



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MÉDICINA, UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

ESTUDIO DE LA FERROPTOSIS COMO MECANISMO DE DAÑO EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO ASOCIADO A DISFUNCIÓN METABÓLICA (MAFLD)

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

PRESENTA:

ALBERTO ADRIÁN SOLÍS ORTEGA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. RICARDO ULISES MACÍAS RODRÍGUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIERREZ RUÍZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. SEPTIEMBRE, 2023



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.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---------|---|
| 3..... | Introducción |
| 9..... | Material y métodos |
| 10..... | Variables estudiadas y formas de medición |
| 13..... | Análisis estadístico |
| 13..... | Resultados |
| 21..... | Discusión |
| 24..... | Conclusión |
| 24..... | Referencias bibliográficas |

Introducción

La enfermedad por hígado graso asociado a disfunción metabólica (MAFLD) es la hepatopatía más frecuente a nivel mundial con una prevalencia global reportada del 24.2%. Se define como ocupación de >5% de la totalidad del hígado por triglicéridos asociado a sobrepeso/obesidad, diabetes mellitus y/o síndrome metabólico. Esta patología puede coexistir con consumo significativo de alcohol, condiciones que no son mutuamente excluyentes (1,2). De igual manera se ha incrementado la identificación de hígado graso no alcohólico en sujetos sin obesidad o síndrome metabólico con una prevalencia del 25 al 50% en regiones como México (3)

El espectro de esta patología incluye a) esteatosis hepática simple caracterizada por infiltración de grasa, sin inflamación, balonización de hepatocitos o fibrosis (90-95% de los casos), que en el 5-10% de los casos puede progresar a b) esteatohepatitis caracterizada por infiltrado inflamatorio mononuclear, balonización de hepatocitos con ó sin fibrosis, la cual a su vez tiene el potencial de progresar en el 30% de los casos a c) cirrosis con fibrosis avanzada y nódulos de regeneración en la totalidad de la arquitectura hepática . (4)

La fisiopatología es multifactorial y se ha implicado la susceptibilidad genética (polimorfismos en el gen PNPLA3), factores epigenéticos, resistencia a la insulina, lipogénesis intrahepática, lipoperoxidación, inflamación hepática y sistémica, así como alteraciones del eje hígado-microbiota intestinal (5). El curso clínico es heterogéneo y se ha observado que no todos los que la padecen progresan hacia cirrosis o hepatocarcinoma. Esto ha planteado la hipótesis de los múltiples golpes que indica que la progresión está determinada por la convergencia múltiples mecanismos de daño que contribuyen de forma simultánea al avance a través de las diferentes etapas de la enfermedad. El estudio de estos mecanismos es de sumo interés por representar un potencial blanco terapéutico por lo que dilucidarlos permitiría disminuir el impacto en salud pública. (4) La muerte celular es un fenómeno presente desde las etapas tempranas de esta enfermedad y representa un mecanismo de daño tisular hepático, en donde se han reportado diferentes tipos de muerte celular, incluyendo apoptosis, piroptosis, necroptosis y autofagia (6), (figura 1).

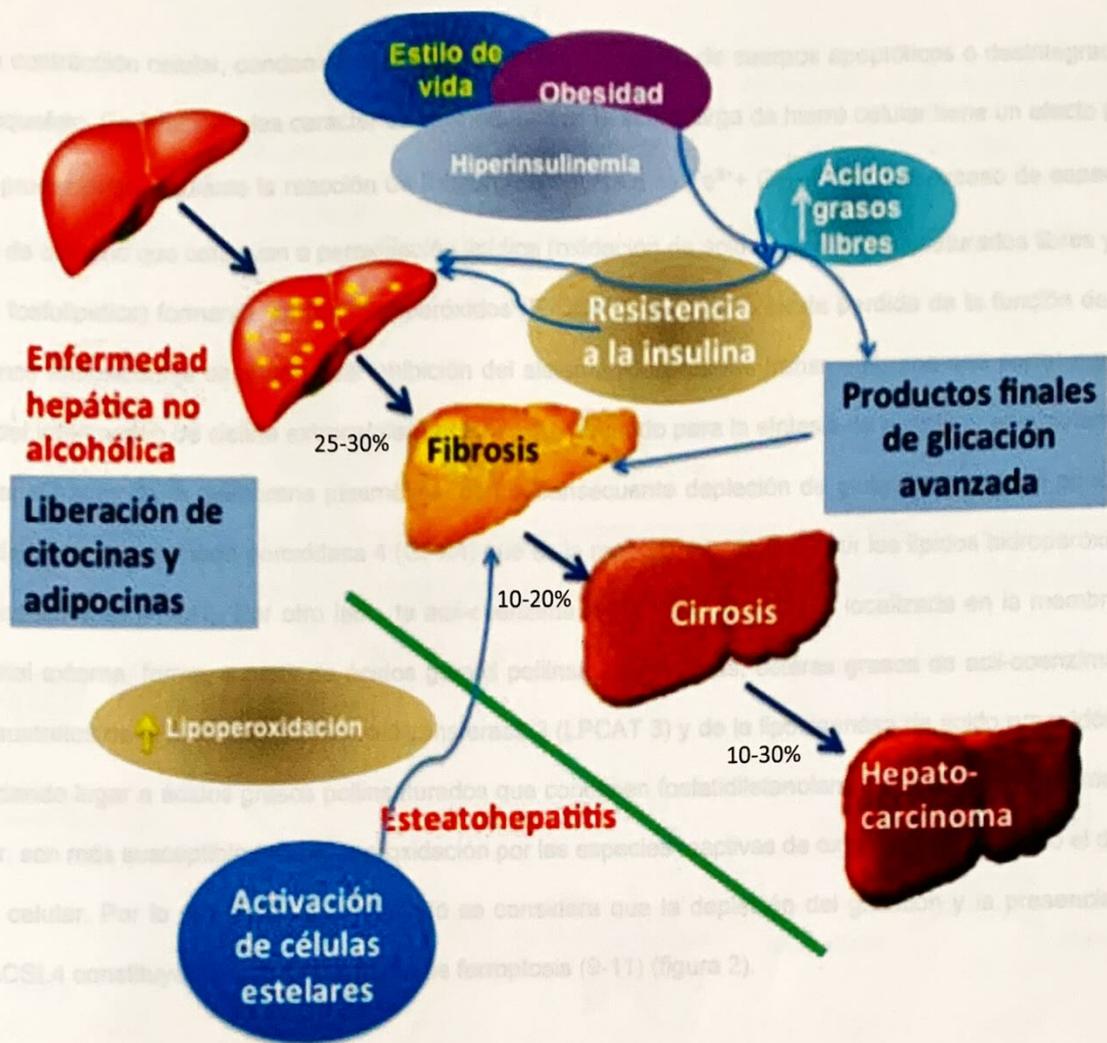


Figura 1. Fisiopatología de MAFLD. Factores genéticos, celulares y ambientales asociados al desarrollo de la enfermedad y porcentajes de progresión entre los diferentes estadios.(7)

Más recientemente la ferroptosis un mecanismo de muerte celular no apoptótico mediado por hierro, descrito por Dixon en 2012 en neoplasias incluyendo carcinoma hepatocelular, se ha descrito como el primer evento que desencadena esteatohepatitis y que precede otros tipos de muerte celular como la apoptosis y necrosis, en MAFLD. (8) Este tipo de muerte celular posee características morfológicas y bioquímicas distintivas (tabla 1). En análisis celular microestructural se observan mitocondrias pequeñas con densidades condensadas, reducción o desaparición de las crestas mitocondriales y la ruptura de la membrana mitocondrial externa, a diferencia de lo que ocurre en apoptosis (tipo de muerte celular descrito inicialmente en hígado graso), las células ferroptóticas no

muestran contracción celular, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos o desintegración del citoesqueleto. En relación a las características bioquímicas la sobrecarga de hierro celular tiene un efecto pro-oxidante produciendo mediante la reacción de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^*$) un exceso de especies reactivas de oxígeno que conllevan a peroxidación lipídica (oxidación de ácidos grasos poliinsaturados libres y de la bicapa fosfolipídica) formando lípidos hidroperóxidos (R-OOH); así mismo existe pérdida de la función de los mecanismos antioxidantes observándose inhibición del sistema Xc^- (proteína transmembrana anti porte) que se encarga del intercambio de cistina extracelular (aminoácido requerido para la síntesis de glutatión) con glutamato intracelular a través de la membrana plasmática, con la consecuente depleción de glutatión que es el principal sustrato de la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4) que es la responsable de convertir los lípidos hidroperóxidos a alcoholes lipídicos (R-OH). Por otro lado, la acil-coenzima A sintetasa 4 (ACSL4) localizada en la membrana mitocondrial externa, forma, a partir de ácidos grasos poliinsaturados libres, ésteres grasos de acil-coenzima A, que son sustratos de la lisofosfatidilcolina aciltransferasa 3 (LPCAT 3) y de la lipoxigenasa de ácido araquidónico (ALOX) dando lugar a ácidos grasos poliinsaturados que contienen fosfatidiletanolaminas que, por su geometría molecular, son más susceptibles a la lipoperoxidación por las especies reactivas de oxígeno, promoviendo el daño y muerte celular. Por lo previamente comentado se considera que la depleción del glutatión y la presencia de enzima ACSL4 constituyen firmas moleculares de ferroptosis (9-11) (figura 2).

