



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS
UMSNH

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS**

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

**“Evaluación de la actividad de los ciclodipeptidos
de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en la
enfermedad esteatótica hepática asociada a
disfunción metabólica en ratas obesas de la cepa
Wistar”**

TESIS

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta: L.B.T. Citlali Figueroa Guzmán

Director: D.C. Jesús Campos García

Co-Director: D.C. Lorena Martínez Alcantar

Morelia, Michoacán, agosto 2024

Agradecimientos

Agradezco a la vida por permitirme recorrer este fascinante trayecto dentro de la ciencia; en la cual he encontrado una nueva forma de darle sentido al mundo; en equilibrio entre la razón y la creatividad con una búsqueda infinita de respuestas que cada día encienden mi pasión y curiosidad. Agradezco por las experiencias que me han moldeado como persona y como profesional; por las oportunidades que he recibido, las lecciones aprendidas y por las personas maravillosas que he conocido en este viaje.

Agradezco a El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) porque el poder estudiar un posgrado, hacer lo que más amo y ser remunerada por ello es una gran fortuna y un privilegio.

Gracias a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por brindarme las herramientas y el entorno propicio para el aprendizaje y el cumplimiento de mis objetivos académicos.

Agradezco a mi comité sinodal; a la D.C. Rocío del Carmen Montoya Pérez, el D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez y el D.C. Homero Reyes de la Cruz por sus valiosas recomendaciones que enriquecieron significativamente este trabajo, por su dedicación para asegurar la calidad y rigor académico.

Agradezco al director del proyecto el D.C. Jesús Campos García por recibirme nuevamente en su grupo de trabajo; por su confianza en mí, por brindarme las herramientas necesarias para enfrentar cada desafío y por estar siempre dispuesto a ofrecerme su orientación.

Agradezco a la co-directora del proyecto la D.C. Lorena Martínez Alcantar, por su guía, paciencia y apoyo constante. Su conocimiento y experiencia han sido una fuente de inspiración y aprendizaje.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio de Biotecnología Microbiana; quienes con su colaboración y amistad han hecho de este un entorno de trabajo estimulante y productivo. En especial agradezco a Marlene Campos con quien trabajamos en conjunto una parte de este proyecto, haciendo un productivo equipo

gracias a su colaboración y disponibilidad. Su apoyo y compañía siempre hacían más amenos los largos días de trabajo.

Agradezco a la Universidad de Guanajuato y el Departamento de Ciencias Aplicadas al Trabajo por recibirme durante una estancia en sus instalaciones. Agradezco a la D.C. Elizabeth Sánchez Duarte por el tiempo que dedicó para compartir sus conocimientos. Su enfoque detallista y experiencia enriquecieron significativamente este trabajo. Agradezco a el D.C. Luis Alberto Sánchez Briones su entusiasmo por la investigación y su disposición para compartir su experiencia fueron clave en mi aprendizaje. Estoy profundamente agradecida por la oportunidad de haber trabajado con ustedes en un entorno tan estimulante y positivo.

Quiero dedicar un especial agradecimiento a mis padres, quienes han sido un pilar constante de apoyo y guía. Agradezco a mi mamá, Ana del Rocío, su compromiso con la excelencia en todo lo que hace y su pasión por su vocación han sido un gran ejemplo en mi vida. Agradezco a mi papá, Cuauhtémoc, por ser una guía en cada etapa de mi vida; y una fuente de sabiduría, inspiración y fortaleza. Me siento afortunada y agradecida de tenerlos en mi vida.

Agradezco a mis hermanos, su amor y compañía han sido una parte fundamental de esta etapa y en mi vida en general. Agradezco a mi hermana, Verónica por ser mi mejor amiga, compartiendo conmigo cada aventura y acompañándome en los momentos de incertidumbre. A mi pequeña sobrina Elenor, quien ha traído a nuestras vidas una inmensa alegría añadiendo un brillo especial a este capítulo de mi vida.

Agradezco a Jordy, su presencia en mi vida ha sido un gran aliento. Gracias por brindarme el ánimo necesario en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada pequeño logro.

Índice de contenido

1. Introducción	11
1.1 Obesidad y tejido adiposo	11
1.1.1 Adiposidad abdominal	13
1.2 Síndrome metabólico	15
1.2.1 Resistencia a la insulina	17
1.3 Hígado	18
1.3.1 Célula estrellada	22
1.3.2 Célula de Kupffer	23
1.3.3 Metabolismo hepático	25
1.4 Enfermedad esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD)	32
1.4.1 Fisiopatología de la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica	34
1.4.1.1 Lipotoxicidad en MASLD	35
1.4.2 Fibrosis	42
1.4.3 Diagnóstico de MASLD	43
1.4.4 Tratamiento para MASLD	46
1.4.5 Marcadores moleculares en MASLD	48
1.5 Ciclodipéptidos	53
2. Justificación	57
3. Hipótesis	58
4. Objetivo general	59
4.1 Objetivos específicos	59
5. Metodología	60
5.1 Experimentos con animales	60
5.1.1 Pruebas de tolerancia metabólica	62
5.2 Análisis histopatológico	63
5.3 Análisis de la expresión de genes	63
5.4 Análisis del estrés oxidativo	65
5.4.1 Análisis de peroxidación lipídica	65
5.4.2 Determinación de glutatión	66
6. Resultados	67
6.1 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la ganancia de peso de ratas con MASLD	67

6.2 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre el metabolismo energético en ratas con MASLD.....	69
6.3 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la supervivencia de ratas con MASLD	73
6.5 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre estrés oxidativo presente en el hígado de ratas con MASLD	77
6.6 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la expresión de componente de la Vía Akt/mTOR en el hígado de ratas con MASLD	79
6.7 efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la exportación de vLDL y β -oxidación en el hígado de ratas con MASLD	81
6.8 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la lipogénesis <i>de novo</i> y transporte de ácidos grasos en el hígado de ratas con MASLD.....	83
6.9 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la inflamación y la fibrosis en el hígado de ratas con MASLD	85
6.10 Efecto de los CDPs de PA01 sobre la funcionalidad del hígado en ratas con MASLD	87
6.11 Efecto de los CDPs de PA01 sobre la histopatología del hígado en ratas con MASLD	87
7. Discusión.....	92
7.1 Mecanismo de acción propuesto del efecto de los CDPs en MASLD.....	112
8. Conclusión	113
9. Referencias	114
10. Anexos.....	141

Índice de figura

1. Obesidad y síndrome metabólico.....	14
2. Organización del tejido hepático	20
3. Zonación del tejido hepático	21
4. Organización del sinusoide hepático	23
5. Metabolismo de glucosa en el hepatocito	26
6. Metabolismo de lípidos en el hepatocito	27
7. Etapas de MASLD	36
8. Glutación	40
9. Hallazgos histopatológicos en MASLD	44
10. Fotografías representativas de integrantes de cada grupo	68
11. Ganancia de peso y consumo de alimento	68
12. Circunferencia abdominal y longitud	69
13. Prueba de resistencia a la insulina	71
14. Prueba de tolerancia a la glucosa.....	72
15. Porcentaje de supervivencia	73
16. Peso del hígado.....	74
17. Peso del tejido adiposo	75
18. Peso de órganos.....	76
19. Estrés oxidativo y respuesta antioxidante.....	78
20. Vía mTOR.....	80
21. Síntesis de vLDL y β -oxidación.....	82
22. Lipogénesis <i>de novo</i>	83
23. Transporte de ácidos grasos	84
24. Fibrosis e inflamación	86
25. Abúmina sérica	87
26. Número y tamaño de las gotas lipídicas	88
27. Puntuación NAS	89
28. Histología hígado hematoxilina y eosina.....	90
29. Histología hígado tricrómina de Masson.....	91
30. Efectos del tratamiento con CDPs en MASLD	112

31. Fotografías representativas de integrantes de cada grupo ANEXO	141
32. Gananacia de peso, consumo de alimento y circunferencia abdominal ANEXO	142
33. Masa de los órganos ANEXO	143
34. Prueba de resistencia a la insulina ANEXO	144
35. Fotografías de órganos ANEXO	145

Índice de cuadros

1. Obesidad y síndrome metabólico.....	16
2. Evaluación NAS	45
3. Proporciones para la preparación de la dieta obesogénica	60
4. Composición de la dieta obesogénica	60
5. Composición de la dieta regular	61
6. Organización de los grupos ANEXO	61
7. Organización de los grupos	62
8. Oligos para RT-PCR	65

Resumen

Los ciclodipeptidos (CDPs) producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA01 han atraído la atención por su actividad antibacteriana, antifúngica, anticancerígena y antiobesidad; reportes indican que poseen la capacidad de modular genes relacionados con diversos procesos biológicos. En el presente trabajo se analizó su efecto sobre la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica (MASLD) en ratas alimentadas de forma crónica (45 semanas) con una dieta obesogénica con el objetivo desarrollar un estado avanzado de la enfermedad; las ratas fueron tratadas con CDPs durante 10 semanas tres veces por semana administrando una dosis de 5 mg/kg. Los resultados obtenidos indican que los CDPs mejoran el estado de MASLD; disminuyendo la ganancia de peso, mejorando el metabolismo de glucosa, disminuyendo el estrés oxidativo y modulando la expresión de diversos genes relacionados al metabolismo de lípidos; los animales tratados también mostraron una mejora en los marcadores histopatológico asociados a la enfermedad. Concluyendo que el tratamiento con CDPs disminuye la progresión de MASLD en ratas obesas.

