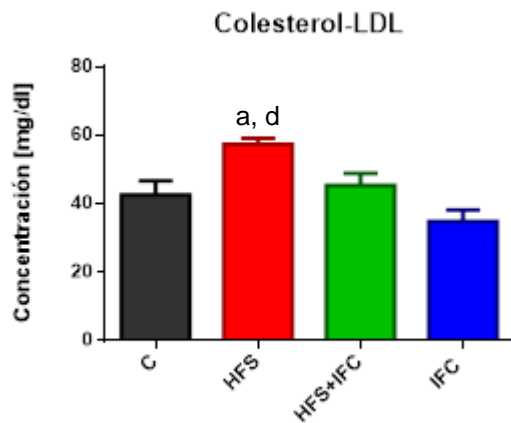


**Figura 5.** Insulina en suero. Se muestran los niveles de insulina tras las 18 semanas de tratamientos. Las letras representan cambios significativos respecto al grupo control (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d). Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey de comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ .

#### 6.1.4. Dislipidemias.



**Figura 6.** Concentración de triglicéridos en suero. Se muestran los niveles de triglicéridos al finalizar los tratamientos. Las letras representan cambios significativos respecto al grupo C (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d). Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey de comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ .



**Figura 7.** Concentración de colesterol-LDL en suero. Las letras representan cambios significativos respecto al grupo C (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d). Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey de comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ .

Siguiendo la línea de la caracterización del modelo se encontró que tanto la insulina como triglicéridos y el colesterol-LDL aumentan después del tratamiento con la dieta hipercalórica, respecto al grupo control y al que le fue administrado IFC-305 y dieta

estándar (figuras 5-7). Controversialmente no se encontraron diferencias entre los grupos HFS y HFS+IFC en la concentración sérica de insulina (figura 5), aunque sí en su curva de tolerancia (figura 4). El IFC-305 tuvo respuesta protectora sobre los niveles de triglicéridos en circulación (figura 6).

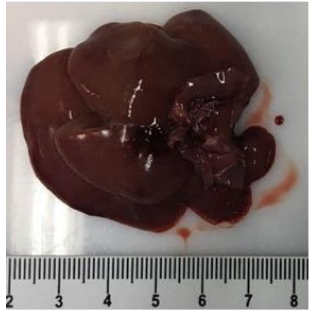
Los resultados muestran que las ratas alimentadas con la dieta HF + sacarosa al 10% desarrollan elementos característicos de síndrome metabólico. Se determinó que el grupo HFS presentó obesidad, desregulación en la concentración de glucosa sanguínea ante estímulos independientes con glucosa e insulina, así como altos niveles de insulina, triglicéridos y colesterol-LDL en circulación.

De manera simultánea, se hallaron los primeros efectos del compuesto IFC-305. En los antecedentes directos se hace mención de que esta sal de adenosina no genera efectos adversos. En este modelo, específicamente, se demostró que no afecta a la ganancia de peso, la tolerancia a la glucosa, ni los niveles de insulina y lípidos en suero. Además, se demostró que su administración ante la dieta hipercalórica previene parcialmente la obesidad, ayuda a mantener regulada la concentración de glucosa en sangre y evita el aumento de triglicéridos séricos.

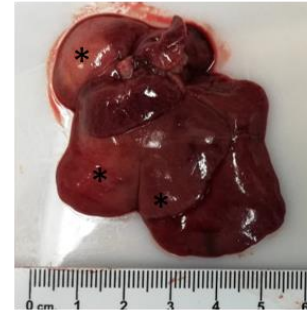
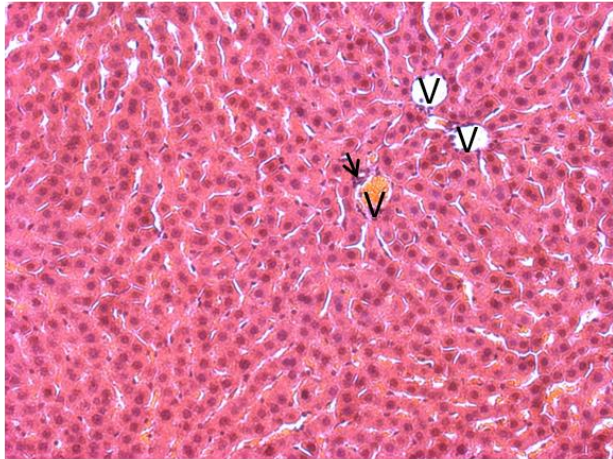
## **6.2. Parámetros de daño hepático para la estandarización del modelo experimental y el efecto del IFC-305 sobre ellos.**

### **6.2.1. Análisis histológico.**

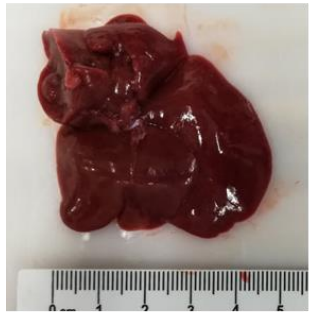
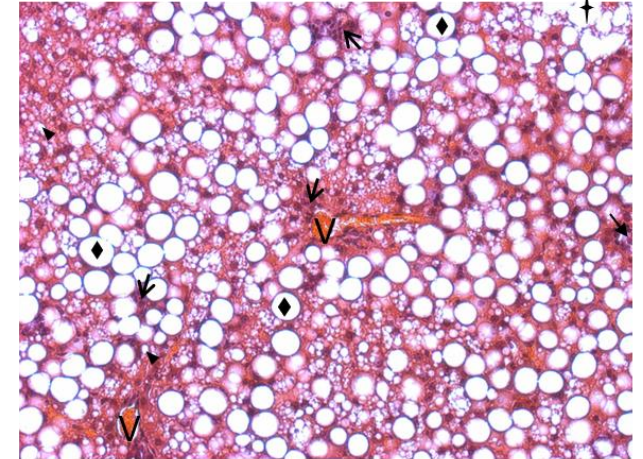
Se procesaron secciones hepáticas tomadas todas de la misma región, del mismo lóbulo, para cada unidad de experimentación de acuerdo con lo que se menciona en los métodos, para su visualización en microscopio óptico, así como MET. A continuación, se encuentran las imágenes obtenidas de secciones representativas, con su respectivo análisis.



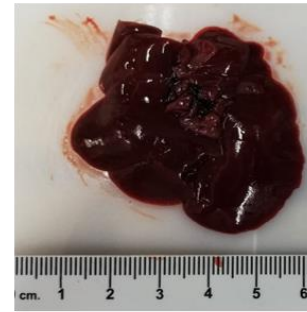
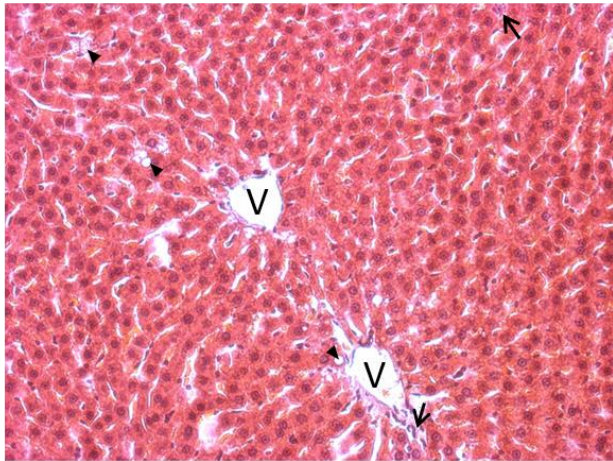
CONTROL



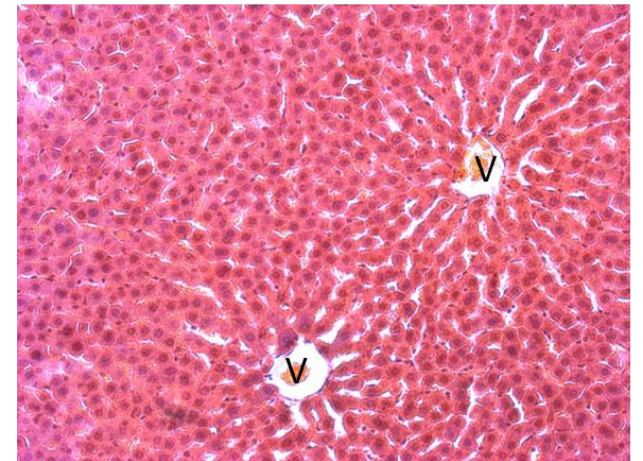
HFS



HFS+IFC



IFC



**Figura 7.** Hígados y secciones tisulares teñidas con H y E. Se muestran hígados representativos de cada grupo (n= 5-7). Las secciones teñidas fueron vistas bajo microscopio óptico a un aumento de 20X. Se observan muestras representativas de cada grupo. \*: Cambio en coloración, V: Vaso sanguíneo, ▲: esteatosis microvesicular, ◆: esteatosis macrovesicular, ↘: infiltrado inflamatorio, ✦: Zona con muerte celular.