| Tipo de muerte celular | Características morfológicas | Características bioquímicas |
|------------------------|--|---|
| Ferroptosis | <ul style="list-style-type: none"> -Mitocondrias pequeñas -Reducción de crestas mitocondriales -Ruptura de membrana mitocondrial externa -Tamaño nuclear normal, sin condensación de cromatina, sin ruptura de membrana plasmática | <ul style="list-style-type: none"> -Sobrecarga de hierro hepática -Aumento de radicales libres de oxígeno -Inhibición de sistema Xc^- (\downarrow entrada de cistina) -Depleción de glutatión -Liberación de mediadores de ácido araquidónico |
| Apoptosis | <ul style="list-style-type: none"> -Formación de burbujas de membrana plasmática -Reducción de volumen celular y nuclear -Fragmentación nuclear y condensación de cromatina -Formación de cuerpos apoptóticos -Sin cambios en estructura mitocondrial | <ul style="list-style-type: none"> -Activación de caspasas -Fragmentación de ADN oligonucleosomal -Exposición de fosfatidilserina |
| Necroptosis | <ul style="list-style-type: none"> -Ruptura de membrana plasmática -Edema citoplásmico -Condensación de cromatina -Derrame de componentes celulares en microambiente pericelular | <ul style="list-style-type: none"> -Disminución de niveles de ATP -Liberación de patrones moleculares asociados a daño -Hiperactivación de Poli (ADP ribosa) polimerasa 1 |

Autofagia

-Sin cambios en membrana plasmática
 -Acumulación de vacuolas autofágicas
 -Falta de condensación de cromatina
 -Formación de autolisosomas de doble membrana, incluye macro y micro autofagia
 Y autofagia mediada por chaperonas

-Conversión de la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulo 1 (LC3-I) a LC3-II
 -Degradación de sustrato

Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas distintivas de los diferentes tipos de muerte celular descritos en MAFLD. (10)

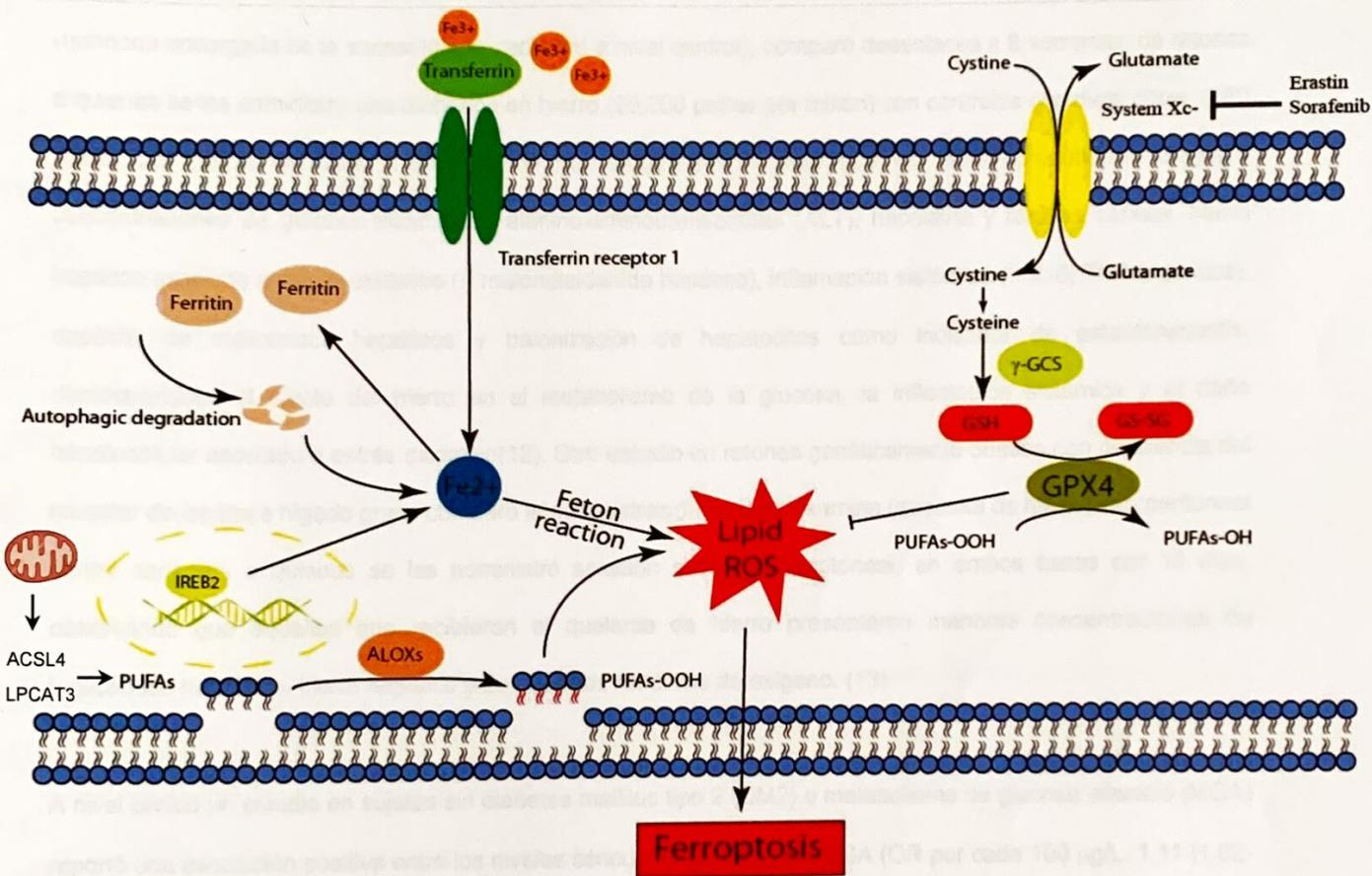


Figura 2. Mecanismo de muerte celular en ferroptosis. En el lado derecho de la imagen se observa como la inhibición del sistema Xc y de la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4) ocasiona una falla en los mecanismos antioxidantes. En el lado izquierdo de la imagen se observa como la sobrecarga de hierro a través de la reacción de Fenton y la acción de la acil-coenzima A sintetasa (ACSL4), lisofosfatidilcolina acil-transferasa 3 (LPCAT3) y de las lipooxigenasas de ácido araquidónico (ALOXs) sobre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la membrana lipídica producen especies reactivas de oxígeno (ROS). En el centro de la imagen se observa como la sobrecarga de ROS produce lipoperoxidación de la bicapa lipídica llevando a la muerte celular por ferroptosis. γ -GCS: gamma glutamylcysteine sintetasa. GSH: glutatión reducido. GS-SG: glutatión oxidado. IREB2: proteína reguladora de elementos de respuesta a hierro. (11)

En estudios preclínicos y clínicos se ha demostrado la asociación entre la sobrecarga de hierro plasmático y hepático con alteraciones en el metabolismo de la glucosa consecuencia de la resistencia a la insulina, la presencia de hígado graso y daño hepatocelular lo que se ha denominado Síndrome de sobrecarga de hierro dismetabólico (DIOS, por sus siglas en inglés).

A nivel preclínico un estudio en modelos murinos genéticamente obesos con deficiencias del receptor de leptina (hormona encargada de la sensación de saciedad a nivel central), comparó desenlaces a 8 semanas, de ratones a quienes se les administró una dieta rica en hierro (20,000 partes por millón) con controles con dieta chow (280 partes por millón de hierro), encontrando que aquellos con dieta rica en hierro presentaron mayores concentraciones de glucosa plasmática, alanino-aminotransferasas (ALT), hepcidina y ferritina séricas, hierro hepático asociado a estrés oxidativo (\uparrow malondialdehído hepático), inflamación sistémica (\uparrow IL-6, TNF- α séricos), depósito de triglicéridos hepáticos y balonización de hepatocitos como indicador de esteatohepatitis, demostrándose el efecto del hierro en el metabolismo de la glucosa, la inflamación sistémica y el daño hepatocelular asociado a estrés oxidativo(12). Otro estudio en ratones genéticamente obesos con deficiencia del receptor de leptina e hígado graso comparó la administración de deferoxamina (quelante de hierro) intraperitoneal contra controles a quienes se les administró solución salina intraperitoneal, en ambos casos por 15 días, observando que aquellos que recibieron el quelante de hierro presentaron menores concentraciones de triglicéridos hepáticos, hierro hepático y de especies reactivas de oxígeno. (13)

