



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO ASOCIADO
CON EL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO. EFECTO DE LA
VACUNA TERAPÉUTICA HB-ATV-8.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias
PRESENTA

Sandra Daniela Calixto Tlacomulco

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jaime Mas Oliva

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

[Instituto Nacional de Medicina Genómica](#)

Dr. Marcelino Arciniega Castro

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Junio, 2022



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.

Calixto Tlacomulco Sandra Daniela
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 18 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de Maestra en Ciencias, con la réplica de la tesis "Identificación del perfil transcriptómico asociado con el hígado graso no alcohólico. Efecto de la vacuna terapéutica HB-ATV-8", dirigida por el Dr. Mas Oliva Jaime.

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

PRESIDENTE	Chagoya de Sánchez Victora (IFC)
VOCAL	Macias Silva Marina(IFC)
VOCAL	Ochoa Leyva Adrián (IBT)
VOCAL	Gutiérrez Ruiz María Concepción(UAM)
SECRETARIO	Mauricio Díaz Muñoz (IN)

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene 20(Maestría) días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

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

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de abril de 2022
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

RESUMEN

El péptido Seq-1 derivado del carboxilo terminal de CETP, corresponde al componente activo de la vacuna terapéutica HB-ATV-8 de aplicación nasal, diseñada para prevenir los procesos de aterosclerosis y la enfermedad del hígado graso (patentes US9539312; EP2868327; WO2014003531). Comprobamos la efectividad de esta terapia en modelos de aterosclerosis en conejo y en cerdo, evidenciando que el tratamiento con HB-ATV-8 reduce significativamente la aterogénesis y el proceso fibrótico en hígado. Estas observaciones están fundamentadas en resultados histológicos, bioquímicos y moleculares que han sido consistentes a lo largo de nuestras investigaciones. En ese sentido, hipotetizamos que más allá de la modulación de la actividad de CETP llevada a cabo por los anticuerpos neutralizantes generados a partir del tratamiento intranasal con HB-ATV-8, los efectos moleculares observados también pueden corresponder a la acción directa del péptido Seq-1 sobre diversos sistemas celulares y aspectos moleculares que intervienen en el desarrollo de la fibrosis hepática. En este trabajo evaluamos el efecto del péptido Seq-1 en el proceso fibrótico, para lo cual establecimos un modelo de esteatosis *in vitro* que imita algunos de los procesos observados *in vivo* durante el inicio de la fibrosis hepática. La línea celular hepática HepG2 se expuso a concentraciones elevadas de ácidos grasos similares a los que se encuentran en humanos. Observamos que el péptido Seq-1 reduce la acumulación intracelular de lípidos, respuesta que se asoció con una disminución del estrés oxidante y a su vez del daño hepático. También evidenciamos que Seq-1 modula la respuesta inflamatoria y profibrótica reflejada en una regulación negativa en la expresión génica de COL1A1, ACTA2, TGF- β , y una menor síntesis de las proteínas de matriz COL1A1, MMP-2 y TIMP-2. Además, encontramos que el sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas más el tratamiento con Seq-1 regula negativamente la expresión de marcadores clave de fibrosis en células estrelladas hepáticas humanas. Nuestros resultados muestran que el péptido Seq-1 como componente activo de la vacuna intranasal HB-ATV-8 tiene un efecto directo en la regulación de la expresión de genes y proteínas asociadas con la remodelación de componentes de matriz extracelular.

ABSTRACT

The Seq-1 peptide is a carboxyl-terminal sequence of CETP that corresponds to the active component of HB-ATV-8 therapeutic vaccine for nasal application, designed to prevent atherosclerosis and fatty liver disease (patents US9539312; EP2868327; WO2014003531). We evaluated the effectiveness of HB-ATV-8 therapy in rabbit and pig models of atherosclerosis, demonstrating that HB-ATV-8 treatment reduces atherogenesis and the fibrotic process in the liver. Histological, biochemical, and molecular results that have been consistent throughout our investigations supported these observations. We hypothesize that beyond the modulation of CETP activity carried out by neutralizing antibodies generated from intranasal treatment with HB-ATV-8, the observed molecular effects may also correspond to the direct action of the Seq-1 peptide on diverse cellular systems and molecular aspects involved in the development of liver fibrosis. In this work, we evaluated the effect of the Seq-1 peptide on the fibrotic process, establishing an *in vitro* steatosis model that mimics some processes observed *in vivo* during the onset of liver fibrosis. HepG2 cell line was exposed to elevated concentrations of fatty acids similar to those found in humans. We observed that the Seq-1 peptide reduced intracellular lipid accumulation, a response associated with a decrease in oxidative stress and liver damage. It was found that Seq-1 modulates the inflammatory and pro-fibrotic response reflected in a down-regulation of COL1A1, ACTA2, TGF- β gene expression, and a decreased expression of COL1A1, MMP-2, and TIMP-2 proteins. We found that supernatant from steatotic hepatocytes plus Seq-1 treatment negatively regulates the expression of key markers of fibrosis in human hepatic stellate cells. Our results show that Seq-1 peptide as an active component of the intranasal HB-ATV-8 vaccine regulates the expression of genes and proteins associated with the remodeling of extracellular matrix components.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Esta tesis se realizó en el Instituto de Fisiología Celular bajo la tutoría del Dr. Jaime Mas Oliva, a quien agradezco todas sus enseñanzas, confianza e impulso en el curso de esta investigación.

El comité tutor que evaluó el desarrollo de este trabajo estuvo integrado por el Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda y el Dr. Marcelino Arciniega Castro, a quienes agradezco que enriquecieran mi trabajo con sus conocimientos.

Agradezco el apoyo y la asistencia técnica de la Maestra Blanca Delgado Coello.

A mis compañeros de laboratorio, la Doctora Eréndira Pérez Hernández y el Maestro Ismael Luna Reyes por ser un gran apoyo durante estos años.

Reconozco la participación fundamental de la Dra. Ruth Rincón Heredia, responsable de la Unidad de Imagenología del IFC. Y le agradezco por compartir con entusiasmo su conocimiento conmigo.

Agradezco a las Unidades de Servicio del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en dónde se realizaron experimentos esenciales de este trabajo.

Agradezco al M.C. Rodolfo Paredes Díaz por su asesoría en el uso del sistema TEM y en la preparación de muestras para microscopía electrónica. Así como al Dr. Abraham Rosas Arellano por su asesoría en microscopía confocal.

Al Ingeniero Aurey Galván Lobato, por su disposición y por apoyar mi trabajo en todo momento.

A la Dra. Evelyn Katy Álvarez Salazar, por su invaluable apoyo en los análisis de citomertría de flujo.

A Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega, por su apoyo.

Agradezco a la M.C. Norma Trejo Medina, Secretaria Técnica y a Julio Palacios, Asistente de procesos del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por siempre brindarme apoyo y asistencia.

A Sara Méndez Ibáñez, de Servicios Escolares del Instituto de Fisiología Celular por el seguimiento y apoyo en mi proceso de titulación.

Durante mis estudios de Maestría me fue otorgada una beca por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).Número de beca: 765511.

Para la realización de este proyecto, el Doctor Jaime Mas Oliva recibió un financiamiento por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT IN-207121).

Agradezco al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los estímulos otorgados para participar en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica y para asistir a los cursos para el análisis de datos genómicos y transcriptómicos 01 y 02.

Finalmente, agradezco al Jurado de Examen asignado por el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas:

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Adrián Ochoa Leyva	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz	Universidad Autónoma Metropolitana
Secretario	Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Instituto de Neurobiología, UNAM

DEDICATORIA

A mi abuelito Reyes, quien ha sido fuente de fortaleza y confianza para mí, que nos encontremos en todos los caminos.

Quiero agradecer a mi mamá Genoveva, a mi papá Luis, a mis hermanas Fernanda, Mimi, Camilla, Romina, Luciana y a Sebastián. Finalmente, a mis tías Bertha y Mel. Soy muy afortunada de haber crecido con amor y paciencia infinitos, voces cariñosas y abrazos siempre cálidos. Su sabio consejo ha aclarado todos los caminos, y su presencia ha reducido todo mal, gracias por llevar tanta felicidad a mi vida.

Índice general

Abreviaturas	XVIII
1. Antecedentes	1
1.1. Enfermedad del Hígado Graso no Alcohólico.	2
1.1.1. Definición de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. . .	2
1.1.2. Prevalencia.	3
1.1.3. El síndrome metabólico como factor de riesgo para la enfer- medad del hígado graso no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica.	4
1.2. Patogenia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la estea- tohepatitis no alcohólica.	4
1.2.1. Desarrollo de esteatosis hepática.	5
1.2.2. Estrés oxidante.	7
1.2.3. Resistencia a la insulina (RI).	8
1.3. Progresión de esteatosis simple a esteatohepatitis no alcohólica. . . .	10
1.3.1. Lipotoxicidad.	10

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	VIII
1.3.2. Inflamación.	11
1.4. Fibrosis hepática.	12
1.4.1. Fibrosis hepática y activación de HSC.	13
1.5. Estrategias terapéuticas para la fibrosis hepática.	15
1.5.1. Opciones actuales para el tratamiento del HGNA.	16
1.5.2. Terapia en Desarrollo.	17
2. Vacuna intranasal HB-ATV-8	19
2.1. CETP como blanco terapéutico.	20
2.2. Desarrollo de la vacuna intranasal HB-ATV-8.	20
3. Hipótesis	28
4. Objetivo	29
4.1. Objetivos particulares	29
5. Método	31
5.1. Establecimiento de un modelo de esteatosis <i>in vitro</i>	32
5.1.1. Cultivo y tratamiento celular	32
5.1.2. Inducción de la internalización lipídica con ácidos grasos.	33
5.1.3. Obtención del medio condicionado.	33
5.1.4. Determinación del contenido de lípidos intracelulares por microscopía de fluorescencia: tinción con rojo Nilo.	34

5.2. Evaluación del efecto ateroprotector del péptido Seq-1.	35
5.2.1. Ensayo de citotoxicidad de la sobrecarga con ácidos grasos y del péptido Seq-1.	35
5.2.2. Evaluación de apoptosis mediante citometría de flujo.	36
5.2.3. Análisis bioquímico.	37
5.2.4. Generación de ROS intracelulares por H2DCFDA.	37
5.2.5. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.	38
5.2.6. Análisis de expresión de marcadores profibróticos mediante PCR cuantitativa en tiempo real.	38
5.2.7. Microscopía de inmunofluorescencia de COL1A1, MMP-2 y TIMP-2.	39
5.2.8. Inducción de la activación de células estrelladas.	40
5.2.9. Análisis estadístico.	40
6. Resultados	42
6.1. Establecimiento de un modelo de esteatosis <i>in vitro</i>	43
6.1.1. El tratamiento con oleato y palmitato induce la internalización de lípidos en células HepG2.	43
6.1.2. Citotoxicidad de la sobrecarga de ácidos grasos.	45
6.2. Análisis del efecto hepatoprotector del péptido Seq-1 en un modelo de esteatosis <i>in vitro</i>	47
6.2.1. Evaluación de la apoptosis.	48

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	x
6.2.2. El péptido Seq-1 regula la síntesis de lípidos.	49
6.2.3. El péptido Seq-1 regula la síntesis de ALT y AST.	50
6.2.4. El péptido Seq-1 atenúa la acumulación de glucosa en células HepG2.	51
6.2.5. El péptido Seq-1 atenúa el estrés oxidante causado por la acu- mulación de lípidos en células HepG2.	52
6.2.6. El péptido reduce la expresión de mRNA de citocinas infla- matorias.	54
6.2.7. El péptido Seq-1 promueve la disminución de la expresión de genes pro fibrogénicos en las HepG2.	55
6.2.8. El péptido Seq-1 regula la expresión de proteínas asociadas con la matriz extracelular.	56
6.2.9. El sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas promueve la activación de las HSC.	58
7. Discusión	61
8. Conclusión	70
9. Perspectivas	72
Referencias	73

Índice de figuras

1.1. <i>Progresión de la Enfermedad del Hígado no Alcohólico.</i>	3
1.2. <i>Relación entre el tejido adiposo y el hígado. a) La sobrecarga de ácidos grasos en el tejido adiposo promueve el aumento de la lipólisis y la subsecuente secreción de ácidos grasos libres no esterificados así como adipocinas. b) Los ácidos grasos unidos a la albúmina se internalizan en los hepatocitos a través de transportadores de ácidos grasos, resultando en esteatosis hepática.</i>	6
1.3. <i>El efecto del estrés oxidante en el tejido hepático durante la enfermedad del hígado graso no alcohólico. El aumento significativo de lípidos dentro del hígado da como resultado lipotoxicidad, que induce el estrés oxidante a través del aumento marcado de especies reactivas de oxígeno.</i>	8
1.4. <i>En pacientes con la enfermedad del hígado graso no alcohólico, el desarrollo de resistencia a insulina da como resultado: 1) Aumento de la lipólisis en el tejido adiposo y secreción elevada de ácidos grasos libres disponibles para la captación hepática; 2) Reducción del almacenamiento de glucógeno hepático; 3) Aumento de la gluconeogénesis, y 4) Aumento de la lipogenesis <i>de novo</i>.</i>	10

1.5. *La lesión crónica de los hepatocitos provoca la liberación de moléculas proinflamatorias y profibróticas que activan las células estrelladas hepáticas y reclutan células inmunitarias. Las interacciones multidireccionales entre las HSC activadas y las células de Kupffer, así como las células inmunitarias, promueven la transdiferenciación de las HSC en miofibroblastos proliferativos y productores de matriz extracelular. Abreviaturas: HSC: Celulas estrelladas hepaticas TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta* 12

1.6. *Papel central de las células estrelladas hepáticas en el proceso fibrótico. a) El daño hepático debido a la sobrecarga lipídica promueve la activación de las células estrelladas, las HSC quiescentes pierden la capacidad de almacenar retinoides y se exagera el estrés oxidante. b) Las células etrelladas activas, proliferan, adquieren de forma similar a los fibroblastos la propiedad de contractilidad, desencadenan el proceso fibrótico a través de la secreción de ACTA2 y COL1A1; también están implicadas en alteracion en la síntesis y degradación de matriz extracelular a través de las MMP y TIMP. c) Otros tipos celulares hepaticos también se encuentran implicados en el proceso fibrótico, los hepatocitos esteatóticos y las células epiteliales sinusoidales, secretan moléculas que activan a las HSC.* 15

2.1. *Estructura tridimensional obtenida a partir del cristal de CETP. En verde se muestra el barril N y en amarillo el C, la conexión entre ambos dominios se encuentra marcada en rojo. En color magenta y cian se presentan dos moléculas de ésteres de colesterol. El dominio C-terminal se encuentra señalado en un recuadro azul. Estructura obtenida del Protein Data Bank: 2OBD* 22

2.2. *Microfotografía de HB-ATV-8 por microscopía electrónica de transmisión. Formación de estructuras tipo micelar.* 23

2.3. *La vacuna HB-ATV-8 previene la aterogénesis y reduce la fibrosis inducida por una dieta alta en colesterol. A la izquierda, secciones de la aorta abdominal de un conejo representativo de cada grupo experimental. A) Pared de una aorta sin lesión; B) Engrosamiento patológico de la túnica íntima (flecha verde), la línea en color verde evidencia el grado de la lesión; C) La vacuna HB-ATV-8 previene el engrosamiento de la íntima a pesar de recibir la dieta alta en colesterol (se señala con la flecha verde). A la derecha, muestra de hígado de un conejo representativo de cada grupo, teñidas con tricrómico de Masson para destacar lo componentes del tejido conectivo. A) Organización laminar del parénquima hepático normal; B) La dieta alta en colesterol induce un importante desarrollo de fibrosis alrededor de la vena central (las fibras colágenas se observan en color azul y están señaladas con una flecha amarilla); C) La administración de la vacuna disminuye el depósito de fibras colágenas alrededor de la vena central (flecha amarilla). [1] 26*

6.1. *Acumulación de lípidos intracelulares tras estimulación con oleato/palmitato. Se incubaron células de hepatoma humano HepG2 con concentraciones crecientes de oleato/palmitato (I: CT, II: 0.05 mM, III: 0.1 mM, IV: 0.2 mM, V: 0.4 mM, VI: 0.6 mM, VII: 0.8 mM, VIII: 1 mM y IX: 2 mM) durante 24 h. Las células sin tratamiento con ácidos grasos sirvieron como controles, en verde se observan las gotas de lípidos citoplasmáticas. Tinción Rojo Nilo, imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. 44*

6.2. *Evaluación fluorométrica del contenido de lípidos intracelulares. Los datos representan la media de los valores de intensidad de fluorescencia ± el E.S. 45*

6.3. Curva dosis-respuesta del efecto citotóxico de los ácidos grasos (oleato/palmitato 2:1) sobre la viabilidad de la línea celular HepG2. Los datos mostrados representan la media de triplicados de al menos 5 mediciones independientes \pm E.S. Los símbolos en verde representan los controles utilizados: CT (células sin tratamiento); CT + (células + Tritón X-100). 46

6.4. Viabilidad celular (curva de respuesta logarítmica a la dosis) de las células HepG2 tratadas con concentraciones crecientes del péptido Seq-1. Las células se trataron durante 24 h. Los datos representan la media \pm E.S. CT (células sin tratamiento); CT + (células + Tritón X-100 0.1 %). 47

6.5. La sobrecarga con ácidos grasos (0.6 mM) y el tratamiento con el péptido(100 μ g/mL) no promueven apoptosis celular. (A) Se utilizó citometría de flujo para detectar la tasa de apoptosis mediante tinción con Anexina V/7-AAD después de los tratamientos durante 24 h. Los diagramas de puntos se dividen en cuadrantes; Q4 (inferior izquierdo; células que se tiñen negativamente para 7-AAD y anexina V), Q1 (superior izquierdo; células que se tiñen positivo para 7-AAD pero negativo para anexina V), Q3 (inferior derecho; tinción para anexina V positivo y 7-AAD negativo, que representan células apoptóticas tempranas) y Q2 (superior derecho; tinción positiva tanto para 7-AAD como para anexina V, que representan células apoptóticas/muertas tardías). 49

6.6. Efecto del péptido Seq-1 sobre los niveles intracelulares de triglicéridos y colesterol en células HepG2 esteatóticas. Los valores graficados son una representación del valor de la media \pm E.S. **P= < 0.05; **** P=< 0.0001. Las diferencias significativas se analizaron con una prueba t de Student. 50

6.7. Niveles de ALT y AST en el sobrenadante después del tratamiento de células HepG2 con ácidos grasos (0.6 mM) y ácidos grasos + péptido (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. **P < 0.001 o ****P < 0.0001. Se utilizó una prueba t de Student para la comparación de medias. 51

6.8. Efecto del péptido Seq-1 en los niveles de glucosa intracelular y extracelular en células HepG2. Los datos representan la media \pm E.S. * P < 0.05. Los datos se analizaron con una prueba Kruskal-Wallis. 52

6.9. Formación de ROS intracelulares medida con H2DCFDA en células HepG2 después del tratamiento con ácidos grasos y con el péptido Seq-1. CT (células no tratadas); Tx-Lípidos (células incubadas con ácidos grasos 0.6 mM durante 24 h); Tx-Lípidos+Seq-1 (células HepG2 + tratamiento con ácidos grasos + Seq-1 a una concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos son una representación de la media \pm E.S. *P < 0.05; ****P < 0.0001. Los datos fueron analizados utilizando la prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's. 53

6.10. Expresión de mRNA de TGF- β en la línea celular HepG2 después de la incubación con ácidos grasos (0.6 mM) y péptido (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Análisis realizado mediante RT-qPCR cuantitativo. Los valores representan la media \pm E.S. ***P < 0.001. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey. 54

6.11. El péptido Seq-1 regula negativamente la expresión de COL1A1 y ACTA2 en células HepG2 esteatóticas. 24 h después del tratamiento se analizó la expresión de mRNA de (A) COL1A1 y (B) ACTA2 mediante análisis de RT-qPCR cuantitativo. ***P < 0.001. Los datos fueron analizados empleando la prueba ANOVA de una vía, post hoc Tukey. 56

6.12. Análisis de inmunofluorescencia de COL1A1, MMP-2 y TIMP-2, se muestra una disminución de la expresión de las tres proteínas de estudio en células HepG2 esteatóticas más el péptido. Imágenes representativas (A) COL1A1 (verde); (B) MMP-2 (rojo); MMP-2 (violeta). Los valores se presentan como media \pm E.S. 57

6.13. El sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas más el péptido reduce la expresión profibrogénica de células estrelladas hepáticas. Las HSC se incubaron con el sobrenadante de hepatocitos tratados con palmitato/oleato 2:1 durante 72 h más 100 μ L de Seq-1 . Posteriormente, se analizó la expresión de mRNA de (A)COL1A1, (B) ACTA2 y (C) TGF- β mediante análisis de RT-qPCR cuantitativo;* P <0.05. El análisis de significancia se realizó con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey. 59

6.14. Concentración de ácidos grasos libres en el sobrenadante de los tres grupos de estudio. 60

8.1. El péptido Seq-1 como componente activo de la vacuna intranasal HB-ATV-8 regula negativamente la expresión de genes y proteínas asociadas con la remodelación de componentes de matriz extracelular reduciendo el proceso fibrótico. 71

Índice de cuadros

- 5.1. Primers diseñados para la identificación de genes asociados con fibrosis. 39

Abreviaturas

7AAD 7-aminoactinomicina.

AASLD Asociacion Estadounidense para el Estudio de Enfermedades Hepaticas.

ACTA2 α actina 2.

Akt Proteina cinasa B.

ALT Alanina aminotransferasa.

AST Acido aspartico transferasa.

CETP Proteina Transferidora de esteres de Colesterol.

CHREBP Proteina de union a elementos reguladores de carbohidratos.

COL1A1 colágeno α tipo 1.

DCF 2',7'-diclorofluoresceina.

DT2 Diabetes mellitus tipo 2.

EHGNA Enfermedad del Hgado Graso No Alcoholic.

EHNA Esteatohepatitis no Alcoholic.

EMA Agencia Europea de Medicamentos.

EMT Transición epitelio-mesenquima.

FDA Administracion de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos.

- FXR** Receptor farnesoide X.
- GGT** Gammaglutamil transferasa.
- GLP-1 RA** Receptor del peptido 1 similar al glucagon.
- H2DCFDA** Diacetato de 2'7'-diclorofluoresceina.
- HDL** Lipoproteinas de alta densidad.
- HGNA** Hígado Graso no Alcohólico.
- HSC** Celulas estrelladas hepáticas.
- IMC** Índice de masa corporal.
- ISR** Sustrato del receptor de insulina.
- LDL** Lipoproteinas de baja densidad.
- MMP** Metaloproteasas de matriz.
- OCA** Acido obético.
- PDGF** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PPAR** Receptores activados por proliferadores de peroxisomas.
- RI** Resistencia a la insulina.
- ROS** Especies reactivas de oxígeno.
- SGLT** Cotransportador de sodio-glucosa.
- SREBP** Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides.
- TGF- β** Factor de crecimiento transformante beta.
- TIMP** Inhibidores de metaloproteasas de matriz.
- TZD** Tiazolidinedionas.
- VLDL** Lipoproteinas de muy baja densidad.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Enfermedad del Hígado Graso no Alcohólico.

1.1.1. Definición de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

La Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) es un trastorno caracterizado histológicamente como metabólicamente por la acumulación excesiva de triglicéridos en el hígado, que supera el 5% del peso del hígado [2], mismo que no es atribuible al consumo significativo de alcohol (30 g/día para mujeres y 40 g/día para hombres) de acuerdo con la Asociación estadounidense para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD) [3].

La EHGNA comprende un espectro clínico e histológico de enfermedades que se refleja en un grupo heterogéneo de patologías que van desde la acumulación excesiva de lípidos, característica que se conoce clínicamente como esteatosis a la Esteatohepatitis no Alcohólica (EHNA) [4]. La EHNA es la forma crónica y progresiva de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA), y se caracteriza histológicamente por la presencia de esteatosis y balonamiento hepatocelular. Ante el daño hepático, un reclutamiento gradual de componentes celulares del sistema inmunológico conduce a la inflamación, así como a la fibrosis tisular [5] (Fig. 1.1). La tasa de progresión de la enfermedad suele ser lenta. Alrededor del 20% de los pacientes con HGNA desarrollarán EHNA dentro de tres a siete años [6]; y del 9 al 25% de las personas con EHNA desarrollan cirrosis en un periodo que comprende de 10 a 20 años [7] (Fig. 1.1).

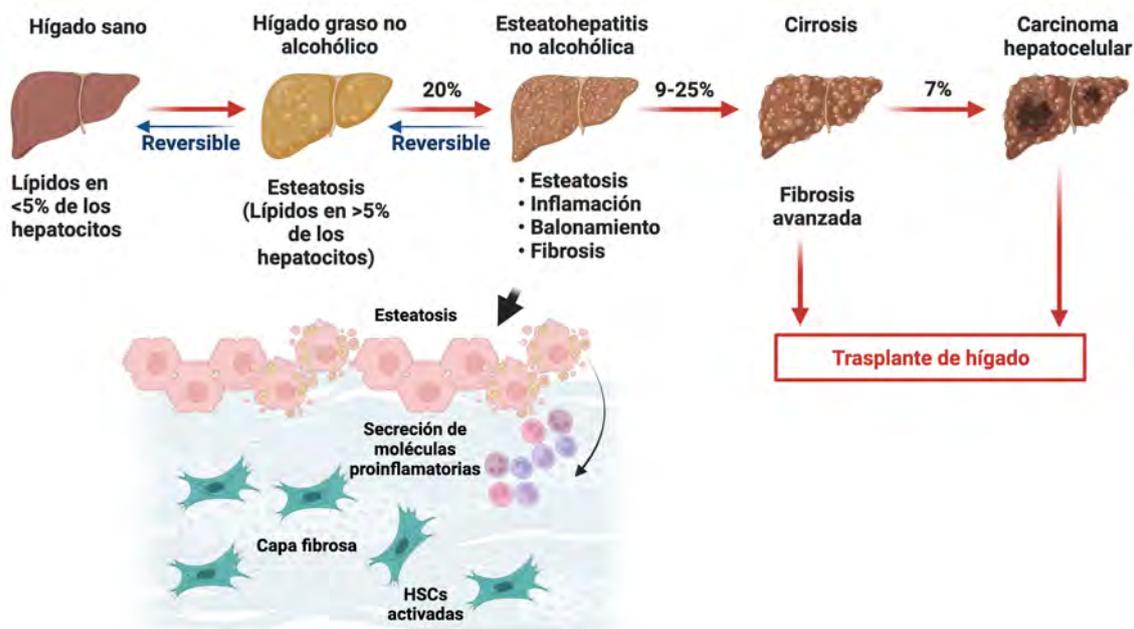


Figura 1.1: Progresión de la Enfermedad del Hígado no Alcohólico.

Debido a que el hígado juega un papel crucial en el metabolismo de lípidos y glucosa, el HGNA está asociado con estados de obesidad y refleja un factor de riesgo para enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 (DT2) [8]. A su vez, la DT2 se asocia con el HGNA hasta en un 90 % de los pacientes [9]. El HGNA también se relaciona con trastornos extrahepáticos, como enfermedades cardiovasculares [10] [11][9] y enfermedad renal crónica [12]. Además, el HGNA no solo es un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer hepático, sino que también se asocia con una tasa elevada de neoplasias malignas extrahepáticas, como gastrointestinales y ginecológicas [13][14]. En conclusión, el HGNA refleja un trastorno metabólico sistémico que se dirige y afecta a diversos órganos extrahepáticos.