Los hígados del grupo control tuvieron la morfología y color característicos. No se encontró algún signo macroscópico que evidenciara daño. Lo mismo fue visto en los correspondientes al grupo IFC. En ambos casos, en las secciones histológicas se observó la estructura típica de los lobulillos hepáticos, que consiste en una vena (V) rodeada en su mayoría de hepatocitos, en disposición radial, con separaciones entre ellos, donde se encuentra tejido conectivo y espacios de Disse o perisinusoidales, en los que suele haber otros tipos celulares, como los relacionados al sistema inmune (∇) que residen allí o vienen del flujo sanguíneo.

En el grupo HFS se notó la pérdida de coloración marrón (\*) en varios lóbulos, debido a la acumulación de grasa, por lo que tiende a tornarse amarillo. Alrededor de la vena se localiza una mayor cantidad de células inflamatorias, además de que se ve la formación de infiltrados en varias zonas alejadas del vaso.

Otra característica importante es la presencia de vesículas de lípidos en prácticamente todo el campo. Se notan micro (▲) y macrovesículas (◆). Estas últimas reflejan el estado conocido como “balonamiento” celular, por su morfología similar a un globo. En algunas regiones también se encontró muerte del tejido (✦), provocada por la rotura de las membranas de los hepatocitos, al contener grasa en exceso.

Lo mencionado anteriormente refleja un estado de NASH, según los parámetros histopatológicos utilizados en su diagnóstico. En la práctica clínica, la esteatosis simple es diferenciada de la NASH por medio de valores o “score” de actividad para EHGNA, donde se engloban características histológicas de ambos grados de daño hepático y pueden ser diferenciadas de acuerdo con su puntaje. La siguiente tabla menciona dichos valores.



**Tabla 5.** Valores de actividad de EHGNA<sup>[69]</sup>.

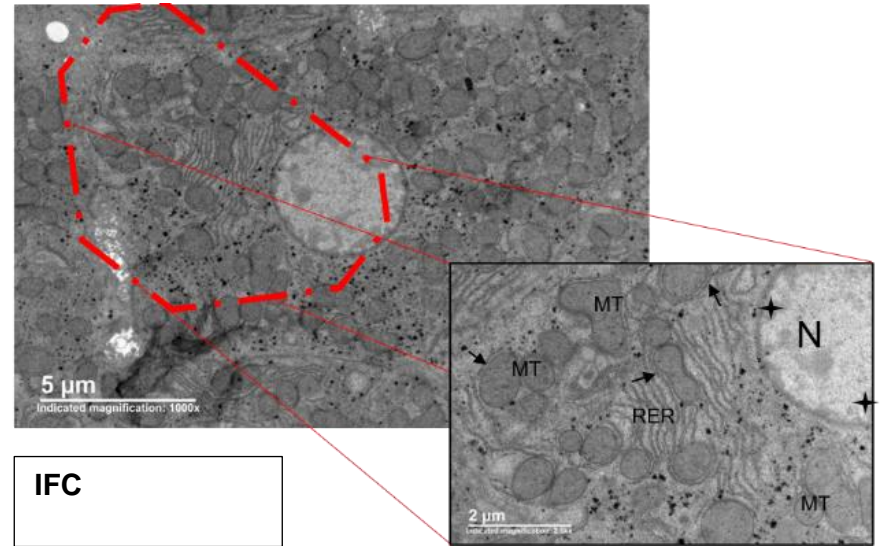
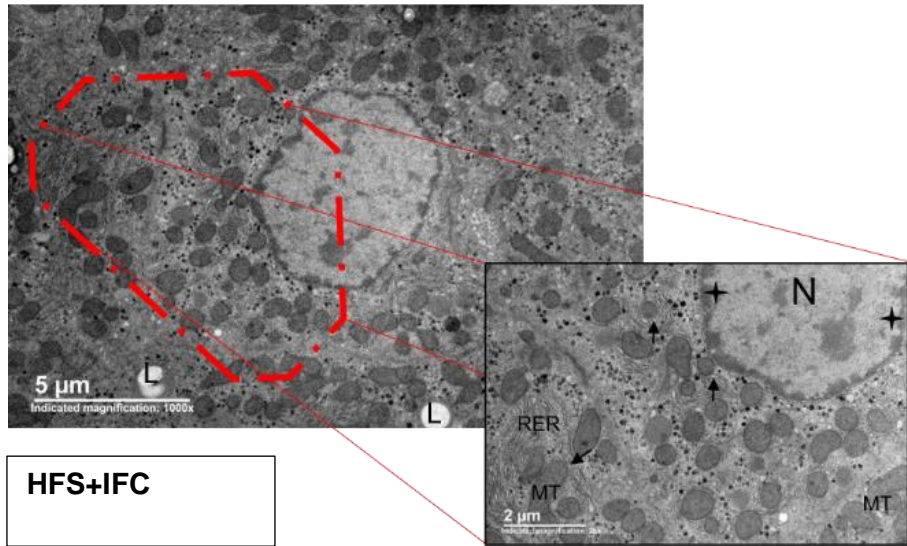
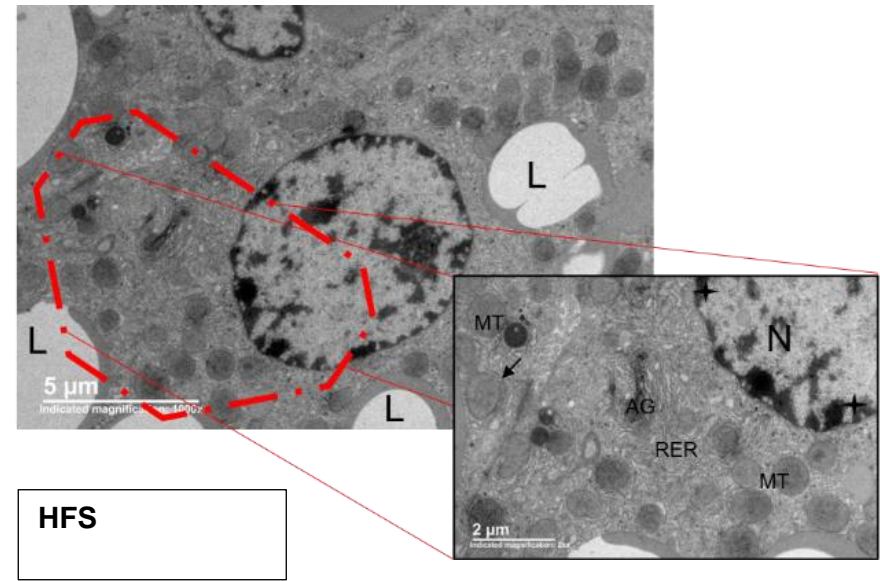
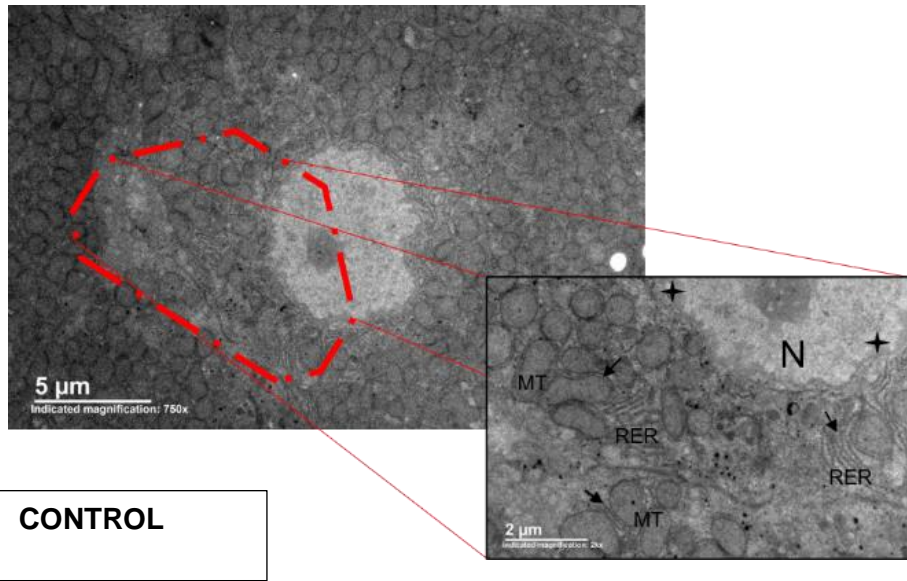
Característica	Puntaje	Extensión
Esteatosis	0	<5% de hepatocitos por campo
	1	5-33%
	2	34-66%
	3	>66%
Inflamación lobular	0	No hay focos
	1	<2 focos/campo x20
	2	2-4
	3	>4
Balonamiento hepático	0	Nula
	1	Baja
	2	Alta
Puntaje total	0-2	Sin EHGNA o esteatosis simple
	3-4	Esteatosis simple a límite para NASH
	5-8	Mayoritariamente NASH

Según los valores, las muestras del grupo HFS tuvieron en promedio un puntaje de 6.43, en comparación con los grupos controles (C e IFC) que fue menor a uno en ambos casos y 2.5 para el grupo HFS+IFC.