A nivel clínico un estudio en sujetos sin diabetes mellitus tipo 2 (DM2) o metabolismo de glucosa alterado (MGA) reportó una asociación positiva entre los niveles séricos de ferritina con MGA (OR por cada 100 μ g/L: 1.11 [1.02-1.23]), desarrollo de DM2 (OR por cada 100 μ g/L: 1.2 [1.06-1.36]) y síndrome metabólico (OR por cada 100 μ g/L: 1.11 [IC 95%: 1.02-1.20]) y con desarrollo de esteatosis hepática entre los sujetos con MGA (OR: 1.92 [IC 95%: 1.38-2.66]), DM2 (OR: 2.42 [IC 95%: 1.13-5.19]) y síndrome metabólico (OR: 4.04 [IC 95%: 2.93-5.57]). (14)

Una revisión sistemática y meta análisis evaluó el efecto de flebotomías (extracción de 250-350 ml de sangre cada 1-3 semanas) en pacientes con hígado graso no alcohólico, con el objetivo de disminuir las concentraciones de ferritina sérica (< 30-80 ng/ml) observando que en comparación con controles, la flebotomía se asoció a disminución en niveles séricos de ALT (diferencia de promedio agrupada [DPA]: 10.05 [IC 95%: 7.19-12.92], I²:

34%), triglicéridos (DPA: 9.89 [IC 95%: 4.96-14.83]), I²: 22%) e incremento de los niveles de colesterol de alta densidad (DPA: 3.48 [IC 95%: 2.03-4.92], I²: 18%). (15)

Por último, se ha demostrado el potencial terapéutico de este mecanismo de daño, a nivel preclínico un estudio en modelos murinos con knockout bialélico para el gen GPX4, demostró que los ratones morían al poco tiempo de nacer asociándose a degeneración hepática avanzada consecuencia de ferroptosis y daño por lipoperoxidación, sin embargo, aquellos que nacían de madres alimentadas con dietas enriquecidas en vitamina E estaban protegidos de este daño y este efecto era reversible, ya que los ratones morían a las 4 semanas de nacer (16). Este hallazgo resulta sumamente interesante ya que la vitamina E, es de los pocos tratamientos recomendados en la actualidad por las guías de manejo de esteatohepatitis no alcohólica y que ha demostrado ser eficaz en disminuir niveles séricos de aminotransferasas, esteatosis, balonización e inflamación lobular hepática. (17) Ejerce su mecanismo de acción en su forma activa de alfa tocoferol, al poseer un efecto antioxidante inherente mediante la donación de iones de hidrógeno a los lipoperoxidos, eliminándolos, así como mediante su acción como coenzima de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidada, incrementando la actividad de estas, con lo que permite la eliminación de las especies reactivas de oxígeno. (18)

En el ámbito clínico la ferroptosis representa hoy en día es una diana terapéutica, en donde inducir su desarrollo resulta beneficioso en patologías como la artritis reumatoide en donde la sulfasalazina induce ferroptosis al inhibir el sistema X_c⁻, la erastina y el sorafenib inducen ferroptosis para tratamiento de cáncer renal, carcinoma hepatocelular y carcinoma tiroideo (19). Por otro lado, inhibir la ferroptosis mediante el uso de α tocoferol, ferrostatinas y liproxstatinas, es el objetivo terapéutico deseado en enfermedades como MAFLD.

Con lo anterior, resulta importante determinar, si en humanos, la ferroptosis es un mecanismo de daño en las diferentes etapas de la MAFLD, en donde su presencia en estadios tempranos como factor determinante de la progresión a esteatohepatitis tendría el potencial de ser una diana terapéutica que prevenga la progresión y morbilidad asociada a esta patología, cada vez más frecuente a nivel mundial.

Material y métodos

Diseño del estudio

Estudio con diseño observacional, transversal y analítico llevado a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki y aprobación por los comités de investigación y ética en investigación, del periodo de junio 2021 a junio de 2022, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Criterios de inclusión

Se incluyeron sujetos \geq a 18 años de cualquier genero, con previo consentimiento informado, a los que se les realizó biopsia hepática estableciendo los siguientes 4 grupos del espectro del MAFLD de acuerdo con los criterios histopatológicos:

-Grupo A: controles sanos, metabólicamente sanos, en donde la biopsia hepática mostró $<5\%$ de infiltración grasa.

-Grupo B: pacientes con MAFLD (esteatosis simple) con evidencia de hígado graso por métodos no invasivos (ultrasonido o elastografía de transición), sin elevación de transaminasas y con biopsia hepática con infiltrado de grasa $>5\%$ sin evidencia de inflamación, balonización o fibrosis.

-Grupo C: pacientes con NASH con evidencia de hígado graso por métodos no invasivos (ultrasonido o elastografía de transición), con elevación de transaminasas, y con biopsia mostrando un infiltrado de grasa $>5\%$ y evidencia de inflamación, balonización y fibrosis, sin nódulos de regeneración.

-Grupo D: pacientes con diagnóstico de cirrosis por NASH, demostrando en la biopsia hepática fibrosis avanzada y nódulos de regeneración (cirrosis).

Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con hepatopatía crónica por otras etiologías dentro de las que se encontraron consumo significativo de alcohol (consumo de > 21 bebidas por semana en hombres y >14 bebidas por semana en mujeres),

virus de hepatitis, causas autoinmunes o del metabolismo del hierro. Pacientes con consumo de medicamentos asociados a esteatosis hepática como metotrexato, valproato, amiodarona, esteroides.

Malignidad de cualquier tipo en los últimos 5 años alteraciones cardiopulmonares graves, infección por virus de la inmunodeficiencia humana y pacientes embarazadas.

VARIABLES ESTUDIADAS Y FORMAS DE MEDICIÓN

Demográficas: Información obtenida mediante interrogatorio y revisión de expediente clínico que incluyó sexo, edad, índice de masa corporal (IMC) para clasificación de grado de obesidad y otras comorbilidades.

Bioquímicas: biometría hemática, química sanguínea electrolitos séricos, química hepática, perfil de hierro, marcadores de inflamación, perfil de lípidos, hemoglobina glucosilada. Las determinaciones de estos parámetros se realizaron de acuerdo con los estándares de calidad de nuestro laboratorio central (College of American Pathologists (CAP's) Laboratory Accreditation).

Imagenológicas:

Ultrasonido: realizado por ultrasonografistas con experiencia en valoración hepática, se estableció el grado de esteatosis como 0: normal, 1: leve con incremento ligero y difuso de la ecogenicidad hepática con visualización normal del diafragma y de la pared de la vena porta, 2: moderado con incremento de la ecogenicidad hepática con apariencia ligeramente deteriorada del diafragma y pared de vena porta y 3: grave pobre visualización de pared de vena porta, diafragma y parte posterior de lóbulo hepático derecho (20)

Elastografía transitoria: Se utilizaron los criterios de Boursier para valorar la fiabilidad del estudio, tomando 10 mediciones válidas, con tasa de éxito $\geq 60\%$ y clasificando la fiabilidad del estudio como "muy fiable" cuando el cociente de rango intercuartilar sobre mediana (IQR/M) fue menor a 10%, "fiable" cuando el IQR/M se encontró entre el 10-30% y "poco fiable" cuando era $>30\%$ tomando en cuenta únicamente estudios clasificados como fiables o muy fiables (21). Se utilizó sonda M o XL según indicaciones del equipo. Se valoró grado de esteatosis mediante el uso del parámetro de atenuación controlada (CAP) expresado en decibelios sobre metro (dB/m) y clasificando de

acuerdo al porcentaje de hepatocitos infiltrados por grasa como en S0 (<232 dB/m) cuando era <5%, S1 (232-256 dB/m) cuando era 5-32%, S2 (257-290 dB/m) cuando era 33-65% y S3 (290-326 dB/m) cuando era >66%. Así mismo se valoró el grado de fibrosis empleando los puntos de corte de 8.2 kilo Pascales (kPa) para F2, 9.7 kPa para F3 y 13.6 kPa para F4 (22)

Histopatológicas: valoradas por un mismo médico experto en patología gastrointestinal.

Puntaje de esteatosis: escala ordinal semicuantitativa mediante tinción de hematoxilina y eosina (H&E) valora en escala ordinal semicuantitativa del grado 0-3 (23).

Índice de actividad histológica de esteatohepatitis: escala ordinal semicuantitativa que, mediante tinción de H&E, permite puntuar el porcentaje de esteatosis (0-3 puntos), la degeneración balonzante del hepatocito (0-2 puntos), inflamación lobular (0-3 puntos) pudiendo obtenerse un total de 0-8 puntos, requiriéndose un valor de 1 punto o más en cada uno de los rubros para el diagnóstico de NASH (24)

Escala de fibrosis: valorada mediante tinción de Masson asignando valores del 0-4 donde 0: sin fibrosis, 1: fibrosis perisinusoidal o periportal, 2: fibrosis perisinusoidal y periportal, 3: fibrosis en puente y 4: cirrosis (24).