1.1.2. Prevalencia.

La prevalencia de la EHGNA se encuentra en un estado continuo de crecimiento en paralelo con la propagación de la obesidad y la DT2, y se ha convertido en una de las causas más comunes de enfermedades crónicas en todo el mundo [15][16]. Una

revisión sistemática y un metanálisis estimaron una prevalencia global del HGNA del 37.33 % (IC del 95 %: 24.70 - 50.02 %) entre los pacientes con DT2 [17]. No obstante, es imperativo no ignorar el impacto de la EHNA en la población no obesa. La prevalencia del HGNA en pacientes delgados es del 2.7 % [17]. Además, la población hispana tiene las tasas de prevalencia más elevadas, y las personas de México tienen tasas aún más altas en comparación con las de la República Dominicana y Puerto Rico [18][19]. Los adolescentes hispanos tienen un riesgo 4 veces mayor de esteatosis hepática en comparación con los no hispanos [20].

1.1.3. El síndrome metabólico como factor de riesgo para la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica.

La inactividad física, así como una dieta abundante en grasas saturadas, azúcares simples y alimentos ultraprocesados, incrementa el depósito ectópico de grasas y la disfunción endotelial, en contraste con dietas saludables [21]. Lejos de estar limitado a una ganancia de peso, el aumento de lípidos en el organismo está relacionado con un conjunto de desórdenes patológicos conocido como síndrome metabólico [22]. El síndrome metabólico es un trastorno que implica una desregulación metabólica caracterizada clínicamente por obesidad, resistencia a la insulina, DT2, hipertensión y dislipidemia [23][24][25].

1.2. Patogenia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica.

El sobrepeso y la obesidad son los principales impulsores de las enfermedades metabólicas como el HGNA. Sin embargo, no todas las personas que padecen obesidad son metabólicamente insanas, ni todos los normopeso/delgados son metabóli-

camente saludables. La distribución de grasa, la funcionalidad del tejido adiposo y la resistencia a la insulina constituyen la base de alteraciones metabólicas como el síndrome metabólico, la DT2 y la EHGNA [26].

1.2.1. Desarrollo de esteatosis hepática.

La disfunción metabólica del tejido adiposo está estrechamente relacionada con la inflamación del hígado y el proceso fibrótico. Es impulsor central del desarrollo de EHNA [27]. En estado de obesidad, la incapacidad del tejido adiposo para expandirse y almacenar el exceso de lípidos conduce a un aumento de la lipólisis y la subsecuente secreción de ácidos grasos libres no esterificados [28]. Los ácidos grasos no esterificados unidos a la albúmina se administran al hígado (Fig. 1.2a). La captación de ácidos grasos no esterificados por parte de los hepatocitos está mediada por proteínas transportadoras de ácidos grasos, CD36, caveolinas, y en menor medida, difusión pasiva [29] (Fig. 1.2b). El aumento de la afluencia de ácidos grasos libres no esterificados derivados del tejido adiposo (que representa aproximadamente el 60 %) es una fuente importante de sustrato para la formación y el almacenamiento de triglicéridos en el hígado, lo que resulta en esteatosis [30]. Otra fuente de ácidos grasos (26 %) en el hígado es la lipogénesis *de novo*, a partir de glucosa y fructosa que ocurre en los hepatocitos y aumenta en sujetos con HGNA [30].

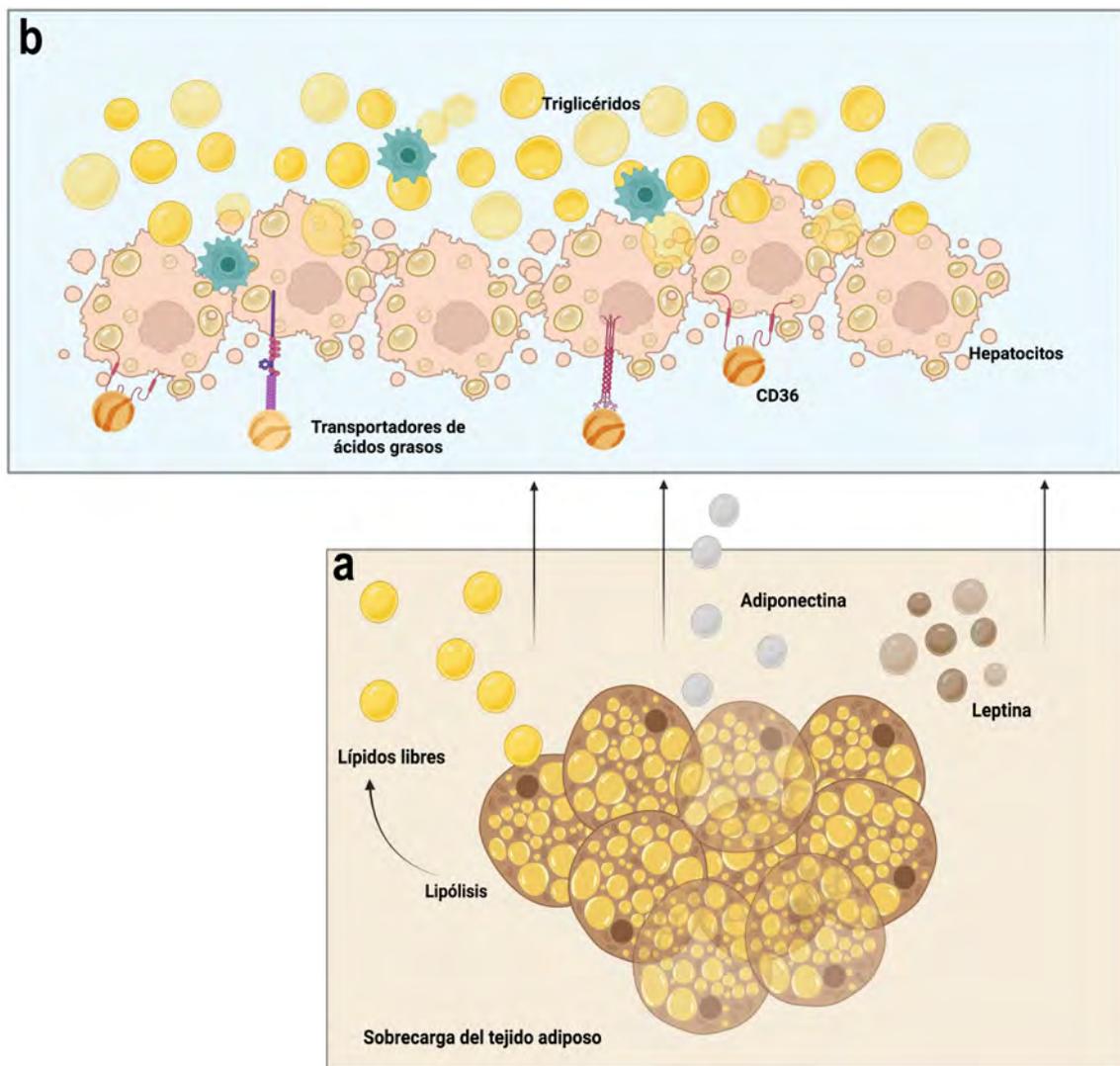


Figura 1.2: *Relación entre el tejido adiposo y el hígado.* a) La sobrecarga de ácidos grasos en el tejido adiposo promueve el aumento de la lipólisis y la subsecuente secreción de ácidos grasos libres no esterificados así como adipocinas. b) Los ácidos grasos unidos a la albúmina se internalizan en los hepatocitos a través de transportadores de ácidos grasos, resultando en esteatosis hepática.

Los triglicéridos presentes en el hígado, pueden ser exportados en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o ser almacenados como gotas de lípidos. La lipólisis de estas gotas libera ácidos grasos no esterificados de nuevo a la reserva hepática y la regulación de este paso es importante en la patogenia de la EHNA. Además de la cantidad, también se altera el tipo de ácidos grasos no esterificados

que se acumulan en el hígado, con significativamente más ácidos grasos saturados que ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. El palmitato de 16 carbonos y el estearato de 18 carbonos son los principales ácidos grasos saturados que se acumulan y se asocian con la progresión de la enfermedad [31]. Otras especies lipotóxicas implicadas incluyen al colesterol libre [32][33]. Por otra parte, el tejido adiposo no sólo es la principal fuente de ácidos grasos libres no esterificados, sino que también es un órgano endocrino que secreta adipocinas con efectos reguladores sistémicos. La leptina y la adiponectina producidas por los adipocitos viscerales influyen en el HGNA y otros componentes del síndrome metabólico a través de la regulación de la ingesta de alimentos, la composición de la grasa corporal, la sensibilidad a la insulina y la inflamación [34].

1.2.2. Estrés oxidante.

El exceso de lípidos en los hepatocitos induce estrés oxidante a través de la sobrecarga mitocondrial que conduce a una producción crónica de especies reactivas de oxígeno (ROS), citocinas y quimiocinas, que son mediadores necesarios para la progresión del HGNA a EHNA. El aumento del estrés oxidante, promueve la muerte celular y la inflamación, perpetuando la activación y proliferación de las células estrelladas hepáticas (HSC, por sus siglas en inglés) produciendo compuestos de la matriz extracelular [35][36][37] [38] [39] [40] [41][42] (Fig. 1.3.).

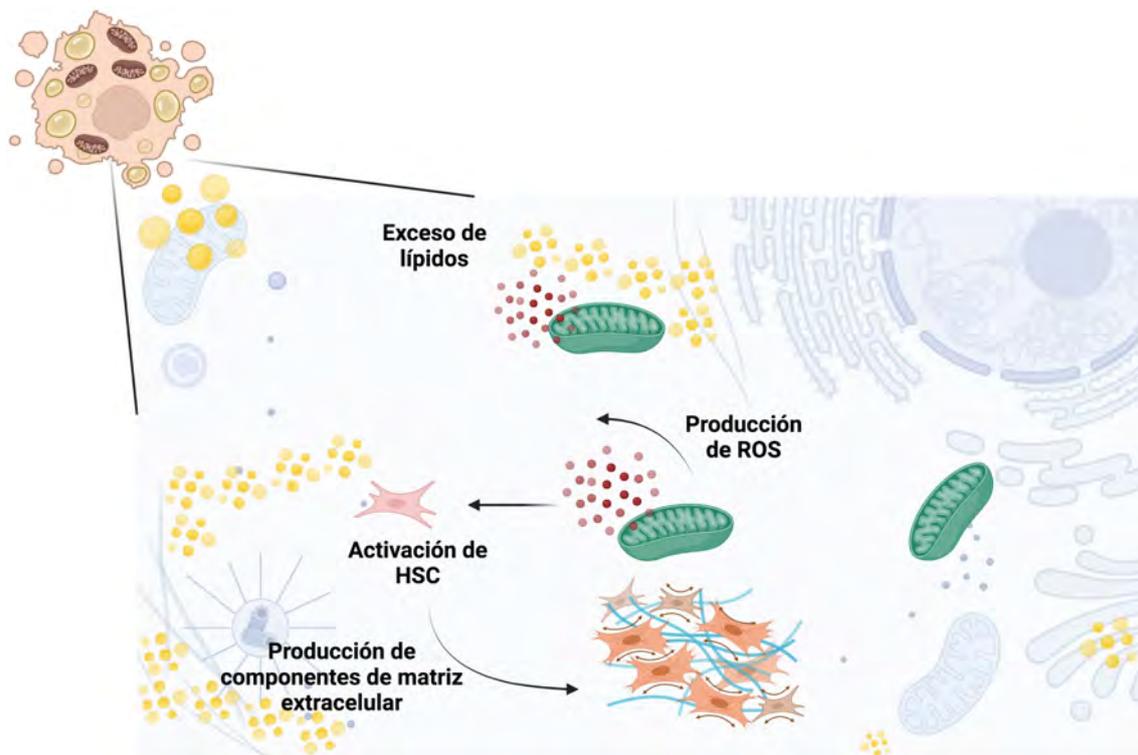


Figura 1.3: El efecto del estrés oxidante en el tejido hepático durante la enfermedad del hígado graso no alcohólico. El aumento significativo de lípidos dentro del hígado da como resultado lipotoxicidad, que induce el estrés oxidante a través del aumento marcado de especies reactivas de oxígeno.

1.2.3. Resistencia a la insulina (RI).

La insulina es una hormona secretada por las células beta pancreáticas para regular los niveles de glucosa en sangre [43]. La insulina actúa sobre diferentes tejidos metabólicos, principalmente hígado, músculos y tejido adiposo, promoviendo la absorción de glucosa por el hígado y los músculos esqueléticos, donde la glucosa se oxida o se almacena como glucógeno. Mientras que en el tejido adiposo, la glucosa se utiliza en la síntesis de triglicéridos [44]. De esta manera, en los hepatocitos, la insulina estimula la glucogénesis, inhibe la gluconeogénesis y activa la lipogénesis *de novo*. Por otro lado, en los adipocitos, la insulina estimula la lipogénesis, a través de la esterificación de los ácidos grasos, e inhibe la lipólisis. Los efectos de la insulina

ocurren a través de su unión al receptor de insulina, seguido por la fosforilación de tirosina y la activación río abajo del sustrato del receptor de insulina (ISR), la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y la proteína cinasa B (Akt) [45] (Fig. 1.4.). La resistencia a la insulina se refiere a una respuesta biológica débil a la insulina, a pesar de que los niveles de la misma sean normales o elevados [46]. En los estados de resistencia a insulina, se estimula al páncreas para que secrete más insulina a fin de corregir los defectos en la captación periférica de glucosa y suprimir la producción hepática de glucosa [47]. En consecuencia, la RI sistémica en el HGNA conduce a una inhibición deficiente de la lipólisis mediada por insulina en el tejido adiposo, lo que da como resultado un aumento de la lipólisis de los adipocitos y, por lo tanto, una mayor liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo. Los altos niveles circulantes de ácidos grasos son posteriormente absorbidos por el hígado, como se mencionó anteriormente [48] (Fig. 1.4.). La acumulación de lípidos y ácidos grasos libres en los hepatocitos activa varias cinasas de residuos de serina/treonina, que fosforilan el receptor de insulina en los residuos de serina o treonina, lo que interfiere con su fosforilación de tirosina [46]. Esto conduce a la interrupción de la señalización de la insulina y, por lo tanto, al desarrollo de resistencia a la insulina hepática [49]. La RI hepática da como resultado una disminución de la glucogénesis y un aumento de la gluconeogénesis, lo que lleva a la hiperglucemia y la consiguiente hiperinsulinemia [50]. Aunque la insulina estimula la lipogénesis *de novo* en los hepatocitos, la RI no conduce a la supresión de la lipogénesis *de novo*, sino que, de hecho, se asocia con un aumento de la misma [51] [48].

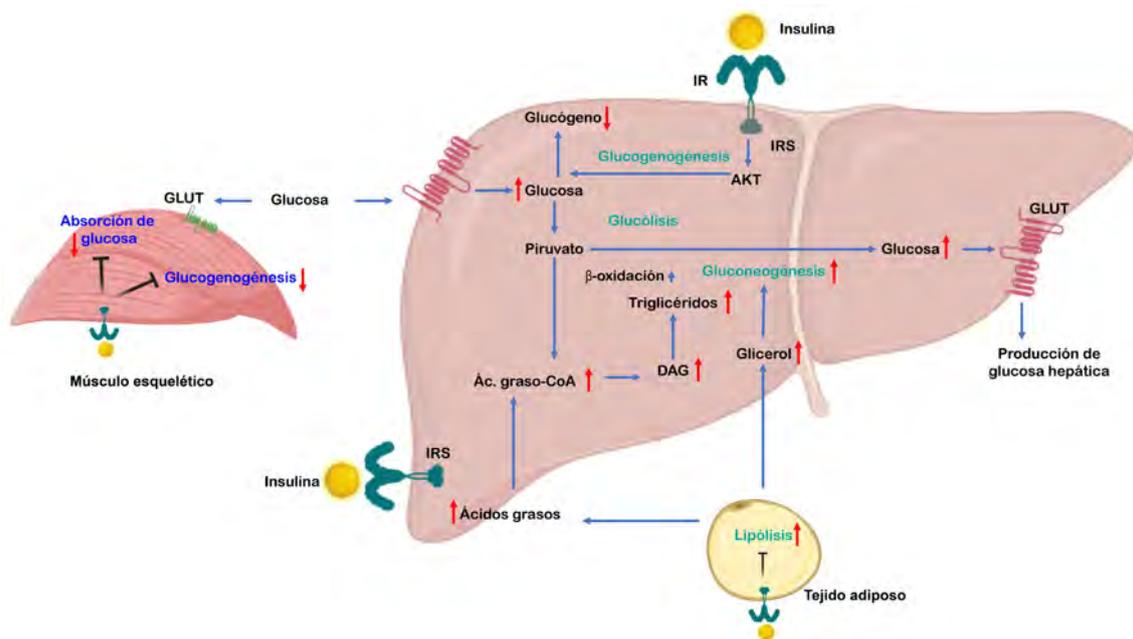


Figura 1.4: En pacientes con la enfermedad del hígado graso no alcohólico, el desarrollo de resistencia a insulina da como resultado: 1) Aumento de la lipólisis en el tejido adiposo y secreción elevada de ácidos grasos libres disponibles para la captación hepática; 2) Reducción del almacenamiento de glucógeno hepático; 3) Aumento de la gluconeogénesis, y 4) Aumento de la lipogenesis *de novo*.

1.3. Progresión de esteatosis simple a esteatohepatitis no alcohólica.

1.3.1. Lipotoxicidad.

Todos los lípidos que se acumulan en el hígado contribuyen al desarrollo de lipotoxicidad, un término utilizado para describir los efectos tóxicos de los ácidos grasos libres en la célula [52][53][44]. La evidencia de los estudios actuales sugiere que la lipotoxicidad es un factor que conduce a la lesión de los hepatocitos y a la progresión de la EHNA [54].

La lipotoxicidad tiene lugar de diversas formas. La acumulación de ácidos grasos libres no esterificados, que no se almacenan en gotas de lípidos, podría provocar daño celular e inflamación irreversibles [40]. Además, el aumento de la lipogénesis *de novo* se asocia con un mayor riesgo de lipotoxicidad y daño celular [30][40]. El aumento del contenido hepático de triglicéridos es un fenómeno que ocurre simultáneamente con la lipotoxicidad y la lesión hepática [52]. El colesterol también es una de las principales moléculas lipotóxicas involucradas en la fisiopatología de diferentes trastornos metabólicos, incluida la EHGNA [55][56][57].

1.3.2. Inflamación.

La inflamación juega un papel clave en el desarrollo de la fibrosis hepática. Después de que se produce la lesión, surge una infiltración de células del sistema inmunológico (macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas) en el sitio de daño. En particular, los linfocitos producen citocinas y quimiocinas, que activan a los macrófagos. En ese sentido, durante el proceso fibrótico, las células de Kupffer, que son los macrófagos residentes del hígado, juegan un papel central en la inflamación del hígado. Las células de Kupffer se localizan dentro de la luz de los sinusoides hepáticos y representan alrededor del 30% de las células sinusoidales [58][59]. En respuesta a la lesión de los hepatocitos, las células de Kupffer se activan y secretan factores proinflamatorios y profibróticos. El Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), que es secretado principalmente por las células de Kupffer desempeña un papel importante en la fibrosis hepática [60], se une a un receptor en las células estrelladas hepáticas (HSC) para activarlas e inducir la producción de colágeno [61] (Fig. 1.5).

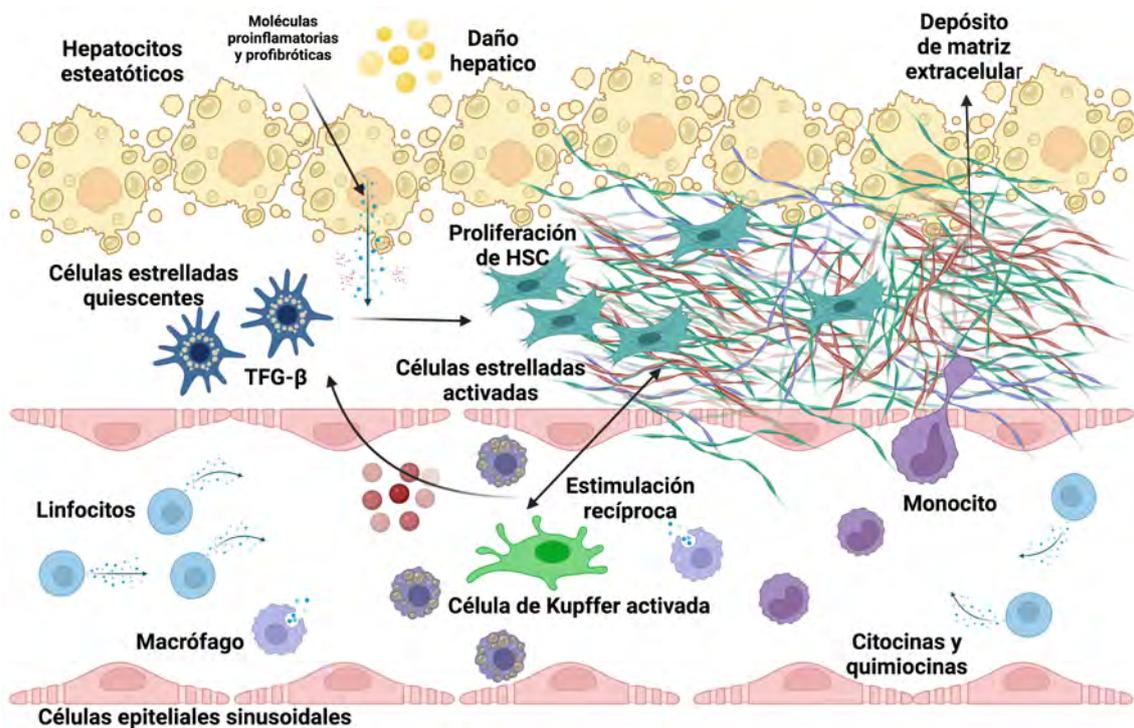


Figura 1.5: La lesión crónica de los hepatocitos provoca la liberación de moléculas proinflamatorias y profibróticas que activan las células estrelladas hepáticas y reclutan células inmunitarias. Las interacciones multidireccionales entre las HSC activadas y las células de Kupffer, así como las células inmunitarias, promueven la transdiferenciación de las HSC en miofibroblastos proliferativos y productores de matriz extracelular. Abreviaturas: HSC: Células estrelladas hepáticas TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

1.4. Fibrosis hepática.

Desafortunadamente, la fibrosis es una consecuencia natural de la inflamación crónica, definida como una respuesta inmune que persiste durante varios meses y en la que los procesos de inflamación, remodelación y reparación de tejidos ocurren simultáneamente. La mayoría de los trastornos fibróticos tienen en común la producción de factores de crecimiento, enzimas proteolíticas y citocinas fibrogénicas, que en conjunto estimulan la sobreproducción de tejido conectivo, el cual progresiva-

mente remodela la arquitectura normal del tejido [62][63][21]. La fibrosis hepática es resultado de la acumulación excesiva de proteínas del tejido conectivo en el hígado, especialmente colágenos intersticiales que forman una cicatriz fibrosa. Durante la progresión de la fibrosis, las células hepáticas experimentan cambios específicos. Los hepatocitos sufren apoptosis, las células epiteliales sinusoidales experimentan una pérdida de fenestras que se denomina capilarización de los sinusoides. Los macrófagos residentes en el hígado y las células de Kupffer se activan y producen diversas citocinas y quimiocinas. Los linfocitos se infiltran en el hígado lesionado contribuyendo a la inflamación y finalmente, las HSC se activan para producir proteínas de matriz extracelular [64]. Cuando se activan las HSC expresan receptores como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) y TGF- β [64].

El recambio de colágeno y la remodelación de la matriz extracelular están regulados por diversas metaloproteasas de matriz (MMP) y por sus inhibidores tisulares (TIMP) (Fig. 1.6.). Los cambios en la síntesis frente a la degradación de la matriz extracelular regulan el aumento o la disminución neta de colágeno, en ese sentido, la fibrosis tiene lugar cuando la síntesis de colágeno excede la velocidad a la que se degrada, de modo que la cantidad de colágeno total aumenta con el tiempo [65][66].

1.4.1. Fibrosis hepática y activación de HSC.

La fibrosis representa un proceso activo y permanente que tiene lugar en respuesta a una lesión crónica y afecta la homeostasis de la matriz extracelular [67][68].

El principal tipo de células implicadas en la fibrogenesis hepática está representado por las HSC [67][69][70][68][71]. En respuesta a la lesión hepática, las células estrelladas se activan y pasan de ser células ricas en vitamina A inactivas a células similares a miofibroblastos con propiedades proliferativas, contráctiles, migratorias y fibrogénicas [67][69][72][73][68].

Durante la activación, pierden sus gotas de lípidos específicas, adquieren una forma similar a la de los fibroblastos y expresan altos niveles de actina de músculo liso (α -SMA) y otros elementos de matriz extracelular [67] [69][73] [68] [74][75]. La activación de las HSC se puede resumir en dos etapas: iniciación y perpetuación [67][73]. La iniciación se caracteriza por las modificaciones en la expresión génica y la morfología que hacen que las células respondan a otras citocinas y estímulos [67][69] [73] [68]. La segunda fase, la perpetuación, es el resultado de los efectos de los estímulos sobre el mantenimiento del fenotipo activado y la producción de fibrosis. La perpetuación incluye proliferación, contractilidad, fibrogénesis, degradación de la matriz, pérdida de retinoides e infiltración de células inflamatorias [67][69] [73] (Fig. 1.6b.). Durante estas fases, las HSC son estimuladas de manera autocrina y paracrina por diversas citocinas y factores de crecimiento producidos por los tipos de células residentes en el hígado, como las células de Kupffer, los hepatocitos, las plaquetas, los leucocitos y las células epiteliales sinusoidales [67] [76] [74].

Los mediadores mejor analizados que activan las HSC incluyen PDGF, TGF- β , receptor de muerte de la superficie celular (Fas), cuerpos apoptóticos y vesículas extracelulares [69] [77][78] [74]. Estos mediadores son secretados por varios tipos de células como células epiteliales sinusoidales [77], células de Kupffer [79], hepatocitos lesionados [80][81] y HSC [71] (Fig. 1.6.c).

Como se mencionó anteriormente, las células de Kupffer influyen en la activación y proliferación de las HSC a través de la secreción de citocinas, incluida TGF- β 1, así como ROS y peróxidos de lípidos [69] [68] [72]. Además, las células de Kupffer también promueven la migración de HSC al secretar PDGF [73][74]. Los hepatocitos, las principales células del parénquima hepático, también contribuyen a la activación de las HSC [76][68][74] debido a que los hepatocitos dañados sufren apoptosis y elaboran cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por las HSC [80][81]. Este proceso promueve la actividad fibrogénica de las HSC a través de la producción de COL1A1, TGF- β 1 y α -SMA [74][81]. Los hepatocitos lesionados también producen ROS y peróxidos de lípidos, que activan las HSC y provocan fibrosis hepática [74][82].