En el grupo HFS+IFC generalmente no se encontraron cambios macroscópicos respecto al control. En algunos hígados se notó un ligero cambio en la coloración. Los cortes histológicos teñidos con H y E mostraron una arquitectura similar a la de los grupos sanos. Se observaron, no obstante, microvesículas lipídicas y células del sistema inmune, aunque estas últimas estaban en su mayoría asociadas a vasos sanguíneos, como sucede normalmente y en menor agregación respecto al grupo HFS.

Las imágenes obtenidas por ME que se muestran a continuación contribuyeron sustancialmente a profundizar en el daño hepático establecido por la dieta hipercalórica.





**Figura 8.** Secciones hepáticas vistas bajo MET (n= 3-4). Se observan muestras representativas de cada grupo a diferentes aumentos. N: núcleo, MT: mitocondria, RER: retículo endoplásmico rugoso, L: vesícula lipídica, AG: aparato de Golgi,  $\blacktriangledown$ : RER asociado a MT,  $\blackstar$ : cromatina.

En la figura 8 se aprecian imágenes representativas de cada grupo tratadas para MET a dos diferentes aumentos.

En la muestra control se señala un hepatocito sano. Los hepatocitos generalmente muestran una gran cantidad de mitocondrias (MT), como se muestra en la imagen, debido a su alta actividad metabólica. También hay abundante retículo endoplásmico rugoso (RER) y este, en muchas ocasiones, se asocia a las mitocondrias (↘), lo cual se aprecia con mayor facilidad en el aumento más cercano.

Estas asociaciones generalmente se dan entre membranas de ambos organelos y se implican en varias funciones, como el movimiento de calcio intracelular, la síntesis y transporte de lípidos, así como dinámica mitocondrial<sup>[70]</sup>.

En la imagen continua (HFS) se observa una célula hepática dañada. Las mitocondrias no tuvieron su morfología típica y fueron más electrodensas. Se hallaron menos asociaciones entre estos organelos y RER en comparación con el control, y en este último fue complicado notar la presencia de ribosomas (nótese en la micrografía con mayor acercamiento). También el número de mitocondrias observadas por campo fue menor respecto al grupo anterior.

El núcleo (N) fue otro organelo con cambios. En él se encontró que la cromatina (✦) en general tuvo mayor electrodensidad, lo que sugiere un estado de compactación mayor.

En el campo mostrado se ve aparato de Golgi (AG). También se apreciaron vesículas lipídicas (L), como en la microscopía óptica.

El tratamiento con IFC-305 corroboró que las vesículas lipídicas fueron de menor tamaño y en menor cantidad. Además, se notó un incremento en el número de mitocondrias, respecto a las muestras HFS. Estas se vieron una vez más asociadas a RER, también con mayor frecuencia que ante solamente la dieta modificada. En el RER fue más fácil encontrar los ribosomas. Por último, la cromatina nuclear mostró menor electrodensidad.

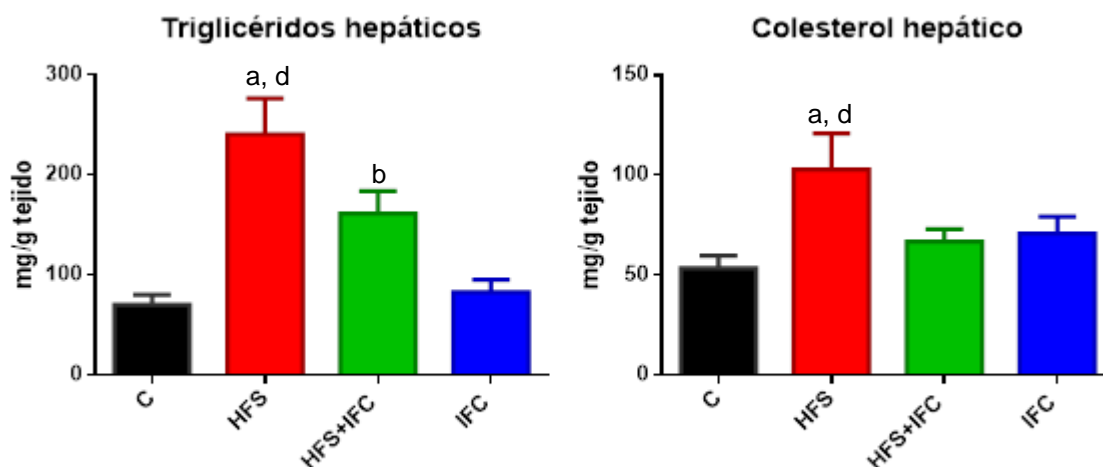
El tratamiento con IFC-305, en las ratas alimentadas con dieta estándar (IFC), no provocó algún fenotipo desfavorable en las células hepáticas observadas. Se

hallaron múltiples mitocondrias, así como abundante RER, comunicados entre ellos y cromatina nuclear laxa.

Estos hallazgos fueron importantes, ya que no solo corroboraron el daño tisular y la hepatoprotección por parte de la sal de adenosina en cuestión, si no que dieron pie para la búsqueda de las implicaciones tanto de la dieta como del compuesto sobre la inflamación y el daño oxidante.

### 6.2.2. Determinación cuantitativa de lípidos hepáticos.

Se cuantificó la concentración de lípidos en extractos hepáticos (figura 9), obtenidos mediante un solvente orgánico. Se determinó la concentración de triglicéridos y colesterol total y se notó una vez más su incremento en el grupo HFS, respecto a los grupos que fungieron como controles. También se observó la prevención del incremento en los niveles de triglicéridos en el tejido, por el tratamiento con IFC-305 ante la dieta hipercalórica.