Depósito de hierro con tinción de Azul de Prusia de Pearls, se valoró mediante dos escalas:

- a) Escala de Scheuer modificada por Searle (utilizada en la práctica clínica): escala ordinal que gradúa el depósito de hierro del 0-4 de acuerdo a la magnificación requerida y facilidad de observación de hierro clasificando como grado 0: sin identificación de gránulos de hierro, 1: gránulos de hierro discernibles con imagen de alto poder (x250), 2: gránulos de hierro discernibles con imagen de alto aumento (x100), 3: gránulos de hierro observables en imagen panorámica (x25) y 4: gránulos gruesos visibles sin empleo de microscopía de luz (25).
- b) Escala de Deugnier (utilizada en protocolos de investigación) escala dimensional discreta que basa la asignación del puntaje de acuerdo con el sitio del depósito de hierro y al tamaño de los gránulos. Pudiendo asignar para el hepatocito: 0,3,6,9 y 12 puntos en cada área de Rappaport, en el sinusoide:

0,1,2,3 o 4 puntos en cada área de Rappaport y en región portal 0,1,2,3 o 4 puntos de acuerdo al porcentaje de hierro en macrófagos, células biliares y paredes vasculares. (25)

Estudio de apoptosis: Se valoró mediante escala dicotómica la presencia ó ausencia de cuerpos de Councilman también llamados cuerpos apoptóticos en 4mm² de tejido hepático con tinción de HyE en cada una de las muestras. Así mismo se empleó inmunohistoquímica para determinar la presencia o ausencia de apoptosis, en una muestra por grupo seleccionada al azar, utilizando el anticuerpo anti caspasa 3 (laboratorio abcam ab4051) que reacciona contra la proenzima de 32 kilodaltones (kDa) y la forma activa de la enzima de 17 kDa. Para la valoración cuantitativa de la presencia de caspasa 3 fosforilada, se empleó un análisis morfométrico de la muestra utilizando el software Image-Pro express versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc), en donde se midió en primer lugar el área de parénquima hepático valorable restando áreas de hemorragia, necrosis y espacio muerto sin tejido y posteriormente el software realiza una medición del área de tejido que resultó positivo a la reacción de inmunohistoquímica, representado por formación de gránulos citoplásmáticos de color café tabaco en hepatocitos. No se contabilizó la positividad de células inflamatorias o macrófagos.

Evaluación mitocondrial mediante microscopía electrónica: se seleccionó una muestra por grupo al azar, la cual se conservó en glutaraldehído que posteriormente era fijada en tetraóxido de osmio para el análisis ultraestructural, llevado a cabo con el microscopio electrónico Prisma E SEM de Thermo Fisher Scientific. Posterior a la obtención de imágenes con escala de 1 micra, se realizó el análisis morfométrico utilizando el software Image-Pro express versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc) para la evaluación de las siguientes características: área total valorable del hepatocito, área ocupada por mitocondrias, proporción citoplasma-mitocondrias y tamaño mitocondrial promedio.

Expresión proteica: Cada una de las muestras obtenidas mediante biopsia hepática, se preservaron inmediatamente y se congelaron y almacenaron a -70°C, hasta su análisis ulterior. La expresión proteica se efectuó mediante Western-Blot. Se analizaron 6 muestras por grupo (grupo A-C), 5 en el caso de cirrosis por NASH (grupo

D), obteniendo por muestra 20 mcg de lisado celular completo el cual se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico con el objetivo de separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética para después ser transportado a una membrana de difluoro de polivinilideno la cual fue bloqueada por 60 minutos a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en solución de fosfato tampón salino (0.1%). Posteriormente se agregaron los anticuerpos primarios recombinantes anti GPX4 de conejo monoclonal [EPNCIR144] (ab125066) y anti ACSL4 de conejo monoclonal [EPR8640] (ab155282) ambos de laboratorio abcam y se incubó por una noche a 4°C. Posteriormente se lavaron las membranas y se agregaron anticuerpos secundarios anti conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, USA) para la reacción de quimioluminiscencia cuya señal fue detectada empleando el ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) las imágenes fueron digitalizadas utilizando Chemidoc (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva utilizando proporciones para variables categóricas, medidas de tendencia central para variables dimensionales en forma de medias o medianas con sus respectivas medidas de dispersión (desviación

estándar y rango intercuartilar) según la distribución de los datos la cual se analizó con la prueba de Shapiro Wilk. Para el análisis estadístico inferencial se calculó un tamaño de muestra para obtener un error alfa de 0.05 y un beta de 0.20 de 5 pacientes por grupo, de acuerdo a la presencia o no de ferroptosis, mediante la expresión proteica de ACSL4/GPX4. Se utilizó X^2 para comparación de proporciones, t de Student para muestras independientes para comparación de medias y estadística no paramétrica mediante la prueba de U de Mann Whitney y Kruskal Wallis para comparación de medianas de dos o más grupos respectivamente. Se considero un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Se empleo el programa SPSS para Mac versión 20.0.

Resultados

Se obtuvieron un total de 32 biopsias, siendo 9 del grupo A (control), 11 del grupo B (esteatosis simple) 6 del grupo C (esteatohepatitis) y 6 del grupo D (cirrosis por NASH).

Características generales de la población

Las características basales de la población de estudio se muestran en la tabla 2. De manera general, se observó una mayor frecuencia de muestras provenientes de hombres en 61% de los casos, la edad promedio de la población fue de 46 años siendo mayor en el grupo de cirrosis por NASH ($p=0.024$), la mediana de IMC en el grupo control fue de 22.6, con diferencia estadísticamente significativa al compararla con el resto de los grupos ($p=0.024$), así mismo el grupo de esteatosis simple presentó un mayor IMC al compararlo el grupo de NASH y de cirrosis por NASH ($p=0.001$). La comorbilidad más frecuente fue DM2 con diferencias significativas entre los grupos con MAFLD en comparación con el grupo control ($p=0.001$) seguida por hipertensión arterial sistémica (HAS) (0.005) y síndrome de apnea hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS).

Tabla 2. Características basales de la población estudiada de acuerdo al espectro de MAFLD

| | Todos (n= 32) | No MAFLD (n=9) | Esteatosis simple (n=11) | Esteatohepatitis (n=6) | Cirrosis por NASH (n=6) | Valor de p |
|-------------------------------------|------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------|
| Características demográficas | | | | | | |
| Sexo (% H / M) | 56% H | 100% H | 72% M | 77% H | 50% M | 0.003 |
| Edad (promedio y DE) | 45.7 (10.3) | 39.4 (± 5.9) ^{abcd} | 48.3 (± 10.6) | 47.3 (± 10.6) | 53.7 (± 5.5) | 0.024 |
| IMC (Mediana RIQ) | 30.8 (23.3-36.6) | 22.6 (21.4-27.1) ^{abcd} | 45 (32.8-48.3) ^{ef} | 31.8 (28.8-36.1) | 28.7 (21.9-33.7) | 0.001 |
| Comorbilidades (n / %) | | | | | | |
| DM2 | 15(46) | 0 (0) | 8 (72.7) | 5 (83.3) | 2 (33) | 0.001 |
| Hipertensión | 10 (32) | 1 (11.1) | 8 (72.7) | 1 (16.7) | 0 (0) | 0.005 |
| SAHOS | 7 (22.6) | 0 (0) | 5 (45) | 1 (16) | 1 (20) | 0.026 |

Tabla 2. (a) $p < 0.05$ control vs. espectro de MAFLD, (b) $p < 0.05$ control vs. esteatosis simple, (c) $p < 0.05$ control vs NASH, (d) control vs cirrosis por NASH, (e) $p < 0.05$ esteatosis simple vs NASH, (f) $p < 0.05$ esteatosis simple vs. Cirrosis por NASH, (g) $p < 0.05$ NASH vs cirrosis por NASH

Características bioquímicas

En relación con las variables bioquímicas (tabla 3) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ferritina sérica, siendo menores en el grupo de esteatosis simple en comparación con el grupo de NASH y cirrosis por NASH ($p=0.36$) (figura 3). Se encontró menor concentración de hierro sérico entre el grupo de esteatosis simple al comparar con NASH ($p < 0.05$) (figura 4). Se encontraron mayores concentraciones de

bilirrubina total, fosfatasa alcalina, INR, creatinina y menores concentraciones de albumina, hemoglobina, leucocitos y hemoglobina glucosilada en los pacientes con cirrosis por NASH en comparación con los pacientes con NASH sin cirrosis (p < 0.05).