Palabras clave: tratamiento – ciclodipeptidos – MASLD – metabolismo - ratas

Abstract

The cyclodipeptides (CDPs) produced by *Pseudomonas aeruginosa* PA01 have attracted attention for their antibacterial, antifungal, anticancer, and anti-obesity activities; reports indicate that they can modulate genes related to various biological processes. In the present study, their effect on metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) was analyzed in rats fed chronically (45 weeks) with an obesogenic diet to develop an advanced state of the disease; the rats were treated with CDPs for 10 weeks, three times a week, administering a dose of 5 mg/kg. The results indicate that CDPs improve the state of MASLD, reducing weight gain, improving glucose metabolism, decreasing oxidative stress, and modulating the expression of various genes related to lipid metabolism; treated animals also showed an improvement in histopathological markers associated with the disease. In conclusion, treatment with CDPs reduces the progression of MASLD in obese rats.

Keywords: treatment – cyclodipeptides – MASLD – metabolism - rat

1. Introducción

1.1 Obesidad y tejido adiposo

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como una acumulación de grasa anormal y excesiva; cuya causa es un desequilibrio energético (OMS, 2023). La obesidad es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades, entre las cuales se encuentran, diabetes tipo 2, la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Jin et al. 2023).

A pesar de que la relación entre la obesidad y la mortalidad se reconoce desde hace más de 20 años; actualmente representa un problema de salud pública que aumenta rápidamente, y no se limita a países industrializados. Tomando en cuenta el número total de personas afectadas a nivel mundial se le considera la pandemia más grande de todos los tiempos (Gjermeni et al., 2021); la OMS estima que uno de cada cinco adultos en el mundo serán obesos para 2025 (Wen et al., 2022).

En México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) el 75.2% de la población adulta (mayor o igual a 20 años de edad) padece obesidad o sobrepeso (ENSANUT, 2022).

La etiopatogenia de la obesidad es un fenómeno complejo; el aumento de la ingesta de alimentos en relación al gasto energético es la teoría más sencilla sobre los mecanismos que conducen al aumento de masa corporal, sin embargo, es algo limitada considerando que este es un fenómeno de origen muy heterogéneo en el que pueden intervenir no solo factores nutricionales, si no, también genéticos (González, 2013).

La obesidad se reconoce como un trastorno inflamatorio crónico de bajo grado, este estado sistémico acaba afectando la homeostasis metabólica a largo plazo, además de la afección multiorgánica en órganos como páncreas, hígado, músculo y sistema cardiovascular (Uranga & Keller, 2019).

La energía consumida a través de los alimentos es utilizada para funciones corporales, termogénesis y actividad física, pero si excede las necesidades se almacena en forma de triacilglicéridos en las células especializadas del tejido adiposo llamadas adipocitos (Mingrone et al., 2015).

El tejido adiposo está compuesto por: adipocitos, pre-adipocitos, células del sistema inmune, matriz extracelular y vasos sanguíneos; siendo un tejido esencial para la vida, pero en casos extremos de abundancia (obesidad) se provocan alteraciones metabólicas significativas e incrementa el riesgo de mortalidad (Flores-Lázaro et al., 2011).

Existen tres tipos de tejido adiposo: blanco, pardo y beige localizados en diferentes depósitos a través del cuerpo. El adipocito blanco se especializa en el almacenamiento de lípidos; el pardo en termogénesis, disipando la energía en forma de calor (Sakers et al., 2022); por otra parte, el adipocito beige se ha demostrado que puede responder a ciertos estímulos y tener características similares al adipocito pardo, pero a pesar de sus similitudes tienen localizaciones anatómicas distintas (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020).

El tejido adiposo blanco se caracteriza por su composición de adipocitos que contienen una vacuola lipídica en la cual se almacenan lípidos para su utilización cuando exista una demanda elevada de energía; también secretan adipocinas, las cuales actúan como hormonas con una amplia gama de funciones relacionadas con metabolismo, inflamación, transporte de lípidos, entre otras (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2020).

La expansión del tejido adiposo en un estado de obesidad esta medida por hipertrofia (aumento en el tamaño de los adipocitos), hiperplasia (mayor número de adipocitos) o ambas (Sung et al., 2016) esto con el fin de almacenar el exceso de energía en forma de triacilglicéridos. Virtue y Puig en el año 2010 propusieron la “hipótesis de la expansibilidad del tejido adiposo” en la cual se establece que todos los individuos poseen una capacidad máxima de expansión adiposa que está determinada tanto por factores genéticos como por ambientales; una vez que se alcanza este límite el tejido adiposo deja de almacenar la energía de manera

eficiente y los lípidos comienzan a acumularse en células no adiposas provocando lipotoxicidad, resistencia a la insulina, apoptosis e inflamación (Virtue & Puig, 2010).

Esta hipótesis es importante para comprender lo que suele observarse en pacientes con lipodistrofias (enfermedad genética que se caracteriza por diferentes grados de incapacidad para expandir el tejido adiposo), quienes presentan resistencia a la insulina grave, síndrome metabólico, enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica y/o hasta diabetes (Godoy-Matos et al., 2020).

Diversos estudios han reportado que la hipertrofia de los adipocitos da como resultado una función anormal y conduce a la resistencia a la insulina. Los adipocitos hipertrofiados muestran un alto nivel de necrosis, este aumento en la muerte de los adipocitos induce un estado de inflamación con la sobreproducción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 6 y 8 (IL-6, IL-8) (Sung et al., 2016). Estudios clínicos respaldan que el aumento en el tamaño de los adipocitos se asocia con esteatosis hepática y otros marcadores de disfunción metabólica (Harvey et al., 2020).

1.1.1 Adiposidad abdominal

La distribución del tejido adiposo, juega un papel importante en el incremento de factores de riesgo (Flores-Lázaro et al., 2011); los dos compartimientos principales son: tejido adiposo visceral (recubre los órganos internos) y tejido adiposo subcutáneo (se encuentra debajo de la piel), cada uno con diferentes características metabólicas; se considera que el depósito subcutáneo es relativamente benigno e incluso beneficioso y por el contrario, el depósito visceral se asocia a disfunción metabólica y resistencia a la insulina (Wibmer et al., 2021).

Tanto el tejido adiposo visceral como subcutáneo expresan un conjunto de genes idénticos, pero su nivel de expresión es distinto; la expresión de citocinas proinflamatorias es mayor en el tejido adiposo visceral contribuyendo a la inflamación crónica característica de la obesidad (Mittal, 2019).

Una de las hipótesis propuesta para explicar el vínculo entre la obesidad visceral y morbilidades es la “hipótesis visceral/portal” en la que se indica que una mayor tasa de lipólisis por parte de la grasa visceral, es decir, una mayor liberación de ácidos grasos libres a la circulación portal provocando una alteración en la sensibilidad a la insulina hepática, evitando la supresión de la gluconeogénesis, llevando a una mayor producción endógena de glucosa, aumentando la esterificación de los ácidos grasos y dando como resultado un aumento de la síntesis y secreción de vLDL siendo liberadas a la circulación sistémica, provocando cambios en el perfil de lípidos circulantes; en paralelo, el aumento de ácidos grasos libres en la circulación puede afectar la acción de la insulina en otros tejidos (Figura 1) (Yang & Smith, 2007).