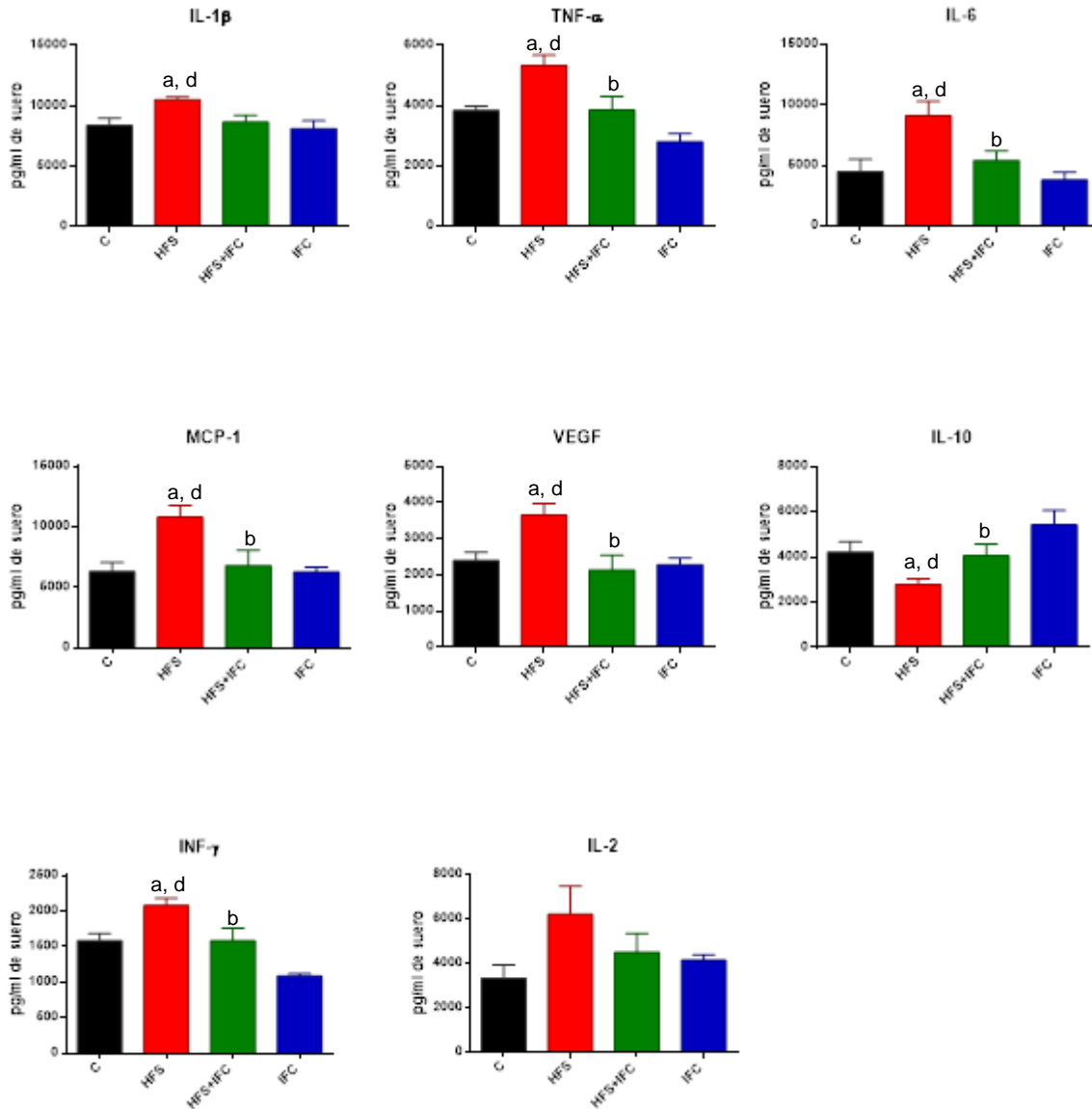


**Figura 9.** Perfil de lípidos hepáticos. Se muestran las concentraciones de triglicéridos y colesterol en extractos orgánicos hepáticos. Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d). Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey de comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ .

### 6.2.3. Inflamación sistémica y hepática.

Para evaluar tanto la inflamación sistémica como específicamente en el hígado, se cuantificaron citocinas y quimiocinas implicadas en el proceso.

a) Evaluación de marcadores de inflamación sistémica:

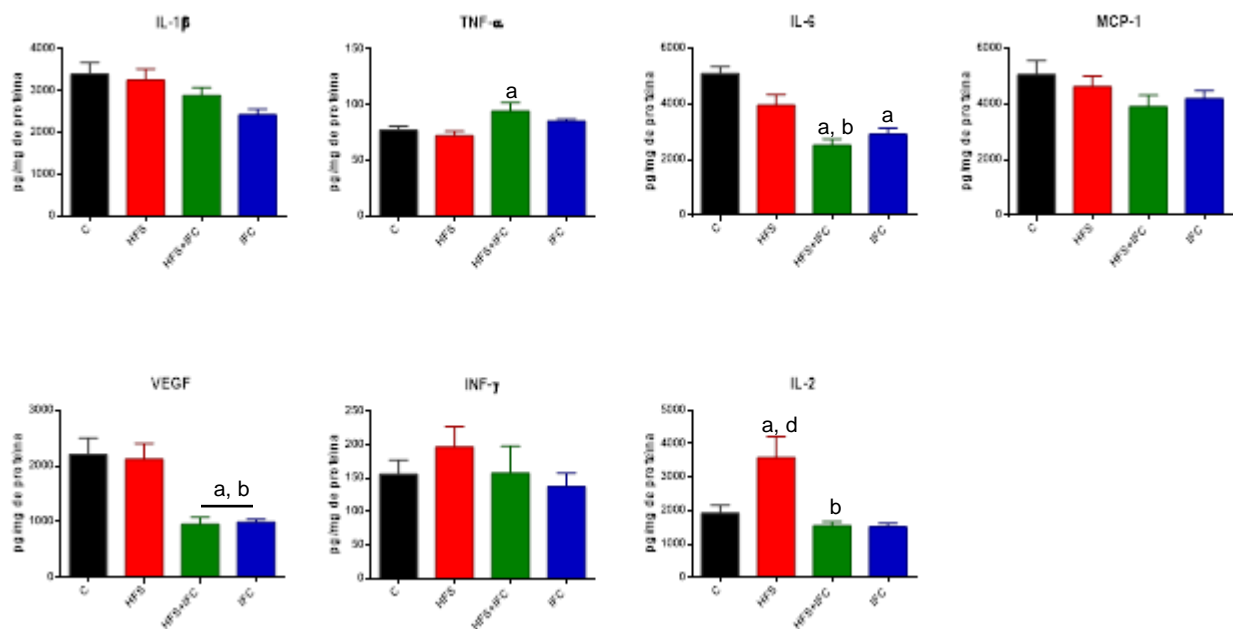


**Figura 10.** Perfil de citocinas séricas. Se midieron las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ , IL-2, la quimiocina reclutadora de macrófagos MCP-1, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la interleucina antiinflamatoria IL-10. Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d). Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey de comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ .

Como puede observarse en la figura anterior, la concentración de todas las moléculas proinflamatorias, excepto IL-2, aumentó en el grupo HFS, mientras que la de IL-10, que es antiinflamatoria, disminuyó. Todo ello, respecto al grupo control. Este indicio de indicadores de inflamación circulantes puede atribuirse directamente al aumento de peso y los estímulos persistentes por el daño crónico de bajo grado<sup>[29]</sup>.

Por otro lado, la respuesta del compuesto IFC-305 ante el consumo de la dieta HFS fue evidente. Dicha molécula fue capaz de prevenir la hipersecreción de los mediadores proinflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, VEGF e INF- $\gamma$ , mientras que aumentó los niveles circulantes de IL-10. La administración del mismo con la dieta estándar, no mostró ningún cambio respecto al grupo control.

b) Evaluación de marcadores de inflamación hepática:

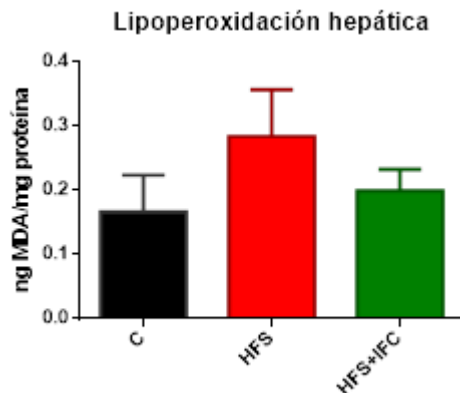


**Figura 11.** Perfil de citocinas hepáticas. Se midieron las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ , IL-2, la quimiocina MCP-1 y el factor de crecimiento VEGF. Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d). Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey de comparaciones múltiples. P<0.05.

Para el caso particular del hígado, la mayoría de las citocinas no presentó cambios en su concentración en el grupo HFS respecto al control; no obstante, los niveles de IL-2 aumentaron. Dicho incremento fue prevenido por la administración de IFC-305 ante la dieta hipercalórica.

Las concentraciones de IL-6 y VEGF disminuyeron en el grupo HFS+IFC respecto a los grupos control y HFS. Sin embargo, dicho comportamiento fue semejante con la administración del fármaco y la dieta estándar. Además, los niveles de TNF- $\alpha$  incrementaron en el grupo HFS+IFC con relación al control.

#### 6.2.4. Estrés oxidante y respuesta antioxidante.



**Figura 12.** Cuantificación de TBARS en tejido hepático. Se expresa como concentración de MDA como producto final de la lipoperoxidación. Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d). Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey de comparaciones múltiples.  $P < 0.05$ .

La concentración de TBARS no fue afectada ante el estímulo de la dieta hipercalórica (figura 12). La administración de IFC-305 tampoco demostró algún cambio significativo.

**Tabla 6.** Niveles de glutatión en homogenados hepáticos.

Parámetro/Grupo	C	HFS	HFS+IFC
GSH ( $\mu\text{mol/g}$ tejido)	8.97 $\pm$ 0.38	5.94 $\pm$ 0.89	5.27 $\pm$ 1.17
GSSG	0.43 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
GSH/GSSG	21.99 $\pm$ 2.83	21.29 $\pm$ 4.39	19.93 $\pm$ 3.09
GSH+GSSG	9.39 $\pm$ 0.42	6.27 $\pm$ 0.88	5.52 $\pm$ 1.18

Se evaluaron las concentraciones de GSH y GSSG de manera independiente. Asimismo, se determinó la relación entre la forma reducida y oxidada (GSH/GSSG), así como la suma de ambas especies (GSH+GSSG) para cada grupo. Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C (a), HFS (b), HFS+IFC (c) o IFC (d).