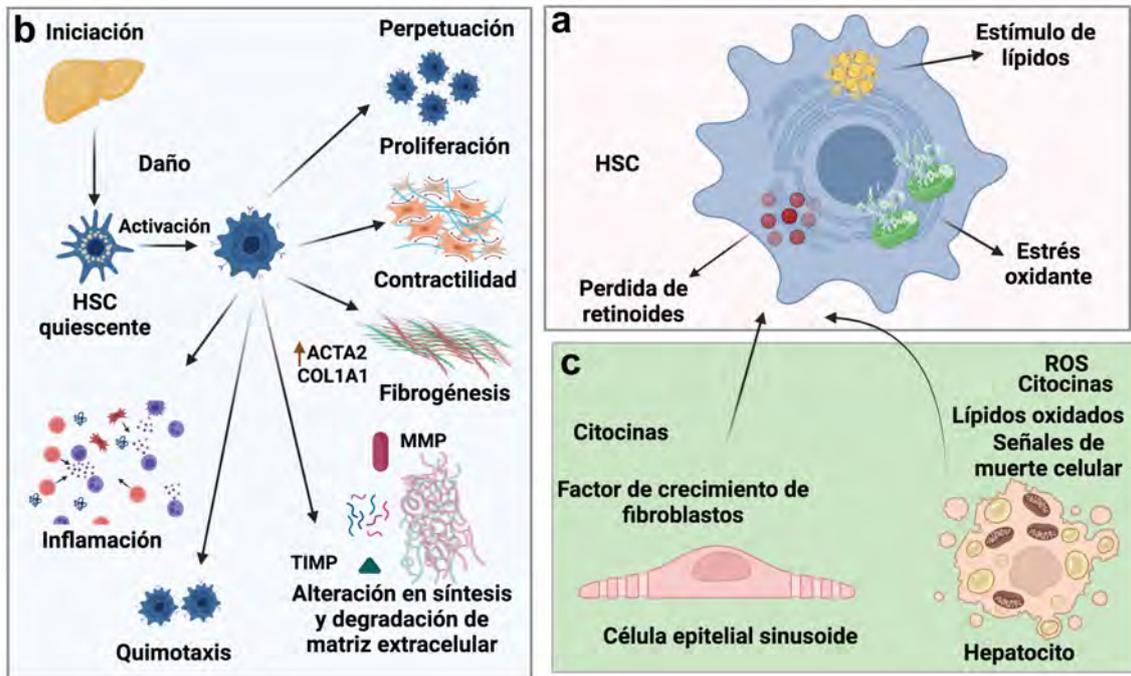


Figura 1.6: *Papel central de las células estrelladas hepáticas en el proceso fibrótico.*
 a) El daño hepático debido a la sobrecarga lipídica promueve la activación de las células estrelladas, las HSC quiescentes pierden la capacidad de almacenar retinoides y se exagera el estrés oxidante. b) Las células etrelladas activas, proliferan, adquieren de forma similar a los fibroblastos la propiedad de contractilidad, desencadenan el proceso fibrótico a través de la secreción de ACTA2 y COL1A1; también están implicadas en alteracion en la síntesis y degradación de matriz extracelular a través de las MMP y TIMP. c) Otros tipos celulares hepaticos también se encuentran implicados en el proceso fibrótico, los hepatocitos esteatóticos y las células epiteliales sinusoidales, secretan moléculas que activan a las HSC.

1.5. Estrategias terapéuticas para la fibrosis hepática.

El manejo de la HGNA se centra en modificaciones del estilo de vida, pérdida de peso y actividad física habitual. La pérdida de peso promueve la reducción de

grasa y la remisión del HGNA. Una reducción del peso corporal del 3 al 5 % mejora la esteatosis y una disminución del 10 % mejora la necroinflamación y la fibrosis [2]. Sin embargo, los cambios en la dieta y el estilo de vida son difíciles de mantener. Como resultado, existe la necesidad de fármacos apropiados para tratar NAFLD. El objetivo del tratamiento sigue siendo un tema de debate. La regresión de la fibrosis (principalmente definida por al menos una mejora de etapa según NASH CRN), como un marcador altamente potencial para el beneficio clínico, es uno de los criterios de valoración aprobados por las autoridades reguladoras para los ensayos de fase III en NASH [83]. Desafortunadamente, actualmente no hay medicamentos aprobados específicamente para el tratamiento de la fibrosis hepática por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) [4], a pesar de la mayor comprensión de los mecanismos moleculares y celulares de fibrosis hepática

1.5.1. Opciones actuales para el tratamiento del HGNA.

Además de la vitamina E, los únicos fármacos que se pueden recomendar para el tratamiento de la NAFLD son los fármacos que ya se utilizan para el tratamiento de la DT2 y/o la obesidad. La mayoría de estos fármacos tienen un efecto directo sobre el HGNA y, a través de este.

Los fármacos utilizados para tratar la DT2 con efectos sobre la histología del HGNA son las tiazolidinedionas TZD [11][4][84][85]. Las TZD como la pioglitazona actúan sobre los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), principalmente sobre la isoforma PPAR γ . Si PPAR γ se une al receptor retinoide X, sensibiliza a la insulina en el tejido adiposo, ejerciendo efectos antiesteatogénicos [86]. En hígados de rata, el tratamiento con pioglitazona condujo a una disminución de la fibrogénesis [87]. Sin embargo, el efecto no fue significativo en los ensayos en humanos con TZD. De hecho, después de 96 semanas de tratamiento con pioglitazona, no se observó mejoría en el estadio de fibrosis en comparación con el placebo [88].

Los AR GLP-1 mejoran el control glucémico a través de una menor secreción de glucagón, vaciamiento gástrico más lento, secreción de insulina dependiente de la glucosa, mayor saciedad, reducción del peso corporal y del índice de masa corporal [84] [89] [90] [91]. También conducen a la mejora de los marcadores hepáticos: alanina aminotransferasa (ALT), ácido aspartico transferasa (AST) y gamma-glutamyl transferasa (GGT). Actualmente, el uso de AR GLP-1 solo se recomienda en caso de índice de masa corporal (IMC) alto ($\geq 27 \text{ kg/m}^2$) y comorbilidades como diabetes e hipertensión arterial [11]. Se investigó la eficacia del fármaco durante 48 semanas con efectos positivos sobre la EHNA pero no sobre la fibrosis como criterio principal de valoración [92]. Otro AR GLP-1, semaglutida, se probó en pacientes con riesgo de desarrollar HGNA durante 104 semanas. La semaglutida redujo significativamente los niveles de ATL después de 28 a 20 semanas de tratamiento [93] pero no se observó una reducción de proceso fibrotico [94]. La pioglitazona TZD y la semaglutida GLP-1 RA no pudieron alcanzar significancia en la reducción de fibrosis [95][96].

SGLT-2 es una clase de antidiabéticos orales que reducen la hiperglucemia al promover la excreción urinaria de glucosa sin afectar la secreción de insulina [97]; al igual que en el caso de los fármacos anteriormente mencionados, en estos estudios no se detectaron efectos sobre la fibrosis hepática [85][98].

1.5.2. Terapia en Desarrollo.

Como se mencionó anteriormente, actualmente no hay medicamentos aprobados para el tratamiento del HGNA, pero existen fármacos en desarrollo. El ácido obeticólico OCA es hasta ahora el único fármaco que demostró eficacia en la fase III. El OCA es un agonista selectivo del receptor farnesoide X FXR. El FXR es un receptor nuclear de ácidos biliares que desempeña un papel en el metabolismo de las lipoproteínas y la glucosa, la regeneración hepática y la regulación de la inflamación hepática, por lo que tiene efectos anticoléstásicos y hepatoprotectores [99]. Se ha demostrado que la activación del receptor FXR en ratones inhibe la activación del

inflamatoria en los hepatocitos, lo que previene la progresión de la enfermedad [100]. OCA fue aprobado por la FDA en 2016 para el tratamiento de la colangitis biliar primaria, aunque actualmente se encuentra en un ensayo de fase III para probar los efectos y la seguridad en pacientes con la EHNA (Regenerate Study) [101]. OCA ha demostrado una regresión estadísticamente significativa de la fibrosis, con un efecto del 11 % en la fase III después de 72 semanas con 25 mg. Sin embargo, OCA no alcanzó el punto final en el mejoramiento de la EHNA [17].

Otros fármacos que se están probando actualmente para el tratamiento de la fibrosis son lanifibranor, PFD y CVC. Lanifibranor (IVA337) es un fármaco que activa cada una de las tres isoformas de PPAR [102], por lo que tiene efectos antifibróticos y antiinflamatorios. Lanifibranor está en fase III de estudio, con resultados significativos en la mejora de la EHNA, la fibrosis y la combinación de ambos [103][104]. PFD es un fármaco antifibrótico oral aprobado para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. Se probó en pacientes con fibrosis hepática avanzada (estudio PROMETEO) y en el 35 % de los pacientes, se observó una reducción significativa de la fibrosis, lo que llevó a la conclusión de que PFD es eficaz y seguro en pacientes con enfermedad hepática avanzada [105]. CVC, un fármaco que se dirige a los macrófagos en el hígado mediante la inhibición de receptores de quimiocinas [106][78] no mostró resultados significativos a los 2 años de estudio [107][108]. De la misma forma, diferentes moléculas no fueron eficaces, a pesar de que los estudios preclínicos fueron positivos. Por ejemplo, el selonsertib, el simtuzumab y el inhibidor de galactina-3 [109][110]. Finalmente, el grupo de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, ha desarrollado una molécula terapéutica con efectos positivos sobre el proceso inflamatorio y la cirrosis hepática [111][112]. IFC305, es un derivado de la adenosina-aspartato y se ha demostrado tanto en modelos animales (rata CCl 4), como en modelo *in vitro* que puede revertir la fibrosis hepática, reducir la presencia de HSC activadas, promover un aumento en el número de HSC quiescentes y modificar la expresión global de genes relacionados con la fibrogenesis y el metabolismo de los lípidos, además de reducir los niveles de citocinas inflamatorias [111][112][113] [114][115].

Capítulo 2

Vacuna intranasal HB-ATV-8

2.1. CETP como blanco terapéutico.

El transporte inverso del colesterol es el proceso fisiológico por el cual el colesterol en los tejidos periféricos es transportado por las HDL al hígado para su excreción biliar, en consecuencia, promueve la disminución de lípidos al interior de diferentes tejidos extrahepáticos [116]. La mayoría de las células y los tejidos periféricos (excepto los de los órganos esteroideogénicos) no pueden catabolizar el colesterol y solo pueden eliminarlo efluyéndolo hacia aceptores extracelulares como las HDL. Sin embargo, hasta dos tercios del colesterol celular que debería llegar al hígado para su excreción se internaliza nuevamente en los tejidos extrahepáticos [117][118], debido a que gran parte de los ésteres de colesterol no permanece en las HDL, sino que se transfiere a las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (VLDL y LDL, respectivamente) por la actividad transferidora de CETP [119], “perjudicando” el flujo de colesterol. Dado su papel central en el metabolismo de las lipoproteínas, CETP es un objetivo terapéutico para regular el metabolismo de los lípidos. En ese sentido, algunos estudios han mostrado que, la inhibición de la CETP aumenta el flujo de colesterol a través de las HDL [43]. En humanos, la deficiencia genética de CETP da lugar a una marcada elevación de las HDL entre los homocigotos y una elevación moderada en los heterocigotos [120][121][122]. Las mutaciones en el gen de CETP que conducen a la deficiencia de CETP son particularmente frecuentes en los japoneses y la deficiencia de CETP es la causa más común de HDL elevadas (3.9-7.8 mmol/L) [123]. Debido a esto, se han desarrollado fármacos que tienen como finalidad inhibir la actividad de CETP.

2.2. Desarrollo de la vacuna intranasal HB-ATV-8.

En nuestro laboratorio durante mucho tiempo se han llevado a cabo investigaciones centradas en la estructura y función de CETP. CETP es una proteína plasmática de 476 residuos, cuya estructura cristalográfica refleja una forma alar-

gada de 'boomerang' con dimensiones de $135 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA}$ [124] [125], puede describirse en cuatro unidades estructurales: un barril en cada extremo de la proteína (barriles N y C), una lámina β central entre los dos barriles y una extensión C-terminal. Cada barril contiene una hoja β altamente retorcida y dos hélices (A y B en el cilindro N, A' y B' en el cilindro C). La cuarta unidad, Glu465–Ser476 en el extremo C de CETP, forma una hélice anfipática distorsionada, la hélice X, que se desenrolla ligeramente al final (Fig. 2.1) [125]. Es importante destacar que, la hélice X de CETP es el componente funcional de la proteína, crítico para la actividad de transferencia de lípidos, ésto fundamentado en estudios de delección y mutagénesis sitio específica que han mostrado que los últimos 12 residuos del C-terminal (E465–S476), corresponde a una región clave para la transferencia de lípidos [126] [127] [128]. Considerando que la estructura α hélice del carboxilo terminal le brinda funcionalidad a CETP, uno de los objetivos de nuestro laboratorio fue crear una vacuna (HB-ATV-8) (Patente concedida en México, WO2014003531; Patente concedida en Estados Unidos de América, US 9,539,312 B2; Patente concedida en la Comunidad Europea, EP2868327.) que pudiera inhibir la actividad de CETP desde un enfoque inmunológico. Brevemente, la vacuna HB-ATV-8 consiste en una nanopartícula micelar en la cual está embebido el péptido Seq-1, la absorción de la vacuna a través de la mucosa nasal permite el desarrollo de anticuerpos neutralizantes de la región funcional de CETP, los que a su vez también actuarán neutralizando a la proteína CETP endógena [129][1].

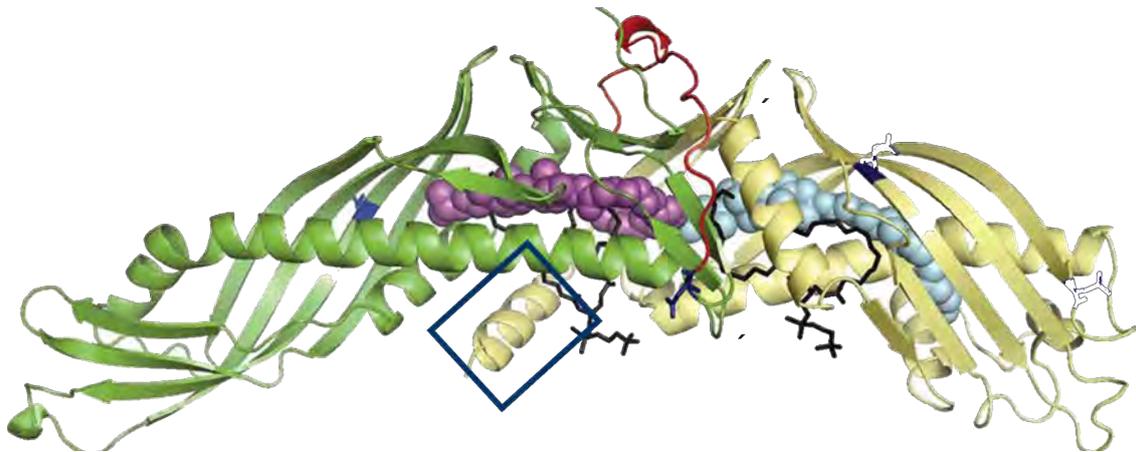


Figura 2.1: Estructura tridimensional obtenida a partir del cristal de CETP. En verde se muestra el barril N y en amarillo el C, la conexión entre ambos dominios se encuentra marcada en rojo. En color magenta y cian se presentan dos moléculas de ésteres de colesterol. El dominio C-terminal se encuentra señalado en un recuadro azul. Estructura obtenida del Protein Data Bank: 2OBD

Como se mencionó anteriormente, la vacuna HB-ATV-8 está diseñada para ser absorbida por la mucosa nasal, a través de la absorción de nanopartículas micelares que conforman la preparación vacunal HB-ATV-8, es importante destacar que la composición de la nanopartícula permite mantener estable la estructura secundaria de la α -hélice funcional del antígeno (Seq-1), que es la conformación que facilita la función de transferencia de lípidos (Fig. 2.2) [129].

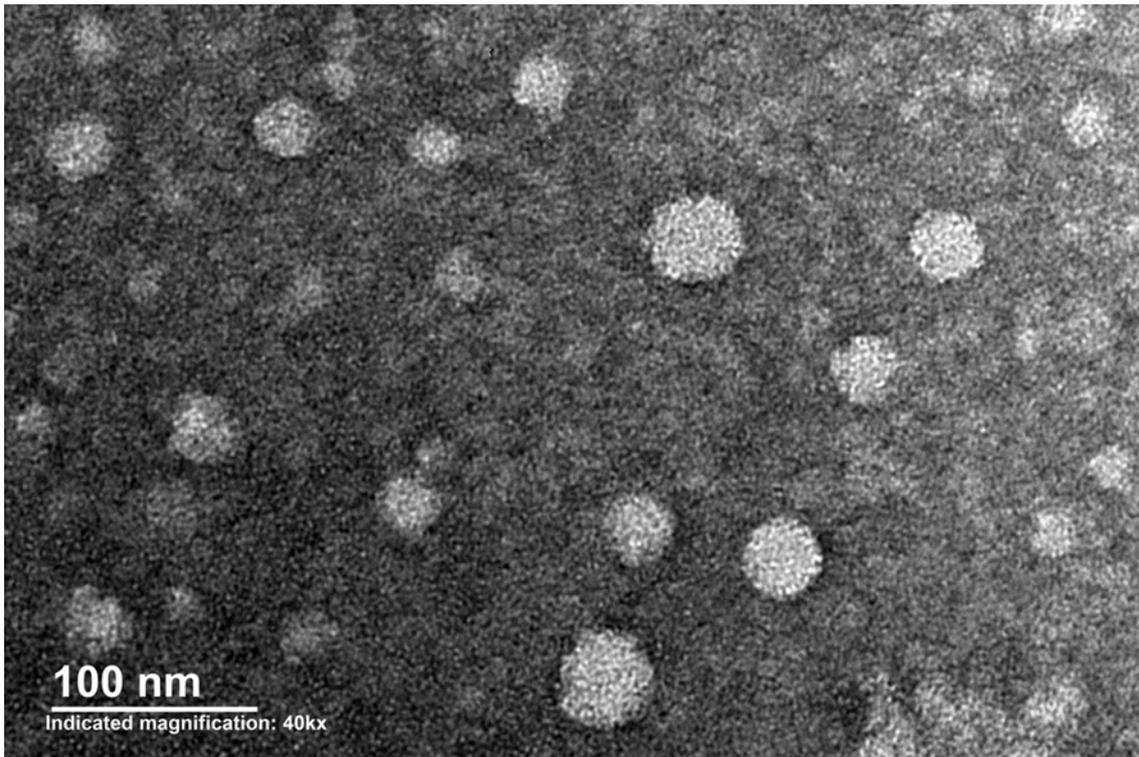


Figura 2.2: Microfotografía de HB-ATV-8 por microscopía electrónica de transmisión. Formación de estructuras tipo micelar.

La vacuna intranasal HB-ATV-8, está diseñada para promover un perfil lipídico antiaterogénico modulado por la inhibición de la actividad de CETP, por lo que se evaluó la efectividad del tratamiento en un modelo de aterosclerosis inducido por una dieta alta en colesterol en conejos blancos Nueva Zelanda, y se encontró que la vacuna reduce de forma significativa la formación de la lesión aterosclerótica, además de que mantiene el correcto funcionamiento de las células endoteliales de la aorta torácica, este último resultado es de particular interés porque la disfunción endotelial es producto de una lesión vascular en la que no hay obstrucciones, pero los vasos sanguíneos se contraen en lugar de dilatarse, en ese sentido es destacable el hecho de que el tratamiento con HB-ATV-8 promueva un efecto directo en el mantenimiento de las células endoteliales[1][130]. De manera interesante, a partir de este estudio, demostramos que la vacuna también tiene un efecto regulatorio sobre el proceso fibrótico en la EHGNA [1]. La vacuna HB-ATV-8 mostró ser eficaz en la

producción de anticuerpos anti-CETP, en paralelo con una reducción en la actividad de CETP. La administración de HB-ATV-8 promueve la reducción significativa de los niveles de triglicéridos y además, observamos un restablecimiento de los niveles de la proteína PPAR α , el cual es un factor de transcripción involucrado con la expresión de proteínas asociadas con la β oxidación de ácidos grasos. Posteriormente, realizamos un estudio en cerdos, debido a que las condiciones fisiológicas y patológicas en este modelo se asemejan a la de los humanos. En este trabajo se encontró que de forma consistente con el estudio en conejos, la administración de la vacuna es capaz de regular los niveles de triglicéridos. Así como, el restablecimiento de los niveles de expresión de los genes de aorta KLF2, SOD1, COL1A1 y ACTA2. Brevemente, KLF2 corresponde a un factor de transcripción ateroprotector que regula la expresión de genes endoteliales vasoactivos involucrados en la regulación de la constricción/dilatación normal de las células vasculares de músculo liso; SOD1 protege a las células contra la citotoxicidad al eliminar los radicales superóxido; COL1A1 corresponde a la proteína más abundante asociada a las fibras de colágeno. Mientras que, ACTA2 es un marcador asociado a diversas enfermedades oclusivas. Por otra parte, también encontramos un restablecimiento en los niveles de expresión de la proteína PPAR α [131][132]. Finalmente, y de forma congruente con los primeros estudios preclínicos, la aplicación de la vacuna muestra una reducción significativa en la lesión aterosclerótica y en el desarrollo del HGNA. [133].

En la Fig. 2.3, se presentan resultados histológicos en el modelo de conejo, que han sido consistentes en todos los estudios preclínicos. Los paneles del lado izquierdo corresponden a un análisis microscópico de secciones transversales de la aorta abdominal de un conejo representativo de cada grupo experimental, la aorta abdominal de los conejos control reflejan la estructura de una aorta sin lesiones en la íntima arterial, caracterizada histológicamente por una monocapa delgada de células endoteliales. En contraste, los conejos alimentados con la dieta alta en colesterol presentan un engrosamiento significativo de la túnica íntima. De manera interesante, con el tratamiento con HB-ATV-8 hay una disminución de la formación de la lesión aterosclerótica reflejada en una túnica íntima no engrosada a pesar de recibir

la dieta alta en colesterol. También se realizó una evaluación de los cambios histológicos inducidos por la dieta alta en grasa en el tejido hepático, al respecto, se pueden observar en la Fig. 2.3 (páneos del lado derecho) secciones histológicas de hígados de los animales de experimentación. Los conejos del grupo control denotan la organización laminar del parénquima hepático normal, al centro se encuentra la vena central en la cual desembocan las trabéculas de hepatocitos y los sinusoides, adoptando una disposición radial. La dieta alta en colesterol induce un importante desarrollo de fibrosis alrededor de la vena central, mientras que la administración de la vacuna concomitantemente con la dieta alta en colesterol disminuyó significativamente el proceso fibrótico.

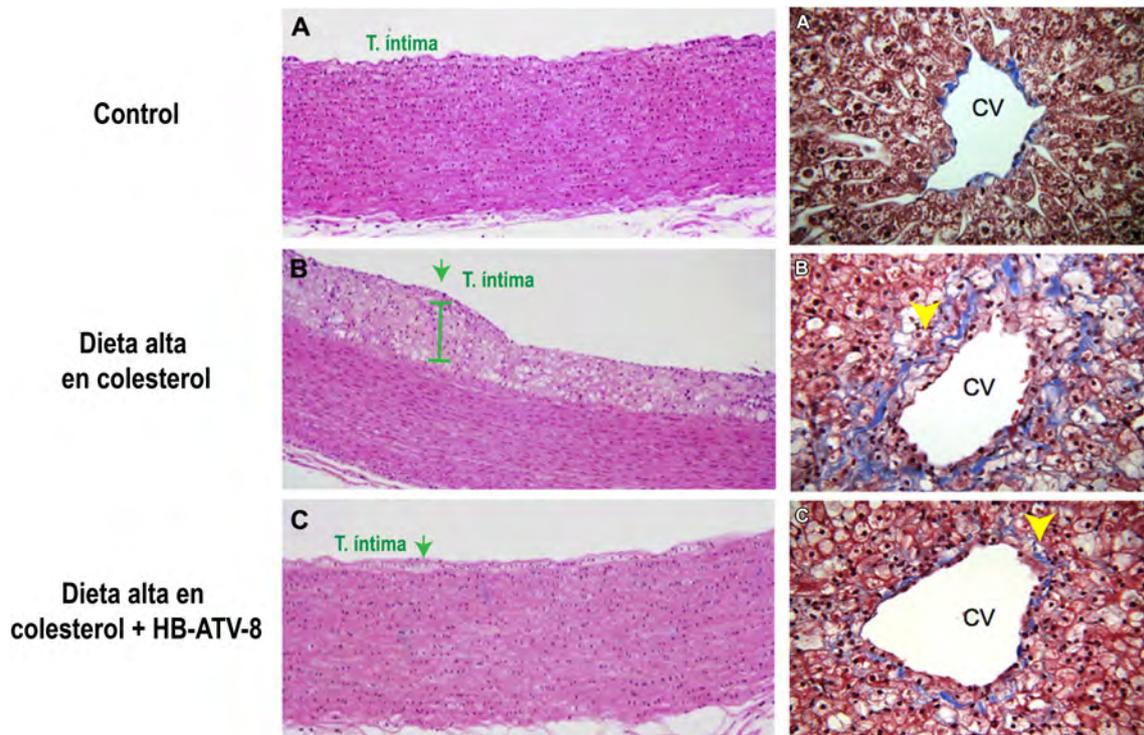


Figura 2.3: La vacuna HB-ATV-8 previene la aterogénesis y reduce la fibrosis inducida por una dieta alta en colesterol. A la izquierda, secciones de la aorta abdominal de un conejo representativo de cada grupo experimental. A) Pared de una aorta sin lesión; B) Engrosamiento patológico de la túnica íntima (flecha verde), la línea en color verde evidencia el grado de la lesión; C) La vacuna HB-ATV-8 previene el engrosamiento de la íntima a pesar de recibir la dieta alta en colesterol (se señala con la flecha verde). A la derecha, muestra de hígado de un conejo representativo de cada grupo, teñidas con tricrómico de Masson para destacar lo componentes del tejido conectivo. A) Organización laminar del parénquima hepático normal; B) La dieta alta en colesterol induce un importante desarrollo de fibrosis alrededor de la vena central (las fibras colágenas se observan en color azul y están señaladas con una flecha amarilla); C) La administración de la vacuna disminuye el depósito de fibras colágenas alrededor de la vena central (flecha amarilla). [1]

Los análisis bioquímicos, moleculares e histológicos derivados de los tres estudios, muestran la eficacia de la vacuna HB-ATV-8 en la prevención de la aterogénesis, y refuerzan el hecho de que ejerce un papel importante en la reducción de la fibrosis en el tejido hepático. Este es un hallazgo muy importante porque más allá de la modificación del perfil lipídico, hay una clara respuesta por parte de los moduladores de la matriz extracelular ante la administración de HB-ATV-8. Es por esta razón que hipotetizamos que más allá de la modulación de la actividad de CETP llevada a cabo por los anticuerpos neutralizantes generados a partir del tratamiento intranasal con HB-ATV-8, los efectos moleculares observados pueden estar regulados por el péptido Seq-1. Derivado de lo anterior, decidimos comprobar la posibilidad de un efecto directo de Seq-1 sobre los aspectos moleculares que intervienen en el desarrollo de la fibrosis hepática. En este estudio nos centraremos precisamente en dilucidar el mecanismo molecular por medio del cual se está llevando a cabo esta regulación, por lo que evaluaremos el efecto del compuesto activo (péptido Seq-1) de la vacuna HB-ATV-8 en un modelo celular *in vitro* que asemeje la esteatosis de la patología del HGNA para conocer los patrones de expresión diferencial, particularmente en genes asociados con la síntesis y degradación de la matriz extracelular.

Capítulo 3

Hipótesis

Proponemos que el uso del péptido (CHLLVDFLQSL, nombrado Seq-1) en líneas celulares de hepatocitos (HepG2) y células estrelladas expuestas a concentraciones elevadas de lípidos, regulará negativamente la expresión de genes implicados en la remodelación de la matriz el extracelular.

Capítulo 4

Objetivo

Analizar la expresión de RNAm asociados con procesos fibrogénicos en un modelo celular *in vitro* que asemeje algunas de las características fisiopatológicas de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

4.1. Objetivos particulares

- Establecer un modelo de esteatosis *in vitro* que asemeje algunas características del hígado graso no alcohólico en la línea celular HepG2 mediante la estimulación de las células con ácidos grasos.
- Realizar la evaluación de la citotoxicidad de los ácidos grasos y del péptido Seq-1 para establecer las concentraciones de trabajo.
- Analizar el efecto de la sobrecarga de ácidos grasos y del péptido Seq-1 en los siguientes parámetros bioquímicos: niveles de lípidos, glucosa y enzimas asociadas con daño hepático.
- Evaluar el efecto de Seq-1 en el estrés oxidante mediante el análisis de los niveles de ROS intracelulares.

- Evaluar el efecto del péptido Seq-1 en la expresión de genes asociados con la remodelación de matriz extracelular en hepatocitos esteatóticos mediante el uso de qRT-PCR.
- Explorar la influencia del péptido Seq-1 en la expresión de proteínas asociadas con remodelación de matriz extracelular en células HepG2 esteatóticas mediante inmunofluorescencia.
- Investigar el efecto del péptido Seq-1 en la activación de células estrelladas humanas, cultivándolas con el sobrenadante de las HepG2 esteatóticas.