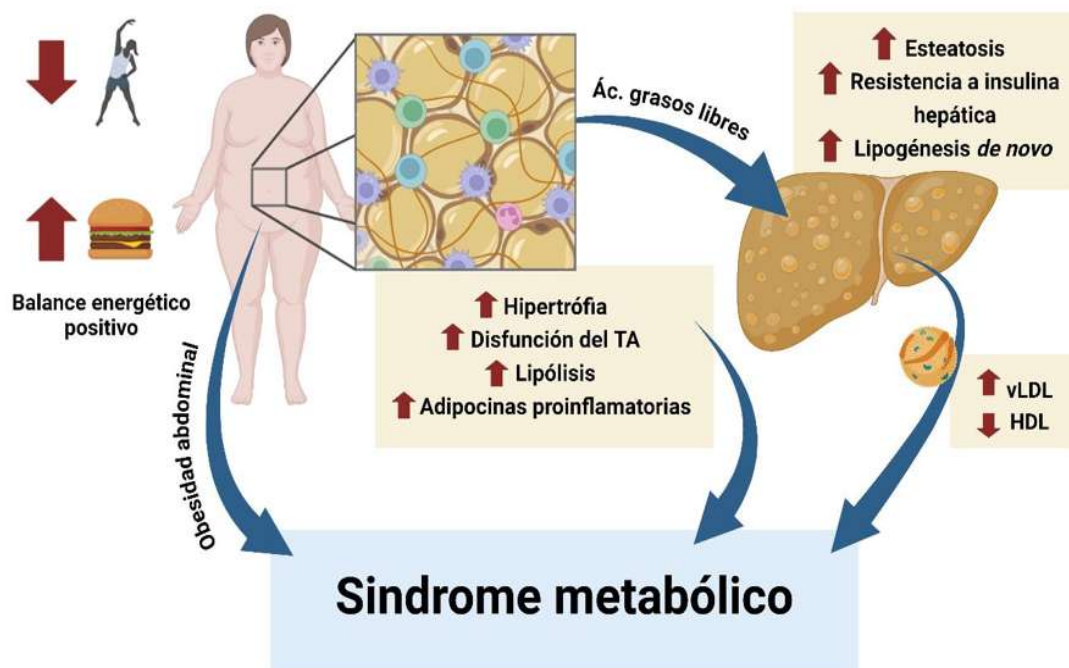


Figura 1. Obesidad y tejido adiposo. En la obesidad como resultado de un balance energético positivo hay un exceso de energía que se almacena en forma de triacilglicéridos en las células especializadas del tejido adiposo llamadas adipocitos. El depósito visceral de TA se asocia a disfunción metabólica y resistencia a la insulina. TA: tejido adiposo. vLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. HDL: lipoproteínas de alta densidad. Imagen realizada en BioRender.

Se han desarrollado diversas técnicas para la evaluación de la grasa visceral. El Índice de Masa Corporal (IMC) es una herramienta común de diagnóstico utilizada para caracterizar la obesidad, sin embargo, esta no puede distinguir entre la masa corporal magra y grasa, y debido a ello se considera que tiene poca correlación con comorbilidades asociadas a la obesidad (Wajchenberg, 2000). En su lugar, se han empleado parámetros antropométricos como la circunferencia abdominal, brindando ventajas por ser un método fácil de estandarización y aplicación clínica (Ross et al., 2020). Se ha encontrado que la circunferencia abdominal se correlaciona fuertemente con el tejido adiposo visceral y todos los factores de riesgo metabólico (Grundy, 2013).

1.2 Síndrome metabólico

En 1988, Reaven definió por primera vez al “síndrome metabólico X” (hoy conocido como síndrome metabólico) como un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares donde incluyo la hiperinsulinemia, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión (Fahed et al., 2022).

En la caracterización de Reaven la grasa corporal total inicialmente no participó como un indicador debido a que se encontraron casos en los que no se mostraba asociación entre esta y la resistencia a la insulina. Posteriormente diversos análisis demostraron que la distribución de la grasa corporal era el elemento que faltaba en la ecuación. Actualmente se sabe que los individuos con obesidad visceral tienen un mayor riesgo de desarrollar resistencia a la insulina (Fahed et al., 2022). En el año de 2005, la Federación Internacional de Diabetes (FID) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) propusieron que el enfoque principal del síndrome metabólico, debería ser la adiposidad visceral (Cornier et al., 2008).

El síndrome metabólico es una serie de anormalidades metabólicas (Lizarzaburu, 2013) no considerada una enfermedad per se, si no un término que sirve como referencia para predecir el riesgo de padecer otras enfermedades (Cornier et al.,

2008). Considerando la obesidad como su elemento central (Dobrowolski et al., 2022).

En el año 2009 representantes de la *International Diabetes Federation* (IDF) y *American Heart Association/ National Heart, Lung, and Blood Institute* (AHA/NHLBI) discutieron la unificación de criterios para la definición del síndrome metabólico, llegando al acuerdo de que este debía ser definido como la presencia de tres de los siguientes componentes:

Componente	Descripción
Incremento en la circunferencia abdominal	Definición específica para la población y país.
Elevación de triglicéridos	Mayores o iguales 150 mg/dL (o en tratamiento hipolipemiante específico)
Disminución del colesterol HDL	Menor de 40 mg% en hombres o menor de 50 mg% en mujeres (o en tratamiento con efecto sobre el HDL).
Elevación de la presión arterial	Presión arterial sistólica (PAS) mayor o igual a 130 mmHg y/o PAD mayor o igual a 85 mmHg (o en tratamiento antihipertensivo).
Elevación de la glucosa en ayunas	Mayor o igual a 100 mg/dL (o en tratamiento con fármacos por elevación de glucosa).

Cuadro 1. Componentes del síndrome metabólico y su descripción. (Lizarzaburu, 2013).

Los niveles de insulina en sangre no se incluyen dentro de los cinco criterios, ya que la medición de este parámetro para la detección a gran escala presenta complicaciones en la práctica clínica (Fahed et al., 2022). En su lugar, se emplea

la circunferencia de la cintura, debido a que se asocia fuertemente a la resistencia a la insulina, debido a que existe un aumento en la producción de citocinas pro inflamatorias por parte del tejido adiposo visceral (TNF- α , IL-6, resistina) y una disminución de la adiponectina, la cual tiene un rol importante en la insulinosensibilidad (Pollak, 2016).

Aunque la etiología específica del síndrome metabólico no está clara, ni se puede unificar; la adiposidad abdominal y la resistencia a la insulina se han propuesto como dos características que parecen encontrarse en el centro de la fisiopatología y sus componentes individuales (Cornier et al., 2018).

1.2.1 Resistencia a la insulina

Posterior a la ingesta de alimentos las células β pancreáticas producen insulina en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en sangre para regular la homeostasis sistémica de la glucosa. La sensibilidad tisular a la insulina se caracteriza por la capacidad de una determinada concentración de insulina para corregir los niveles de glucosa en sangre. Este proceso implica una sofisticada cascada de transducción de señales dependientes de la insulina, que controla diversos procesos en los órganos sensibles (Singh et al., 2022).

La resistencia a la insulina se define como una condición fisiopatológica en la cual la concentración normal de insulina no produce adecuadamente la respuesta normal de la insulina en sus tejidos diana, como: tejido adiposo, músculo e hígado. Bajo esta condición, las células β pancreáticas secretan más insulina (hiperinsulinemia) para superar la hiperglucemia (Meshkani et al., 2009). Cuando el páncreas no puede suministrar un exceso de insulina en humanos con resistencia a la insulina, se produce un defecto importante en la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo, lo que da lugar a hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, características definitorias de la diabetes tipo 2 (Singh et al., 2022).

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo contribuye de forma importante a la fisiopatología del síndrome metabólico. En condiciones normales la insulina inhibe

la lipólisis (movilización de ácidos grasos libres), pero en el contexto de resistencia a la insulina no existe esta supresión adecuada de la lipólisis dando como resultado la liberación de más ácidos grasos libres en sangre (Cornier et al., 2018). En individuos obesos se han identificado altos niveles de ácidos grasos libres en circulación, los cuales se depositan en tejidos no adiposos sensibles a la insulina y resulta en lipotoxicidad, una causa importante de la resistencia a la insulina. Los metabolitos lipídicos de ácidos grasos libres como acil CoA, diacilglicerol y ceramidas activan algunas formas de PKC (proteína cinasa C), IKKb (inhibidor de la subunidad beta de la quinasa del factor nuclear kappa B) y JNK (quinasas c-Jun N-terminal), que inducen la fosforilación de Ser/Thr de IRS-1 y, a su vez, inhiben la fosforilación normal de tirosina estimulada por insulina de IRS-1 (sustrato 1 del receptor de insulina), lo que da como resultado el deterioro de la señalización de insulina (Jin et al., 2023).

1.3 Hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano, comprende del 2% al 3% del peso corporal adulto (Ishibashi et al., 2009); se ubica en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal debajo del hemidiafragma derecho protegido por la caja torácica (Abdel-Misih & Bloomston, 2010). El hepatocito es el componente estructural básico del hígado y representa el 60% de la población celular y el 80% del volumen total de este órgano; tiene una forma poligonal y mide de 25 a 40 μm (Krishna, 2014).