Tabla 3. valores bioquímicos de acuerdo al espectro de MAFLD

| | Todos (n= 32) | No MAFLD (n=9) | Esteatosis simple (n=11) | Esteatohepatitis (n=6) | Cirrosis por NASH (n=6) | Valor de p |
|---|--------------------------|------------------------------|---|-----------------------------------|--|-------------------|
| PCR (Valor de referencia: 0 - 1mg/dL) | 1.2 (0.2-1.9) | SD | 1.2 (0.5-2.7) | 0.35 (0.19-1.4) | 1.8 (0.22-2.1) | 0.357 |
| Ferritina (Valor de referencia: 11 -306.8ng/mL) | 82.4 (11.6-216) | SD | 25.5 (9.4-63.8) ^{ef} | 221 (110-249) | 150 (8.2-499.5) | 0.036 |
| Hierro Valores de referencia (50-212µg/dl) | 80.5 (36.9-102.5) | SD | 75.5 (37.7-87) ^e | 106 (77-213) | 34 (23.5-140.3) | 0.102 |
| Bilirubina total (Valor de referencia: 0/3- 1mg/dL) | 0.5 (0.4-0.7) | 0.5 (0.4-0.6) ^d | 0.5 (0.41-0.6) ^f | 0.43 (0.36-0.62) ^g | 1.7 (0.78-4.7) | 0.034 |
| ALT (Valor de referencia: 7- 52U/L) | 37.5 (25-57) | 45 (37-53.5) ^b | 29 (20-34) ^e | 51 (39-68) | 49.3 (24.2-82.9) | 0.088 |
| AST (Valor de referencia: 13 - 39U/L) | 42 (23-55) | 54 (47-56) ^{abc} | 23 (17-29) | 37 (23-47) | 71 (23-91) | 0.004 |
| Albumina (Valor de referencia: 3.5-5.7g/dL) | 4.2 (3.7-4.4) | 3.7 (3.5-4.1) ^{abc} | 4.2 (4.1-4.4) ^e | 4.6 (4.5-4.8) ^g | 3.5 (2.8-4.3) | 0.001 |
| Fosfatasa alcalina (Valor de referencia: 34-104U/L) | 94 (74-111) | 97 (71.5-106.5) | 76 (65-87) ^f | 100 (81-114) | 153 (97-210) | 0.002 |
| GGT Valores de referencia: 9- 64 | 45.2 (42-75.4) | 41 (29-49) ^d | 35 (29-64) | 57 (45-69) | 52 (42-75.4) | 0.201 |
| Creatinina (Valor de referencia: | 0.77 (0.6-1) | 1.0(0.7-1.2) ^b | 0.64 (0.58-0.79) | 0.66 (0.61-0.97) | 1 (0.59-1.39) | 0.039 |

| | | | | | | |
|---|------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------|-------|
| 0.6 0 1.2mg/dL) | | | | | | |
| Sodio Valores de referencia: 136-145 mmol/L | 138 (136-140) | 141 (136-143) | 138 (136-140) | 139 (137-141) | 137 (134-139) | 0.305 |
| Leucocitos (Valor de referencia: 4-12X 10 ³ /uL) | 5,3 (4.5-6.3) | 5,6 (5,2-6,7) ^d | 6,0 (4,8-6,8) ^f | 5.2 (3,5-6,2) | 3,4 (2,4-4,8) | 0.038 |
| Hemoglobina (Valor de referencia: 13-16.6 g/dl) | 13.1 (11.2-15.4) | 13.3 (11.2-14.2) ^{cd} | 12.9 (11.2-14.8) ^{ef} | 16.8 (14.9-17.7) ^g | 9.1 (8.5-12) | 0.001 |
| Plaquetas (Valor de referencia: 150 - 450K/uL) | 252(157-341) | 378 (331-440) ^{abcd} | 255 (190-326) ^{ef} | 184 (134-229) | 85 (46-105) | 0.001 |
| INR Valores de referencia < 1.5 | 1.1 (1.0-1.2) | 1.1 (1.1-1.2) ^{abc} | 1 (1-1) ^f | 1 (1-1.1) | 1.35 (1-1.6) | 0.001 |
| 25 (OH) vitamin D (Valor de referencia: 30 - 100ng/mL) | 16.1 (11.7-19.1) | SD | 15.7 (11.4-18.4) | 19.2 (17.2-19.2) | 13(8.2-17) | 0.317 |
| Trigliceridos (Valor de referencia: <150mg7dL) | 141 (65-329) | SD | 165 (130-272) | 136 (111-199) | 105 (65-330) | 0.605 |
| Colesterol Total Valor de referencia: <200 mg/dl | 179 (137-217) | SD | 182 (164-218) | 186 (118-219) | 137 (112-170) | 0.283 |
| Colesterol LDL Valores de referencia: < 130 mg/dl | 105 (65-141) | SD | 115 (101-142) | 65 (50-148) | 66 (57-89) | 0.222 |
| Colesterol HDL Valores de referencia: 40-60 mg/dl | 42 (35-47) | SD | 45 (31-51) | 37 (35-42) | 41 (34-48) | 0.686 |
| HbA1c Valores de referencia: 5.7-6.4% | 5.8 (5.2-6.5) | SD | 5.9 (5.4-7.0) ^f | 6.3 (5.7-7.3) ^g | 5 (4.9-5.5) | 0.068 |

Tabla 3. (a) $p < 0.05$ control vs. espectro de MAFLD, (b) $p < 0.05$ control vs. esteatosis simple, (c) $p < 0.05$ control vs NASH, (d) control vs cirrosis por NASH, (e) $p < 0.05$ esteatosis simple vs NASH, (f) $p < 0.05$ esteatosis simple vs. Cirrosis por NASH, (g) $p < 0.05$ NASH vs cirrosis por NASH

Concentración sérica de ferritina

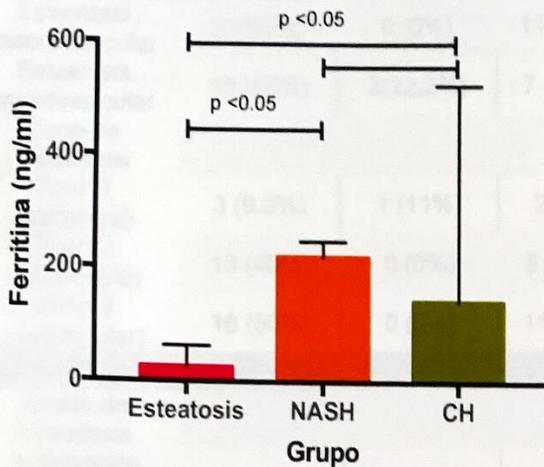


Figura 3. Concentraciones séricas de ferritina espectro MAFLD

Concentración sérica de hierro

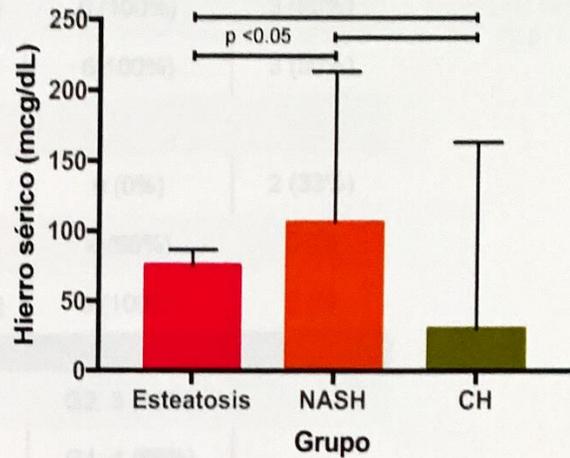


Figura 4. Concentraciones séricas de hierro espectro MAFLD

Caracterización histopatológica

Los hallazgos en la histología más relevantes se muestran en la tabla 3. Cada grupo de estudio se caracterizó de acuerdo con la presencia de esteatosis, inflamación y datos de balonización, así como a la cantidad de fibrosis hepática encontrada en la biopsia hepática, mediante tinción por H&E. De manera interesante, se observó aumento en los depósitos de hierro conforme progresó la enfermedad (en los grupos de NASH y cirrosis), así como aumento en marcadores de muerte celular en etapas avanzadas de la enfermedad (cirrosis hepática). Finalmente, también se encontraron diferencias morfométricas en las mitocondrias examinadas a través de microscopía electrónica, con un gradiente claro entre el grupo control y la esteatosis simple, y los estadios de enfermedad más graves (NASH y cirrosis). Las imágenes representativas de estos hallazgos histopatológicos se muestran en las figuras 4-7.