Capítulo 5

Método

De forma general, este proyecto fue diseñado para evaluar el efecto hepatoprotector del péptido Seq-1 (incluido en la vacuna HB-ATV-8; Número de patente US9539312; MX347400B; EP2868327; WO2014003531) en células HepG2 y en células estrelladas hepáticas (HSC, por sus siglas en inglés) expuestas a concentraciones elevadas de lípidos.

5.1. Establecimiento de un modelo de esteatosis *in vitro*.

5.1.1. Cultivo y tratamiento celular

Partiendo de los análisis histológicos obtenidos en nuestro laboratorio, en un modelo de aterosclerosis tanto en conejo como en cerdo [1][132][133], en los que se observó una disminución significativa del proceso fibrótico en el hígado al aplicar la vacuna intranasal HB-ATV-8, en este trabajo se desarrolló un modelo *in vitro* con líneas celulares provenientes de células hepáticas de humano HepG2 y HSC, para asemejar las características del hígado graso no alcohólico. La viabilidad del modelo anterior, ha sido comprobada experimentalmente en diversos trabajos [134][135][136].

La línea celular derivada de hepatoma HepG2 (ATCC HB-8065, USA) se cultivó en medio de cultivo Dulbecco's Eagle Modified (DMEM) (gibco, USA) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (gibco, USA) y 10,000 U/mL de penicilina, 10 mg de estreptomycin y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B en condiciones de humedad a 37 °C y a una atmósfera de CO_2 al 5 %.

5.1.2. Inducción de la internalización lipídica con ácidos grasos.

Para inducir la sobrecarga de lípidos, una vez que las células HepG2 alcanzaron el 75 % de confluencia, se expusieron a una mezcla de ácido oléico (Cat # O1383) (Merck, Alemania) y ácido palmítico (Cat # P0500) (Merck, Alemania) en una relación 2:1 respectivamente. Los ácidos grasos se adicionaron a una solución de albúmina de suero fetal bovino (BSA) al 1 % (Cat # A9418) (Merck, Alemania). Para determinar la concentración lipídica a la cual se estimularía a las células para inducir una respuesta profibrótica, las células se expusieron durante 24 h a concentraciones crecientes de la mezcla de ácidos grasos (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2 mM).

Brevemente, para el tratamiento con ácidos grasos, se prepararon soluciones stock de ácido palmítico y oleico 100 mM disolviendo los ácidos grasos en DMSO. Posteriormente, se preparó una solución de BSA (Sigma) sin ácidos grasos al 10 % (p/v) en H_2O MilliQ y se mantuvo a 50°C en un baño de agua. Se obtuvo una solución de ácidos grasos 5 mM/BSA al 1 % adicionando la cantidad apropiada de soluciones stock de oleato y palmitato con BSA al 10 % a 55°C durante 30 min. La solución fue filtrada en condiciones de esterilidad antes de utilizarse. La viabilidad celular para la siembra de células en todos los experimentos de cultivo celular se evaluó con la prueba de exclusión del colorante azul de tripano (gibco). Las dosis experimental se determinó realizando curvas de dosis y evaluando la viabilidad celular que siempre fue superior al 85 % en comparación con las células control (100 % de viabilidad), protocolo que se describe posteriormente.

5.1.3. Obtención del medio condicionado.

Después de 24 h de exposición al tratamiento con ácidos grasos o de ácidos grasos más el péptido Seq-1, el sobrenadante se centrifugó a 6000 RPM para eliminar los detritos celulares, se esterilizó por filtración (filtro de membrana con un tamaño de

poro de $0.45\ \mu\text{m}$) y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

5.1.4. Determinación del contenido de lípidos intracelulares por microscopía de fluorescencia: tinción con rojo Nilo.

El contenido de lípidos intracelulares se determinó microscópicamente basándose en la tinción con rojo Nilo, un tinte lipofílico utilizado para marcar la acumulación de lípidos en el citosol [137]. Se sembraron 250 mil células en cajas de seis pozos, que se expusieron a un tratamiento con ácidos grasos durante 24 h a las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2 mM. Después, las células se lavaron dos veces con DPBS y se permeabilizaron con tritón al 0.1 %, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 min. Los lípidos neutros intracelulares se tiñeron con rojo Nilo ($0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 min. Todo el procedimiento de tinción se realizó a temperatura ambiente protegiendo las muestras de la luz directa. Los hepatocitos teñidos se lavaron con DPBS para eliminar el tinte no incorporado. La acumulación lipídica intracelular se examinó utilizando un microscopio confocal ZEISS LSM 800, con un objetivo 40x/1.3. Los datos cualitativos se confirmaron mediante un análisis cuantitativo de la internalización de lípidos en el que se evaluó la cantidad de lípidos al interior de las células mediante una aproximación fluorimétrica utilizando el software ImageJ (NIH).

5.2. Evaluación del efecto ateroprotector del péptido Seq-1.

5.2.1. Ensayo de citotoxicidad de la sobrecarga con ácidos grasos y del péptido Seq-1.

La viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo colorimétrico de captación de rojo neutro. Se sembró una densidad de 1×10^5 células HepG2 por pozo en una placa de 96 pozos, permitiendo su adherencia durante 24 h en una atmósfera de CO_2 al 5% a $37^\circ C$. Posteriormente cada pocillo se lavó con DPBS, y las células fueron tratadas con las concentraciones crecientes de ácidos grasos descritas anteriormente (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2 y 4 mM). Después de 24 h se removió el tratamiento y el procedimiento continuó con la adición de $40 \mu g/mL$ de rojo neutro y la incubación a $37^\circ C$ por 2 h y 30 min. Se realizaron lavados con DPBS para posteriormente adicionar la solución de desteñido. La absorbancia de cada pozo se leyó a 540 nm en un lector de microplacas (BioTek Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader). La absorbancia de las células sin tratamiento (control) fue tomada como el 100% de supervivencia. Los datos se expresan como la media \pm E.S de 6 experimentos independientes. Para estos análisis, las células fueron distribuidas en los siguientes grupos de estudio: un grupo de células control que fueron incubadas únicamente con DMEM suplementado, un segundo grupo con el disolvente de la solución lipídica (DMSO 0.1%) y finalmente, un grupo de células a las que se les adicionó la solución lipídica a diferentes concentraciones. Puesto que el punto fundamental de este trabajo es la evaluación del efecto del péptido Seq-1 en la regulación génica de las células hepáticas, una vez que se determinó la concentración de ácidos grasos para inducir una respuesta profibrótica, se realizó un análisis posterior para establecer la concentración de péptido a utilizar, para lo cual se empleó una solución stock 5 mg/mL del péptido Seq-1, el cual se disolvió en buffer de carbonatos ($NaHCO_3/Na_2CO_3$ 50 mM pH 9.5). Las células se estimularon con diferentes concentraciones del péptido

(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. La dosis experimental también se determinó mediante la elaboración de curvas de viabilidad celular con rojo neutro como se describió anteriormente.

5.2.2. Evaluación de apoptosis mediante citometría de flujo.

La apoptosis y la apoptosis tardía se determinaron con un ensayo de dos tinciones y se evaluó por citometría de flujo. Las células se marcaron con Anexina V, que detecta la fosfatidilserina expuesta en la membrana celular, y con 7-aminoactinomicina D (7AAD), el cual es un tinte que se une al DNA, ingresa a las células solo una vez que se rompe la membrana celular y es indicativo de necrosis celular. Para garantizar la consistencia de los datos de citometría de flujo, así como para realizar la compensación por el cruce de fluoróforo, para cada preparación de hepatocitos humanos se realizaron tinciones únicas de cada colorante (anexina V y 7-AAD). Las células se recolectaron mediante tripsinización suave que se inactivó mediante la adición de medio con FBS al 10%. Las células se lavaron, el sedimento se suspendió en DMEM ajustando la densidad celular a 1×10^6 células. Se incubaron 200×10^3 mismas que se incubaron con 5 μL de Anexina V y 5 μL de 7AAD durante 30 min a 37°C . Las células se diluyeron con el tampón de incubación hasta un volumen final de 600 μL y se analizaron con un citómetro Cytoflex S, utilizando un filtro de paso de banda de 660/20 nm para la detección de anexina (canal FL6) y un filtro 690/50 nm para la detección de 7AAD (canal FL4). Los datos se analizaron utilizando el software Flow Jo. Se utilizó el mismo protocolo de citometría de flujo para todos los experimentos del estudio; esto significó que los voltajes para todos los marcadores fueron constantes.

5.2.3. Análisis bioquímico.

Se realizó la detección de la concentración de triglicéridos (TG), colesterol total (TC), así como la actividad enzimática de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), y niveles de glucosa en las células HepG2, mediante espectrofotometría uv- visible Dirui cs- T240, utilizando reactivos dcL-SEKISUI. Estos estudios se realizaron en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

5.2.4. Generación de ROS intracelulares por H2DCFDA.

Para establecer si la producción de ROS inducida por ácidos podría revertirse mediante el tratamiento con el péptido, las células se trataron conjuntamente con ácidos grasos y el péptido Seq-1 0.1 mg/mL . La acumulación de ROS se determinó con la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H2DCFDA, Invitrogen). Esta sonda es permeable a las células y, una vez dentro de una célula, es dividida por esterasas intracelulares en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que luego se vuelve impermeable a las células. posteriormente, la DCF puede reaccionar con las ROS intracelulares (específicamente peróxido de hidrógeno) y producir una señal fluorescente detectable a $\approx 492 - 495/517 - 527 \text{ nm}$. La señal es directamente proporcional al nivel de ROS intracelular presente. Brevemente, las células previamente tratadas, se lavaron en DPBS por centrifugación y se incubaron con $5\mu\text{M}$ de H2DCFDA durante 30 min a 37° en DPBS. Las células se lavaron y el sedimento se resuspendió en DPBS, posteriormente se adicionaron $100\mu\text{L}$ de la solución a una microplaca y se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un lector de microplacas (BioTek Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader) a una excitación de 485 nm y emisión de 530 nm.

5.2.5. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

Después de los tratamientos, se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con DPBS y se aisló el RNA total. Brevemente, las células se lisaron con el reactivo Trizol (Invitrogen, E.U.), se añadió cloroformo y el RNA celular se precipitó con alcohol isopropílico. Después de lavar con etanol al 75 %, el RNA se disolvió en agua sin nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, E.U.). La pureza del RNA se evaluó midiendo la relación A260/A280, considerando RNA con pureza adecuada aquellos que presentaban valores entre 1.8 y 2.0. El RNA total (1 μ g) se transcribió de forma inversa utilizando el kit de síntesis de cDNA iScript BioRad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción se realizó en un termociclador de acuerdo con el protocolo de reacción propuesto por el fabricante: 5 min a 25°C (hibridación), 20 min a 46°C (síntesis de cDNA) y 1 minuto a 95°C (desnaturalización enzimática).

5.2.6. Análisis de expresión de marcadores profibróticos mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real en un QuantStudio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific); se utilizó GAPDH como gen constitutivo. Todos los pares de cebadores fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y fueron diseñados usando el software GenScript Online PCR Primers Designs Tool. Las secuencias de cebadores y las referencias se especifican en el Cuadro 5.1. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 12 μ L que contenía 1 μ g de cDNA y PowerUp SYBR Green Master Mix (SYBR Green, DNA polimerasa Taq Dual-Lock, dNTPs con mezcla dUTP/dTTP, UDG termolábil, tinte de referencia pasivo ROX y estabilizadores). Para verificar la especificidad de la amplificación, se realizó un análisis de la curva

de fusión, inmediatamente después del protocolo de amplificación. En ningún caso se encontraron productos inespecíficos. La cuantificación relativa se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, teniendo en cuenta las eficiencias de los genes individuales. Los resultados se normalizaron a GAPDH, la cantidad inicial de la plantilla de cada muestra se determinó como expresión relativa frente a una de las muestras elegidas como referencia (en este caso la muestra de control). Los resultados informados son la expresión media \pm error estándar de al menos 3 determinaciones diferentes para cada gen.

Gen	Secuencia
COL1A1 fwd	5'-TTC ACT TGG CTT CAG CGC CA-3'
COL1A1 rev	5'-GTG ACT GCA ACC CCC AGC TT-3'
ACTA2 fwd	5'-AGC TGG GGC AGT TGG GTC TA-3'
ACTA2 rev	5'-TGG CCC CAG AGC TGG TAA GT-3'
TGF-beta fwd	5'-ACA GGT TCC TGC TGT GTG CC-3'
TGF-beta rev	5'-CCA TCC TGC ATG CCT CCC TG-3'
GAPDH fwd	5'-CCA TCC TGC ATG CCT CCC TG-3'
GAPDH rev	5'-ACT GAC ACG TTG GCA GTG GG-3'

Cuadro 5.1: Primers diseñados para la identificación de genes asociados con fibrosis.

5.2.7. Microscopía de inmunofluorescencia de COL1A1, MMP-2 y TIMP-2.

Las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pozos, cada una con un cubreobjetos de vidrio, y se cultivaron durante 24 h en DMEM que contenía FBS al 10% y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin). Las células se estimularon con la solución lipídica 0.6 mM y con solución lipídica más el péptido (100 μ g/mL) durante 24 h. Se fijaron en paraformaldehído al 4% y se

permeabilizaron en Triton X-100 al 0.2% a temperatura ambiente durante 20 min. Las células se bloquearon con una solución de bloqueo (BSA 5% & 0.1% Tx-100 en PBS) durante 2 h, seguido de una incubación con los anticuerpos anti-COL1A1 (SC-293182), anti-MMP-2 (SC-13594) y anti-TIMP-2 (SC-21735) 1:500 durante la noche a 4°C. Posteriormente, se realizó la incubación con Goat anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen No. cat. A11001) 1:5000 durante 1 hora. Las imágenes fueron adquiridas en un Microscopio confocal LSM800, con un objetivo 63 X.

5.2.8. Inducción de la activación de células estrelladas.

Para evaluar el efecto de las HepG2 esteatóticas en el proceso de activación de las HSC, se utilizaron HSC de ScienCell Research Laboratories, las cuales se aislaron de hígado humano, se criopreservaron en el primer pase y se mantuvieron congeladas hasta su uso. Sólo se utilizaron reactivos ScienCell en el manejo de la células.

Las HSC se incubaron con el sobrenadante de HepG2 tratadas con ácidos grasos 0.6 mM, con ácidos grasos 0.6 mM más el péptido Seq-1 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o bien con el medio condicionado de células control durante 72 h. En el presente estudio nos centramos en analizar el efecto del péptido Seq-1 en la activación de las HSC, debido a que estas células tienen un papel central en el proceso fibrótico.

5.2.9. Análisis estadístico.

A menos que se indique lo contrario, todos los datos se expresan como media \pm error estándar (E.S) de tres experimentos independientes (réplicas biológicas). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de cada grupo. La significancia de las diferencias entre más de dos grupos se calcularon mediante la prueba de ANOVA de una vía y Tukey para datos con distribución normal y la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn's para datos sin distribución normal. La comparación entre dos grupos se realizó utilizando pruebas t de Student de una

vía para comparar los datos con distribución normal; para los datos con distribución no normal se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Para todas las pruebas se consideraron valores significativos aquellos que presentaron una $P < 0.05$. El análisis estadístico y las figuras se realizaron con el software Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Capítulo 6

Resultados

6.1. Establecimiento de un modelo de esteatosis *in vitro*.

6.1.1. El tratamiento con oleato y palmitato induce la internalización de lípidos en células HepG2.

Para investigar el efecto del péptido Seq-1 en células esteatóticas humanas, establecimos un modelo *in vitro* que asemeja la patología del hígado graso inducido por una mezcla de oleato y palmitato 2:1. Los ácidos grasos se adicionaron a una solución de BSA 1 % para obtener una relación molar 6:1 (ácidos grasos/BSA), imitando así las condiciones hiperlipidémicas. El contenido de lípidos en el interior celular se determinó mediante la tinción Rojo Nilo, debido a sus propiedades solvatocrómicas utilizamos 2 espectros de emisión y excitación ($\lambda_{ex} = 495 / \lambda_{em} = 519$ nm y $\lambda_{ex} = 594 / \lambda_{em} = 618$ nm) [138][139][140].

La exposición celular a 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2 mM de oleato/palmitato 2:1 durante 24 h indujo una acumulación de lípidos dependiente de la dosis (Fig. 6.1.).

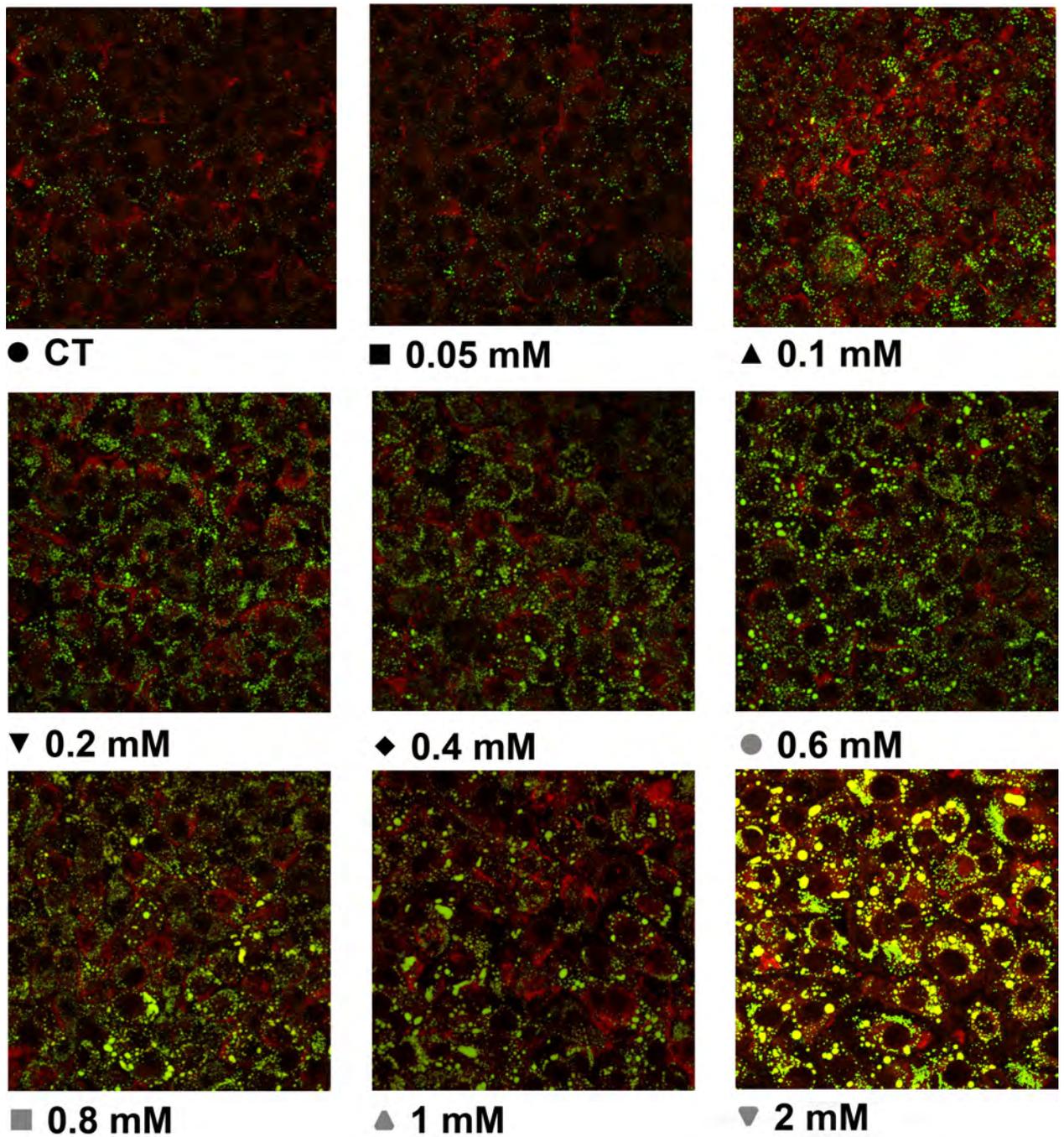


Figura 6.1: Acumulación de lípidos intracelulares tras estimulación con oleato/palmitato. Se incubaron células de hepatoma humano HepG2 con concentraciones crecientes de oleato/palmitato (I: CT, II: 0.05 mM, III: 0.1 mM, IV: 0.2 mM, V: 0.4 mM, VI: 0.6 mM, VII: 0.8 mM, VIII: 1 mM y IX: 2 mM) durante 24 h. Las células sin tratamiento con ácidos grasos sirvieron como controles, en verde se observan las gotas de lípidos citoplasmáticas. Tinción Rojo Nilo, imágenes adquiridas mediante microscopía confocal.

La internalización es evidente después de la exposición de oleato/palmitato 0.2 mM donde la cantidad de gotas lipídicas aumentaron en comparación con la observada con las dosis más bajas. Estos hallazgos cualitativos se confirmaron mediante una aproximación fluorométrica utilizando el software ImageJ (Fig. 6.2.). Se observó que el aumento en la fluorescencia de las células respecto a la fluorescencia extracelular (ΔF), es proporcional a la concentración de ácidos grasos. Encontramos un aumento de 3 veces (± 2.3 ; $P= 0.0005$) en la fluorescencia después de la incubación con ácidos grasos 0.6 mM en comparación con las células control. La acumulación de lípidos fue incluso más pronunciada después de la exposición a palmitato 2 mM durante 24 h (aumento de 5 ± 6.8 veces sobre el control $P=(<0.0001)$).

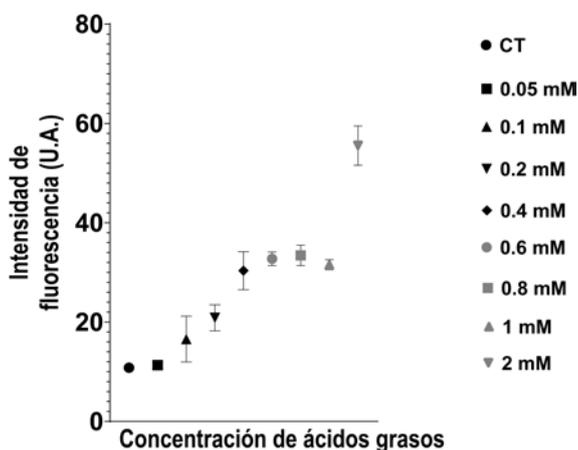


Figura 6.2: Evaluación fluorométrica del contenido de lípidos intracelulares. Los datos representan la media de los valores de intensidad de fluorescencia \pm el E.S.

6.1.2. Citotoxicidad de la sobrecarga de ácidos grasos.

La citotoxicidad del tratamiento con oleato/palmitato se evaluó midiendo la absorción de rojo neutro a 540 nm. Los resultados muestran que las células HepG2 fueron sensibles a concentraciones elevadas de ácidos grasos, produciendo una reducción de la viabilidad celular a partir de la concentración 1.2 mM ($P=<0.0001$) sobre el control (Fig. 6.3). Para evaluar el efecto del vehículo en el que se solubilizaron los ácidos grasos, las células también se trataron con la concentración equivalente

de DMSO que se usó para solubilizar los ácidos grasos. En tal caso, la viabilidad no se redujo después de 24 h de incubación. Como muestra la Fig. 6.3., hay un efecto citotóxico dependiente de un aumento en la concentración de ácidos grasos. No se observó algún efecto citotóxico en hepatocitos humanos en las concentraciones de oleato/palmitato 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mM, mientras que se mostró un fuerte efecto citotóxico a partir de la concentración 1.2 mM de la mezcla de ácidos grasos. Por lo tanto, para lograr una sobreacumulación máxima de lípidos con una citotoxicidad mínima, se seleccionó la mezcla de ácidos grasos 0.6 mM para los experimentos posteriores. Como control positivo, en este análisis se utilizó el detergente Tritón X-100 (Sigma) a una concentración 0.1 %, misma que se determinó mediante una curva de citotoxicidad.

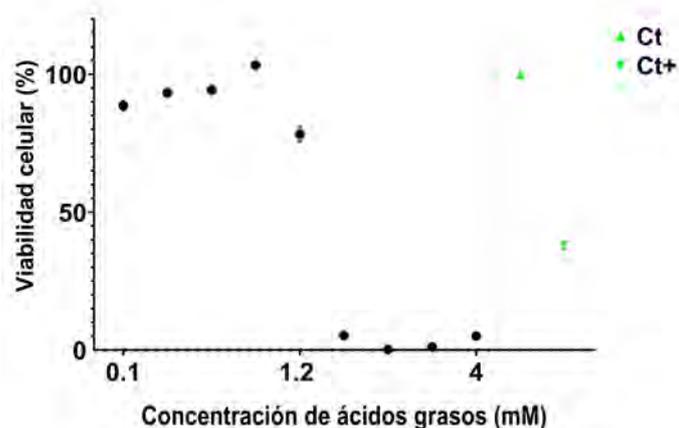


Figura 6.3: Curva dosis-respuesta del efecto citotóxico de los ácidos grasos (oleato/palmitato 2:1) sobre la viabilidad de la línea celular HepG2. Los datos mostrados representan la media de triplicados de al menos 5 mediciones independientes \pm E.S. Los símbolos en verde representan los controles utilizados: CT (células sin tratamiento); CT + (células + Tritón X-100).

6.2. Análisis del efecto hepatoprotector del péptido Seq-1 en un modelo de esteatosis *in vitro*.

También se evaluó el efecto del péptido Seq-1 en la viabilidad de las células HepG2, se probó un amplio rango de concentraciones (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y no observamos disminución significativa de la viabilidad con alguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 6.4). El efecto del péptido Seq-1 sobre la proliferación de células se midió mediante el ensayo rojo neutro, y los resultados mostraron que la concentración utilizada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en los experimentos posteriores es segura.

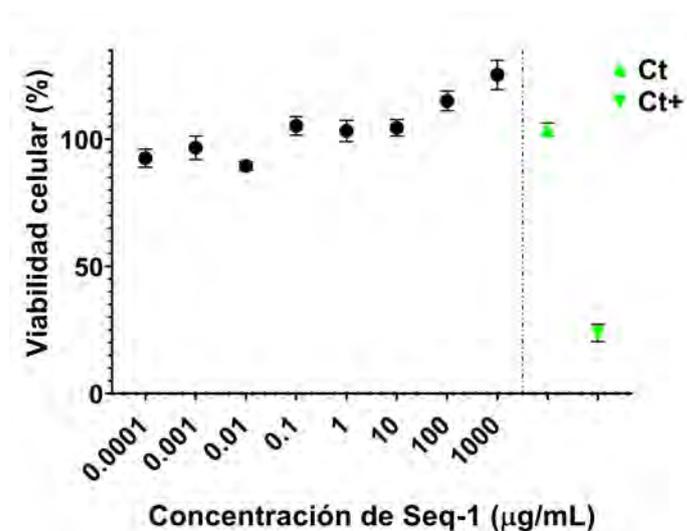


Figura 6.4: Viabilidad celular (curva de respuesta logarítmica a la dosis) de las células HepG2 tratadas con concentraciones crecientes del péptido Seq-1. Las células se trataron durante 24 h. Los datos representan la media \pm E.S. CT (células sin tratamiento); CT + (células + Tritón X-100 0.1%).

6.2.1. Evaluación de la apoptosis.

Para confirmar los resultados de viabilidad celular, tanto las células HepG2 estimuladas con ácidos grasos 0.6 mM como las que fueron tratadas con el péptido Seq-1 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se tiñeron con Anexina V y 7AAD para evaluar la apoptosis temprana y tardía. De acuerdo con la tinción celular, las células se clasificaron como: 1) células vivas negativas tanto para anexina V-FITC como para 7AAD; 2) células apoptóticas tempranas, positivas para anexina V-FITC y negativas para 7AAD; y 3) células apoptóticas tardías, positivas tanto para anexina-V-FITC como para 7AAD; las células positivas sólo para 7AAD se consideraron necróticas. La evaluación mostró que el porcentaje de células apoptóticas en el grupo control, el grupo de esteatosis y el grupo tratado con el péptido fue de 2.64 %, 2.53 % y 2.41 %, respectivamente.