La principal función del hígado es mantener la homeostasis metabólica. El hepatocito es capaz de almacenar glucógeno en su interior y liberar glucosa al torrente sanguíneo en periodos de ayuno, alternando la oxidación de lípidos y glucosa, además de ser uno de los principales centros de síntesis de proteínas. El hígado es también la primera línea de defensa para la desintoxicación de drogas y alcohol. Este órgano logra llevar a cabo funciones fisiológica tan vitales y

multifacéticas gracias a su compleja arquitectura (Cunningham & Porat-Shliom, 2021).

Las secciones histológicas del hígado se dividen en lóbulos para su estudio, cada lóbulo hepático tiene en el centro la vena central formando un hexágono que en cada una de sus vértices se encuentra la tríada portal (conformada por la vena portal, la arteria hepática y el conducto biliar) descrito por primera vez en 1833 por Kiernan (Figura 2) (Maynard & Downes, 2019).

En 1906, Mall propuso el acomodo del tejido hepático en forma de lóbulo portal (Figura 2), el cual tiene una forma triangular y se centra en la tríada portal, basado en el flujo de la bilis, con la vena centrar en las esquinas; este acomodo muestra el sistema conductor como el centro de estudio, sin embargo, no fue ampliamente aceptado (Maynard & Downes, 2019).

La estructura microscópica puede conceptualizarse de varias maneras. El acino es una unidad que contiene un pequeño espacio porta en el centro y vénulas hepáticas terminales en la periferia (Figura 2) (Suriawinata et al., 2007). Mientras que el lóbulo hepático representa la unidad más estructural del tejido, el acino hepático se considera la unidad funcional en términos de flujo sanguíneo (Kietzmann, 2017).

El lóbulo acino se divide en tres (Figura 2); la zona 1 es la más cercana a la tríada portal la cual suministra oxígeno y nutrientes a los hepatocitos, la zona 2 conecta las zonas, y la zona 3 es la más próxima a la vena central, la cual realiza funciones de glucogénesis, desintoxicación y lipogénesis (Nair & Weiskirchen, 2024). A medida que la sangre fluye en dirección a la vena central, los hepatocitos absorben oxígeno, nutrientes y metabolizan hormonas creando un microambiente con un gradiente, impulsando la expresión génica diferencial y la posterior heterogeneidad funcional de los hepatocitos dentro del lóbulo (Figura 3), fenómeno denominado “zonación hepática” (Cunningham & Porat-Shliom, 2021).

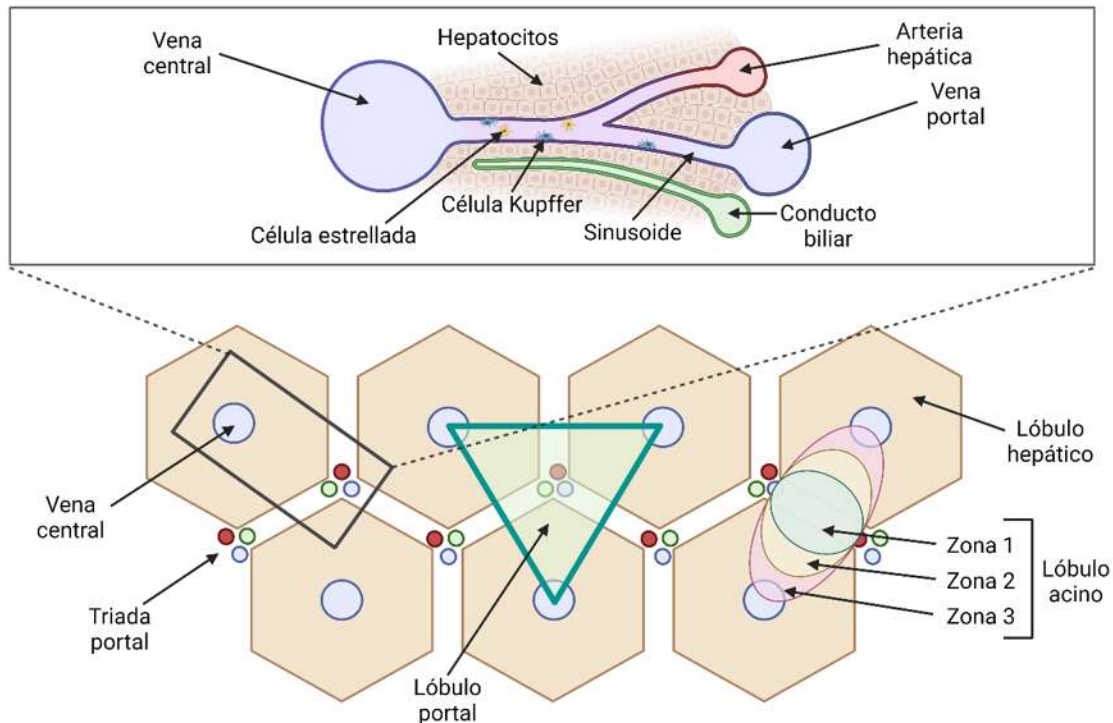


Figura. 2. Organización del tejido hepático. Las secciones histológicas del hígado se dividen en lóbulos para su estudio. El lóbulo hepático con la vena central como referencia; el lóbulo portal con la triada portal al centro y el lóbulo acino que a su vez se divide en tres zonas según la cercanía de los hepatocitos a la vena central. La triada portal se conforma por la arteria hepática, la vena portal y el conducto biliar. Imagen realizada en BioRender.

Los procesos que requieren mucha energía, como la secreción de proteínas y gluconeogénesis, se realizan en las células portales (zona 1) en donde el oxígeno es abundante. Los hepatocitos pericentrales (zona 2) participan preferentemente en el metabolismo xenobiótico, biosíntesis de ácidos biliares y glucólisis; a su vez, estos captan el exceso de glutamato y lo convierten en glutamina, manteniendo el equilibrio en la entrada y salida de los aminoácidos. Los hepatocitos periportales (zona 3) realizan lipogénesis, captan glucosa y realizan glucólisis (Figura 3) (Manco & Itzkovitz, 2021).

La zonación del hígado es importante para comprender las enfermedades hepáticas, muchas de las cuales se desarrollan de forma no uniforme en todo el lóbulo (Figura 3) (Cunningham & Porat-Shliom, 2021).

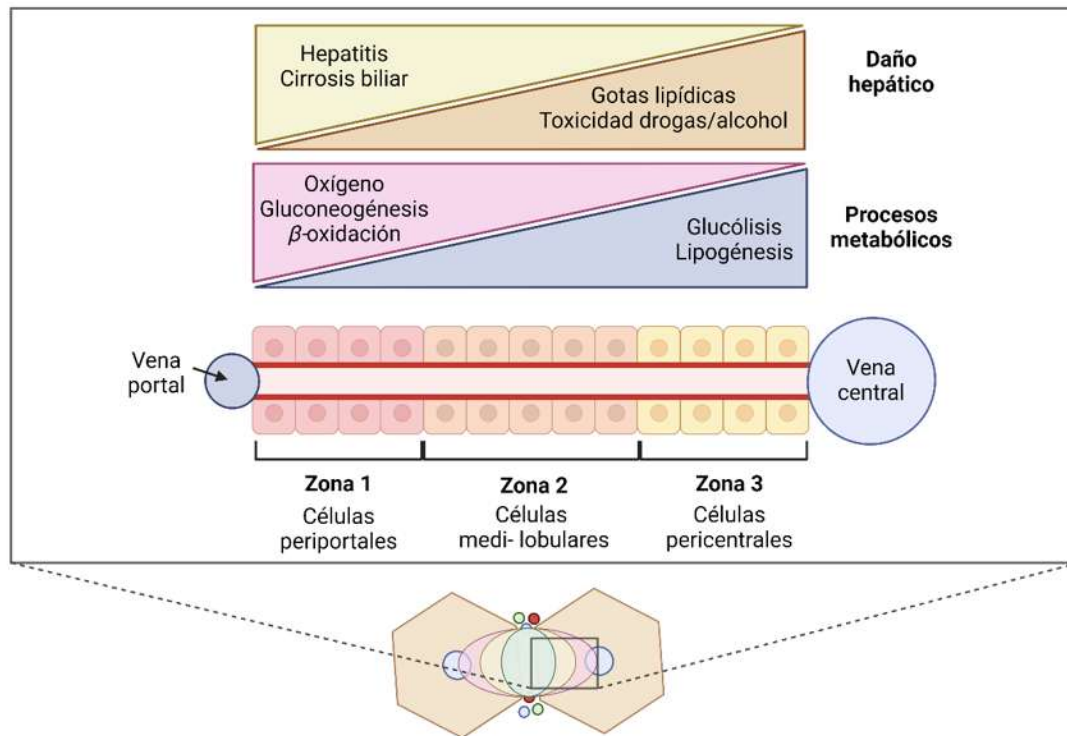


Figura. 3. Zonación del tejido hepático. El lóbulo acino divide el tejido hepático en tres zonas según la cercanía de los hepatocitos a la vena central. Los hepatocitos más cercanos son pericentrales, los más lejanos periportales y los que se encuentran en medio medi-lobulares; según la ubicación de los hepatocitos dependen ciertas características a lo que se llama "zonación". Muchas de las enfermedades hepáticas no se distribuyen de forma uniforme por todo el lóbulo si no que se observan con un patrón zonal. Imagen realizada en BioRender.