Por otro lado, en la determinación de glutatión (tabla 6), las diferencias encontradas en su concentración en la forma reducida (GSH) no fueron estadísticamente significativas entre los grupos; mientras que la forma oxidada (GSSG) disminuyó en el grupo HFS+IFC respecto al grupo control, no obstante que el grupo HFS permaneció sin cambios. Por último, la relación entre sus especies (GSH/ GSSG) así como la suma de ambas (GSH+GSSG) se mantuvo sin alteraciones.

Se podría inferir que el estado de óxido-reducción en el hígado no se modifica; sin embargo es necesario analizar otras moléculas o sistemas relacionados con el estrés oxidante y la respuesta ante el mismo, para poder concluir si el consumo de la dieta alta en grasas y azúcares tiene algún efecto directo.

## 7. Discusión.

El concepto de síndrome metabólico actualmente es de alta importancia por el aumento en su prevalencia y al ser factor de riesgo para otras enfermedades<sup>[71]</sup>. Además de una alta ingesta calórica, la inactividad física se ha evidenciado como uno de los principales factores ambientales para su establecimiento<sup>[72]</sup>. Cabe enfatizar la necesidad de comprender esta enfermedad en función de la interacción de los sistemas involucrados en la absorción, almacenamiento, detección y uso de energía química, y los niveles en que puede existir disfunción de los mismos<sup>[10]</sup>.

Tanto investigaciones clínicas como modelos experimentales han determinado que el consumo excesivo de grasas se relaciona positivamente con el aumento de peso; además, hacen evidente una mayor incidencia de síndrome metabólico y colelitiasis en las poblaciones que incluyen en su alimentación una tasa elevada de azúcares y harinas refinadas<sup>[73-75]</sup>.

Para la investigación básica y el análisis de moléculas con interés terapéutico, los modelos animales pueden proveer buenas aproximaciones. Algunos consisten en el establecimiento de dietas específicas para el desarrollo de la enfermedad, que generalmente se basan en un contenido hipercalórico, y otros en la modificación genética de las unidades experimentales en moléculas clave para el metabolismo de lípidos y/o carbohidratos<sup>[76]</sup>.

Varios diseños experimentales, en roedores de distintas cepas, se basan en observar los efectos de la sacarosa y/o fructosa en complemento de alimentos sólidos altos en grasas, carbohidratos o en combinación<sup>[77]</sup>. En el caso del uso exclusivo de soluciones ricas en fructosa o sacarosa en sustitución del agua para beber los datos son controversiales<sup>[77]</sup>. Por ejemplo, algunos de ellos no muestran aumento significativo en la masa corporal de los animales, mientras que otros sí<sup>[72,78,79]</sup>. Por otro lado, existen modelos que además de síndrome metabólico, también reflejan parte del espectro de la EHGNA, en su mayoría esteatosis simple o NASH<sup>[72]</sup>.



El modelo experimental planteado para el presente trabajo buscó la presentación de características clínicas tanto para síndrome metabólico como para EHGNA. Su montaje fue en ratas macho de la cepa *Wistar*, y se empleó la combinación de una dieta sólida alta en grasa (45% kcal) y una solución de sacarosa al 10%, modificada de una dieta estándar de acuerdo con las recomendaciones por AIN-93, referida en la sección de métodos<sup>[65,66]</sup>. Este resultó de la sustitución de un modelo anterior, en el que se administró de manera diaria una emulsión rica en lípidos, suplementaria a la dieta estándar para roedores, además de una solución de sacarosa al 18% en ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley*, cuyos resultados obtenidos fueron contradictorios a lo reportado por los autores<sup>[64]</sup>.

Entre las premisas favorables se encontraba el corto tiempo de duración del modelo (seis semanas), ya que para el establecimiento del cuadro de síndrome metabólico y daño hepático exclusivamente mediante componentes dietarios, este es más prolongado.

En el anexo se puede ver que casi todos los resultados esperados no se pudieron replicar en más de una ocasión, lo cual pudo atribuirse al estrés en que los animales se encontraron al hacer la administración de la emulsión mediante una cánula, diariamente, además de que se ha descrito previamente a la cepa *Sprague-Dawley* como resistente a la obesidad<sup>[80]</sup>.

En el nuevo protocolo se encontró que los animales alimentados con la dieta alta en grasas y solución con sacarosa al 10% durante 18 semanas, desarrollaron aumento de peso significativo (aprox. 75% respecto al grupo control) (figura 2); similar a lo ya reportado<sup>[66]</sup>. Además, tuvieron alteraciones en parámetros bioquímicos séricos indicadores de síndrome metabólico: insulina, triglicéridos y colesterol LDL (figuras 5-7).

Estudios acerca de la acción de la adenosina sobre sus receptores, la han propuesto como una posible aproximación terapéutica en el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico. En general, se conoce que la activación de su receptor A1 aumenta la adipogénesis y disminuye la lipólisis, en A2A tiene un efecto contrario, mientras que sobre a A2B disminuye la resistencia a la insulina y la adipogénesis<sup>[53]</sup>.

Por otro lado, se sabe que el IFC-305 regula la activación de los receptores A2A y A3 en el carcinoma hepático inducido, cuyas sobreexpresiones en el tejido se han relacionado positivamente con el crecimiento tumoral; aunque también se ha analizado a la adenosina como un agente anticancerígeno<sup>[55]</sup>.

No se ha evaluado la expresión o cantidad de receptores hepáticos o circulantes en la propuesta aquí planteada, sin embargo se hace notoria una prevención parcial del aumento de peso ante la dieta obesogénica (figura 2). Esto podría traer por consecuencia directa la concentración de triglicéridos similar al grupo control (figura 6), por lo que se podría sugerir un análisis con mayor profundidad en pro de intentar esclarecer un mecanismo de acción.

Los ensayos de tolerancia a la glucosa e insulina (figuras 3, 4) también fueron determinantes para establecer que se dio un cuadro de síndrome metabólico. Los valores de glucosa en sangre reflejan un equilibrio entre la absorción intestinal de carbohidratos, la producción y el transporte de glucosa hepática y su captación periférica<sup>[81]</sup>.

Durante el ETG el primer valor refleja la homeostasis de glucosa basal; mientras que los siguientes puntos de la curva vienen tanto de su salida hepática, como de la carga de glucosa obtenida al realizar la prueba<sup>[81]</sup>. Así pues, los animales alimentados por la dieta hipercalórica desarrollaron intolerancia a la glucosa, pero sin llegar a diabetes, ya que el primer punto de la curva (T0, en el ayuno) no muestra alguna diferencia respecto a su control (figura 3) pero una vez administrada la glucosa exógena, esta se mantiene elevada durante más tiempo.

En la curva siguiente (figura 4) se observa el fenómeno de resistencia a la insulina en las ratas del grupo HFS. Dicha anomalía refiere a la incapacidad de la insulina, exógena o endógena, para aumentar la captación y utilización de glucosa. Generalmente la insulina actúa mediante la unión a su receptor membranal, con el desencadenamiento de una serie de interacciones proteínicas cuyas vías están involucradas en el metabolismo intermediario y en el crecimiento y proliferación celular<sup>[82]</sup>.

Se puede decir que los animales alimentados con la dieta HFS no absorben o captan correctamente la glucosa, por lo que mantienen niveles elevados de la misma en circulación. Además, esto está ligado directamente a la incapacidad celular de responder a la insulina administrada. Dicha disfunción podría estudiarse tanto en tejido adiposo como en el músculo esquelético y el hígado, que son los principales órganos donde la insulina ejerce sus acciones biológicas. Dicho lo anterior, se relacionan estos resultados con la hiperinsulinemia encontrada (figura 5).

Se ha demostrado que algunos nucleósidos como la adenosina y la inosina, tienen efectos hipoglucemiantes en el postprandio<sup>[83]</sup>. Estudios en animales mostraron que este descenso de glucosa se da por la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en intestino, lo que ocasiona retraso en la digestión de la sacarosa, y por lo tanto evita que aumente rápidamente la concentración de glucosa circulante<sup>[84]</sup>. El mismo grupo de trabajo observó en humanos que la adenosina disminuye los niveles séricos de insulina, como consecuencia<sup>[83]</sup>.