Como se muestra en la Fig. 6.5, la concentración 0.6 mM de ácidos grasos no induce un aumento en el porcentaje de células en apoptosis temprana (2.53 %), apoptosis tardía (1.61 %) y hubo un 0.12 % en la población necrótica. De la misma manera, el péptido no induce un aumento en el porcentaje de células en apoptosis temprana (2.41 %), apoptosis tardía (1.57 %) o necrosis (0.20 %).

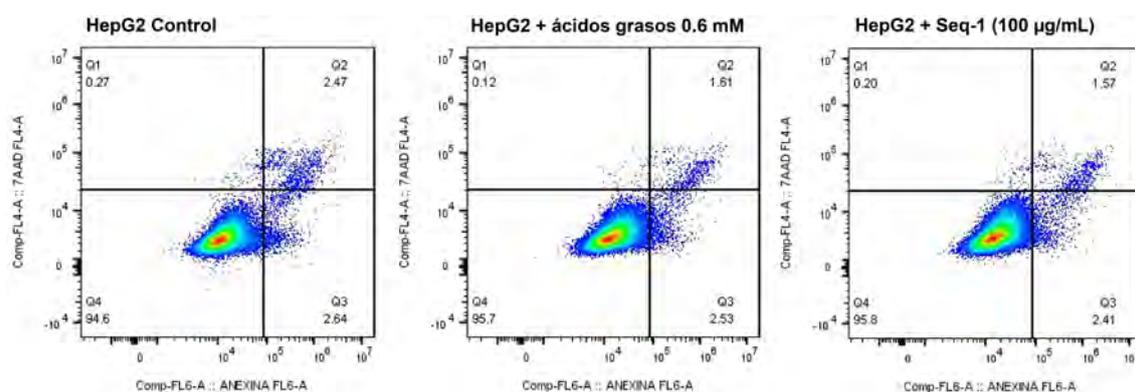


Figura 6.5: La sobrecarga con ácidos grasos (0.6 mM) y el tratamiento con el péptido (100 µg/mL) no promueven apoptosis celular. (A) Se utilizó citometría de flujo para detectar la tasa de apoptosis mediante tinción con Anexina V/7-AAD después de los tratamientos durante 24 h. Los diagramas de puntos se dividen en cuadrantes; Q4 (inferior izquierdo; células que se tiñen negativamente para 7-AAD y anexina V), Q1 (superior izquierdo; células que se tiñen positivo para 7-AAD pero negativo para anexina V), Q3 (inferior derecho; tinción para anexina V positivo y 7-AAD negativo, que representan células apoptóticas tempranas) y Q2 (superior derecho; tinción positiva tanto para 7-AAD como para anexina V, que representan células apoptóticas/muertas tardías).

6.2.2. El péptido Seq-1 regula la síntesis de lípidos.

El análisis de los niveles de lípidos intracelulares en las HepG2 mostró que el contenido de triglicéridos en las células tratadas con 0.6 mM de ácidos grasos durante 24 h aumentó significativamente en comparación con el del grupo control ($P < 0.0001$, Fig. 6.6A). Este resultado prueba que los ácidos grasos inducen con éxito la esteatosis en las células HepG2. Además, encontramos que también aumenta la concentración de colesterol total (Fig. 6.6B) ($P = 0.0018$) comparado con el Ct. En contraste, el péptido Seq-1 provoca una disminución significativa de la concentración de triglicéridos y colesterol ($P < 0.0001$; $P = 0.0031$) respectivamente, en células tratadas con ácidos grasos.

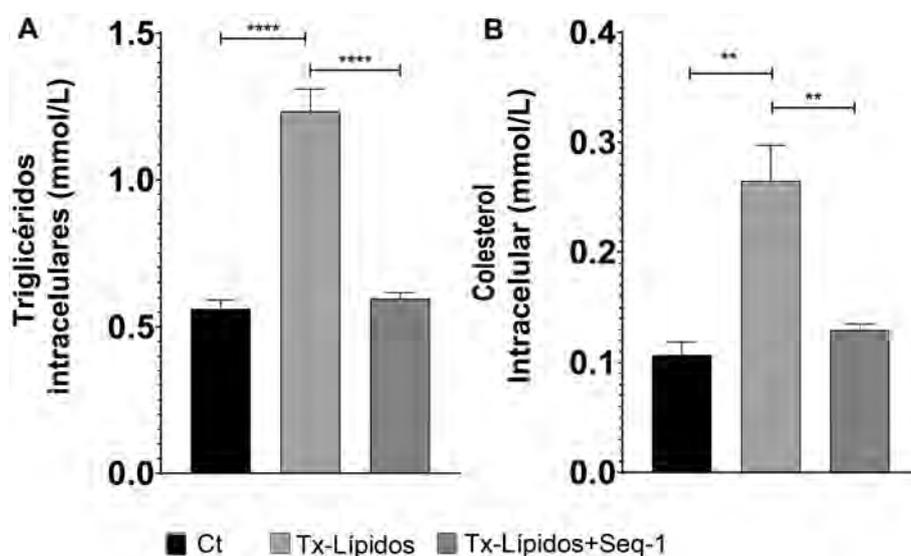


Figura 6.6: Efecto del péptido Seq-1 sobre los niveles intracelulares de triglicéridos y colesterol en células HepG2 esteatóticas. Los valores graficados son una representación del valor de la media \pm E.S. **P= < 0.05; **** P=< 0.0001. Las diferencias significativas se analizaron con una prueba t de Student.

6.2.3. El péptido Seq-1 regula la síntesis de ALT y AST.

En respuesta al tratamiento con ácidos grasos, hay un aumento significativo de los niveles de las enzimas ALT (30.85 ± 5.412 P=0.0023) y AST (99.42 ± 16.42 P=0.0019) en el medio extracelular después de 24 h de estímulo con los ácidos grasos en las células HepG2 comparados con el control. De manera interesante, con la adición de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ péptido Seq-1, los niveles de ALT y AST en el medio se redujeron significativamente en contraste con los niveles del medio de células esteatóticas (71.33 ± 43.04 , P= 0.0002 y 115.8 ± 8.021 , P= < 0.0001) respectivamente (Fig. 6.7.).

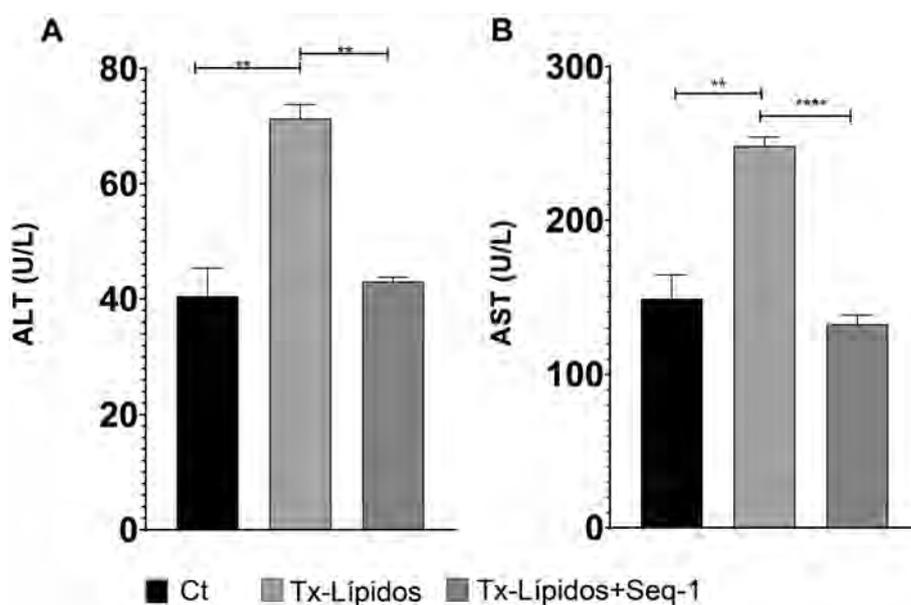


Figura 6.7: Niveles de ALT y AST en el sobrenadante después del tratamiento de células HepG2 con ácidos grasos (0.6 mM) y ácidos grasos + péptido (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. ** $P < 0.001$ o **** $P < 0.0001$. Se utilizó una prueba t de Student para la comparación de medias.

6.2.4. El péptido Seq-1 atenúa la acumulación de glucosa en células HepG2.

Para analizar el efecto del péptido en el metabolismo de la glucosa, se midió el contenido de glucosa en las células HepG2. Después de la adición de ácidos grasos a las células, la captación de glucosa por parte de las HepG2 aumentó 6 veces con respecto al control ($P=0.0847$), pero el contenido de glucosa intracelular disminuyó después de la adición de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido Seq-1 ($P=0.0055$) Fig. 6.8A. Los resultados mostrados en la Fig. 6.8B, son un reflejo de la captación de glucosa por parte de las células, ya que observamos una disminución de 10 veces de glucosa extracelular de las células esteatóticas con respecto al control ($P=0.0011$), mientras que el nivel de glucosa extracelular del grupo de células tratadas con ácidos grasos más el péptido no muestra una reducción significativa con respecto al grupo control

(P=0.2258).

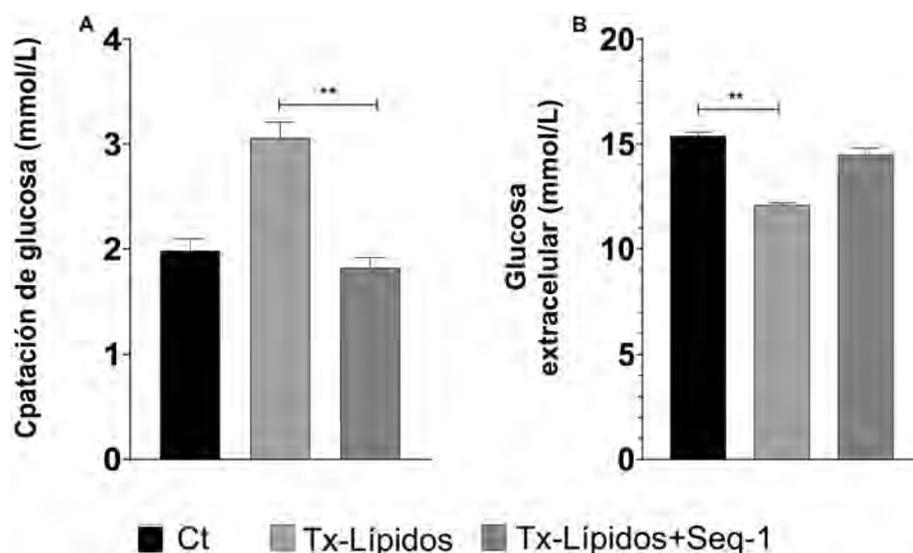


Figura 6.8: Efecto del péptido Seq-1 en los niveles de glucosa intracelular y extracelular en células HepG2. Los datos representan la media \pm E.S. * P < 0.05. Los datos se analizaron con una prueba Kruskal-Wallis.

6.2.5. El péptido Seq-1 atenúa el estrés oxidante causado por la acumulación de lípidos en células HepG2.

Para investigar el efecto del péptido sobre el estrés oxidante en las células esteatóticas, medimos los niveles de ROS intracelulares. Los resultados mostraron que, después de la estimulación con lípidos 0.6 mM en las células HepG2, los niveles de ROS aumentaron significativamente y los niveles disminuyeron después de la adición del péptido Seq-1 (Fig. 6.9). Los datos anteriores indican que la acumulación de lípidos en las células HepG2 exagera el estrés oxidante y el tratamiento con el péptido lo reduce. Las células tratadas con lípidos 0.6 mM mostraron un aumento significativo (P = < 0.0001) de 1.4 ± 14.22 veces en la generación de ROS frente al control no tratado. Cuando las células tratadas con lípidos 0.6 mM se expusieron

concomitantemente a $100\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido Seq-1, el nivel de ROS disminuyó ($P=0.0158$) 1.22 ± 0.12 veces en comparación con el grupo de células únicamente estimuladas con lípidos, lo que indica que la adición del péptido pudo revertir la alteración en estado redox inducido por tratamiento con ácidos grasos.

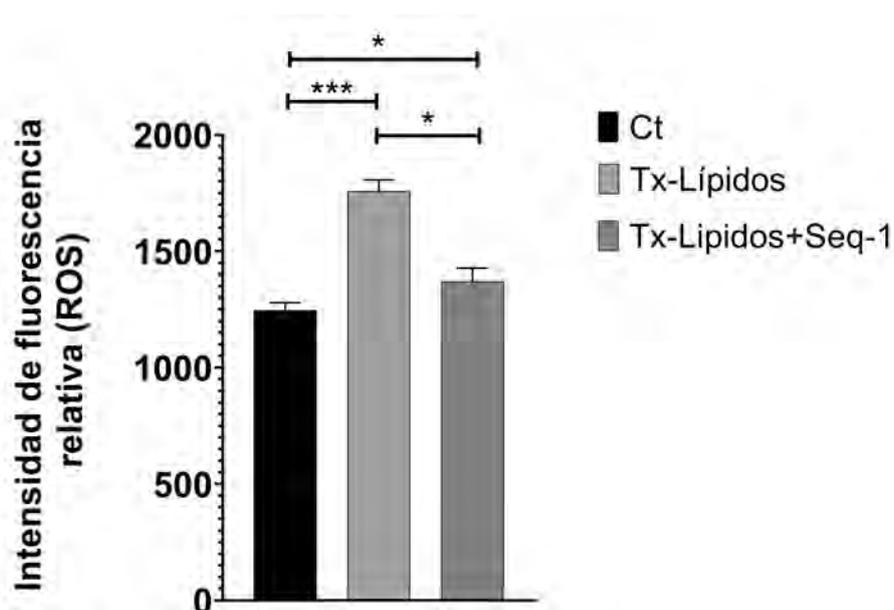


Figura 6.9: Formación de ROS intracelulares medida con H2DCFDA en células HepG2 después del tratamiento con ácidos grasos y con el péptido Seq-1. CT (células no tratadas); Tx-Lípidos (células incubadas con ácidos grasos 0.6 mM durante 24 h); Tx-Lípidos+Seq-1 (células HepG2 + tratamiento con ácidos grasos + Seq-1 a una concentración $100\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos son una representación de la media \pm E.S. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$. Los datos fueron analizados utilizando la prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn's.

6.2.6. El péptido reduce la expresión de mRNA de citocinas inflamatorias.

El proceso fibrótico está mediado por diversas citocinas y para analizar el efecto del péptido en el proceso inflamatorio, se evaluó la expresión de TGF- β , una citocina reportada como marcadora de fibrosis en el HGNA. Como se muestra en la Fig. 6.10., la acumulación de lípidos intracelulares se asoció con una regulación positiva en el mRNA de TGF- β ($P= >0.9999$), y observamos una regulación negativa de TGF- β del grupo estimulado con el péptido Seq-1 en contraste con el grupo de lípidos (1.73 ± 0.36 $p=0.0008$). Lo que sugiere que el péptido tiene un efecto sobre la respuesta inflamatoria regulada por TGF- β .

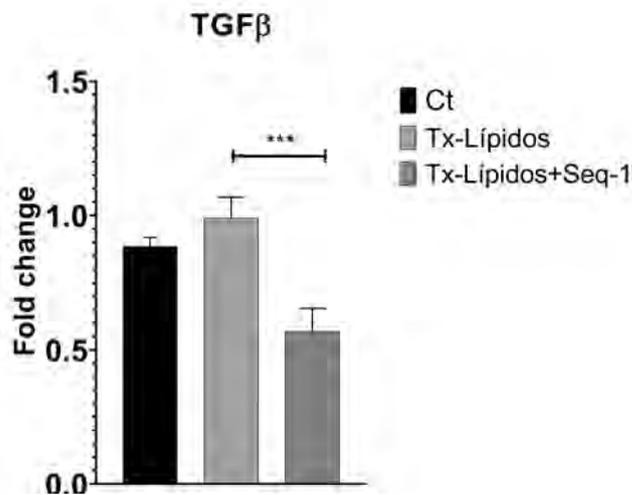


Figura 6.10: Expresión de mRNA de TGF- β en la línea celular HepG2 después de la incubación con ácidos grasos (0.6 mM) y péptido (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Análisis realizado mediante RT-qPCR cuantitativo. Los valores representan la media \pm E.S. *** $P < 0.001$. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey.

6.2.7. El péptido Seq-1 promueve la disminución de la expresión de genes pro fibrogénicos en las HepG2.

Analizamos el efecto del péptido Seq-1 en la expresión génica de las HepG2 estimuladas con ácidos grasos. La expresión de mRNA de dos marcadores establecidos de activación de HSC, colágeno tipo I (COL1A1) y ACTA2 se determinó mediante análisis cuantitativo de RT-qPCR. Las HepG2 estimuladas con ácidos grasos 0.6 mM revelaron una expresión de colágeno tipo I mayor (1.57 ± 0.17 , $P=0.340$; α Fig. 6.11.A) y ACTA2 (1.3 ± 0.563 , $P=0.981$; α Fig. 6.11.B) en comparación con los hepatocitos control . De forma interesante, la expresión de COL1A1 y ACTA2 del grupo estimulado con lípidos y con el péptido Seq-1 disminuye significativamente en contraste con el grupo únicamente estimulado con ácidos grasos (2.73 ± 0.3280 $P= 0.0010$ y 2.42 ± 0.1741 $P=0.0456$). Estos resultados confirman el efecto que tiene el péptido sobre las vías de señalización y genes directamente implicados con el proceso fibrótico.

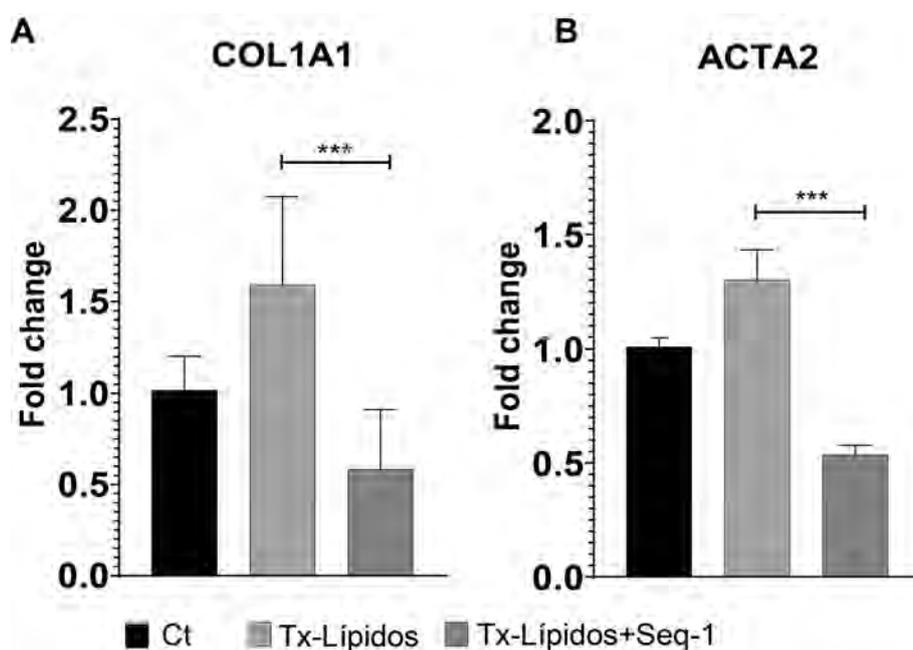


Figura 6.11: El péptido Seq-1 regula negativamente la expresión de COL1A1 y ACTA2 en células HepG2 esteatóticas. 24 h después del tratamiento se analizó la expresión de mRNA de (A) COL1A1 y (B) ACTA2 mediante análisis de RT-qPCR cuantitativo. ***P < 0.001. Los datos fueron analizados empleando la prueba ANOVA de una vía, post hoc Tukey.

6.2.8. El péptido Seq-1 regula la expresión de proteínas asociadas con la matriz extracelular.

A continuación, analizamos el efecto del tratamiento con el péptido en las HepG2 esteatóticas con respecto a la expresión de 3 proteínas relacionadas con la fibrosis: COL1A1, MMP-2 y TIMP-2. En comparación con los hepatocitos control, la estimulación con ácidos grasos indujo una expresión de COL1A1 (3.005 ± 0.03 veces; Fig. 6.12.A), MMP-2 (3.847 ± 0.0085 ; Fig. 6.12.B) y TIMP-2 (34.54 ± 0.038 veces; Fig. 6.12.C). De forma consistente con la regulación negativa en genes profibróticos con en tratamiento del péptido, en este ensayo observamos una disminución en la expresión de las tres proteínas, misma que se expresa como la intensidad

de fluorescencia. En comparación con el grupo Tx-Lípidos observamos una disminución de COL1A1 (5.017 ± 0.028 veces; Fig. 6.12.A); MMP-2 (2.731 ± 0.0085 veces; Fig. 6.12.B) y TIMP-2 (36.51 ± 0.038 veces; Fig. 6.12.C) en el grupo Tx-Lípidos+Péptido. Las diferencias significativas entre tratamientos se analizaron con una ANOVA de una vía/post-test de Tukey.

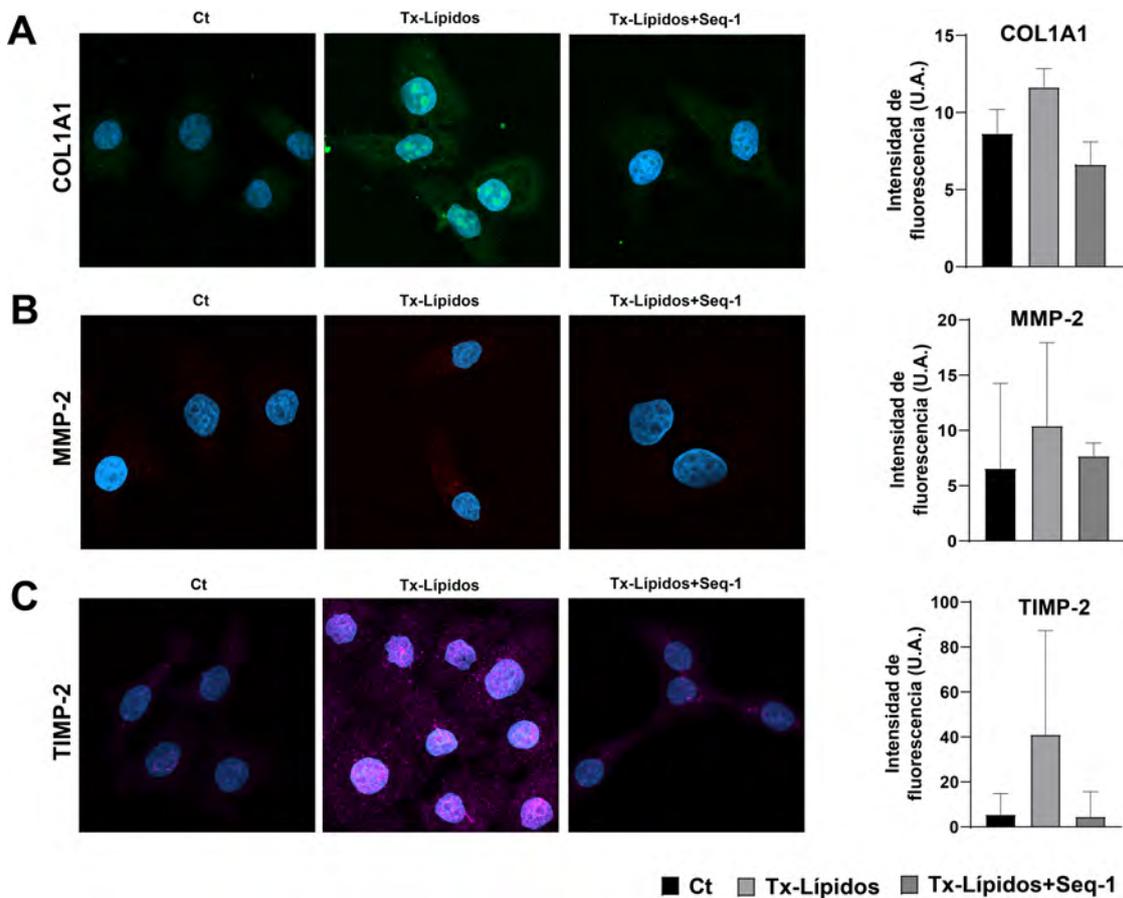


Figura 6.12: Análisis de inmunofluorescencia de COL1A1, MMP-2 y TIMP-2, se muestra una disminución de la expresión de las tres proteínas de estudio en células HepG2 esteatóticas más el péptido. Imágenes representativas (A) COL1A1 (verde); (B) MMP-2 (rojo); MMP-2 (violeta). Los valores se presentan como media \pm E.S.

6.2.9. El sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas promueve la activación de las HSC.

Se expusieron HSC humanas al sobrenadante de las HepG2 con los diferentes tratamientos durante 3 días. Las HSC expuestas al sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas muestran una regulación positiva de los genes profibróticos, misma que es estadísticamente diferente que las HSC tratadas con el sobrenadante de hepatocitos control: COL1A1 (9.54 ± 2.189 , $P = 0.0010$; Fig. 6.13. A), ACTA2 (17 ± 1.068 , $P = < 0.0001$; Fig. 6.13.B) y TGF- β (5.690 ± 0.106 , $P = 0.0009$; Fig. 6.13.C). En contraste, observamos un restablecimiento en los niveles de expresión de COL1A1, ACTA2 y TGF- β en las HSC cultivadas en el sobrenadante de las HepG2 estimuladas con ácidos grasos y con $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido comparados con las HSC cultivadas con el sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas: COL1A1 (6.240 ± 1.317 , $P = 0.0752$; Fig. 6.13A), ACTA2 (8.262 ± 0.588 , $P = 0.0003$; Fig. 6.13B) y TGF- β (3.574 ± 0.676 , $P = 0.0190$; Fig. 6.13C). Los resultados sugieren que las HepG2 secretan factores pro fibrogénicos que participan en la activación de las HSC y que el péptido tiene una participación en la regulación del proceso fibrótico al promover una disminución de la expresión de COL1A, ACTA2 y TGF- β .

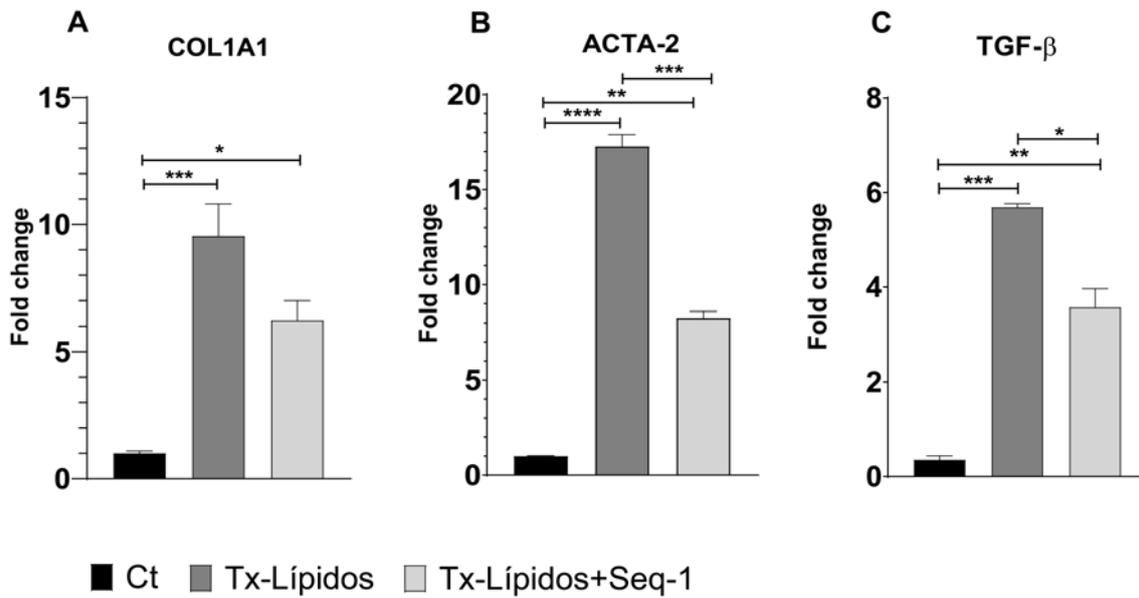


Figura 6.13: El sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas más el péptido reduce la expresión profibrogénica de células estrelladas hepáticas. Las HSC se incubaron con el sobrenadante de hepatocitos tratados con palmitato/oleato 2:1 durante 72 h más 100 μ L de Seq-1 . Posteriormente, se analizó la expresión de mRNA de (A)COL1A1, (B) ACTA2 y (C) TGF- β mediante análisis de RT-qPCR cuantitativo;* P <0.05. El análisis de significancia se realizó con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey.