Es desconocido el papel que juega la zonación en la autorregeneración del hígado, pero se ha sugerido que los hepatocitos en proliferaciones se distribuyen de forma uniforme en todo el lóbulo (Cunningham & Porat-Shliom, 2021).

A nivel celular el hígado se compone por diferentes tipos de células que se dividen en: células parenquimatosas (hepatocitos) y células no parenquimatosas (célula estrellada y de Kupffer) (Ishibashi et al., 2009).

1.3.1 Célula estrellada

Las células estrelladas hepáticas son células mesenquimales que comprenden del 5% al 10% de todas las células residentes del hígado localizadas en el espacio de Disse (Figura 4). Estas residen en un estado inactivo en el hígado normal y se activan en respuesta a una lesión hepática.

En estado inactivo las células estrelladas presentan gotas de lípidos citoplasmáticas que contienen metabolitos de vitamina A (retinol), hasta el 95% de todo el almacenamiento de los retinoides en el cuerpo se encuentran en las células estrelladas; además, estas gotas de lípidos contienen también triacilglicéridos y pequeñas cantidades de colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos libres. El consumo de triacilglicéridos en la dieta tiene un poco efecto en el contenido de lípidos en las gotas de las células estrelladas (Kamm & McCommis, 2022).

La activación de las células estrelladas lleva a la diferenciación del fenotipo adipogénico al miofibroblástico con la pérdida de las gotitas de lípidos y aumento de proliferación celular, señales proinflamatorias y desarrollo de retículo endoplásmico rugoso maduro para aumentar la producción de matriz extracelular; el objetivo principal es mejorar la acumulación local de matriz extracelular capaz de formar una cicatriz en el área de la lesión hepática; estudios también indican que las células estrelladas cumplen un papel importante en la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática (Kamm & McCommis, 2022).

Los factores de crecimiento producidos por las células estrelladas hepáticas como PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF β (Factor de crecimiento transformante β), FGF (Factor de crecimiento fibroblástico), el factor de crecimiento endotelial vascular y la angiopoyetina, son importantes para la regeneración del hígado fomentando la formación de nueva vasculatura y angiogénesis (Kamm & McCommis, 2022).

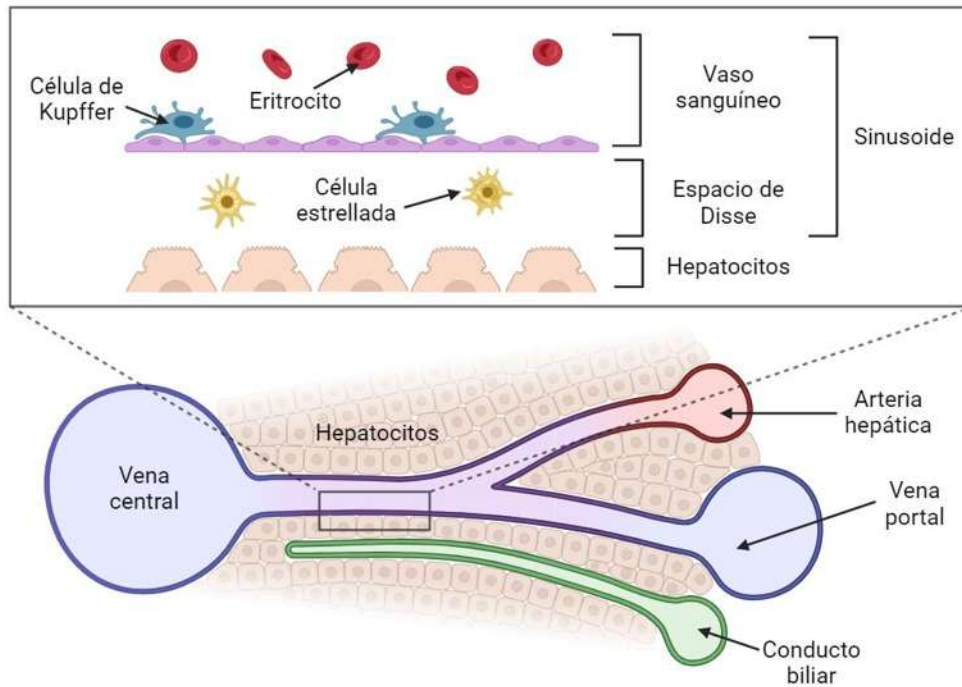


Figura. 4. Organización del sinusoide hepático. Las filas de hepatocitos se encuentran separados por el espacio sinusoidal, el cual se conforma por el vaso sanguíneo y el espacio de Disse. En el vaso sanguíneo se encuentran los eritrocitos y las células de Kupffer cercanas a las células endoteliales. El espacio de Disse se encuentra delimitado por las células endoteliales y los hepatocitos; en donde se localizan las células estrelladas. Imagen realizada en BioRender.

1.3.2 Célula de Kupffer

Las células de Kupffer fueron identificadas por primera vez por Karl Wilhem von Kupffer en 1879; después de una ardua investigación realizada por Tadeusz Browicz se edificaron como macrófagos residentes del tejido hepático. Las células de Kupffer se localizan dentro de la luz de los sinusoides hepáticos (Figura 4) y son capaces de adherirse a las células endoteliales que componen las paredes de los vasos sanguíneos (Nguyen-Lefebvre & Horuzsko, 2015).

El hígado actúa como un sistema de filtración para el cuerpo, elimina productos derivados del intestino de la vena arterial y porta del hígado (Weiyang et al., 2022); por lo tanto, gracias a su posición estratégica, las células de Kupffer son las primeras células inmunitarias del hígado que se encuentran en contacto con las endotoxinas bacterianas intestinales y desechos microbianos. También participan en el

metabolismo de múltiples compuestos como complejos proteicos, lípidos y la eliminación de células apoptóticas en la circulación (Nguyen-Lefebvre & Horuzsko, 2015).

El aumento de la necrosis hepatocelular resultado de las lesiones hepáticas son la principal fuente de activadores de la células de Kupffer; una vez activados, muestran la capacidad de diferenciarse a macrófagos de tipo M1 (clásicos) o macrófagos de tipo M2 (alternativo), estas poblaciones difieren en la capacidad de responder a estímulos y en el repertorio de citocinas y receptores que expresan después de su activación; teniendo en común la alta actividad fagocítica y secretora de citocinas (Weiyang et al., 2022).

La diferenciación a la población M1 puede ser inducida por interferón gamma (IFN- γ) productos microbianos como lipopolisacáridos o citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF). Esta población se caracteriza por su alta capacidad de producir antígenos e IL-12, IL-23. Por otra parte, la población M2 puede ser inducida por IL-4, IL-10, IL-13, IL-33, TGF- β y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); estos muestran una alta producción y secreción citocinas tanto pro como antiinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12) y siendo responsables de la producción de TGF- β y componentes de la matriz extracelular (Nguyen-Lefebvre & Horuzsko, 2015).

El desequilibrio entre los macrófagos M1 y M2 media la posterior progresión y resolución de la lesión hepática; durante las primeras etapas de la lesión hepática, los monocitos derivados de la médula ósea se reclutan ampliamente al hígado y ahí se diferencian principalmente en macrófagos M1 para producir citocinas proinflamatorias y profibróticas, promoviendo respuesta de inflamación y activación de las células estrelladas. Posteriormente, los macrófagos reclutados pueden cambiar su fenotipo a uno de M2 para un aumento de la secreción de metaloproteinasas de la matriz (MMP) que son las principales enzimas que degradan matriz extracelular para facilitar la resolución del daño (Zhang et al., 2016).

1.3.3 Metabolismo hepático

El hígado es un órgano esencial en el metabolismo energético en el cuerpo. Los alimentos consumidos se ingieren en el tracto gastrointestinal; la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos son absorbidos en el torrente sanguíneo y se transportan al hígado a través de la circulación de la vena porta (Liu et al., 2017).