En esta tesis se manifiesta que el derivado de adenosina IFC-305 también tiene una capacidad similar, si bien no se esclarece si actúa sobre la enzima antes mencionada, al evitar la mala absorción o intolerancia a la glucosa establecida por el consumo de la dieta rica en grasas saturadas y sacarosa; y por lo tanto, también regular los niveles de insulina en suero. Por otro lado, no se descarta la actividad de la adenosina sobre la resistencia a la insulina a través de la actividad o expresión de sus receptores.

Todos estos componentes del síndrome metabólico están asociados a la EHGNA<sup>[26]</sup>. Dado el papel esencial del hígado en el metabolismo, es fundamental para responder a cambios en el estado nutricional del organismo. Por lo tanto, el daño hepático puede ser un indicador de enfermedades metabólicas<sup>[10]</sup>.

En este trabajo, los animales alimentados con la dieta HFS desarrollaron daño hepático, visible a nivel macro y microscópico. La figura 7 expone los cambios histológicos.

En la EHGNA estos cambios son, generalmente, consecuencia de anomalías en el metabolismo de lípidos como aumento en su hidrólisis, captura hepática de ácidos grasos y síntesis de LDL; así como disminución en la oxidación de ácidos grasos y exportación de triglicéridos<sup>[85]</sup>. El desarrollo y progresión de la enfermedad hepática se asocia a respuestas inflamatorias y acumulación o producción excesiva de ERO<sup>[85,86]</sup>.

Histológicamente es posible ver el infiltrado inflamatorio hepático en las ratas alimentadas con la dieta HFS. También se observa una gran cantidad de vacuolas lipídicas y el fenómeno de “balonamiento”, el cual ha sido propuesto como el factor histopatológico determinante para el establecimiento de NASH, si bien se recomienda la evaluación de marcadores de muerte celular<sup>[87]</sup>.

En contraste con lo anterior, el tratamiento con IFC-305 previno de manera importante la acumulación de lípidos en los hepatocitos, mejorando notablemente la apariencia del tejido. La cuantificación de colesterol y triglicéridos (figura 9) corroboró estos resultados.

Previamente fue demostrado que la adenosina evita alrededor de 50 % la acumulación de triglicéridos en el hígado graso inducido por etanol<sup>[59,88]</sup>; y se sabe que el IFC-305 reduce la fibrosis hepática y regula la concentración de lípidos en las células estelares<sup>[54]</sup>.

Las muestras también fueron analizadas mediante microscopía electrónica para revisar más detalladamente las alteraciones en los hepatocitos ante la dieta HFS.

Se ha descrito que las mitocondrias sufren alteraciones estructurales y funcionales en la progresión de la enfermedad hepática asociada a la resistencia a la insulina y otros elementos del síndrome metabólico. Entre los cambios hallados se encuentran estructuras de la matriz mitocondrial altamente condensadas o cambios en su densidad, redondeamiento o pérdida de las crestas y disminución en la biogénesis de estos organelos<sup>[89,90]</sup>.

La alimentación con la dieta HFS produjo anomalías similares (figura 8); aunque aún no se han determinado los procesos implicados.

La administración simultánea del compuesto IFC-305 evitó las modificaciones estructurales. Está demostrado que este derivado de adenosina recupera la morfología de mitocondrias hepáticas dañadas durante la progresión de cirrosis a cáncer, en un modelo *in vivo*. También previene estas alteraciones una vez establecido el hepatocarcinoma<sup>[63]</sup>.

La pérdida de la arquitectura y la consecuente disfuncionalidad mitocondrial puede conducir a la disminución de la respiración celular y de los niveles de ATP<sup>[89]</sup>. El IFC-305 tiene la capacidad de recuperar o mantener la actividad enzimática de la ATPasa mitocondrial, así como del consumo de oxígeno, en el cáncer hepático y su progresión desde la cirrosis<sup>[63]</sup>.

Por otro lado, en la EHGNA también hay daño al retículo endoplásmico, generalmente asociado al mal plegamiento de proteínas<sup>[25]</sup>. En la figura 8 se puede apreciar la pérdida de ribosomas asociados a RER ante la dieta HFS. Sumado a ello, las uniones entre retículo y mitocondrias disminuyeron considerablemente. Otros autores han encontrado respuestas semejantes en modelos de obesidad y diabetes<sup>[91]</sup>. Se sugiere que tanto mitocondrias como RE participan en el balance energético del hígado y que la resistencia a la insulina hepática se asocia con la disfunción de estos organelos y la alteración de su homeostasis<sup>[92]</sup>.

El tratamiento con IFC conservó la integridad del RE, así como sus asociaciones con las mitocondrias. También existen aproximaciones que sugieren que la adenosina puede modular la actividad de canales de calcio en el retículo sarcoplásmico cardíaco y esquelético<sup>[93]</sup>.

Como se mencionó en la introducción, la disfunción los organelos mencionados puede estar relacionada directamente en procesos de inflamación y estrés oxidante.

En general, durante la inflamación crónica de bajo grado se promueve la polarización y el reclutamiento de macrófagos M1, así como la hipersecreción de TNF- $\alpha$  y la síntesis y liberación de MCP-1 tanto en tejido adiposo como en hepatocitos, lo que contribuye al establecimiento de infiltrado celular. Además, los

macrófagos residentes hepáticos pueden activar vías inflamatorias y aumentar la producción local de citocinas y quimiocinas<sup>[94]</sup>.

En pacientes con síndrome metabólico se han hallado altos niveles séricos de IL-6 y TNF- $\alpha$ , así como polimorfismos en sus genes, asociados a mayor severidad en el desarrollo de esta enfermedad<sup>[95]</sup>.

Además, se ha propuesto que el factor de crecimiento VEGF tiene un papel importante en la ganancia de peso. Se encontró que su alta concentración en suero se correlaciona positivamente con aumento en el índice de masa corporal y deposición de grasa visceral, mientras que en el tejido adiposo su sobreexpresión promueve angiogénesis. Igualmente, se sugiere que su desregulación puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades vasculares<sup>[96,97]</sup>.

De acuerdo con lo encontrado en la concentración de citocinas circulantes y lo mencionado anteriormente, se puede decir que los animales del grupo HFS cursan con inflamación sistémica (figura 10).

Se conoce que ratas alimentadas durante siete meses con la misma dieta alta en grasas suplementada con sacarosa al 5%, sobreexpresan al gen *Tnf- $\alpha$*  en tejido adiposo y tienen mayor concentración de esta citocina en el hígado<sup>[66]</sup>. No obstante, en este trabajo, los datos obtenidos de las citocinas hepáticas (figura 11) no fueron concluyentes sobre el estado de inflamación en el tejido, si bien pareciera que el IFC-305 establece un ambiente antiinflamatorio a expensas del tipo de dieta, de acuerdo con las concentraciones de IL-6, VEGF e IL-2.

Se ha estudiado el efecto del IFC-305 sobre elementos del sistema inmune. Se sabe que tiene la capacidad de revertir la cirrosis y disminuir la concentración sérica y hepática de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6, así como aumentar la de IL-10<sup>[62]</sup>.

Dados los resultados obtenidos, y como primera aproximación hacia el daño por ERO y la respuesta antioxidante, se midieron las concentraciones de TBARS y glutatión. Al no haber encontrado diferencias en los productos de lipoperoxidación, se propone medir los niveles de otros agentes implicados en este proceso y en otros daños a biomoléculas. Respecto al glutatión, la única diferencia encontrada fue la

disminución de su forma oxidada (GSSG) respecto al control, con el tratamiento de IFC-305 simultáneo a la dieta HFS. Se podría especular acerca de una respuesta antioxidante temprana por el IFC-305, si a la vez aumentara su forma reducida (GSH), sin embargo se mantiene la relación entre ambas.

Recientemente se encontró que en la progresión de cirrosis a hepatocarcinoma el derivado de adenosina regula tanto el estrés oxidante como la respuesta antioxidante; mediante la disminución de la lipoperoxidación y la regulación del glutatión en sus distintas formas en diferentes estados de progresión de la enfermedad<sup>[98]</sup>.

Por último, los resultados obtenidos mediante este trabajo de investigación demostraron que el compuesto IFC-305 evita el desarrollo de varias alteraciones asociadas a la progresión del síndrome metabólico y el daño hepático asociados al consumo excesivo y constante de grasas y azúcares. Dichos efectos se notaron desde la regulación de la glucosa sanguínea y otros elementos séricos, hasta la conservación de la estructura hepática y la prevención de la inflamación; gracias a lo cual se podrá profundizar en aspectos particulares de cada respuesta.

## 8. Conclusiones.

Se logró estandarizar un modelo experimental de síndrome metabólico e hígado graso consistente en ratas *Wistar* macho alimentadas con una dieta sólida rica en lípidos de origen animal y suplementada con sacarosa al 10% en sustitución del agua para beber (HFS).