Para este trabajo fue importante demostrar que los factores solubles liberados por las células HepG2 esteatóticas en lugar de los ácidos grasos residuales en el sobrenadante eran responsables de los efectos pro fibrogénicos observados en las HSC tras la estimulación con el sobrenadante de los hepatocitos tratados con ácidos grasos. Por lo tanto, medimos la concentración de ácidos grasos presentes utilizando el colorante fluorescente Rojo Nilo. Al respecto, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos tratados con ácidos grasos comparados con el control.

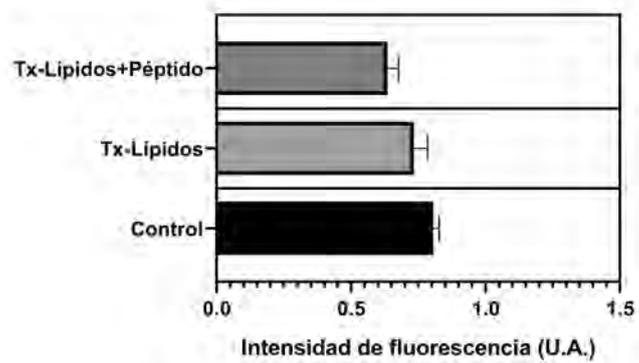


Figura 6.14: Concentración de ácidos grasos libres en el sobrenadante de los tres grupos de estudio.

Capítulo 7

Discusión

En el presente estudio se caracterizó un modelo hepático *in vitro* de esteatosis celular con un perfil de sobreacumulación de ácidos grasos, en el que se evaluaron los efectos bioquímicos, metabólicos y citotóxicos/apoptóticos, así como la expresión genética de marcadores fibróticos. Lo anterior permitió analizar el efecto hepatoprotector del péptido Seq-1 sobre las células HepG2 esteatóticas, particularmente en la regulación de genes involucrados en el proceso fibrótico.

Los ácidos palmítico y oleico son los ácidos grasos de cadena larga más abundantes en los triglicéridos hepáticos tanto en sujetos normales como en pacientes con esteatosis micro y macrovesicular [141], estos ácidos grasos suelen estar elevados en estados de resistencia a la insulina y obesidad (como principales factores de riesgo de EHGNA/EHNA). Se utilizó una mezcla de ácidos oleico y palmítico en una proporción 2:1 para inducir la acumulación de lípidos en las células hepáticas HepG2 y emular las características de la EHGNA.

La línea celular HepG2 se aisló de un carcinoma hepatocelular y exhibe características clave de los hepatocitos [142]. Debido a su procedencia tumoral, algunas de las diferencias entre la línea celular HepG2 y los hepatocitos normales, son que las células HepG2 se caracterizan por un número anormal de cromosomas, además, las proteínas involucradas en la función metabólica se expresan de manera deficiente, lo que limita la comparación directa con la patología humana *in vivo* [143][144][145][146]. Sin embargo, la línea celular HepG2 se utiliza para el estudio de fármacos *in vitro* porque conserva la mayoría de las funciones metabólicas de los hepatocitos normales [147]. En ese sentido, aunque los hepatocitos humanos primarios se consideran el modelo *in vitro* estándar debido a su alta funcionalidad en relación con el órgano humano *in vivo*, su uso conlleva inconvenientes con la disponibilidad, la variabilidad entre donantes y el corto período de tiempo durante el cual permanecen diferenciados, por este motivo empleamos células HepG2, además de su potencial de crecimiento ilimitado y fenotipo estable a lo largo del tiempo de estandarización del modelo de esteatosis, garantizando así la reproducibilidad del ensayo [148].

Este enfoque, de forma consistente con otros modelos *in vitro*, confirma la participación activa de los hepatocitos en la progresión de la EHGNA, ya que el hepatocito

tiene efectos autocrinos y paracrinos sobre células hepáticas no parenquimatosas residentes [149]. Nuestro estudio mostró que indujimos con éxito la acumulación de lípidos al cultivar con ácido oleico y palmítico a las células HepG2. Se observó una gran cantidad de gotas de lípidos y un cambio significativo en la estructura de los hepatocitos. Mostrando que las células HepG2 son una alternativa viable para la sustitución de hepatocitos humanos de cultivo primario en modelos celulares de esteatosis, como se ha propuesto en trabajos anteriores [150] [134][135]. Al evaluar la citotoxicidad de la proporción 2:1 de ácido oleico y palmítico, observamos un efecto citotóxico asociado con el aumento de la concentración de ácidos grasos en células HepG2. Estos resultados son consistentes con informes que muestran una relación entre el aumento de los ácidos grasos y el incremento en el daño hepático, utilizando modelos dietéticos de esteatosis hepática caracterizados por una acumulación similar de triglicéridos totales, pero una composición diferente de ácidos grasos [151]. De igual manera, se han mostrado hallazgos en una variedad de sistemas *in vitro* en los que hay un efecto lipotóxico inducido por ácidos grasos en diferentes tipos celulares: células endoteliales [152], células β pancreáticas [153], cardiomiocitos [154], células CHO [155], hepatocitos [156], células HepG2 [32] y células H4IIE de hepatoma de rata [157]. A pesar de que se observó que concentraciones de ácidos grasos mayores a 1 mM inducen una acumulación significativa de gotas de lípidos, para realizar los ensayos de expresión génica realizados en este estudio fue necesario garantizar la integridad del RNA por lo que se estableció la concentración 0.6 mM de ácidos grasos 2:1 para todos los experimentos, debido a que con dicha concentración observamos efectos proinflamatorios y profibrogénicos en las células sin desencadenar daño celular. La relevancia de nuestro modelo experimental radica en que reproduce algunas de las afecciones provocadas por la acumulación de lípidos característica de la EHGNA. Los pacientes con HGNA muestran una internalización de lípidos mayor a la capacidad de eliminación de los mismos, esto significa que hay un incremento en la captación hepática de ácidos grasos y lipogénesis *de novo* (síntesis de ácidos grasos), provocando que la oxidación y exportación de éstos sea insuficiente para normalizar los niveles lipídicos, promoviendo el daño celular y la progresión de la

enfermedad al inducir estrés oxidante [29].

Para evaluar el efecto del péptido Seq-1 en el modelo de células esteatóticas, realizamos un análisis de la citotoxicidad del péptido Seq-1, en el cual evaluamos un amplio rango de concentraciones y observamos que ninguna concentración fue citotóxica, los resultados fueron consistentes cuando los confirmamos mediante citometría de flujo, por lo que la concentración de péptido utilizada para este trabajo fue segura.

Encontramos un aumento en la síntesis de triglicéridos y colesterol en las células esteatóticas con respecto al control, evidenciando un aumento de la lipogénesis *de novo* a partir de los ácidos grasos libres. El tratamiento con el péptido Seq-1 promueve una disminución de la síntesis tanto de triglicéridos como de colesterol, reflejada en una disminución significativa de los mismos en las HepG2 esteatóticas. La lipogénesis *de novo* está regulada principalmente por dos factores de transcripción clave: la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP1) y la proteína de unión a elementos reguladores de carbohidratos (CHREBP). La expresión de SREBP1 aumenta en pacientes con HGNA, debido a que promueve la expresión de enzimas lipogénicas. Mientras que, CHREBP es el principal regulador del flujo glucolítico y lipogénico dependiente de carbohidratos [158] [159][50]. Por otra parte, un factor de transcripción que también está involucrado es SREBP2, que conduce a una mayor síntesis y acumulación de colesterol en los hepatocitos [160]. En ese sentido, Caballero reportó un aumento de 3 a 7 veces la expresión de SREBP2 en pacientes con HGNA comparado con sujetos sanos [161]. Al respecto, se ha descrito que las terapias peptídicas pueden interferir competitivamente con los eventos de reconocimiento proteína-proteína y proteína-DNA [162], por lo que existe la posibilidad de que el péptido Seq-1 pueda estar inhibiendo la translocación o la activación de los factores de transcripción SREBP1, SREBP2 y CHREBP, promoviendo la disminución de triglicéridos y colesterol intracelular. Por otra parte, observamos una captación de glucosa aumentada por parte de las células HepG2 esteatóticas, mientras que, cuando las células HepG2 esteatóticas fueron tratados con el péptido Seq-1 la captación de glucosa disminuyó significativamente. La membrana celular no es permeable a moléculas polares como la glucosa, por lo que es necesaria

la participación de proteínas transportadoras acopladas a la membrana. Los GLUT transportan glucosa siguiendo su gradiente electroquímico y están distribuidos diferencialmente en los tejidos. Brevemente, la glucosa se une a la proteína, la dirección de la membrana del complejo glucosa-proteína se invierte mediante un mecanismo flip-flop; el azúcar se libera y la proteína se voltea para comenzar un nuevo ciclo. Las células HepG2 expresan: GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT9 y GLUT10 [163]. En particular, en los hepatocitos, GLUT2 controla la mayor parte de la captación de glucosa y se ha informado que la expresión del gen de GLUT2 está regulada al alza en el hígado de animales obesos y diabéticos y en sujetos humanos [164][165]. Este fenómeno se relaciona con estudios *in vitro* que sugieren que los ácidos grasos aumentan la gluconeogénesis a través de la estimulación de enzimas gluconeogénicas [166]. Estos resultados indican que la esteatosis es una de las causas del aumento de la expresión del gen GLUT2 hepático, que puede estar asociado a la gluconeogénesis. Además, la energía liberada en el hígado durante la β -oxidación de los ácidos grasos se utiliza para la síntesis de glucosa. Se ha sugerido que la expresión de GLUT2 está regulada en estados de mayor producción hepática de glucosa, ya que la expresión de GLUT2 está aumentada en el hígado de animales deficientes de insulina. En ese sentido, existe la posibilidad de que el péptido Seq-1 inhiba enzimas clave en la gluconeogénesis y a su vez al haber menos glucosa o ácidos grasos se inhiba la sobreexpresión de GLUT2 internalizando menos glucosa en comparación con células esteatóticas.

La EHGNA humana se asocia con el estrés oxidante, que puede determinar la transición de la esteatosis simple a la EHNA. De hecho, se sabe que el estrés oxidante se encuentra aumentado en pacientes con EHGNA [167]. Por lo tanto, la inhibición de esta desregulación es una de las estrategias más importantes para la intervención del HGNA [168]. En ese sentido, el estrés oxidante se ve reflejado por una gran cantidad de ROS que puede estar relacionado con la disfunción mitocondrial, ya que la cadena respiratoria mitocondrial es la principal fuente subcelular de ROS [169][170][157][171][172][173]. El exceso de ROS da como resultado la producción de peróxidos de lípidos, que a su vez pueden exacerbar el estrés oxidante y el daño mi-

tocondrial. En nuestro modelo *in vitro*, el tratamiento con ácidos grasos induce un mayor contenido de ROS intracelular. Cabe destacar que la observación del aumento de la generación de ROS después de la acumulación intracelular de ácidos grasos casi se mitiga por completo al tratar las células con el péptido Seq-1 por lo que es posible que el péptido Seq-1 pueda activar un sistema antioxidante para neutralizar las ROS y otros peróxidos de lípidos. En respuesta a la producción de ROS, observamos que los niveles de AST y ALT se elevaron significativamente en el sobrenadante de las células esteatóticas. AST y ALT son enzimas que participan en la gluconeogénesis al catalizar la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido cetoglutarico para producir ácido oxaloacético y ácido pirúvico respectivamente. La lesión hepatocelular, en este caso producida por la sobreacumulación lipídica es el desencadenante de la liberación de estas enzimas en la circulación. Los niveles de AST y ALT se correlacionan con la obesidad con un rango de referencia más alto en individuos con un índice de masa corporal elevado [174]. Después del tratamiento con el péptido Seq-1, se redujo el daño hepático causado por la esteatosis, reflejado en la disminución de la proporción de AST y ALT en el sobrenadante.

La fibrosis hepática se caracteriza por el depósito excesivo de matriz extracelular, se desarrolla en un entorno inflamatorio y diversas vías de señalización se ven alteradas. Uno de los procesos fundamentales para el desarrollo de fibrosis es la activación de las HSC, que se diferencian a células similares a miofibroblastos secretando cantidades importantes de componentes de matriz extracelular. Sin embargo, no es el único proceso involucrado en la fibrogenesis, la transición epitelio-mesenquima (EMT, por sus siglas en inglés) es un proceso que conduce a la diferenciación de las células epiteliales como las HepG2 en células con un fenotipo similar al mesenquimatoso, en el cual las células muestran un reordenamiento de la arquitectura del citoesqueleto, derivado de la regulación a la baja de las citoqueratinas junto con la regulación al alza de las proteínas del citoesqueleto que pertenecen al linaje mesenquimatoso, incluida la vimentina, la proteína específica de fibroblastos-1, y la α -actina de músculo liso [175]. Estas remodelaciones del citoesqueleto y de la superficie celular conducen a la pérdida de la polaridad apical-basal, típica del fenotipo epitelial, lo que con-

duce al aumento de la motilidad que muestran las células mesenquimales [175]. La inflamación contribuye significativamente al proceso fibrótico, promueve daño en la membrana basal ocasionando que las células se separen de la capa epitelial y adquieran un fenotipo fibroblástico, produciendo componentes de la matriz extracelular, como colágeno fibrilar, fibronectina, elastina y tenascina, junto con una variedad de metaloproteasas de matriz, particularmente MMP-2 y MMP-9 [176][177][178][179]. Al respecto, la MMP-2 es considerada una MMP profibrogénica, ya que regula la degradación de la lámina basal permitiendo su sustitución por colágenos fibrilares durante la fibrogénesis [63]. Además, en modelos fibróticos así como en enfermedades humanas, la inducción de expresión y/o actividad de metaloproteinasas se acompaña de una expresión elevada de sus inhibidores, especialmente TIMP-1 y TIMP-2 [180][87]. De forma consistente con lo anterior, en nuestro trabajo, los ácidos grasos inducen una mayor expresión de ACTA2 y COL1A1 en HepG2 esteatóticas. Además de la regulación positiva observada en los transcritos de ACTA2 y COL1A1, observamos una síntesis elevada de las proteínas COL1A1, MMP-2 y TIMP-2 en las HepG2 esteatóticas, sugiriendo que nuestro modelo de esteatosis *in vitro* induce la transición epitelio-mesenquima en células HepG2 esteatóticas contribuyendo significativamente al proceso fibrótico.

Es destacable que, aún con el estímulo de lípidos, las células HepG2 tratadas con el péptido Seq-1, presentaron niveles de expresión de COL1A1 y ACTA2 significativamente menores en contraste con las células esteatóticas. Lo mismo ocurrió con las proteínas COL1A1, MMP-2 y TIMP-2. Podemos sugerir que observamos este efecto debido a la disminución de daño hepático promovido por Seq-1 que se traduce en una menor producción de lípidos, ROS y enzimas reportadas como marcadoras de daño, pero más allá de eso, basados en los hallazgos histológicos descritos por nuestro grupo en modelos animales, pensamos que el péptido Seq-1 está regulando directamente genes asociados con el proceso fibrótico, incluidos aquellos que modulan la transición epitelio-mesénquima. Al respecto, las moléculas proinflamatorias que son liberadas en respuesta al daño, en este caso inducido por los ácidos grasos, impulsan la transición epitelio-mesénquima. En particular, citocinas inflamatorias como

TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 activan factores de transcripción como Smads, NF- κ B, STAT3, Snail, Twist y Zeb que promueven la EMT [181]. Especialmente, la expresión de TGF- β está asociada con alteraciones morfológicas como la EMT en los hepatocitos [182]. De hecho, el aumento de los niveles de TGF- β se relaciona con la EMT en las células epiteliales biliares antes de la progresión de la fibrosis hepática [177]. Además, entre los numerosos mediadores profibrogénicos, TGF- β se considera uno de los más importantes en la fibrosis hepática. La sobreexpresión de TGF- β en el hígado induce fibrosis [183], mientras que la interrupción de su síntesis o vía de señalización reduce notablemente la fibrosis en modelos experimentales [184]. En las HSC, el TGF- β promueve el proceso de activación, estimulando la síntesis de proteínas de la matriz extracelular e inhibiendo su degradación [185]. Nuestro estudio demuestra que la exposición de las células HepG2 a los ácidos grasos inducen un proceso inflamatorio, reflejado en el aumento de la expresión de RNAm de TGF- β . De manera interesante, la expresión de TGF- β se reduce significativamente en respuesta al tratamiento con Seq-1, regulando a su vez la EMT y la activación de las HSC.

La activación de las HSC, que se refiere a la conversión de HSC de células inactivas a altamente proliferativas y fibrogénicas, es un evento clave de la fibrogenesis hepática [63][186]. El proceso de activación se reconoce clásicamente por la modulación del filamento del citoesqueleto, principalmente la expresión aumentada de los filamentos α -sma contráctiles [187]. En nuestro estudio, encontramos una expresión significativamente mayor de ACTA2 (gen que codifica para la proteína α -sma) en HSC humanas cultivadas con el sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas en comparación con células control, de manera interesante, observamos que, las HSC cultivadas con el sobrenadante de HepG2 esteatóticas pero tratadas con el péptido Seq-1 presentan niveles de expresión significativamente menores en contraste con las HSC cultivadas con el sobrenadante de HepG2 esteatóticas. Otra característica clave de las HSC activadas es la producción de grandes cantidades de colágeno tipo I, la proteína de matriz extracelular más abundante en hígados cirróticos [63][186]. Es de destacar que los niveles de transcripción de colágeno tipo I mostraron un aumen-

to significativo en HSC tratadas con el sobrenadante de hepatocitos esteatósicos. En contraste, la estimulación con el sobrenadante de células HepG2 más el péptido Seq-1 promovió una disminución significativa de COL1A1 y TGF- β en HSC. Estos datos indican claramente que la acumulación de lípidos en los hepatocitos induce la secreción de factores que aceleran el proceso de activación de las HSC y que el péptido Seq-1 regula la expresión y secreción de estos factores. Finalmente, realizamos un análisis de los niveles de ácidos grasos presentes en el sobrenadante de las células HepG2 esteatóticas, para confirmar que el oleato/palmitato residual en el sobrenadante no promueve los efectos profibrogénicos observados en las HSC y no observamos diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, validando que los efectos observados en las HSC son debidos a factores solubles liberados por las HepG2 al medio en respuesta al estímulo con ácidos grasos.

Capítulo 8

Conclusión

En conjunto, nuestros resultados confirman que además de la inhibición de la actividad de CETP llevada a cabo por los anticuerpos neutralizantes generados a partir del tratamiento intranasal con HB-ATV-8, el péptido Seq-1 reduce la expresión de genes y proteínas directamente involucrados en el proceso fibrótico, en células HepG2 y en HSC, en respuesta a una modulación de los niveles de lípidos intracelulares, atenuando el estrés oxidante y en consecuencia reduciendo el daño hepático. Con fundamento en nuestros resultados, podemos concluir que el péptido Seq-1 como principio activo de la vacuna HB-ATV-8, ejerce un efecto hepatoprotector contra procesos fibróticos (Fig. 8.1).

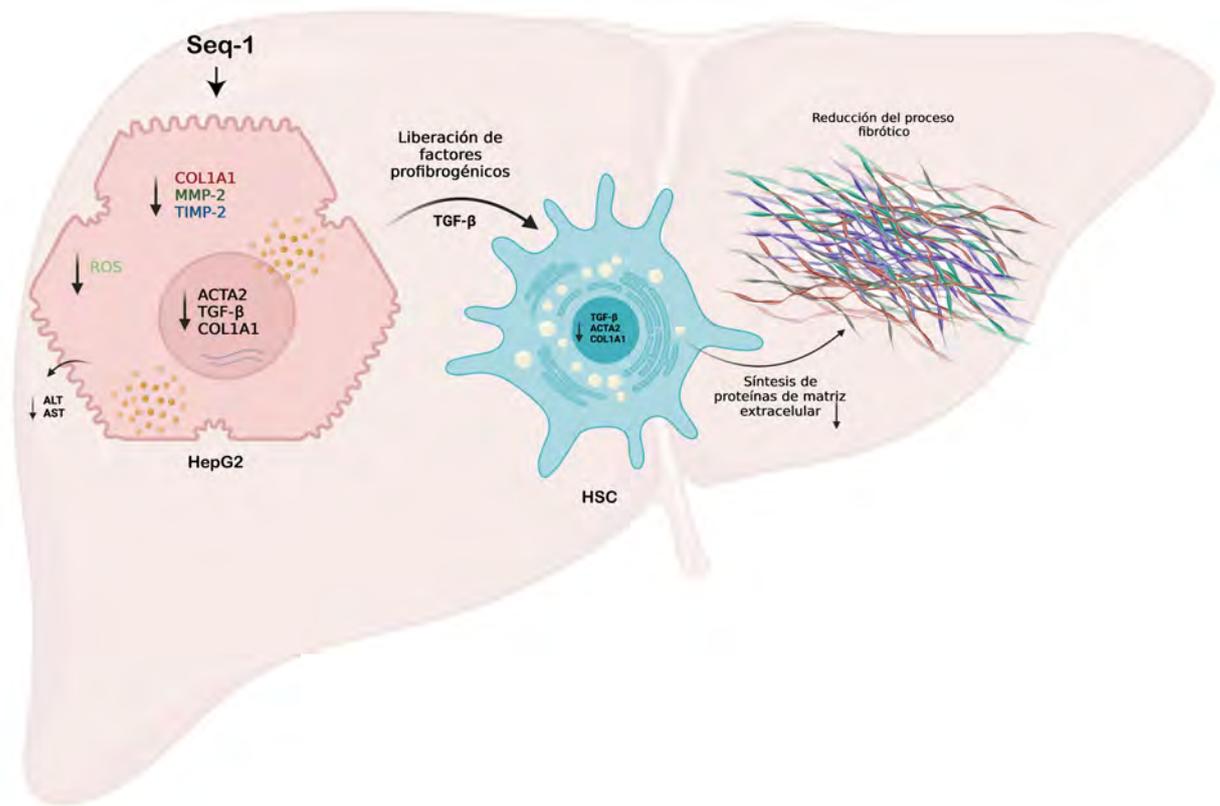


Figura 8.1: El péptido Seq-1 como componente activo de la vacuna intranasal HB-ATV-8 regula negativamente la expresión de genes y proteínas asociadas con la remodelación de componentes de matriz extracelular reduciendo el proceso fibrótico.

Capítulo 9

Perspectivas

Nuestra comprensión sobre la forma en la que el péptido Seq-1 está involucrado en la prevención del desarrollo y la progresión de fibrosis en el hígado graso no alcohólico ha sido evaluada con resultados positivos mediante el análisis de la expresión de marcadores estándar de fibrosis. Sin embargo, no conocemos el panorama global sobre los genes y las vías de señalización que podrían estar siendo regulados por el péptido Seq-1. Por lo que para abordar nuestras hipótesis sobre el mecanismo molecular por medio del cual el péptido Seq-1 regula la expresión de genes involucrados en el proceso fibrótico, es necesario evaluar el efecto del péptido Seq-1 en la expresión de genes asociados con el proceso fibrótico mediante el uso de tecnologías de alto rendimiento, que nos permitan realizar un análisis de la regulación génica.

Referencias

- [1] García-González, Victor, Blanca Delgado-Coello, Armando Pérez-Torres y Jaime Mas-Oliva: *Reality of a Vaccine in the Prevention and Treatment of Atherosclerosis*. Archives of Medical Research, 46(5):427–437, jul 2015, ISSN 0188-4409.
- [2] Perumpail, Brandon J., Muhammad Ali Khan, Eric R. Yoo, George Cholankeril, Donghee Kim y Aijaz Ahmed: *Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease*. 23(47):8263–8276, dec 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307986/><https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i47/8263.htm>.
- [3] Chalasani, Naga, Zobair Younossi, Joel E. Lavine, Michael Charlton, Kenneth Cusi, Mary Rinella, Stephen A. Harrison, Elizabeth M. Brunt y Arun J. Sanyal: *The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases*. Hepatology (Baltimore, Md.), 67(1):328–357, jan 2018, ISSN 1527-3350. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28714183/>.
- [4] Leoni, Simona, Francesco Tovoli, Lucia Napoli, Ilaria Serio, Silvia Ferri y Luigi Bolondi: *Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis*. World journal of gastroenterology, 24(30):3361–3373, aug 2018, ISSN 2219-2840. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30122876/>.

- [5] Bian, Zhaolian y Xiong Ma: *Liver Fibrogenesis in Non-Alcoholic Steatohepatitis*. *Frontiers in Physiology*, 3, 2012, ISSN 1664042X. [/pmc/articles/PMC3429026//pmc/articles/PMC3429026/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3429026/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3429026/).
- [6] Estes, Chris, Quentin M. Anstee, Maria Teresa Arias-Loste, Heike Bantel, Stefano Bellentani, Joan Caballeria, Massimo Colombo, Antonio Craxi, Javier Crespo, Christopher P. Day, Yuichiro Eguchi, Andreas Geier, Loreta A. Kondili, Daniela C. Kroy, Jeffrey V. Lazarus, Rohit Loomba, Michael P. Manns, Giulio Marchesini, Atsushi Nakajima, Francesco Negro, Salvatore Petta, Vlad Ratziu, Manuel Romero-Gomez, Arun Sanyal, Jörn M. Schattenberg, Frank Tacke, Junko Tanaka, Christian Trautwein, Lai Wei, Stefan Zeuzem y Homie Razavi: *Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030*. *Journal of hepatology*, 69(4):896–904, oct 2018, ISSN 1600-0641. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29886156/>.
- [7] Kumar, Ramesh, Rajeev Nayan Priyadarshi y Utpal Anand: *Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Growing Burden, Adverse Outcomes and Associations*. *Journal of clinical and translational hepatology*, 8(1):76–86, 2020, ISSN 2225-0719. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32274348/>.
- [8] Tilg, Herbert, Alexander R. Moschen y Michael Roden: *NAFLD and diabetes mellitus*. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 14(1):32–42, jan 2017, ISSN 1759-5053. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27729660/>.
- [9] Adams, Leon A., Quentin M. Anstee, Herbert Tilg y Giovanni Targher: *Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases*. *Gut*, 66(6):1138–1153, jun 2017, ISSN 1468-3288. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28314735/>.

- [10] Byrne, Christopher D. y Giovanni Targher: *NAFLD: a multisystem disease*. Journal of hepatology, 62(1 Suppl):S47–S64, 2015, ISSN 1600-0641. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25920090/>.
- [11] Francque, Sven M., Denise van der Graaff y Wilhelmus J. Kwanten: *Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications*. Journal of hepatology, 65(2):425–443, aug 2016, ISSN 1600-0641. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27091791/>.
- [12] Byrne, Christopher D. y Giovanni Targher: *NAFLD as a driver of chronic kidney disease*. Journal of Hepatology, 72(4):785–801, apr 2020, ISSN 16000641. <http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168827820300301/fulltext><http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168827820300301/abstract>[https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(20\)30030-1/abstract](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(20)30030-1/abstract).
- [13] Allen, Alina M., Stephen B. Hicks, Kristin C. Mara, Joseph J. Larson y Terry M. Therneau: *The risk of incident extrahepatic cancers is higher in non-alcoholic fatty liver disease than obesity - A longitudinal cohort study*. Journal of hepatology, 71(6):1229–1236, dec 2019, ISSN 1600-0641. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31470068/>.
- [14] Loomba, Rohit, Joseph K. Lim, Heather Patton y Hashem B. El-Serag: *AGA Clinical Practice Update on Screening and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Expert Review*. Gastroenterology, 158(6):1822–1830, may 2020, ISSN 1528-0012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32006545/>.
- [15] Di Cesare, Mariachiara y Bentham: *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants*. Lancet (London, England), 387(10026):1377–1396, apr 2016, ISSN 1474-547X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27115820/>.