1.3.3.1 Metabolismo de glucosa en el hígado

La entrada de glucosa al hepatocito depende de las concentraciones de glucosa en sangre y es facilitada por el transportador de glucosa 2 (GLUT2). El transporte de glucosa al hepatocito es rápido gracias a la alta capacidad de GLUT2, lo cual resulta en un rápido equilibrio de la glucosa a través de la membrana del hepatocito (Figura 5) (Liu et al., 2017). La absorción de glucosa en el hígado no se ve afectada por la insulina, siendo la hiperglucemia más que la hiperinsulinemia el principal determinante del transporte de glucosa hepática (Adeva-Andany et al., 2016).

Dentro del hepatocito, la glucosa es fosforilada por la glucoquinasa (GK) para producir glucosa 6-fosfato (G6P), produciendo una reducción de las concentraciones de glucosa intracelular que aumenta aún más la absorción de glucosa (Liangyou, 2014). G6P es el principal intermediario en el metabolismo de glucosa participando en diferentes rutas metabólicas como es: síntesis de glucógeno, glucólisis y la vía de las pentosas fosfato (Liu et al., 2017).

En estado de alimentación, la G6P actúa como precursor de la síntesis de glucógeno, y se metaboliza para generar piruvato mediante la glucólisis, el piruvato se cataliza hacia la mitocondria donde se oxida para generar ATP a través del ciclo de Krebs y posterior fosforilación oxidativa (Figura 5). El piruvato es utilizado también para sintetizar ácidos grasos mediante lipogénesis. En estado de ayuno, la G6P se transporta al retículo endoplásmico y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) la desfosforila para liberar glucosa (Liangyou, 2014).

La glucosa proveniente de los alimentos es la vía directa para la síntesis de glucógeno después de las comidas, aproximadamente el 50% de la glucosa ingerida se almacena como glucógeno durante el periodo posprandial en sujetos sanos. La glucosa derivada de la gluconeogénesis es la vía indirecta y contribuye a la formación de glucógeno en ayunas. La sobrealimentación con una dieta alta en carbohidratos aumenta la concentración de glucógeno, sin embargo, la capacidad de almacenamiento hepático de glucógeno es limitada y cuando la reserva está completa la glucosa se convierte en grasa por medio de la lipogénesis hepática *de novo* (Adeva-Andany et al., 2016).

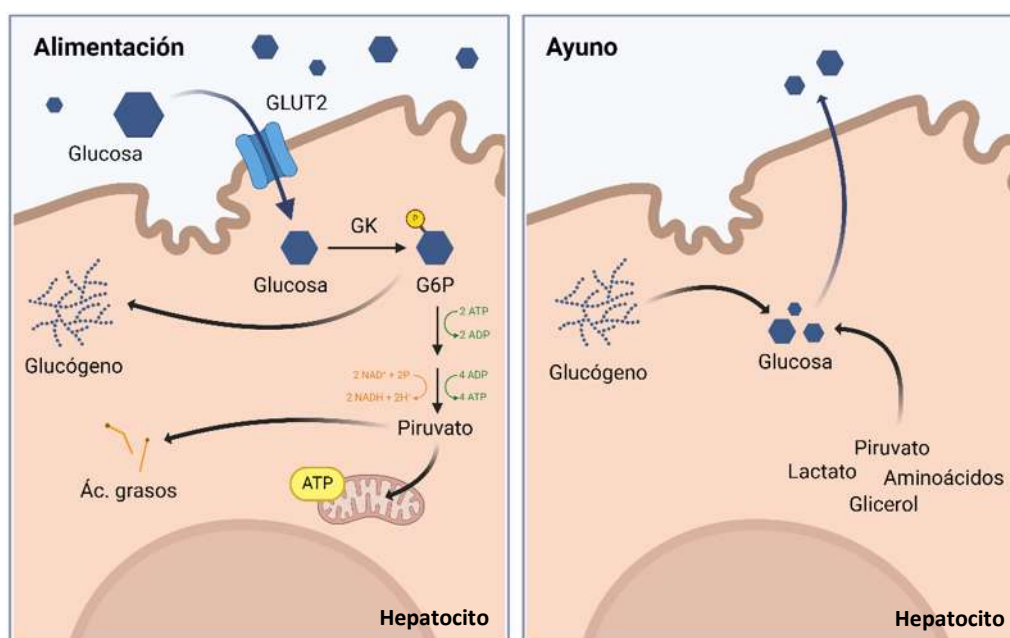


Figura. 5. Metabolismo de la glucosa en el hepatocito. GK: glucoquinasa. G6P: glucosa 6-fosfato. En estado de alimentación hay un aumento en la concentración de glucosa en sangre, esta ingresa al hepatocito por medio de transportadores como GLUT2 el cual no es dependiente de insulina; una vez dentro del hepatocito la glucosa es convertida en glucosa-6-fosfato para ingresar a la glucólisis a partir de la cual se obtiene piruvato que es convertido en ATP en la mitocondria o puede ser utilizado para sintetizar ácidos grasos. En estado de ayuno el hígado es capaz de hidrolizar sus reservas de glucógeno para obtener glucosa; en periodos más largos de ayuno cuando el glucógeno se agota, el hepatocito es capaz de sintetizando otros precursores como piruvato, lactato, aminoácidos y glicerol. Imagen realizada en BioRender.

En periodos cortos de ayuno el hígado es capaz de producir y liberar glucosa por medio de glucogenólisis; si el ayuno continúa y el glucógeno se agota los

hepatocitos sintetizan glucosa mediante gluconeogénesis utilizando otros sustratos generados en el hígado o provenientes de la circulación (como lactato, piruvato, glicerol o aminoácidos) desde tejidos extrahepáticos (Figura 5) (Liangyou, 2014).

1.3.3.2 Metabolismo de lípidos en el hígado

El hígado es un órgano central en la regulación de la homeostasis de lípidos (Ipsen et al., 2018). El hígado puede obtener lípidos provenientes de la lipólisis del tejido adiposo o cuando los carbohidratos en la dieta son abundantes estos son convertidos a ácidos grasos; por otra parte, el hígado elimina lípidos por medio de su exportación y distribución a otros tejidos, u oxidándolos para obtener energía (Liangyou, 2014). La disrupción en uno o más de estos procesos generan la retención de lípidos en el hígado y el subsecuente desarrollo de MASLD. (Ipsen et al., 2018).

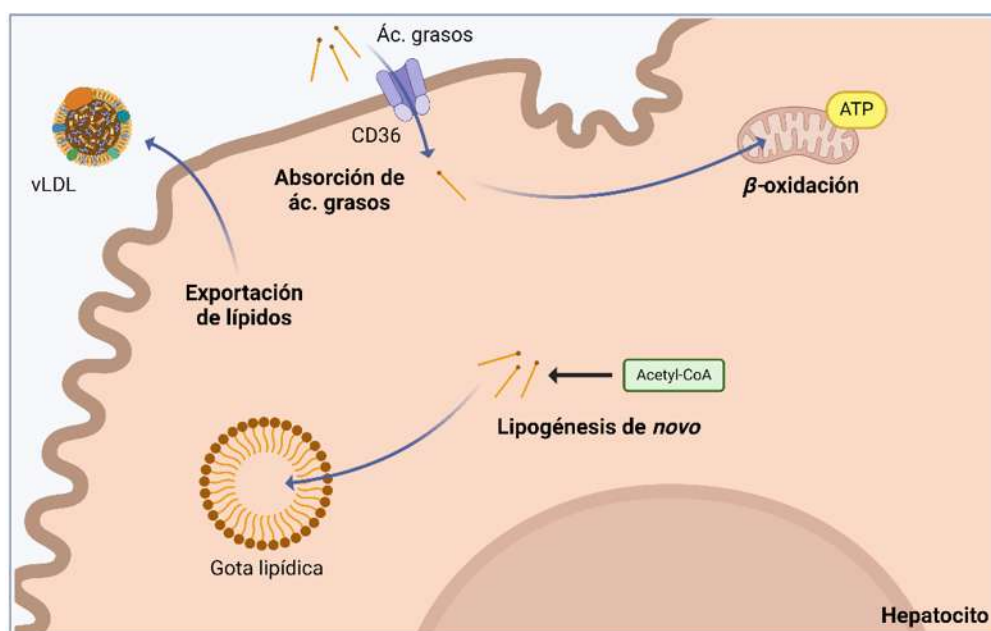


Figura. 6. Metabolismo de lípidos en el hepatocito. Ante el aumento de lipólisis por parte del tejido adiposo el hepatocito obtiene ácidos grasos los cuales ingresan gracias a transportadores como CD36, una vez dentro del hepatocito, los ácidos grasos pueden ingresar a la β -oxidación para obtener energía o se utilizan para sintetizar vLDL y ser exportados a órganos extrahepáticos. Los ácidos grasos se pueden sintetizar a partir de acetil-CoA y ser almacenados en gotas lipídicas. Imagen realizada en BioRender.