Tabla 4. Hallazgos histopatológicos

| | Todos (n= 32) | Control (n=9) | Esteatosis simple (n=11) | Esteatohepatitis (n=6) | Cirrosis por NASH (n=6) |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---|-----------------------------------|--|
| Esteatosis | | | | | |
| Esteatosis macrovesicular | 21(65%) | 0 (0%) | 11 (100%) | 6 (100%) | 3 (50%) |
| Esteatosis microvesicular | 18 (56%) | 2(22.2%) | 7 (63.6%) | 6(100%) | 3 (50%) |
| Zona de esteatosis | | | | | |
| Zona 1 (periportal) | 3 (9.3%) | 1 (11%) | 2 (18%) | 0 (0%) | 2 (33%) |
| Zona 2 (intermedia) | 13 (40%) | 0 (0%) | 8 (72.7%) | 4 (66%) | 0 (0) |
| Zona 3 (perivenular) | 16 (50%) | 0 (0%) | 11 (100%) | 6 (100%) | 0 (0) |
| Esteatohepatitis | | | | | |
| Grado de esteatosis | | | | G2: 3 (50%) | |
| Inflamación lobular | | | | G1: 4 (66%) | |
| Balonización hepatocelular | | | | G1: 5 (83%) | |
| Score total | | | | Leve: 5 (83%) | |
| Fibrosis | | | | | |
| G0 | 3 (9%) | 0 (0%) | 6 (54.5%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| G1 | 3 (9%) | 0 (0%) | 5 (45.5%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| G2 | 8 (25%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 4 (66%) | 0 (0%) |
| G3 | 3 (9%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (33%) | 0 (0%) |
| G4 | 6 (18%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 6 (100%) |
| Deposito de hierro | | | | | |
| Scheuer 0 | 15 (46%) | 5 (55.5%) | 6 (54.5%) | 3 (50%) | 2 (33%) |
| Scheuer 1 | 9 (28%) | 3 (33.3%) | 4 (36.3%) | 1 (16.6%) | 1 (17%) |
| Scheuer 2 | 3 (9.3%) | 0 (0%) | 1 (9%) | 2 (33%) ^{ceg} | 0 (0%) |
| Scheuer 3 | 1 (3.1%) | 1 (11%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Scheuer 4 | 3 (9.3%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 (50%) ^{dfg} |
| Deugnier | 0 (20) | 0 (23) | 0 (20) | 10 (36) ^{ceg} | 20(60) ^{dfg} |
| Apoptosis | | | | | |
| Negativo | 23 (74%) | 9 (100%) | 8 (72.7%) | 5 (83%) | 1 (20%) |
| dFocal | 5 (16%) | 0 (0%) | 3 (27.2%) | 1 (16.6%) | 1 (20%) |
| Generalizado | 3 (9.6%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 (60%) |
| Microscopía electrónica | | | | | |
| Área total valorable | | 19.4 µm ² | 19.42 µm ² | 19.42µm ² | 19.14µm ² |

| | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Área ocupada por mitocondrias | 2.45 μm^2 | 3.24 μm^2 | 4.06 | 5.77 μm^2 |
| Proporción citoplasma: mitocondrias | 12.62% | 16.54% | 21% | 29.70% |
| Tamaño mitocondrial promedio | 0.25 μm^2 | 0.162 μm^2 | 0.28 μm^2 | 0.57 μm^2 |

Tabla 4. Hallazgos histopatológicos. (a) $p < 0.05$ control vs. Espectro MAFLD, (b) $p < 0.05$ control vs esteatosis simple, (c) $p < 0.05$ control vs NASH, (d) control vs cirrosis por NASH, (e) $p < 0.05$ esteatosis simple vs NASH, (f) $p < 0.05$ esteatosis simple vs. Cirrosis por NASH, (g) $p < 0.05$ NASH vs cirrosis por NASH.

Figura 4. Grupo 4 control. A. Tinción con H&E, B. Tinción de Papanicolaou, C. Microscopía electrónica

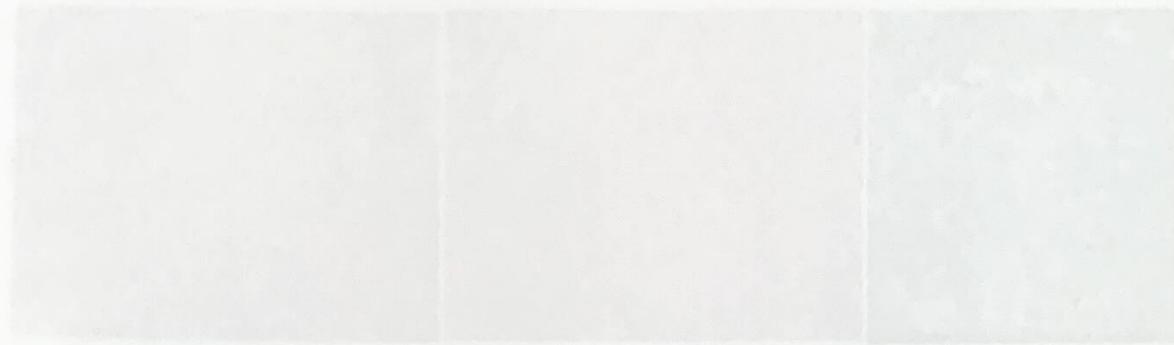


Figura 5. Grupo 5 esteatosis simple. A. Tinción con H&E, B. Tinción de Papanicolaou, C. Microscopía electrónica



Figura 6. Grupo 6 esteatosis simple. A. Tinción con H&E, B. Tinción de Papanicolaou, C. Microscopía electrónica



Figura 7. Grupo 7 control por NASH. A. Tinción con H&E, B. Tinción de Papanicolaou, C. Tinción de Papanicolaou, D. Microscopía electrónica

Imágenes de histopatología por grupo de estudio

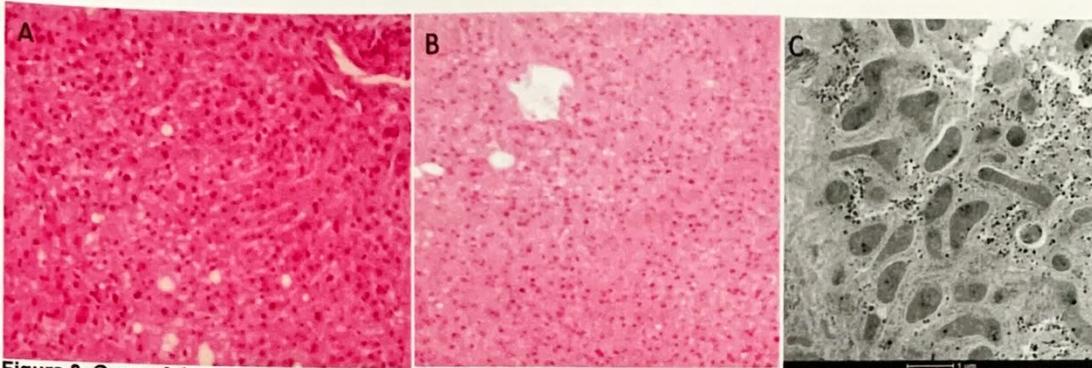


Figura 3. Grupo A (control). A. Tinción con H&E, B. Tinción de Pearls, C. Microscopía electrónica

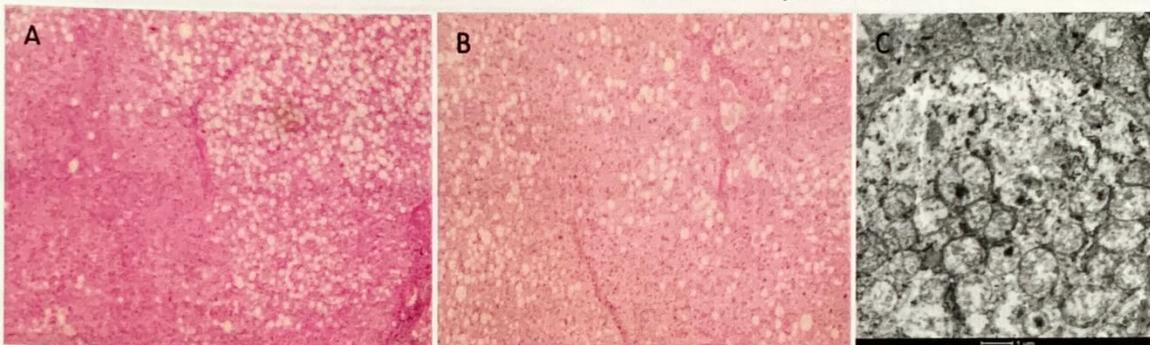


Figura 4. Grupo B (esteatosis simple) A. Tinción con H&E, B. Tinción de Pearls, C. Microscopía electrónica

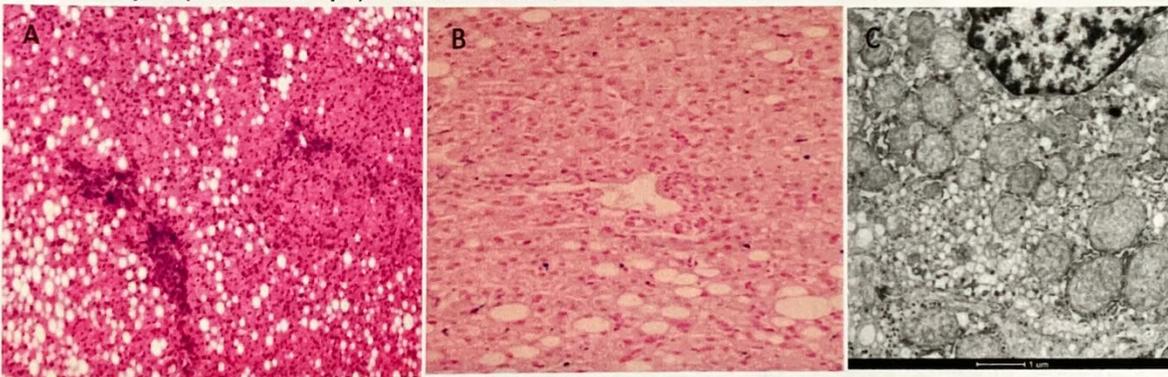


Figura 5. Grupo C (esteatohepatitis) A. Tinción con H&E, B. Tinción de Pearls, C. Microscopía electrónica