- [16] Polyzos, Stergios A., Jannis Kountouras y Christos S. Mantzoros: *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics*. *Metabolism: clinical and experimental*, 92:82–97, mar 2019, ISSN 1532-8600. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30502373/>.
- [17] Younossi, Zobair M., Pegah Golabi, Leyla de Avila, James Minhui Paik, Manirath Srishord, Natsu Fukui, Ying Qiu, Leah Burns, Arian Afendy y Fatema Nader: *The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis*. *Journal of Hepatology*, 71(4):793–801, oct 2019, ISSN 0168-8278.
- [18] Fleischman, Michael Wayne, Matthew Budoff, Ifran Zeb, Dong Li y Temitope Foster: *NAFLD prevalence differs among hispanic subgroups: The multi-ethnic study of atherosclerosis*. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(17):4987, may 2014, ISSN 22192840. [/pmc/articles/PMC4009531/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009531/)[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009531/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009531/?report=abstract).
- [19] Kallwitz, Eric R., Martha L. Daviglius, Matthew A. Allison, Kristen T. Emory, Lihui Zhao, Mark H. Kuniholm, Jinsong Chen, Natalia Gouskova, Amber Pirzada, Gregory A. Talavera, Marston E. Youngblood y Scott J. Cotler: *Prevalence of suspected nonalcoholic fatty liver disease in Hispanic/Latino individuals differs by heritage*. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 13(3):569–576, mar 2015, ISSN 1542-7714. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25218670/>.
- [20] Rehm, Jennifer L., Ellen L. Connor, Peter M. Wolfgram, Jens C. Eickhoff, Scott B. Reeder y David B. Allen: *Predicting hepatic steatosis in a racially and ethnically diverse cohort of adolescent girls*. *The Journal of pediatrics*, 165(2), 2014, ISSN 1097-6833. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24857521/>.

- [21] Mozaffarian, Dariush, Peter W.F. Wilson y William B. Kannel: *Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease*. *Circulation*, 117(23):3031–3038, jun 2008, ISSN 1524-4539. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18541753/>.
- [22] Avolio, Ennio, Paola Gualtieri, Lorenzo Romano, Claudio Pecorella, Simona Ferraro, Giuseppe Palma, Laura Di Renzo y Antonino De Lorenzo: *Obesity and body composition in man and woman: associated diseases and the new role of gut microbiota*. *Current medicinal chemistry*, 27(2):216–229, 2020.
- [23] Alberti, K. George M.M., Paul Zimmet y Jonathan Shaw: *The metabolic syndrome—a new worldwide definition*. *The Lancet*, 366(9491):1059–1062, sep 2005, ISSN 0140-6736. <http://www.thelancet.com/article/S0140673605674028/fulltext><http://www.thelancet.com/article/S0140673605674028/abstract>[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(05\)67402-8/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(05)67402-8/abstract).
- [24] Grundy, Scott M., James I. Cleeman, Stephen R. Daniels, Karen A. Donato, Robert H. Eckel, Barry A. Franklin, David J. Gordon, Ronald M. Krauss, Peter J. Savage, Sidney C. Smith, John A. Spertus y Fernando Costa: *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. *Circulation*, 112(17):2735–2752, oct 2005, ISSN 1524-4539. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16157765/>.
- [25] Eckel, Robert H., KGMM G.M.M. Alberti, Scott M. Grundy y Paul Z. Zimmet: *The metabolic syndrome*. *The Lancet*, 375(9710):181–183, jan 2010, ISSN 0140-6736. <http://www.thelancet.com/article/S0140673609617943/fulltext><http://www.thelancet.com/article/S0140673609617943/abstract>[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(09\)61794-3/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(09)61794-3/abstract).

- [26] Shulman, Gerald I.: *Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease*. New England Journal of Medicine, 371(12):1131–1141, sep 2014, ISSN 0028-4793. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra1011035>.
- [27] Stanton, Michaela C., Shu Cheng Chen, James V. Jackson, Alberto Rojas-Triana, David Kinsley, Long Cui, Jay S. Fine, Scott Greenfeder, Loretta A. Bober y Chung Her Jenh: *Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice*. Journal of Inflammation, 8(1):1–14, mar 2011, ISSN 14769255. <https://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-9255-8-8>.
- [28] Virtue, Sam y Antonio Vidal-Puig: *Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—an allostatic perspective*. Biochimica et biophysica acta, 1801(3):338–349, mar 2010, ISSN 0006-3002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056169/>.
- [29] Ipsen, David Højland, Jens Lykkesfeldt y Pernille Tveden-Nyborg: *Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease*. 75(18), sep 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29936596/>
/pmc/articles/PMC6105174//pmc/articles/PMC6105174/?report=abstract<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6105174/>.
- [30] Donnelly, Kerry L., Coleman I. Smith, Sarah J. Schwarzenberg, Jose Jessurun, Mark D. Boldt y Elizabeth J. Parks: *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. The Journal of clinical investigation, 115(5):1343–1351, 2005, ISSN 0021-9738. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15864352/>.
- [31] Malhi, Harmeet y Gregory J. Gores: *Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease*. Seminars in liver disease, 28(4):360–369, nov 2008, ISSN 0272-8087. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18956292/>.

- [32] Malhi, Harmeet, Steven F. Bronk, Nathan W. Werneburg y Gregory J. Gores: *Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 281(17):12093–12101, apr 2006, ISSN 00219258.
- [33] Musso, Giovanni, Maurizio Cassader, Elena Paschetta y Roberto Gambino: *Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis*. Gastroenterology, 155(2):282–302.e8, aug 2018, ISSN 1528-0012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29906416/>.
- [34] Stojšavljević, Sanja, Marija Gomerčić Palčić, Lucija Virović Jukić, Lea Smirčić Duvnjak y Marko Duvnjak: *Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. World journal of gastroenterology, 20(48):18070–18091, dec 2014, ISSN 2219-2840. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25561778/>.
- [35] DA, Pociask, Sime PJ y Brody AR: *Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGF-beta1*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 84(8), 2004, ISSN 0023-6837. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15122306/>.
- [36] Wang, Lin, Suzanne Clutter, Jonathan Benincosa, James Fortney y Laura F. Gibson: *Activation of transforming growth factor-beta1/p38/Smad3 signaling in stromal cells requires reactive oxygen species-mediated MMP-2 activity during bone marrow damage*. Stem cells (Dayton, Ohio), 23(8):1122–1134, sep 2005, ISSN 1066-5099. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16002781/>.
- [37] Jobling, Michael F., Joni D. Mott, Monica T. Finnegan, Vladimir Jurukovski, Anna C. Erickson, Peter J. Walian, Scott E. Taylor, Steven Ledbetter, Catherine M. Lawrence, Daniel B. Rifkin y Mary Helen Barcellos-Hoff: *Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species*. Radiation research, 166(6):839–848, dec 2006, ISSN 0033-7587. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17149983/>.

- [38] Foo, Ning Ping, Shu Huei Lin, Yu Hsuan Lee, Ming Jiuan Wu y Ying Jan Wang: *α -Lipoic acid inhibits liver fibrosis through the attenuation of ROS-triggered signaling in hepatic stellate cells activated by PDGF and TGF- β* . Toxicology, 282(1-2):39–46, mar 2011, ISSN 1879-3185. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251946/>.
- [39] Abhilash, P. A., R. Harikrishnan y M. Indira: *Ascorbic acid supplementation down-regulates the alcohol induced oxidative stress, hepatic stellate cell activation, cytotoxicity and mRNA levels of selected fibrotic genes in guinea pigs*. Free radical research, 46(2):204–213, feb 2012, ISSN 1029-2470. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22149461/>.
- [40] Saponaro, Chiara, Melania Gaggini, Fabrizia Carli y Amalia Gastaldelli: *The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis*. Nutrients, 7(11):9453–9474, nov 2015, ISSN 2072-6643. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26580649/>.
- [41] Crosas-Molist, Eva y Isabel Fabregat: *Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis*. Redox Biology, 6:106–111, 2015.
- [42] Török, Natalie J.: *Dysregulation of redox pathways in liver fibrosis*. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 311(4):G667, 2016, ISSN 15221547. [/pmc/articles/PMC5142204/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5142204/)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5142204/?report=abstract>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5142204/>.
- [43] Röder, Pia V., Bingbing Wu, Yixian Liu y Weiping Han: *Pancreatic regulation of glucose homeostasis*. Experimental & Molecular Medicine 2016 48:3, 48(3):e219–e219, mar 2016, ISSN 2092-6413. <https://www.nature.com/articles/emm20166>.
- [44] Petta, Salvatore, Amalia Gastaldelli, Eleni Rebelos, Elisabetta Bugianesi, Piergiorgio Messa, Luca Miele, Gianluca Svegliati-Baroni, Luca Valenti y Ferruccio Bonino: *Pathophysiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease*.

- 17(12):2082, dec 2016, ISSN 1422-0067. <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2082><https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27973438/>.
- [45] Huang, Xingjun, Guihua Liu, Jiao Guo y Zheng Quan Su: *The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes*. International Journal of Biological Sciences, 14(11):1483, aug 2018, ISSN 14492288. [/pmc/articles/PMC6158718/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158718/)[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158718/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158718/?report=abstract).
- [46] Boucher, Jérémie, André Kleinridders y C. Ronald Kahn: *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 6(1), jan 2014, ISSN 1943-0264. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384568/>.
- [47] Gastaldelli, Amalia, Kenneth Cusi, Maura Pettiti, Jean Hardies, Yoshinori Miyazaki, Rachele Berria, Emma Buzzigoli, Anna Maria Sironi, Eugenio Cersosimo, Ele Ferrannini y Ralph A. DeFronzo: *Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects*. Gastroenterology, 133(2):496–506, 2007, ISSN 0016-5085. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17681171/>.
- [48] E, Bugianesi, Moscatiello S, Ciaravella MF y Marchesini G: *Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. Current pharmaceutical design, 16(17):16–30, 2010, ISSN 1873-4286. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20370677/>.
- [49] Tilg, Herbert y Alexander R. Moschen: *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology (Baltimore, Md.), 52(5):1836–1846, nov 2010, ISSN 1527-3350. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21038418/>.
- [50] Sanders, Francis W.B. y Julian L. Griffin: *De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose*. Biological

- reviews of the Cambridge Philosophical Society, 91(2):452–468, may 2016, ISSN 1469-185X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25740151/>.
- [51] Schreuder, Tim C.H.A., Bart J. Verwer, Carin M.J. van Nieuwkerk y Chris J.J. Mulder: *Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment*. World journal of gastroenterology, 14(16):2474–2486, apr 2008, ISSN 2219-2840. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18442193/>.
- [52] Neuschwander-Tetri, Brent A.: *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. Hepatology, 52(2):774–788, aug 2010, ISSN 1527-3350. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.23719><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.23719><https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.23719>.
- [53] Ferramosca, Alessandra y Vincenzo Zara: *Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids*. World journal of gastroenterology, 20(7):1746–1755, feb 2014, ISSN 2219-2840. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24587652/>.
- [54] Peverill, William, Lawrie W. Powell y Richard Skoien: *Evolving Concepts in the Pathogenesis of NASH: Beyond Steatosis and Inflammation*. International Journal of Molecular Sciences, 15(5):8591, may 2014, ISSN 14220067. </pmc/articles/PMC4057750></pmc/articles/PMC4057750/?report=abstract><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4057750/>.
- [55] Ioannou, George N.: *The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 27(2):84–95, feb 2016, ISSN 1879-3061. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26703097/>.
- [56] Janoudi, Abed, Fadi E. Shamoun, Jagadeesh K. Kalavakunta y George S. Abela: *Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque*. European heart journal, 37(25):1959–1967, jul 2016, ISSN 1522-9645. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26705388/>.

- [57] Puri, Puneet, Rebecca A. Baillie, Michelle M. Wiest, Faridoddin Mirshahi, Jayanta Choudhury, Onpan Cheung, Carol Sargeant, Melissa J. Contos y Arun J. Sanyal: *A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 46(4):1081–1090, oct 2007, ISSN 0270-9139. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17654743/>.
- [58] Bouwens, L., M. Baekeland y E. Wisse: *Cytokinetic analysis of the expanding Kupffer-cell population in rat liver*. *Cell and tissue kinetics*, 19(2):217–226, 1986, ISSN 0008-8730. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3698079/>.
- [59] Koyama, Yukinori y David A. Brenner: *Liver inflammation and fibrosis*. *The Journal of clinical investigation*, 127(1):55–64, jan 2017, ISSN 1558-8238. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28045404/>.
- [60] Xu, Xin, Liwei Zheng, Quan Yuan, Gehua Zhen, Janet L Crane, Xuedong Zhou y Xu Cao: *Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis*. *Bone research*, 6(1):1–31, 2018.
- [61] Wang, Zheng, Jia Peng Xu, Yong Chao Zheng, Wei Chen, Yong Wei Sun, Zhi Yong Wu y Meng Luo: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits hepatic fibrosis in rats*. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, 10(1):64–71, feb 2011, ISSN 1499-3872. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21269937/>.
- [62] Tomasek, James J., Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christine Chaponnier y Robert A. Brown: *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(5):349–363, 2002, ISSN 1471-0072. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11988769/>.
- [63] Friedman, Scott L.: *Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications*. 1(2):98–105, dec 2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16265071/>.
- [64] Brenner, David A.: *Molecular Pathogenesis of Liver Fibrosis*. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 120:361,

- 2009, ISSN 00657778. [/pmc/articles/PMC2744540//pmc/articles/PMC2744540/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744540/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744540/).
- [65] Pardo, Annie y Moisés Selman: *Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling*. Proceedings of the American Thoracic Society, 3(4):383–388, jun 2006, ISSN 1546-3222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16738205/>.
- [66] Wynn, T. A.: *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. The Journal of pathology, 214(2):199, jan 2008, ISSN 00223417. [/pmc/articles/PMC2693329//pmc/articles/PMC2693329/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2693329/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2693329/).
- [67] Moreira, Roger Klein: *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Archives of pathology & laboratory medicine, 131(11):1728–1734, nov 2007, ISSN 1543-2165. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17979495/>.
- [68] Khomich, Olga, Alexander V. Ivanov y Birke Bartosch: *Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis*. Cells, 9(1), dec 2020, ISSN 20734409. [/pmc/articles/PMC7016711//pmc/articles/PMC7016711/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016711/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016711/).
- [69] Friedman, Scott L.: *Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver*. Physiological reviews, 88(1):125–172, jan 2008, ISSN 0031-9333. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18195085/>.
- [70] Wang, Bin Bin, Jun Yao Cheng, Hong Hao Gao, Yang Zhang, Zhi Nan Chen y Huijie Bian: *Hepatic stellate cells in inflammation-fibrosis-carcinoma axis*. Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007), 293(9):1492–1496, 2010, ISSN 1932-8494. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20652939/>.
- [71] Kostallari, Enis, Petra Hirsova, Alena Prasnicka, Vikas K. Verma, Usman Yaqoob, Nicha Wongjarupong, Lewis R. Roberts y Vijay H. Shah: *Hepatic stellate cell-derived platelet-derived growth factor receptor-alpha-enriched*

- extracellular vesicles promote liver fibrosis in mice through SHP2*. Hepatology (Baltimore, Md.), 68(1):333–348, jul 2018, ISSN 1527-3350. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29360139/>.
- [72] Puche, Juan E., Yedidya Saiman y Scott L. Friedman: *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Comprehensive Physiology, 3(4):1473–1492, 2013, ISSN 2040-4603. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24265236/>.
- [73] Tsuchida, Takuma y Scott L. Friedman: *Mechanisms of hepatic stellate cell activation*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2017 14:7, 14(7):397–411, may 2017, ISSN 1759-5053. <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.38>.
- [74] Kostallari, Enis y Vijay H. Shah: *Pericytes in the liver*. Advances in experimental medicine and biology, 1122:153, 2019, ISSN 22148019. [/pmc/articles/PMC7137998//pmc/articles/PMC7137998/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7137998/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/).
- [75] Dewidar, Bedair, Christoph Meyer, Steven Dooley y Nadja Meindl-Beinker: *TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019*. Cells, 8(11), nov 2019, ISSN 20734409. [/pmc/articles/PMC6912224//pmc/articles/PMC6912224/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6912224/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811111/).
- [76] Gupta, Gaurav, Forough Khadem y Jude E. Uzonna: *Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity*. Cytokine, 124:154542, dec 2019, ISSN 1043-4666.
- [77] Kostallari, Enis y Vijay H. Shah: *Angiocrine signaling in the hepatic sinusoids in health and disease*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 311(2):G246–G251, aug 2016, ISSN 1522-1547. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27288423/>.
- [78] Dou, Changwei, Zhikui Liu, Kangsheng Tu, Hongbin Zhang, Chen Chen, Usman Yaqoob, Yuanguo Wang, Jialing Wen, Jan van Deursen, Delphine Si-

- card, Daniel Tschumperlin, Hongzhi Zou, Wei Chien Huang, Raul Urrutia, Vijay H. Shah y Ningling Kang: *P300 Acetyltransferase Mediates Stiffness-Induced Activation of Hepatic Stellate Cells Into Tumor-Promoting Myofibroblasts*. *Gastroenterology*, 154(8):2209–2221.e14, jun 2018, ISSN 1528-0012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29454793/>.
- [79] Bilzer, Manfred, Frigga Roggel y Alexander L. Gerbes: *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 26(10):1175–1186, dec 2006, ISSN 1478-3223. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17105582/>.
- [80] Canbay, Ali, Hajime Higuchi, Steven F. Bronk, Makiko Tanai, Tom J. Sebo y Gregory J. Gores: *Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis*. *Gastroenterology*, 123(4):1323–1330, oct 2002, ISSN 0016-5085. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12360492/>.
- [81] Canbay, Ali, Pavel Taimr, Natalie Torok, Hajime Higuchi, Scott Friedman y Gregory J. Gores: *Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 83(5):655–663, may 2003, ISSN 0023-6837. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12746475/>.
- [82] Jiang, Joy X., Senthil Venugopal, Nobuko Serizawa, Xiangling Chen, Fiona Scott, Yong Li, Roger Adamson, Sridevi Devaraj, Vijay Shah, M. Eric Gershwin, Scott L. Friedman y Natalie J. Török: *Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 plays a key role in stellate cell activation and liver fibrogenesis in vivo*. *Gastroenterology*, 139(4), 2010, ISSN 1528-0012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20685364/>.
- [83] *Noncirrhotic Nonalcoholic Steatohepatitis With Liver Fibrosis: Developing Drugs for Treatment | FDA*. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/>

noncirrhotic-nonalcoholic-steatohepatitis-liver-fibrosis-developing-drugs-trea
visitado el 2022-05-06.

- [84] Snyder, Heather S., Sami A. Sakaan, Katherine L. March, Osama Siddique, Rosann Cholankeril, Carolyn D. Cummings, Chiran Gadiparthi, Sanjaya K. Satapathy, Aijaz Ahmed y George Cholankeril: *Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Anti-diabetic Pharmacologic Therapies*. Journal of clinical and translational hepatology, 6(2):168–174, 2018, ISSN 2225-0719. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29951362/>.
- [85] Shimizu, Masanori, Kunihiro Suzuki, Kanako Kato, Teruo Jojima, Toshie Iijima, Toshimitsu Murohisa, Makoto Iijima, Hidehiro Takekawa, Isao Usui, Hideyuki Hiraishi y Yoshimasa Aso: *Evaluation of the effects of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, on hepatic steatosis and fibrosis using transient elastography in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease*. Diabetes, obesity & metabolism, 21(2):285–292, feb 2019, ISSN 1463-1326. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30178600/>.
- [86] Panebianco, Concetta, Jude A. Oben, Manlio Vinciguerra y Valerio Paziienza: *Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR-gamma signalings*. Clinical and Experimental Medicine 2016 17:3, 17(3):269–280, sep 2016, ISSN 1591-9528. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10238-016-0438-x>.
- [87] Wang, Hua, Fouad Lafdil, Lei Wang, Shi Yin, Dechun Feng y Bin Gao: *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice: involvement of hepatocyte STAT3 in TIMP-1 production*. Cell & Bioscience, 1(1):14, apr 2011, ISSN 20453701. [/pmc/articles/PMC3125204/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125204/)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125204/?report=abstract>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125204/>.

- [88] Sanyal, Arun J., Naga Chalasani, Kris V. Kowdley, Arthur McCullough, Anna Mae Diehl, Nathan M. Bass, Brent A. Neuschwander-Tetri, Joel E. Lavine, James Tonascia, Aynur Unalp, Mark Van Natta, Jeanne Clark, Elizabeth M. Brunt, David E. Kleiner, Jay H. Hoofnagle y Patricia R. Robuck: *Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis*. *New England Journal of Medicine*, 362(18):1675–1685, may 2010, ISSN 0028-4793. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa0907929>.
- [89] Mills, Elizabeth P, K Paige D Brown, Jennifer D Smith, Phillip W Vang y Katie Trotta: *Treating nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a review of efficacy and safety*. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 9(1):15–28, jan 2018, ISSN 2042-0188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29344336><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5761952>.
- [90] Fan, Hui, Qingrong Pan, Yuan Xu y Xinchun Yang: *Exenatide improves type 2 diabetes concomitant with non-alcoholic fatty liver disease*. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 57(9):702–708, 2013, ISSN 1677-9487. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24402015/>.
- [91] Naftalin, Richard J.: *A computer model simulating human glucose absorption and metabolism in health and metabolic disease states*. *F1000Research*, 5, 2016, ISSN 1759796X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27347379/>.
- [92] Armstrong, Matthew James, Piers Gaunt, Guruprasad P. Aithal, Darren Barton, Diana Hull, Richard Parker, Jonathan M. Hazlehurst, Kathy Guo, George Abouda, Mark A. Aldersley, Deborah Stocken, Stephen C. Gough, Jeremy W. Tomlinson, Rachel M. Brown, Stefan G. Hübscher y Philip N. Newsome: *Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study*. *The Lancet*, 387(10019):679–690, feb 2016, ISSN 0140-6736. <http://www.thelancet.com/article/S014067361500803X/fulltext><http://www.thelancet.com/article/S014067361500803X/abstract><https://www.thelancet.com/article/S014067361500803X/abstract>

[//www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(15\)00803-X/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(15)00803-X/abstract).

- [93] Newsome, Philip, Sven Francque, Stephen Harrison, Vlad Ratziu, Luc Van Gaal, Salvatore Calanna, Morten Hansen, Martin Linder y Arun Sanyal: *Effect of semaglutide on liver enzymes and markers of inflammation in subjects with type 2 diabetes and/or obesity*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 50(2):193–203, jul 2019, ISSN 1365-2036. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31246368/>.
- [94] Legry, Vanessa, Philippe Poulain, Nicolas Stankovic Valentin, Peggy Parroche, Emeline Descamps, Carole Belanger, Dean Hum, Bart Staels, Stephen Harrison, Rohit Loomba, Arun Sanyal, Vlad Ratziu y Robert Walczak: *The combination of elafibranor and semaglutide drastically improves fibrosing steatohepatitis and distinctly modulates liver inflammatory signature*. *Journal of Hepatology*, 73:S12, aug 2020, ISSN 01688278.
- [95] Aithal, Guruprasad P., James A. Thomas, Philip V. Kaye, Adam Lawson, Stephen D. Ryder, Ian Spendlove, Andrew S. Austin, Jan G. Freeman, Linda Morgan y Jonathan Webber: *Randomized, Placebo-Controlled Trial of Pioglitazone in Nondiabetic Subjects With Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Gastroenterology*, 135(4):1176–1184, oct 2008, ISSN 0016-5085.
- [96] Cusi, Kenneth, Beverly Orsak, Fernando Bril, Romina Lomonaco, Joan Hecht, Carolina Ortiz-Lopez, Fermin Tio, Jean Hardies, Celia Darland, Nicolas Musi, Amy Webb y Paola Portillo-Sanchez: *Long-term pioglitazone treatment for patients with nonalcoholic steatohepatitis and prediabetes or type 2 diabetes mellitus a randomized trial*. *Annals of Internal Medicine*, 165(5):305–315, sep 2016, ISSN 15393704.
- [97] Tahrani, Abd A., Anthony H. Barnett y Clifford J. Bailey: *SGLT inhibitors in management of diabetes*. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 1(2):140–151, oct 2013, ISSN 2213-8595. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24622320/>.

- [98] Kuchay, Mohammad Shafi, Sonal Krishan, Sunil Kumar Mishra, Khalid Jamal Farooqui, Manish Kumar Singh, Jasjeet Singh Wasir, Beena Bansal, Parjeet Kaur, Ganesh Jevalikar, Harmendeep Kaur Gill, Narendra Singh Choudhary y Ambrish Mithal: *Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial)*. *Diabetes Care*, 41(8):1801–1808, aug 2018, ISSN 0149-5992. <https://diabetesjournals.org/care/article/41/8/1801/36391/Effect-of-Empagliflozin-on-Liver-Fat-in-Patients>.
- [99] Abenavoli, Ludovico, Tetyana Falalyeyeva, Luigi Boccutto, Olena Tsyryuk y Nazarii Kobylak: *Obeticholic Acid: A New Era in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 11(4), dec 2018, ISSN 1424-8247. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30314377/>.
- [100] Han, Chang Yeob, Hyun Soo Rho, Ayoung Kim, Tae Hyun Kim, Kiseok Jang, Dae Won Jun, Jong Won Kim, Bumseok Kim y Sang Geon Kim: *FXR Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress-Induced NLRP3 Inflammasome in Hepatocytes and Ameliorates Liver Injury*. *Cell Reports*, 24(11):2985–2999, sep 2018, ISSN 2211-1247.
- [101] Sumida, Yoshio y Masashi Yoneda: *Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH*. *Journal of gastroenterology*, 53(3):362–376, mar 2018, ISSN 1435-5922. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29247356/>.
- [102] Wettstein, Guillaume, Jean Michel Luccarini, Laurence Poekes, Patrick Faye, Francine Kupkowski, Vanessa Adarbes, Evelyne Defrêne, Céline Estivalet, Xavier Gawronski, Ingrid Jantzen, Alain Philippot, Julien Tessier, Pascale Tuyaa-Boustugue, Fiona Oakley, Derek A. Mann, Isabelle Leclercq, Sven Francque, Irena Konstantinova, Pierre Broqua y Jean Louis Junien: *The new-generation pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis*. *Hepatology Communications*, 1(6):524–537, aug 2017, ISSN 2471254X. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep4.1057><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep4.1057>

[//onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep4.1057](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep4.1057)[https:](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep4.1057)

[//aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1057](https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1057).