En estado postprandial, las grasas ingeridas en la dieta se digieren en el intestino delgado y se absorben en los enterocitos, en donde los ácidos grasos se resintetizan en triacilglicéridos y se secretan a la circulación en forma de quilomicrones. Estos quilomicrones llegan al hígado y se descomponen en ácidos grasos libres y glicerol por medio de la lipólisis mediada por la lipoproteína lipasa (Liangyou, 2014). Por otra parte, en estado de ayuno, hay una reducción en los niveles de insulina, estimulando la hidrólisis de triacilglicéridos por parte del tejido adiposo liberando ácidos grasos a la circulación que serán transportados al hígado (Figura 6) (Enjoji et al., 2016).

En cualquiera de estos dos estados la tasa de absorción de ácidos grasos depende de su concentración plasmática, así como de la capacidad de captación hepatocelular, dependiente del número y actividad de sus proteínas transportadoras expresadas en la membrana plasmática sinusoidal del hepatocito. Dentro de los transportadores de ácidos grasos se encuentran las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP), caveolinas, translocasas de ácidos grasos (CD36) / (FAT) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP) (Enjoji et al., 2016). Los ácidos grasos de cadena larga ingresan al hepatocito principalmente a través de CD36, la cual es regulada por el receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPARY) (Liangyou, 2014).

Una vez dentro del hepatocito, los ácidos grasos derivados del tejido adiposo o de la dieta, así como los ácidos grasos que son sintetizados de forma endógena, se pueden utilizar para: la producción de energía por medio de la β -oxidación mitocondrial, la esterificación de triacilglicéridos, el almacenamiento en las gotas lipídicas o la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su posterior secreción a circulación (Figura 6) (Enjoji et al., 2016).

La lipogénesis *de novo* es una vía anabólica que permite la síntesis de nuevos ácidos grasos a partir de acetil-CoA (Ipsen et al., 2018). La acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) cataliza la carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA, el donante de las unidades de carbono para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga. ACC1 se expresa en tejidos lipogénicos como el hígado y tejido adiposo, y su

actividad de encuentra regulada en varios niveles; a corto plazo, su regulación se produce por la interacción alostérica con metabolitos celulares con citrato, CoA y palmitoil-CoA; mientras que a largo plazo su regulación es a nivel transcripcional (Mao et al., 2003).

Los dos principales tejidos en los que se lleva a cabo la lipogénesis *de novo* son el tejido adiposo y el hígado; en el caso del tejido adiposo la síntesis de ácidos grasos contribuye al reservorio de energía a largo plazo; por otra parte, en hígado, los ácidos grasos que son sintetizados se exportan a otros tejidos mediante la producción de vLDL proporcionando una fuente de energía y componentes esenciales para la formación de membranas lipídicas (Figura 6). La lipogénesis *de novo* se lleva a cabo en el citosol del hepatocito y es un proceso que esta estrictamente regulado por las condiciones hormonales y nutricionales; una dieta alta en carbohidratos la inducen, mientras que el estado de ayuno o alimentaciones con grasas la inhiben, dependiendo principalmente de las concentraciones de insulina y la sensibilidad del tejido a ella (Nguyen et al., 2008). La vía PI3K/Akt es necesaria para la estimulación de la lipogénesis por insulina. La insulina estimula la activación de mTORC1 por medio de la vía PI3K/Akt y se requiere de mTORC1 para que la insulina estimule la expresión de SREBP-1c (Proteína 1 de unión a elementos reguladores del esteroles) y la lipogénesis. La interrupción de la señalización de mTORC1 en el hígado mediante la eliminación de Raptor previene la esteatosis hepática dietética; pero la activación de mTORC1 por si solo no es suficiente para estimular la lipogénesis. También, la insulina estimula la glucólisis aumentando así, la disponibilidad de precursores lipogénicos (Liangyou, 2014).

Sin embargo, la insulina no es la única implicada, la lipogénesis está controlada por un gran número de factores de transcripción que modulan la expresión de genes glucolíticos y lipogénicos (Liangyou, 2014). Dentro de estos se encuentran los miembros de la familia de proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), proteínas integrales de la membrana del retículo endoplásmico que se translocan al aparato de Golgi y se encienden mediante las proteasas SIP1 y SIP2 para liberar a SREBP transcripcionalmente activa; entre sus isoformas en

mamíferos las proteínas SREBP-1a y SREBP-1c se producen a partir del mismo gen mediante dos promotores distintos (Xiaoping & Fajun, 2012). Ambos altamente expresados en hígado. SREBP-1c activa los genes que controlan la síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos. El estrés del retículo endoplásmico promueve la escisión proteolítica y la activación de SREBP-1c en hígado, aumentando la lipogénesis. La activación de SREBP-1c es inhibida por la traslocación nuclear de lipina 1, el complejo mTORC1 fosforila a lipina 1 y promueve la actividad de SREBP-1c y la lipogénesis (Liangyou, 2014).

Por su parte, PPAR γ hepático aumenta la expresión de muchos de los genes que controlan la absorción, tráfico y biosíntesis de ácidos grasos; en ratones normales PPAR γ se encuentra en bajos niveles y aumenta en estado de obesidad. La eliminación específica de PPAR γ suprime muchos de los genes lipogénicos y protege contra la MASLD (Liangyou, 2014). La resistencia sistémica a la insulina es un factor causal del desarrollo de MASLD y acumulación de lípidos en hígado promoviendo aún más la resistencia hepática a la insulina y formando un círculo vicioso.

La β -oxidación puede llevarse a cabo, ya sea en las mitocondrias o en los peroxisomas; su tasa es alta en condiciones de ayuno y baja en estado de alimentación, ocurriendo principalmente en las mitocondrias. La oxidación mitocondrial puede ser incompleta llevando a la formación de cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato y acetona) que se exportan a la circulación y son fuente de combustible metabólico para tejidos extrahepáticos en estado de ayuno (Nguyen et al., 2008).

La β -oxidación mitocondrial es responsable de la oxidación del mayor número de ácidos grasos de cadena corta (menos de 8 carbonos), media (de 8 a 12 carbonos) y larga (de 14 a 20 carbonos), debido a que estos últimos constituyen gran parte de la dieta se convierte en la principal fuente de energía en condiciones normales (Reddy & Hashimoto, 2001).

La entrada de los ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias está regulada por la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2) la cual es una proteína

integral situada en la membrana mitocondrial externa que cataliza la formación de moléculas de acil-carnitina que se transportan a través de la membrana mediante una proteína transportadora específica y se reconvierten en acil-CoA una vez dentro de la matriz mitocondrial mediante la acción de la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT1) una proteína periférica de la membrana mitocondrial interna. Los ácidos grasos de cadena corta y media atraviesan la membrana mitocondrial y la acil-CoA sintetasa se encarga de convertirlos en acil-CoA; por lo tanto, la oxidación de estos ácidos grasos no está controlada por CPT1 (D'Amore et al., 2014).

Ante una mayor absorción de ácidos grasos, el hígado produce mayor conversión de acetil-CoA en cuerpos cetónicos, en lugar de una oxidación completa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, permitiendo que el hígado metabolice aproximadamente cinco veces más ácidos grasos (Nguyen et al., 2008). En un estado de sobrecarga de lípidos como en la MASLD la oxidación de ácidos grasos en los citocromos contribuye, sin embargo, estos procesos generan especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, que, en consecuencia, promueve la inflamación y la progresión de la enfermedad (Ipsen et al., 2018).

Las tres enzimas que participan en la β -oxidación peroxisomal son: acil-CoA oxidasa (Acox1) que es la enzima que cataliza el primer paso; enoil-CoA hidratasa/L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y la 3-cetoacil-CoA tiolasa. Estas enzimas son activadas transcripcionalmente por ligando de PPAR α (Reddy & Hashimoto, 2001).

PPAR α es un regulador maestro en la oxidación de ácidos grasos que induce la transcripción de una gran variedad de genes, siendo mayor en estado de ayuno; la eliminación de PPAR α disminuye la β -oxidación y exacerba la esteatosis hepática. Los diversos tratamientos con agonistas de PPAR α corrigen la esteatosis hepática y la hipoglucemia en ratones (Ipsen et al., 2018).

El hígado mantiene una estrecha comunicación con tejidos extrahepáticos, como el tejido adiposo y músculo esquelético; siendo capaz de exportar lípidos a estos tejidos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (vLDL) (Liangyou, 2014). Las vLDL son partículas lipoproteicas complejas constituidas por proteínas

(apolipoproteína B-100, ApoB-100), lípidos (triacilglicéridos o ésteres de colesterol) y fosfolípidos. La formación de vLDL implica la fusión de una molécula de ApoB-100 con gotas lipídicas de triacilglicéridos mediante la acción de la proteína de transferencia microsomal (MTTP) dentro del hepatocito; es así como los ácidos grasos no oxidados se esterifican en triacilglicéridos y se incorporan a las vLDL para posteriormente ser secretadas a la circulación y entregarse al tejido periférico (D'Amore et al., 2014).