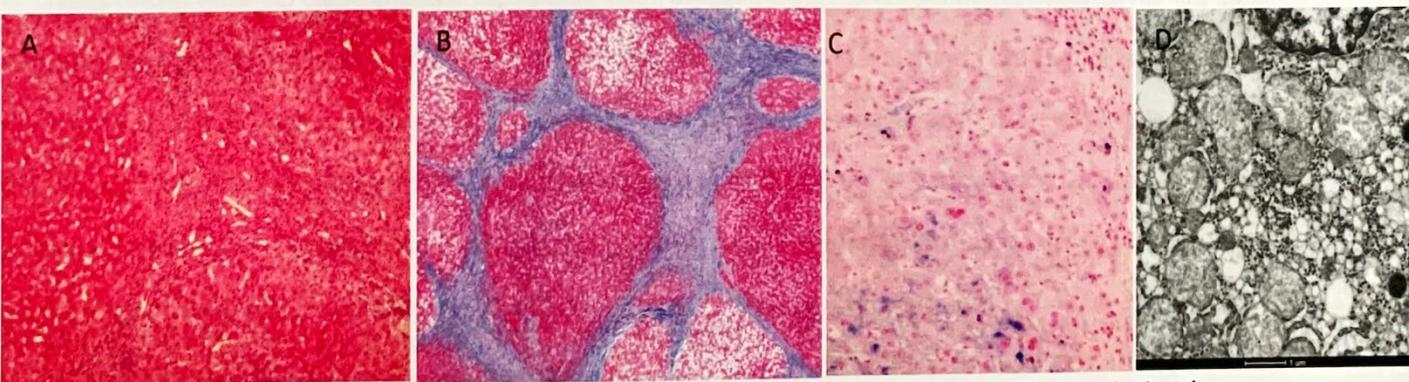


Figura 6. Grupo D (cirrosis por NASH). A. Tinción con H&E, B. Tinción de Masson, C. Tinción de Pearls, D. Microscopía electrón

Análisis de Western Blot

Finalmente, como parte de la caracterización de la ferroptosis, se analizó la expresión de las proteínas GPX4 y ACSL4, en las que destacó de manera interesante, un aumento en la expresión proteica de ACSL4, el cual se refiere como marcador de ferroptosis, desde etapas tempranas de la enfermedad (esteatosis simple) y un incremento más acentuado en las etapas avanzadas, incluyendo NASH y cirrosis hepática (Figura 7).

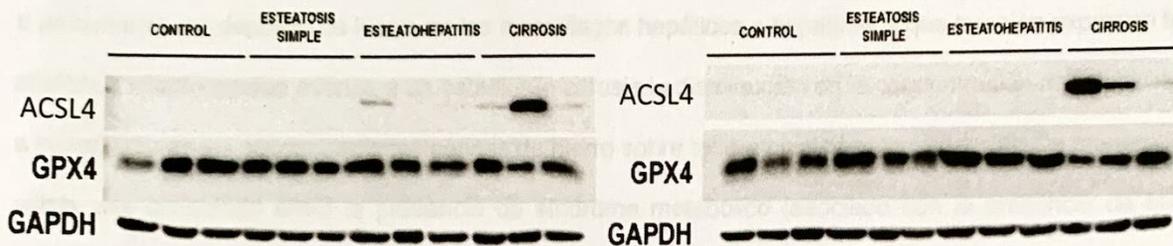


Figura 7. Expresión proteica de GPX4, ACSL4 en las diferentes etapas de MAFLD, comparado con expresión constitutiva de GAPDH.

Discusión

La ferroptosis es un tipo de muerte celular no apoptótica, dependiente de hierro descrito por Dixon en 2012, la cual se ha identificado en diferentes patologías como lesión renal aguda, cáncer de mama, hepatocarcinoma, daño por isquemia reperfusión y distintas hepatopatías crónicas como infección por virus de hepatitis C y B, incluyendo algunos modelos de hígado graso no alcohólico (26,27). Es morfológica y bioquímicamente diferente a otros tipos de muerte celular teniendo características específicas como afección de la morfología mitocondrial, la ruptura de la membrana mitocondrial externa, reducción de las crestas mitocondriales y que a diferencia de la apoptosis o necrosis no presenta ruptura de membrana plasmática, condensación de cromatina y conservando un tamaño nuclear normal (11). Bioquímicamente se ha implicado la pérdida de la actividad de la GPX4 y la peroxidación lipídica con daño a la membrana mitocondrial mediada por lipoxigenasas principalmente la enzima ACSL4, para que se produzca este tipo de muerte celular (28). Esta última se ha utilizado como un marcador de ferroptosis.

Por otro lado, el hígado es el principal órgano de almacenamiento de hierro, de manera fisiológica regula su homeostasis mediante la producción de la proteína hepcidina la cual se produce al elevarse la concentración de hierro sérico y tiene la función de inhibir a la ferroportina del enterocito y del macrófago disminuyendo la disponibilidad del hierro absorción al disminuir la absorción intestinal y liberación hacia el torrente sanguíneo respectivamente (29). En el espectro de MAFLD se ha visto a un deterioro un deterioro en la homeostasis del hierro asociado a un estado inflamatorio sistémico crónico y progresivo, en donde la liberación de interleucinas como la IL-6 y el TNF- α por parte del tejido adiposo conllevan un aumento en la concentración sérica de hepcidina que conducen a un aumento del depósito de hierro en los macrófagos hepáticos y hepatocitos que también expresan ferroportina, conforme la enfermedad avanza a un estadio de cirrosis la disminución en la concentración de hepcidina se asocia a incremento en las concentraciones séricas de hierro sobre todo a nivel hepatocelular (30) De manera interesante, existe una asociación entre la presencia de síndrome metabólico (asociado con la presencia de MAFLD) y la sobrecarga de hierro, en una entidad clínica denominada síndrome de sobrecarga de hierro dismetabólica (DIOS por sus siglas en inglés). Esto enfatiza el papel del metabolismo de hierro con la MAFLD. (31)

El estado proinflamatorio y la resistencia a la insulina conllevan a un aumento triglicéridos a nivel del hepatocito asociado a sobrecarga de hierro, haciendo plausible la ferroptosis como un mecanismo de daño y muerte celular en pacientes con el espectro de MAFLD, en quienes a su vez se ha descrito que, a mayor estadio de la enfermedad, la peroxidación lipídica funge como mecanismo principal de daño celular, mismo que observado en ferroptosis (32).

En este estudio se encontró un aumento a las concentraciones séricas de ferritina y hierro a medida que progresa la enfermedad, aumentado ambos parámetros de forma estadísticamente significativa en el grupo de NASH en comparación con el de esteatosis simple, que si bien aún se encontraban en rangos de normalidad en ambos grupos sugiere un deterioro progresivo en el mecanismo de homeostasis de hierro al avanzar la enfermedad. Estos hallazgos no fueron aislados, sino que también se observaron de manera directa en las biopsias hepáticas, encontrando mayor depósito de hierro mediante la tinción de Perls en etapas más avanzadas de la MAFLD.

En los hallazgos histopatológicos predominó la esteatosis macro vesicular sobre la micro vesicular como se ha reportado en pacientes con MAFLD, de igual manera en el grupo de NASH destacó una mayor proporción de distribución de esteatosis en la zona 3 (perivenular) en comparación con la zona 1 (periportal), lo cual como sugieren

algunos estudios pudiera tener implicaciones terapéuticas, hablándose de dos fenotipos de la enfermedad que parecen estar determinadas por un metabolismo alterado de aminoácidos de cadena ramificada, el cual está regulado por el receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma (PPAR- γ), siendo este un mecanismo propuesto de la utilidad de ligandos PPAR- γ como la pioglitazona en pacientes con NASH. Se ha descrito que los pacientes con este fenotipo presentan menor inflamación y mayor balonización de hepatocitos lo cual se corresponde con lo encontrado en este estudio (inflamación en un 66% y balonización 83%) (33,34).

Como era esperado los pacientes con NASH presentaron mayor grado de fibrosis en comparación con los de esteatosis simple. En relación con el depósito de hierro valorado por la escala de Scheuer se observó que en el grupo de cirrosis el 60% de los pacientes tenía algún grado de depósito de hierro, en el caso de pacientes con NASH este se observó en 50% de los pacientes y en esteatosis simple en un 45.5% de los casos lográndose observar un gradiente en relación con el depósito de hierro a medida que la enfermedad evoluciona.