- [103] Boubia, Benaïssa, Olivia Poupardin, Martine Barth, Jean Binet, Philippe Peralba, Laurent Mounier, Elise Jacquier, Emilie Gauthier, Valérie Lepais, Maryline Chatar, Stéphanie Ferry, Anne Thourigny, Fabrice Guillier, Jonathan Llacer, Jérôme Amaudrut, Pierre Dodey, Olivier Lacombe, Philippe Masson, Christian Montalbetti, Guillaume Wettstein, Jean Michel Lucarini, Christiane Legendre, Jean Louis Junien y Pierre Broqua: *Design, Synthesis, and Evaluation of a Novel Series of Indole Sulfonamide Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) $\alpha/\gamma/\delta$ Triple Activators: Discovery of Lanifibranor, a New Antifibrotic Clinical Candidate*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(6):2246–2265, mar 2018, ISSN 15204804. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.7b01285>.
- [104] Sven M., Francque, Bedossa Pierre, Abdelmalek Manal F., Anstee Quentin M., Bugianesi Elisabetta, Ratziu Vlad, Huot Marchand Philippe, Scherrer Bruno, Junien Jean-Louis, Broqua Pierre y Abitbol Jean-Louis: *A randomised, double-blind, placebo-controlled, multi-centre, dose-range, proof-of-concept, 24-week treatment study of lanifibranor in adult subjects with non-alcoholic steatohepatitis: Design of the NATIVE study*. *Contemporary Clinical Trials*, 98:106170, nov 2020, ISSN 1551-7144.
- [105] Poo, Jorge Luis, Aldo Torre, Juan Ramón Aguilar-Ramírez, Mauricio Cruz, Luis Mejía-Cuán, Eira Cerda, Alfredo Velázquez, Angélica Patiño, Carlos Ramírez-Castillo, Laura Cisneros, Francisco Bosques-Padilla, Larissa Hernández, Frida Gasca, Francisco Flores-Murrieta, Samuel Treviño, Graciela Tapia, Juan Armendariz-Borunda y Linda E. Muñoz-Espinosa: *Benefits of prolonged-release pirfenidone plus standard of care treatment in patients with advanced liver fibrosis: PROMETEO study*. *Hepatology international*, 14(5):817–827, sep 2020, ISSN 1936-0541. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32813194/>.

- [106] Tacke, Frank: *Cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis*. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1442436>, 27(3):301–311, mar 2018, ISSN 17447658. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13543784.2018.1442436>.
- [107] Friedman, Scott L., Vlad Ratziu, Stephen A. Harrison, Manal F. Abdelmalek, Guruprasad P. Aithal, Juan Caballeria, Sven Francque, Geoffrey Farrell, Kris V. Kowdley, Antonio Craxi, Krzysztof Simon, Laurent Fischer, Liza Melchor-Khan, Jeffrey Vest, Brian L. Wiens, Pamela Vig, Star Seyedkazemi, Zachary Goodman, Vincent Wai Sun Wong, Rohit Loomba, Frank Tacke, Arun Sanyal y Eric Lefebvre: *A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis*. *Hepatology*, 67(5):1754–1767, may 2018, ISSN 15273350. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.29477><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.29477><https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.29477>.
- [108] Ratziu, Vlad, Arun Sanyal, Stephen A. Harrison, Vincent Wai Sun Wong, Sven Francque, Zachary Goodman, Guruprasad P. Aithal, Kris V. Kowdley, Star Seyedkazemi, Laurent Fischer, Rohit Loomba, Manal F. Abdelmalek y Frank Tacke: *Cenicriviroc Treatment for Adults With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis: Final Analysis of the Phase 2b CENTAUR Study*. *Hepatology*, 72(3):892–905, sep 2020, ISSN 1527-3350. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.31108><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.31108><https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.31108>.
- [109] Harrison, Stephen A., Andrea Dennis, Martine M. Fiore, Matt D. Kelly, Catherine J. Kelly, Angelo H. Paredes, Jennifer M. Whitehead, Stefan Neubauer, Peter G. Traber y Rajarshi Banerjee: *Utility and variability of three non-invasive liver fibrosis imaging modalities to evaluate efficacy of GR-MD-02 in subjects with NASH and bridging fibrosis during a phase-2 randomized clinical trial*.

PLOS ONE, 13(9):e0203054, sep 2018, ISSN 1932-6203. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203054>.

- [110] Chalasani, Naga, Manal F. Abdelmalek, Guadalupe Garcia-Tsao, Raj Vuppalanchi, Naim Alkhoury, Mary Rinella, Mazen Nouredin, Maxmillan Pyko, Mitchell Shiffman, Arun Sanyal, Adam Allgood, Harold Shlevin, Rex Horton, Eliezer Zomer, William Irish, Zachary Goodman, Stephen A. Harrison, Peter G. Traber, Manal Abdelmalek, Luis Balart, Brian Borg, Michael Charlton, Hari Conjeevaram, Michael Fuchs, Reem Ghalib, Pierre Gholam, Dina Halegoua-De Marzio, Stephen Harrison, Christopher Jue, Nyingi Kemmer, Kris Kowdley, Michelle Lai, Eric Lawitz, Rohit Loomba, Angelo Paredes, Don Rockey, Miguel Rodriguez, Raymond Rubin, Michael Ryan, Andrew Scanga, Thomas Sepe, Brent Tetri, Paul Thuluvath, Dawn Torres, John Vierling, Julia Watacheril, Amanda Weiland y Donald Zogg: *Effects of Belapectin, an Inhibitor of Galectin-3, in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With Cirrhosis and Portal Hypertension*. *Gastroenterology*, 158(5):1334–1345.e5, apr 2020, ISSN 0016-5085.
- [111] Pérez-Carreón, Julio Isael, Lidia Martínez-Pérez, María Lilia Loredó, Lucía Yáñez-Maldonado, Gabriela Velasco-Loyden, Susana Vidrio-Gómez, Jorge Ramírez-Salcedo, Francisco Hernández-Luis, Israel Velázquez-Martínez, Juan Antonio Suárez-Cuenca, Rolando Hernández-Muñoz y Victoria Chagoya de Sánchez: *An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl(4)-induced rat cirrhosis*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(2):287–296, feb 2010, ISSN 1878-5875. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19914391/>.
- [112] Velasco-Loyden, Gabriela, Julio Isael Pérez-Carreón, José Fernando Cabello Agüero, Pilar Cabrales Romero, Susana Vidrio-Gómez, Lidia Martínez-Pérez, Lucía Yáñez-Maldonado, Rolando Hernández-Muñoz, Marina Macías-Silva y Victoria Chagoya de Sánchez: *Prevention of in vitro hepatic stellate cells ac-*

tivation by the adenosine derivative compound IFC305. Biochemical Pharmacology, 80(11):1690–1699, dec 2010, ISSN 0006-2952.

- [113] Chávez, Enrique, María Guadalupe Lozano-Rosas, Mariana Domínguez-López, Gabriela Velasco-Loyden, Jesús Rafael Rodríguez-Aguilera, Concepción José-Nuñez, Marietta Tuena De Gómez-Puyou y Victoria Chagoya De Sánchez: *Functional, Metabolic, and Dynamic Mitochondrial Changes in the Rat Cirrhosis-Hepatocellular Carcinoma Model and the Protective Effect of IFC-305.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 361(2):292–302, may 2017, ISSN 1521-0103. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209723/>.
- [114] Rodríguez-Aguilera, Jesús Rafael, Carlos Guerrero-Hernández, Rosario Pérez-Molina, Carla Elizabeth Cadena-del Castillo, Rebeca Pérez-Cabeza de Vaca, Nuria Guerrero-Celis, Mariana Domínguez-López, Adrián Rafael Murillo-de Ozores, Rodrigo Arzate-Mejía, Félix Recillas-Targa y Victoria Chagoya de Sánchez: *Epigenetic Effects of an Adenosine Derivative in a Wistar Rat Model of Liver Cirrhosis.* Journal of cellular biochemistry, 119(1):401–413, jan 2018, ISSN 1097-4644. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28590037/>.
- [115] Pérez-Cabeza de Vaca, Rebeca, Mariana Domínguez-López, Nuria Guerrero-Celis, Jesús R. Rodríguez-Aguilera y Victoria Chagoya de Sánchez: *Inflammation is regulated by the adenosine derivative molecule, IFC-305, during reversal of cirrhosis in a CCl₄ rat model.* International immunopharmacology, 54:12–23, jan 2018, ISSN 1878-1705. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29100033/>.
- [116] Tall, A. R.: *An overview of reverse cholesterol transport.* European Heart Journal, 19 Suppl A(SUPPL. A):A31–5, feb 1998, ISSN 0195-668X. <https://europepmc.org/article/med/9519340>.
- [117] Schwartz, Charles C., Julie M. VandenBroek y Patricia S. Cooper: *Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans.*

Journal of Lipid Research, 45(9):1594–1607, sep 2004, ISSN 0022-2275.
<http://www.jlr.org/article/S002222752031275X/fulltext><http://www.jlr.org/article/S002222752031275X/abstract>[https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)31275-X/abstract](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)31275-X/abstract).

- [118] Rader, Daniel J., Eric T. Alexander, Ginny L. Weibel, Jeffrey Billheimer y George H. Rothblat: *The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis*. Journal of Lipid Research, 50(SUPPL.):S189–S194, apr 2009, ISSN 0022-2275.
- [119] Yen, F. T., R. J. Deckelbaum, C. J. Mann, Y. L. Marcel, R. W. Milne y A. R. Tall: *Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody. Effects on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma*. Journal of Clinical Investigation, 83(6):2018, 1989, ISSN 00219738. [/pmc/articles/PMC303926/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/303926/)<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC303926/>.
- [120] Inazu, Akihiro, Maryanne L Brown, Charles B Hesler, Luis B Agellon, Junji Koizumi, Koki Takata, Yoshisuke Maruhama, Hiroshi Mabuchi y Alan R Tall: *Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation*. New England Journal of Medicine, 323(18):1234–1238, 1990.
- [121] Inazu, Akihiro, Xian Cheng Jiang, Tatsuo Haraki, Kunimasa Yagi, Nobuo Kamon, Junji Koizumi, Hiroshi Mabuchi, Ryoyu Takeda, Koki Takata, Yuri Moriyama y cols.: *Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol*. The Journal of clinical investigation, 94(5):1872–1882, 1994.
- [122] Cefalù, Angelo B, Davide Noto, Lucia Magnolo, Elisa Pinotti, Monica Gomaschi, Scipione Martini, Giovanni B Vigna, Laura Calabresi, Patrizia Tarugi

- y Maurizio R Averna: *Novel mutations of CETP gene in Italian subjects with hyperalphalipoproteinemia*. *Atherosclerosis*, 204(1):202–207, 2009.
- [123] Nagano, Makoto, Shizuya Yamashita, Ken ichi Hirano, Mayumi Ito, Takao Maruyama, Mitsuaki Ishihara, Yukiko Sagehashi, Tomoichiro Oka, Takeshi Kujiraoka, Hiroaki Hattori *y cols.*: *Two novel missense mutations in the CETP gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects: high-throughput assay by Invader[®] assay*. *Journal of lipid research*, 43(7):1011–1018, 2002.
- [124] Beamer, L. J.: *Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins*. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 4):791–794, aug 2003, ISSN 0300-5127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12887307/>.
- [125] Qiu, Xiayang, Anil Mistry, Mark J. Ammirati, Boris A. Chrnyk, Ronald W. Clark, Yang Cong, Jeffrey S. Culp, Dennis E. Danley, Thomas B. Freeman, Kieran F. Geoghegan, Matthew C. Griffor, Steven J. Hawrylik, Cheryl M. Hayward, Preston Hensley, Lise R. Hoth, George A. Karam, Maruja E. Lira, David B. Lloyd, Katherine M. McGrath, Kim J. Stutzman-Engwall, Ann K. Subashi, Timothy A. Subashi, John F. Thompson, Ing Kae Wang, Honglei Zhao y Andrew P. Seddon: *Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules*. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007 14:2, 14(2):106–113, jan 2007, ISSN 1545-9985. <https://www.nature.com/articles/nsmb1197>.
- [126] Wang, Suke, Xingbo Wangz, Liping Deng, Eric Rassarts, Ross W Milnez y Alan R Tallll: *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Point Mutagenesis of Carboxyl-terminal Amino Acids of Cholesteryl Ester Transfer Protein OPPOSITE FACES OF AN AMPHIPATHIC HELIX IMPORTANT FOR CHOLESTERYL ESTER TRANSFER OR FOR BINDING NEUTRALIZING ANTIBODY**. 268(3):1955–1959, 1993.

- [127] Wang, S., P. Kussie, L. Deng y A. Tall: *Defective Binding of Neutral Lipids by a Carboxyl-terminal Deletion Mutant of Cholesteryl Ester Transfer Protein: EVIDENCE FOR A CARBOXYL-TERMINAL CHOLESTERYL ESTER BINDING SITE ESSENTIAL FOR NEUTRAL LIPID TRANSFER ACTIVITY (*)*. Journal of Biological Chemistry, 270(2):612–618, jan 1995, ISSN 0021-9258. <http://www.jbc.org/article/S0021925818830459/fulltext><http://www.jbc.org/article/S0021925818830459/abstract>[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)83045-9/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)83045-9/abstract).
- [128] Bolaños-García, Víctor M., Manuel Soriano-García y Jaime Mas-Oliva: *Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (i, i+4) array*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1384(1):7–15, apr 1998, ISSN 0167-4838.
- [129] García-González, Victor, Nadia Gutiérrez-Quintanar, Paola Mendoza-Espinosa, Pilar Brocos, Ángel Piñeiro y Jaime Mas-Oliva: *Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity*. Journal of structural biology, 186(1):19–27, 2014, ISSN 1095-8657. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24530617/>.
- [130] Gutiérrez-Vidal, R., C.A. Franco-Urquijo, A. Ríos-Rodríguez, B. Escalante-Acosta, B. Delgado-Coello y J. Mas-Oliva: *Nanomicellar preparation, HB-ATV-8, protects against endothelial dysfunction induced by a high-fat diet*. Atherosclerosis, 331:e60, aug 2021, ISSN 0021-9150. <http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021915021004421/fulltext><http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021915021004421/abstract>[https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(21\)00442-1/abstract](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(21)00442-1/abstract).
- [131] Mas-Oliva, Jaime, Blanca Delgado-Coello, Kevin Méndez-Acevedo, Roxana Gutiérrez-Vidal y Sandra Calixto-Tlacomulco: *Preclinical evidence studying intranasal HB-ATV-8 vaccine in a porcine model of atherosclerosis*.

rosis shows high efficiency in the prevention of atherogenesis and fatty liver disease. *Atherosclerosis*, 263:e52, aug 2017, ISSN 0021-9150. <http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021915017304264/fulltext>[http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(17\)30426-4/abstract](http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021915017304264/abstract).

- [132] Gutiérrez-Vidal, Roxana, Blanca Delgado-Coello, Kevin Manuel Méndez-Acevedo, Sandra Calixto-Tlacomulco, Salvador Damián-Zamacona y Jaime Mas-Oliva: *Therapeutic Intranasal Vaccine HB-ATV-8 Prevents Atherogenesis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in a Pig Model of Atherosclerosis*. *Archives of Medical Research*, 49(7):456–470, oct 2018, ISSN 0188-4409.
- [133] Mas-Oliva, J.: *Molecular events involved in the efficacy of therapeutic vaccine HB-ATV-8*. *Atherosclerosis*, 315:e138, dec 2020, ISSN 0021-9150. <http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S002191502031008X/fulltext>[http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(20\)31008-X/abstract](http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S002191502031008X/abstract).
- [134] Wobser, Hella, Christoph Dorn, Thomas S. Weiss, Thomas Amann, Cornelius Bollheimer, Roland Büttner, Jürgen Schölmerich y Claus Hellerbrand: *Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells*. *Cell Research* 2009 19:8, 19(8):996–1005, jun 2009, ISSN 1748-7838. <https://www.nature.com/articles/cr200973>.
- [135] Chavez-Tapia, Norberto C., Natalia Rosso y Claudio Tiribelli: *Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease*. *BMC Gastroenterology*, 12(1):1–10, mar 2012, ISSN 1471230X. <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-12-20>.

- [136] Giraudi, Pablo J, Varenka J Barbero Becerra, Veronica Marin, Norberto C Chavez-Tapia, Claudio Tiribelli y Natalia Rosso: *The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation*. *Experimental and molecular pathology*, 98(1):85–92, 2015.
- [137] Martinez, Vincent y Maged Henary: *Nile red and Nile blue: applications and syntheses of structural analogues*. *Chemistry—A European Journal*, 22(39):13764–13782, 2016.
- [138] Teo, Wulin, Andrew V. Caprariello, Megan L. Morgan, Antonio Luchicchi, Geert J. Schenk, Jeffrey T. Joseph, Jeroen J.G. Geurts y Peter K. Stys: *Nile Red fluorescence spectroscopy reports early physicochemical changes in myelin with high sensitivity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(8), feb 2021, ISSN 10916490.
- [139] Romek, Marek, Barbara Gajda, Ewa Krzysztofowicz, Mariusz Kepczynski y Zdzisław Smorag: *New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe*. *Theriogenology*, 75(1):42–54, jan 2011, ISSN 0093-691X.
- [140] Nigam, Shalini y Sarah Rutan: *Principles and Principles and*. *Applied Spectroscopy*, 55(11):362A, 2001.
- [141] Araya, Julia, Ramón Rodrigo, Luis A. Videla, Lilian Thielemann, Myriam Orellana, Paulina Pettinelli y Jaime Poniachik: *Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Clinical science (London, England : 1979)*, 106(6):635–643, jun 2004, ISSN 0143-5221. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14720121/>.
- [142] Aden, David P., Alice Fogel, Stanley Plotkin, Ivan Damjanov y Barbara B. Knowles: *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line [15]*. *Nature*, 282(5739):615–616, 1979, ISSN 00280836.

- [143] Peter Guengerich, F.: *Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry*. The Journal of biological chemistry, 294(5):1671–1680, feb 2019, ISSN 1083-351X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29871932/>.
- [144] Arzumanian, Viktoriia A., Olga I. Kiseleva y Ekaterina V. Poverennaya: *The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise*. International Journal of Molecular Sciences, 22(23), dec 2021, ISSN 14220067. [/pmc/articles/PMC8658661//pmc/articles/PMC8658661/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8658661/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39888888/).
- [145] Müller, Fabrice A. y Shana J. Sturla: *Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease*. Current Opinion in Toxicology, 16:9–16, aug 2019, ISSN 2468-2020.
- [146] Ramos, Maria Jimenez, Lucia Bandiera, Filippo Menolascina y Jonathan Andrew Fallowfield: *In vitro models for non-alcoholic fatty liver disease: Emerging platforms and their applications*. iScience, 25(1), jan 2022, ISSN 25890042. [/pmc/articles/PMC8689151//pmc/articles/PMC8689151/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8689151/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39888888/).
- [147] Pareek, Anil, Ashok Godavarthi, Roshan Issarani y Badri Prakash Nagori: *Antioxidant and hepatoprotective activity of Fagonia schweinfurthii (Hadidi) Hadidi extract in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in HepG2 cell line and rats*. Journal of ethnopharmacology, 150(3):973–981, dec 2013, ISSN 1872-7573. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140589/>.
- [148] Soret, Pierre Antoine, Julie Magusto, Chantal Housset y Jérémie Gautheron: *In Vitro and In Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Appraisal*. Journal of Clinical Medicine, 10(1):1–18, jan 2021, ISSN 20770383. [/pmc/articles/PMC7794936//pmc/articles/PMC7794936/?report=abstracthttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7794936/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39888888/).

- [149] March, Sandra, Elliot E. Hui, Gregory H. Underhill, Salman Khetani y Sangeeta N. Bhatia: *Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro*. *Hepatology*, 50(3):920–928, 2009, ISSN 02709139.
- [150] Gómez-Lechón, María José, María Teresa Donato, Alicia Martínez-Romero, Nuria Jiménez, José Vicente Castell y José Enrique O’Connor: *A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis*. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2):106–116, jan 2007, ISSN 0009-2797.
- [151] Wang, Dong, Yuren Wei y Michael J. Pagliassotti: *Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis*. *Endocrinology*, 147(2):943–951, feb 2006, ISSN 0013-7227. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16269465/>.
- [152] Yamagishi, Sho Ichi, Tamami Okamoto, Shinjiro Amano, Yosuke Inagaki, Kohachiro Koga, Mari Koga, Hiroshi Choei, Nobuyuki Sasaki, Seiji Kikuchi, Masayoshi Takeuchi y Zenji Makita: *Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes*. *Molecular Medicine*, 8(4):179–184, 2002, ISSN 10761551.
- [153] Maedler, Kathrin, José Oberholzer, Pascal Bucher, Giatgen A. Spinas y Marc Y. Donath: *No Title*. *Diabetes*, 52(3):726–733, mar 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606514/>.
- [154] Miller, Thomas A., Nathan K. LeBrasseur, Gregory M. Cote, Mario P. Trucillo, David R. Pimentel, Yasuo Ido, Neil B. Ruderman y Douglas B. Sawyer: *Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(1):309–315, oct 2005, ISSN 0006291X.
- [155] Listenberger, Laura L., Daniel S. Ory y Jean E. Schaffer: *Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18):14890–14895, may 2001, ISSN 00219258.

- [156] Ji, Jun, Li Zhang, Ping Wang, Yi Ming Mu, Xiao Yu Zhu, Yuan Yuan Wu, Huan Yu, Bin Zhang, Shu Min Chen y Xi Zuo Sun: *Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture*. Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie, 56(6):369–376, apr 2005, ISSN 0940-2993. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15945276/>.
- [157] Wei, Yuren, Dong Wang, Farran Topczewski y Michael J. Pagliassotti: *Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 291(2), 2006, ISSN 01931849.
- [158] Yamashita, Hiromi, Makoto Takenoshita, Masaharu Sakurai, Richard K. Bruick, William J. Henzel, Wendy Shillinglaw, David Arnot y Kosaku Ueyada: *A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(16):9116–9121, jul 2001, ISSN 00278424. <https://www.pnas.org>.
- [159] Eberlé, Delphine, Bronwyn Hegarty, Pascale Bossard, Pascal Ferré y Fabienne Foufelle: *SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis*. Biochimie, 86(11):839–848, 2004, ISSN 0300-9084. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15589694/>.
- [160] Liang, Guosheng, Jian Yang, Jay D. Horton, Robert E. Hammer, Joseph L. Goldstein y Michael S. Brown: *Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c*. The Journal of biological chemistry, 277(11):9520–9528, mar 2002, ISSN 0021-9258. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11782483/>.
- [161] Caballero, Francisco, Anna Fernández, Antonio M. De Lacy, Jose C. Fernández-Checa, Juan Caballería y Carmen García-Ruiz: *Enhanced free cho-*

lesterol, SREBP-2 and Star expression in human NASH. Journal of hepatology, 50(4):789–796, apr 2009, ISSN 1600-0641. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19231010/>.

- [162] Inamoto, Ichiro y Jumi A. Shin: *Peptide therapeutics that directly target transcription factors*. Peptide Science, 111(1):e24048, jan 2019, ISSN 2475-8817. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pep2.24048><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pep2.24048><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pep2.24048>.
- [163] Takanaga, Hitomi, Bhavna Chaudhuri y Wolf B Frommer: *GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1778(4):1091–1099, 2008.
- [164] Yamamoto, Taizo, Hirofumi Fukumoto, Gyohan Koh, Hideki Yano, Koichiro Yasuda, Kazuhiro Masuda, Hitoshi Ikeda, Hiroo Imura y Yutaka Seino: *Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats*. Biochemical and biophysical research communications, 175(3):995–1002, mar 1991, ISSN 0006-291X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2025268/>.
- [165] Weinstein, Steven P., Elizabeth O’boyle, Meredith Fisher y Richard S. Haber: *Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system*. Endocrinology, 135(2):649–654, 1994, ISSN 0013-7227. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8033812/>.
- [166] Staehr, Peter, Ole Hother-Nielsen, Bernard R. Landau, Visvanathan Chandramouli, Jens Juul Holst y Henning Beck-Nielsen: *Effects of Free Fatty Acids Per Se on Glucose Production, Gluconeogenesis, and Glycogenolysis*. Diabetes, 52(2):260–267, feb 2003, ISSN 0012-1797. <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/52/2/260/26659/Effects-of-Free-Fatty-Acids-Per-Se-on-Glucose>.

- [167] Spahis, Schohraya, Edgard Delvin, Jean Michel Borys y Emile Levy: *Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis*. Antioxidants and Redox Signaling, 26(10):519–541, apr 2017, ISSN 15577716.
- [168] Kong, Jennifer Y. y Simon W. Rabkin: *Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: Prevention by cyclosporin A*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1485(1):45–55, may 2000, ISSN 13881981.
- [169] Lu, Zhao Hui, Yi Ming Mu, Bao An Wang, Xie Ling Li, Ju Ming Lu, Jiang Yuan Li, Chang Yu Pan, Toshihiko Yanase y Hajime Nawata: *Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 303(4):1002–1007, apr 2003, ISSN 0006291X.
- [170] Caldwell, Stephen H., Charissa Y. Chang, Robert K. Nakamoto y Lisa Krugner-Higby: *Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease*. Clinics in Liver Disease, 8(3):595–617, aug 2004, ISSN 10893261.
- [171] Rolo, Anabela P., João S. Teodoro y Carlos M. Palmeira: *Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Free Radical Biology and Medicine, 52(1):59–69, jan 2012, ISSN 08915849.
- [172] Rinella, Mary E.: *Nonalcoholic fatty liver disease a systematic review*. JAMA - Journal of the American Medical Association, 313(22):2263–2273, jun 2015, ISSN 15383598.
- [173] Teixeira, José, Cláudia M. Deus, Fernanda Borges y Paulo J. Oliveira: *Mitochondria: Targeting mitochondrial reactive oxygen species with mitochondriotropic polyphenolic-based antioxidants*. The international journal of biochemistry & cell biology, 97:98–103, apr 2018, ISSN 1878-5875. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29454114/>.
- [174] Ruhl, Constance E. y James E. Everhart: *Trunk fat is associated with increased serum levels of alanine aminotransferase in the United States*. Gastroente-

rology, 138(4), 2010, ISSN 1528-0012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20060831/>.

- [175] Fabris, Luca, Simone Brivio, Massimiliano Cadamuro y Mario Strazzabosco: *Revisiting Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Liver Fibrosis: Clues for a Better Understanding of the reactive "Biliary Epithelial Phenotype*. Stem Cells International, 2016, 2016, ISSN 16879678.
- [176] Fabris, Luca y Mario Strazzabosco: *Epithelial-mesenchymal interactions in biliary diseases*. Seminars in Liver Disease, 31(1):11–32, 2011, ISSN 02728087.
- [177] Lamouille, Samy, Jian Xu y Rik Derynck: *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(3):178–196, mar 2014, ISSN 14710072.
- [178] Christiansen, Jason J. y Ayyappan K. Rajasekaran: *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. Cancer Research, 66(17):8319–8326, sep 2006, ISSN 00085472.
- [179] Kalluri, Raghu y Robert A. Weinberg: *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. Journal of Clinical Investigation, 119(6):1420–1428, jun 2009, ISSN 00219738.
- [180] Hemmann, Stefanie, Jürgen Graf, Martin Roderfeld y Elke Roeb: *Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies*. Journal of hepatology, 46(5):955–975, may 2007, ISSN 0168-8278. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17383048/>.
- [181] Chattopadhyay, Indranil, Rangarao Ambati y Rohit Gundamaraju: *Exploring the Crosstalk between Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer*. Mediators of Inflammation, 2021, 2021, ISSN 14661861.
- [182] Kaimori, Aki, James Potter, Jun Ya Kaimori, Connie Wang, Esteban Mezey y Ayman Koteish: *Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro*. The Journal of

biological chemistry, 282(30):22089–22101, jul 2007, ISSN 0021-9258. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17513865/>.

- [183] Ueberham, Elke, Rainer Löw, Uwe Ueberham, Kai Schönig, Hermann Bujard y Roll Gebhardt: *Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis*. Hepatology, 37(5):1067–1078, may 2003, ISSN 02709139.
- [184] Qi, Zhe, Nobuhiko Atsuchi, Akira Ooshima, Akira Takeshita y Hikaru Ueno: *Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(5):2345–2349, mar 1999, ISSN 00278424.
- [185] Hellerbrand, Claus, Branko Stefanovic, Frank Giordano, Elmar R. Burchardt y David A. Brenner: *The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo*. J Hepatol, 30(1):77–87, 1999, ISSN 01688278.
- [186] Bataller, Ramón y David A. Brenner: *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 115(2):209–218, 2005, ISSN 00219738.
- [187] DC Rockey, JK, G Boyles, SL Gabbiani y Friedman: *Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture*. J Submicrosc Cytol Pathol, 24:193–203, 1992.