La administración del compuesto IFC-305 previno parcialmente el sobrepeso, así como la intolerancia a la glucosa exógena, la resistencia a la insulina y la alta concentración sérica de triglicéridos.

De acuerdo con los parámetros histopatológicos e inflamatorios evaluados, la alimentación con la dieta HFS desarrolló un cuadro de esteatohepatitis. El tratamiento simultáneo con IFC-305 evitó los cambios histológicos y moduló la concentración de los marcadores de inflamación en suero. Los datos obtenidos sobre la concentración de citocinas hepáticas no fueron concluyentes.

La dieta HFS causó daños en los hepatocitos. Se encontraron alteraciones en la morfología mitocondrial, así como disminución en su cantidad. El RE fue escaso y se encontraron pocas asociaciones entre ambos organelos. El tratamiento con la sal de adenosina previno estas alteraciones.

No se encontraron cambios en la concentración de TBARS como productos de lipoperoxidación, ni glutatión total, como respuesta antioxidante, entre los grupos tratados.

La administración de IFC-305 ante una dieta normal no presentó ningún efecto desfavorable.



## 9. Referencias.

1. Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2010;375:181-3.
2. Wilson PW, Kannel WB, Silbershatz H, D'Agostino RB. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1999;159:1104-9.
3. Gonzalez-Muniesa P, Martinez-Gonzalez MA, Hu FB, Despres JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, Moreno LA, Bray GA, Martinez JA. Obesity. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17034.
4. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2018;20:12.
5. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635-43.
6. Despres JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 2006;38:52-63.
7. Sharma P. Inflammation and the metabolic syndrome. *Indian J Clin Biochem* 2011;26:317-8.
8. Costa B, Cabre JJ, Martin F. [Metabolic syndrome, resistance to insulin and diabetes. What is hidden beneath the tip of the iceberg?]. *Aten Primaria* 2003;31:436-45.
9. Lusis AJ, Attie AD, Reue K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nat Rev Genet* 2008;9:819-30.
10. Priest C, Tontonoz P. Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nat Metab* 2019;1:1177-88.
11. Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 2008;57:2461-9.
12. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801.
13. Lee J, Park JS, Roh YS. Molecular insights into the role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Pharm Res* 2019;42:935-46.
14. Drucker-Colín R. Fisiología Médica. México;2005.
15. Franciscus A., Highleyman L. A guide to understanding hepatitis C. In: HCV Advocate; 2012.

16. Liu X., Wang H., Liang X., Robert MS. Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. In: Muriel P. editor. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. México:Elsevier;2017.
17. FAO. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S02.htm>. 1989.
18. Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2007;132:2191-207.
19. Alkhouri N, Tamimi TA, Yerian L, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. The inflamed liver and atherosclerosis: a link between histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease and increased cardiovascular risk. *Dig Dis Sci* 2010;55:2644-50.
20. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917-23.
21. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018;24:908-22.
22. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:521-33, viii.
23. Kechagias S, Nasr P, Blomdahl J, Ekstedt M. Established and emerging factors affecting the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2020.1016/j.metabol.2020.154183:154183.
24. García-Monzon C, Lo Iacono O, Crespo J, Romero-Gómez M, García-Samaniego J, Fernández-Bermejo M, Domínguez-Diez A, Rodríguez de Cia J, Saez A, Porrero JL, Vargas-Castrillón J, Chávez-Jiménez E, Soto-Fernández S, Díaz A, Gallego-Durán R, Madejón A, Miquilena-Colina ME. Increased soluble CD36 is linked to advanced steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Invest* 2014;44:65-73.
25. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, Bugianesi E, Sirlin CB, Neuschwander-Tetri BA, Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15080.
26. Akhtar DH, Iqbal U, Vazquez-Montesino LM, Dennis BB, Ahmed A. Pathogenesis of Insulin Resistance and Atherogenic Dyslipidemia in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Transl Hepatol* 2019;7:362-70.
27. ES Ferreti, ME Tanno, Vorobioff J. Hígado graso, resistencia insulínica y síndrome metabólico. *Fundación Dr J R Villavicencio* 2004;12:84-6.
28. Li C, Liu Q, Xie L. Suppressing NLRP2 expression accelerates hepatic steatosis: A mechanism involving inflammation and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;507:22-9.

29. Blancas-Flores G, Almanza-Pérez JC, López-Roa RI, Alarcón-Aguilar FJ, García-Macedo R, M. C. Obesity as inflammatory process. *sciELO Analytics* 2010;67:88-97.
30. Carlson CJ, Koterski S, Sciotti RJ, Poccard GB, Rondinone CM. Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 2003;52:634-41.
31. Castoldi A, Naffah de Souza C, Camara NO, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol* 2015;6:637.
32. Catrysse L, van Loo G. Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. *Cell Immunol* 2018;330:114-9.
33. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metab* 2014;19:512-26.
34. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:16-23.
35. Nouredin M, Sanyal AJ. Pathogenesis of NASH: The Impact of Multiple Pathways. *Curr Hepatol Rep* 2018;17:350-60.
36. Lee BH, Park SY, Kang KB, Park RW, Kim IS. NF-kappaB activates fibronectin gene expression in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:1218-24.
37. Roh YS, Seki E. Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28 Suppl 1:38-42.
38. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martines D. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G518-25.
39. Li S, Hong M, Tan HY, Wang N, Feng Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:4234061.
40. Ore A, Akinloye OA. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina (Kaunas)* 2019;55.
41. Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology* 2018;155:629-47.
42. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G193-9.

43. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int* 2009;3:526-36.
44. Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr* 2001;131:1129-32.
45. Asghari S, Hamed-Shahraki S, Amirkhizi F. Systemic redox imbalance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Invest* 2020;50:e13211.
46. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
47. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
48. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
49. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469-80.
50. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr., International Diabetes Federation Task Force on E, Prevention, Hational Heart L, Blood I, American Heart A, World Heart F, International Atherosclerosis S, International Association for the Study of O. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640-5.
51. Ardiansyah, Shirakawa H, Sugita Y, Koseki T, Komai M. Anti-metabolic syndrome effects of adenosine ingestion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr* 2010;104:48-55.
52. Merino M, Briones L, Palma V, Herlitz K, Escudero C. Role of adenosine receptors in the adipocyte-macrophage interaction during obesity. *Endocrinol Diabetes Nutr* 2017;64:317-27.
53. Pardo F, Villalobos-Labra R, Chiarello DI, Salsoso R, Toledo F, Gutierrez J, Leiva A, Sobrevia L. Molecular implications of adenosine in obesity. *Mol Aspects Med* 2017;55:90-101.
54. Pérez-Carreón JI, Martínez-Pérez L, Loredó ML, Yáñez-Maldonado L, Velasco-Loyden G, Vidrio-Gómez S, Ramírez-Salcedo J, Hernández-Luis F, Velázquez-Martínez I, Suárez-Cuenca JA, Hernández-Muñoz R, de Sánchez VC. An adenosine derivative

compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl<sub>4</sub>-induced rat cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:287-96.

55. Velasco-Loyden G, Pérez-Martínez L, Vidrio-Gómez S, Pérez-Carreón JI, Chagoya de Sánchez V. Cancer chemoprevention by an adenosine derivative in a model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *Tumour Biol* 2017;39:1010428317691190.

56. García-Sainz JA, Hernández-Muñoz R, Santamaría A, de Sánchez VC. Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. *Biochem Pharmacol* 1979;28:1409-13.

57. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez J, Chagoya de Sanchez V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 1990;12:242-8.

58. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JA, Trejo-Solís C, López V, Sánchez-Sevilla L, Yáñez L, De Sánchez VC. Adenosine reverses a preestablished CCl<sub>4</sub>-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001;34:677-87.

59. Hernández-Muñoz R, Santamaría A, García-Sáinz JA, Piña E, Chagoya de Sánchez V. On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Arch Biochem Biophys* 1978;190:155-62.

60. Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, Villa-Treviño S. Use of adenosine aspartate for the preparation of pharmaceutical products for the treatment of liver cancer. In: México UNAM, editor; 2013.

61. Velasco-Loyden G, Pérez-Carreón JI, Agüero JF, Romero PC, Vidrio-Gómez S, Martínez-Pérez L, Yáñez-Maldonado L, Hernández-Muñoz R, Macías-Silva M, de Sánchez VC. Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1690-9.