En la escala cuantitativa de Deugnier se pudo observar de igual forma un gradiente en el depósito de hierro alcanzando puntajes máximos de 60 en aquellos pacientes con cirrosis por NASH sin embargo se puede observar cómo en algunos casos no se observó depósito de hierro y esto pudiera estar en asociación a las pérdidas de sangre y ferropenia asociadas a sangrados de tubo digestivo en pacientes con cirrosis.

En microscopía electrónica destacó la disminución del tamaño mitocondrial promedio en comparación con el grupo control lo cual como se ha comentado es un hallazgo específico de ferroptosis; si bien el tamaño mitocondrial se normaliza en el grupo de NASH e incluso se encontró mayor en cirrosis por NASH una posible explicación es la concomitancia de otros tipos de muerte celular como la apoptosis y la necrosis en estadios más avanzados, siendo la ferroptosis posiblemente un mecanismo más temprano de muerte celular.

Por último, a nivel de expresión proteica se observó que a mayor estadio de la enfermedad aumenta la expresión de la enzima ACSL4 considerada una firma de ferroptosis la cual provee los sustratos para la lipoperoxidación que es el mecanismo de daño celular que caracteriza a la esteatohepatitis. Por otro lado, se observó que la expresión de la enzima GPX4 no se modifica en las diferentes etapas de la enfermedad, siendo comparable con lo encontrado en el estudio realizado por Jie Tong et al. en donde se observó que la expresión de mRNA de GPX4 era similar en

muestras hepáticas de sujetos controles en comparación MAFLD, en donde se hipotetiza que la expresión de esta enzima pudiera estar regulada por estrés lipídico a nivel post-transcripcional y pudiera estar implicado como mecanismo de retroalimentación negativa, en donde a falta del sustrato glutatión, se sintetiza más enzima GPX4 en un intento celular de protección contra el daño oxidativo. (35)

Estos hallazgos sugieren que la ferroptosis es un tipo de muerte celular presente desde etapas tempranas de la MAFLD y como se ha visto en modelos murinos conduce a lipoperoxidación como mecanismo de daño celular que conduce al desarrollo de esteatohepatitis, lo cual lo hace una diana terapéutica con el potencial de prevenir la progresión y la morbimortalidad asociada a esta patología.

Conclusión

Los pacientes con el espectro de MAFLD tienen aumento en las concentraciones séricas de hierro y ferritina al progresar la enfermedad, acompañado de aumento del depósito de hierro hepático, a alteraciones en la morfología mitocondrial y aumento en la expresión proteica de enzimas asociadas a ferroptosis. Estos hallazgos en conjunto sugieren que la ferroptosis es un mecanismo de daño en las diferentes etapas de la MAFLD, siendo potencialmente una diana terapéutica que para evite la progresión de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. 2015; Available from: <http://www.prisma-statement.org/>
2. Lin S, Huang J, Wang M, Kumar R, Liu Y, Liu S, et al. Comparison of MAFLD and NAFLD diagnostic criteria in real world. *Liver International*. 2020 Sep 1;40(9):2082–9.
3. Ye Q, Zou B, Yeo YH, Li J, Huang DQ, Wu Y, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. 2020 Aug 1;5(8):739–52.
4. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2016 Aug 1;65(8):1038–48.
5. Higuera-de la Tijera F, Servín-Caamaño AI. Pathophysiological mechanisms involved in non-alcoholic steatohepatitis and novel potential therapeutic targets. Vol. 7, *World Journal of Hepatology*. Baishideng Publishing Group Co; 2015. p. 1297–301.
6. Zhao J, Hu Y, Peng J. Targeting programmed cell death in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD): a promising new therapy. Vol. 26, *Cellular and Molecular Biology Letters*. BioMed Central Ltd; 2021.
7. Hernández-Pérez E, León García PE, López-Díazguerrero NE, et al. Liver steatosis and nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to therapy. *Medwave*. 2016 Sep 13;16(8):e6535. Spanish, English.

8. Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, Nakasone M, Sakamoto T, Matsuoka M, Imai H, Yuet-Yin Kok C, Okochi H, Nakano H, Miyajima A, Tanaka M. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis.* 2019 Jun 18;10(6):449.
9. Kuwata H, Hara S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. Vol. 144, *Prostaglandins and Other Lipid Mediators.* Elsevier Inc.; 2019.
10. Capelletti MM, Manceau H, Puy H, Peoc'h K. Ferroptosis in liver diseases: An overview. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020 Jul 2;21(14):1–23.
11. Lu B, Chen XB, Ying MD, He QJ, Cao J, Yang B. The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Front Pharmacol.* 2018 Jan 12;8:992.
12. Handa P, Morgan-Stevenson V, Maliken BD, Nelson JE, Washington S, Westerman M, et al. Iron overload results in hepatic oxidative stress, immune cell activation, and hepatocellular ballooning injury, leading to nonalcoholic steatohepatitis in genetically obese mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol [Internet].* 2016;310:117–27. Available from: <http://www.ajpgi.org>
13. Xue H, Chen D, Zhong YK, Zhou ZD, Fang SX, Li MY, et al. Deferoxamine ameliorates hepatosteatosis via several mechanisms in ob/ob mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 Jul 1;1375(1):52–65.
14. Pitchika A, Kühn JP, Schipf S, Nauck M, Dörr M, Lerch MM, et al. Hepatic steatosis and hepatic iron overload modify the association of iron markers with glucose metabolism disorders and metabolic syndrome. *Liver International.* 2021 Aug 1;41(8):1841–52.
15. Jaruvongvanich V, Rianguiwat T, Sanguankeo A, Upala S. Outcome of phlebotomy for treating nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. Vol. 22, *Saudi Journal of Gastroenterology.* Medknow Publications; 2016. p. 407–14.
16. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, Tsuji PA, Hoffmann VJ, Schweizer U, et al. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biology.* 2016 Oct 1;9:22–31.
17. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley K v., McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *New England Journal of Medicine.* 2010 May 6;362(18):1675–85.
18. Perumpail BJ, Li AA, John N, Sallam S, Shah ND, Kwong W, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. The Role of Vitamin E in the Treatment of NAFLD. *Diseases.* 2018 Sep 24;6(4):86.
19. Liang C., Zhang X., Yang M., Dong X. Recent Progress in Ferroptosis Inducers for Cancer Therapy. *Adv. Mater.* 2019;31:e1904197.
20. Dasarathy S, Dasarathy J, Khyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: A prospective study. *Journal of Hepatology.* 2009 Dec;51(6):1061–7.
21. Boursier J, Zarski JP, de Ledinghen V, Rousselet MC, Sturm N, Lebaill B, et al. Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology.* 2013 Mar;57(3):1182–91.
22. Eddowes PJ, Sasso M, Allison M, Tsochatzis E, Anstee QM, Sheridan D, et al. Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2019 May 1;156(6):1717–30.
23. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. Vol. 65, *Metabolism: Clinical and Experimental.* W.B. Saunders; 2016. p. 1080–6.
24. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. Vol. 323, *JAMA - Journal of the American Medical Association.* American Medical Association; 2020. p. 1175–83.
25. Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol.* 2007 Sep 21;13(35):4755–60. doi: 10.3748/wjg.v13.i35.4755. PMID: 17729397; PMCID: PMC4611197.
26. Gautheron J, Gores GJ, Rodrigues CMP. Lytic cell death in metabolic liver disease. Vol. 73, *Journal of Hepatology.* Elsevier B.V.; 2020. p. 394–408.
27. Macías-Rodríguez RU, Inzaugarat ME, Ruiz-margáin A, Nelson LJ, Trautwein C, Cubero FJ. Reclassifying hepatic cell death during liver damage: Ferroptosis—a novel form of non-apoptotic cell death? Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2020.
28. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology.* 2017 Jan 1;13(1):91–8.
29. Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. Vol. 105, *Haematologica.* Ferrata Storti Foundation; 2020. p. 260–72.
30. Datz C, Müller E, Aigner E. Iron overload and non-alcoholic fatty liver disease. Vol. 42, *Minerva Endocrinologica.* Edizioni Minerva Medica; 2017. p. 173–83.
31. Sachinidis A, Doumas M, Imprialos K, Stavropoulos K, Katsimardou A, Athyros VG. Dysmetabolic Iron Overload in Metabolic Syndrome. *Current Pharmaceutical Design.* 2020 Jan 31;26(10):1019–24.

32. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. Vol. 24, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2018. p. 908–22.
33. Ajmera V, Loomba R. Do Zones of Hepatic Steatosis Associate With Subtypes and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children? Vol. 16, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. W.B. Saunders; 2018. p. 341–2.
34. Kakazu E, Sano A, Morosawa T, Inoue J, Ninomiya M, Iwata T, et al. Branched chain amino acids are associated with the heterogeneity of the area of lipid droplets in hepatocytes of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research*. 2019 Aug 1;49(8):860–71
35. Tong J, Li D, Meng H, Sun D, et al. Targeting a novel inducible GPX4 alternative isoform to alleviate ferroptosis and treat metabolic-associated fatty liver disease. *Acta Pharm Sin B*. 2022 Sep;12(9):3650-3666.