62. Pérez-Cabeza de Vaca R, Domínguez-López M, Guerrero-Celis N, Rodríguez-Aguilera JR, Chagoya de Sánchez V. Inflammation is regulated by the adenosine derivative molecule, IFC-305, during reversion of cirrhosis in a CCl<sub>4</sub> rat model. *Int Immunopharmacol* 2018;54:12-23.

63. Chávez E, Lozano-Rosas MG, Domínguez-López M, Velasco-Loyden G, Rodríguez-Aguilera JR, José-Núñez C, Tuena de Gómez-Puyou M, Chagoya de Sánchez V. Functional, Metabolic, and Dynamic Mitochondrial Changes in the Rat Cirrhosis-Hepatocellular Carcinoma Model and the Protective Effect of IFC-305. *J Pharmacol Exp Ther* 2017;361:292-302.

64. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006;79:1100-7.

65. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51.
66. Sanchez-Tapia M, Aguilar-Lopez M, Perez-Cruz C, Pichardo-Ontiveros E, Wang M, Donovan SM, Tovar AR, Torres N. Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Sci Rep* 2017;7:4716.
67. Panchal SK, Ward L, Brown L. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Nutr* 2013;52:559-68.
68. Zhao J, Zhou G, Li M, Li W, Lu J, Xiong L, Liang L, Zhao Y, Xu D, Yu J. A novel non-alcoholic steatohepatitis animal model featured with insulin resistance, hepatic inflammation and fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1360-71.
69. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
70. Wu S, Zou MH. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in the heart. *Arch Biochem Biophys* 2019;662:201-12.
71. Lizarzaburu-Robles JC. Metabolic syndrome: concept and practical application. *SciELO Analytics* 2013;74:315-20.
72. Aydin S, Aksoy A, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, Citil C, Catak Z. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* 2014;30:1-9.
73. Kwon YJ, Lee HS, Lee JW. Association of carbohydrate and fat intake with metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2018;37:746-51.
74. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004;23:447-56.
75. Pak M, Lindseth G. Risk Factors for Cholelithiasis. *Gastroenterol Nurs* 2016;39:297-309.
76. Tsuneyama K, Nishitsuji K, Matsumoto M, Kobayashi T, Morimoto Y, Tsunematsu T, Ogawa H. Animal models for analyzing metabolic syndrome-associated liver diseases. *Pathol Int* 2017;67:539-46.
77. Souza Cruz EM, Bitencourt de Moraes JM, Dalto da Rosa CV, da Silva Simoes M, Comar JF, de Almeida Chuffa LG, Seiva FRF. Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic oxidative stress in Wistar rats. *Biol Open* 2020;9.

78. Aguilera AA, Díaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RM. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2004;15:350-7.
79. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, Soto V, Ávila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F423-9.
80. Mercer JG, Archer ZA. Diet-induced obesity in the Sprague-Dawley rat: dietary manipulations and their effect on hypothalamic neuropeptide energy balance systems. *Biochem Soc Trans* 2005;33:1068-72.
81. Phillips PJ. Oral glucose tolerance testing. *Aust Fam Physician* 2012;41:391-3.
82. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109 Suppl 2:S135-48.
83. Fukumori Y, Takeda H, Fujisawa T, Ushijima K, Onodera S, Shiomi N. Blood glucose and insulin concentrations are reduced in humans administered sucrose with inosine or adenosine. *J Nutr* 2000;130:1946-9.
84. Fukumori Y, Maeda N, Takeda H, Onodera S, Shiomi N. Serum glucose and insulin response in rats administered with sucrose or starch containing adenosine, inosine or cytosine. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:237-43.
85. Katsiki N, Mikhailidis DP, Mantzoros CS. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. *Metabolism* 2016;65:1109-23.
86. Lakhani HV, Sharma D, Dodrill MW, Nawab A, Sharma N, Cottrill CL, Shapiro JI, Sodhi K. Phenotypic Alteration of Hepatocytes in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Med Sci* 2018;15:1591-9.
87. Farrell G, Schattenberg JM, Leclercq I, Yeh MM, Goldin R, Teoh N, Schuppan D. Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2019;69:2241-57.
- ñ88. García-Sáinz JA, Hernández-Muñoz R, Glender W, Piña E, Chagoya de Sánchez V. Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism. *Biochem Pharmacol* 1980;29:1709-14.
89. Simoes ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2018;95:93-9.
90. Vial G, Dubouchaud H, Leverve XM. Liver mitochondria and insulin resistance. *Acta Biochim Pol* 2010;57:389-92.

91. Rieusset J. The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death Dis* 2018;9:388.
92. Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin MA, Ji-Cao J, Zoulim F, Bartosch B, Ovize M, Vidal H, Rieusset J. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 2014;63:3279-94.
93. Hleihel W, Lafoux A, Ouaini N, Divet A, Huchet-Cadiou C. Adenosine affects the release of Ca<sup>2+</sup> from the sarcoplasmic reticulum via A2A receptors in ferret skinned cardiac fibres. *Exp Physiol* 2006;91:681-91.
94. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017;127:1-4.
95. Zafar U, Khaliq S, Ahmad HU, Lone KP. Serum profile of cytokines and their genetic variants in metabolic syndrome and healthy subjects: a comparative study. *Biosci Rep* 2019;39.
96. Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 2007;117:2362-8.
97. Mazidi M, Rezaie P, Kengne AP, Stathopoulou MG, Azimi-Nezhad M, Siest S. VEGF, the underlying factor for metabolic syndrome; fact or fiction? *Diabetes Metab Syndr* 2017;11 Suppl 1:S61-S4.
98. Lozano-Rosas MG, Chávez E, Velasco-Loyden G, Domínguez-López M, Martínez-Pérez L, Chagoya De Sánchez V. Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative. *Cancer Biol Ther* 2020;21:81-94.



## 10. Anexo.

Se emplearon 15 ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* de entre 210 y 250 gramos de masa corporal. Fueron obtenidas de la Unidad de Producción Animal del Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN); mantenidas a temperatura ambiente a un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, en el vivario del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se administraron dos tipos de dieta, según fue el grupo de la población a tratar. Para el grupo control se manejó una estándar.

Al siguiente grupo se dio la misma dieta, pero, además, se adicionó una emulsión alta en grasas, cuyo contenido se muestra a continuación:

**Tabla 7.** Componentes de la emulsión alta en grasas (Modificado de Zou *et al.*, 2006)<sup>[64]</sup>.

Componente	Cantidad
Aceite de maíz	400 g
Sacarosa	177.5 g
Leche entera en polvo	92 g
Colesterol	120 g
Desoxicolato de sodio	10 g
Emulsificante (Tween)	36.4 g
Propilenglicol	31.1 g
Mezcla de vitaminas	2.5 g
Sal de mesa	10 g
Mezcla de minerales	1.5 g
Agua destilada	300 ml

La emulsión se administró por vía i.g. una vez al día en una dosis de 10 ml/kg. Del mismo modo, este grupo tuvo acceso *ad libitum* a agua con sacarosa al 18% y mediante vía i.p. recibió solución salina en una dosis de 2.6 ml/kg<sup>[64]</sup>.

Un tercer grupo fue tratado de la misma manera que el anterior, además de que se le administró el compuesto IFC-305 en una dosis de 50 mg/kg, vía i.p., en lugar de la solución salina.

Los resultados obtenidos en un primer montaje del modelo experimental mostraron el cuadro de síndrome metabólico y daño hepático de acuerdo con lo ya reportado; sin embargo, su réplica no lo hizo así.

**Tabla 8.** Comparativa de los resultados obtenidos ante el tratamiento con emulsión alta en grasas y agua con sacarosa al 18% y la administración preventiva del IFC-305 en dos montajes experimentales independientes.

Primer montaje experimental	Réplica
Los animales alimentados por la emulsión (E) presentan niveles séricos de glucosa en ayuno mayores al grupo control.	No se encontraron diferencias en la glucosa en ayuno entre los grupos tratados.
El grupo E mostró hiperinsulinemia, altos niveles séricos de triglicéridos y colesterol. El tratamiento con IFC previno estos cambios.	No se notaron cambios en la insulina ni en triglicéridos circulantes entre los grupos. El grupo E mostró hipercolesterolemia. El tratamiento con IFC lo previno.
El grupo E mostró sobrepeso. El tratamiento con IFC lo previno parcialmente.	No se encontraron cambios.

Se encontró esteatosis y fibrosis en el grupo E, respecto al control. El tratamiento con IFC previno el cambio en el fenotipo.	También se encontró esteatosis en el grupo E. No se determinó la existencia de fibrosis.
El tratamiento con IFC ante la emulsión, aumentó los niveles de glutatión total (GSH + GSSG) hepático respecto al grupo E.	Parámetro no determinado.