1.4 Enfermedad esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD)

En 1836 por primera vez, el médico y científico Thomas Addison describió casos de acumulación de grasa hepática consecuencia del consumo excesivo de alcohol llamando a la enfermedad “hígado graso” (Oyekoya, 2021). A partir de 1836 y durante las siguientes décadas los patólogos identificaron similitudes histológicas en hígados de pacientes con diabetes y obesidad (Lonardo et al., 2020).

En 1980, el patólogo estadounidense Jurgen Ludwig introdujo el término “esteatohepatitis no alcohólica” basándose en una serie de casos predominantemente en mujeres con obesidad y diabetes que negaban cualquier abuso del consumo de alcohol (Oyekoya, 2021). Los médicos estadounidenses Michael Adler y Fenton Schaffne en 1986 fueron los primeros en utilizar el nombre “enfermedad del hígado graso no alcohólico” tomando en cuenta que dicha enfermedad no era única de adultos, ya que hallaron casos de niños obesos que presentaban anomalías en los niveles de enzimas hepáticas y otras características de la enfermedad (Lonardo et al., 2020).

Es así como a partir de 1986 a la actualidad la enfermedad ha sido identificada, sin embargo, en 2020 un panel internacional con expertos de 22 países de todo el mundo ha propuesto abandonar esta nomenclatura con el objetivo de mejorar la evaluación de la gravedad de la enfermedad, minimizando las implicaciones negativas de la conceptualización errónea (Lonardo et al., 2020).

La enfermedad del hígado graso no alcohólico se describió como una condición por exclusión que solo existe cuando otras condiciones como hepatitis viral B y C, enfermedades autoinmunes o la ingesta del alcohol están ausentes, sin embargo, con los avances en la comprensión de los procesos subyacentes se sabe que es una enfermedad que debe ser definida por inclusión y no por exclusión. Es por ello que se ha propuesto un cambio de nomenclatura de “Enfermedad del hígado graso no alcohólico” a “Enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica”, la cual, incluye de forma más correcta la naturaleza heterogénea de la enfermedad sin agregar la palabra “alcohol” y el estigma que trae consigo (Eslam et al., 2020).

A finales del año 2023 bajo los auspicios de la Asociación Americana para el Estudio de la Enfermedad Hepática (AASLD) y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) en colaboración con la Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado (ALEH) y con la participación de profesionales académicos de más de 50 países la iniciativa para la nueva terminología global ha sido aceptada, reemplazando el término "enfermedad del hígado graso no alcohólico" (EHGNA) por “enfermedad esteatótica asociada a disfunción metabólica” (MASLD por sus siglas en inglés). De igual forma, el término "esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)" se reemplaza por "esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH por sus siglas en inglés)" (Erpecum et al., 2023).

La enfermedad esteatótica asociada a disfunción metabólica es un espectro de enfermedades hepáticas asociadas con trastornos metabólicos y cardiovasculares, como la obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia y diabetes tipo 2; siendo reconocida como la manifestación hepática del síndrome metabólico y la afección hepática más frecuente en todo el mundo (Godoy-Matos et al., 2020).

La prevalencia de la MASLD en la población adulta asintomática varía en los diferentes países del 14 al 24% con un incremento de hasta el 4.6% más en la población obesa. Esta manifestación hepática puede progresar hacia cirrosis en el 22% de los casos dentro de un periodo de 10 años, en este subgrupo hasta un 27% desarrollará carcinoma hepatocelular (Ortega et al., 2020).

MASLD se caracteriza por esteatosis hepática cuando no se pueden identificar otras causas de acumulación de grasa hepática; por ejemplo: virus hepatitis B y C, ingesta de alcohol mayor a 20 g/día en mujeres y 40 g/día en hombres, hemocromatosis, enfermedad de Wilson (ceruloplasmina), enfermedad tiroidea y fármacos hepatotóxicos (Esteve-Lafuente et al., 2006). El espectro de esta enfermedad comienza con la condición más benigna que es la esteatosis hepática, también llamado hígado graso, que se caracteriza por la acumulación de la grasa intrahepática que excede al 5% de la masa del hígado, la cual se almacena en gotas lipídicas en forma de triacilglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos; cuando existe evidencia de inflamación se asocia con esteatohepatitis, en la que se puede presentar apoptosis que progresa a fibrosis; y por último, la cirrosis es el resultado del daño hepático crónico (Romero-Gómez, 2020).

La lipotoxicidad es considerada causante de la progresión de enfermedades desde una esteatosis simple hasta fibrosis. La MASLD puede generarse mediante mecanismos que incluyen: aumento de ácidos grasos libres, aumento en la lipogénesis de *novo*, disminución en la oxidación de grasas y disminución en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad. (Chen et al., 2017).

1.4.1 Fisiopatología de la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica

Inicialmente se planteó la teoría del “doble impacto” para intentar explicar el desarrollo de la MASLD, en ella se propone un “primer impacto” caracterizado por la acumulación de lípidos en los hepatocitos, lo cual a su vez causa lipotoxicidad que eventualmente produce un estado de resistencia a la insulina hepática, este conjunto de características aumentan la vulnerabilidad del hígado a sufrir el “segundo impacto” en el cual hay un estado de inflamación crónico promoviendo la apoptosis y fibrosis (Paschos & Paletas, 2009).

Actualmente se considera que esta teoría es simplista tratando de explicar una patología tan compleja y heterogénea como la MASLD, sin lograr captar la compleja

relación entre factores ambientales, genéticos y metabólicos; es por ello que se ha propuesto en su lugar la teoría del “múltiple impacto” (Buzzetti et al., 2016).

1.4.1.1 Lipotoxicidad en MASLD

La obesidad juega un rol importante en el desarrollo de MASLD. Cuando existe una disfunción en la actividad del adipocito y este disminuye su capacidad de almacenamiento de exceso de energía, hay un aumento en los ácidos grasos libres circulantes resultado de una lipólisis alterada y una reducción en la absorción de estos por parte del tejido adiposo blanco; los hepatocitos almacenan estos lípidos adicionales en forma de triacilglicéridos en gotitas de lípidos intrahepáticas (lo que se conoce como esteatosis simple) (Polyzos et al., 2018). La esteatosis ocurre con un patrón zonal, inicialmente se encuentra en las células pericentrales y progresa hacia afuera; este mismo patrón se observa en la hepatotoxicidad producida por el alcohol y drogas (Cunningham & Porat-Shliom, 2021).

El aumento de estos niveles de ácidos grasos intrahepáticos es el principal desencadenante de lipotoxicidad (Santoleri & Titchenell, 2018). La lipotoxicidad también desencadena mecanismos de daño hepático como: estrés del retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial y alteraciones de la cadena transportadora de electrones generando una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno provocando estrés oxidativo (Ramírez-Mejía et al., 2023).

Es así como la incapacidad del hepatocito para eliminar el exceso de ácidos grasos da como resultado la lipoapoptosis (característica de la esteatohepatitis), esta puede suceder de forma intrínseca o extrínseca convergiendo en caspasas efectoras de apoptosis (Méndez-Sánchez et al., 2018).

Está bien caracterizado el efecto del estrés del retículo endoplásmico y el estrés oxidativo inducido por ácidos grasos libres como los responsables de la activación de vías de señalización apoptóticas dependientes de CHOP y JNK, llevado a la activación de vías apoptóticas intrínsecas. Por otra parte, se ha investigado la activación de los receptores de muerte por los ácidos grasos libres, pero, no son los

únicos responsables de la lipoapoptosis (Cazanave & Gores, 2010). Cuando se presentan en exceso lípidos como la ceramida y el colesterol pueden desencadenar procesos de lipoapoptosis por medio de $\text{TNF}\alpha$ y Fas (Rada et al., 2020).

Estas alteraciones desencadenan la activación de las células de Kupffer, encargadas de la liberación de citocinas proinflamatorias; en última instancia el proceso inflamatorio y estrés oxidativo estimulan a las células estrelladas hepáticas que en respuesta producen un exceso de matriz extracelular conduciendo a fibrosis hepática (Ramírez-Mejía et al., 2023).

El factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF-}\beta$) es un importante marcador de la fibrogénesis humana, este se une al receptor de las células estrelladas activando diversas cascadas de señalización que estimulan la expresión génica de proteínas de matriz extracelular como es el caso de colágeno I y III. La expresión de $\text{TGF-}\beta$ es proporcional al grado de fibrosis (Odena & Bataller, 2012).

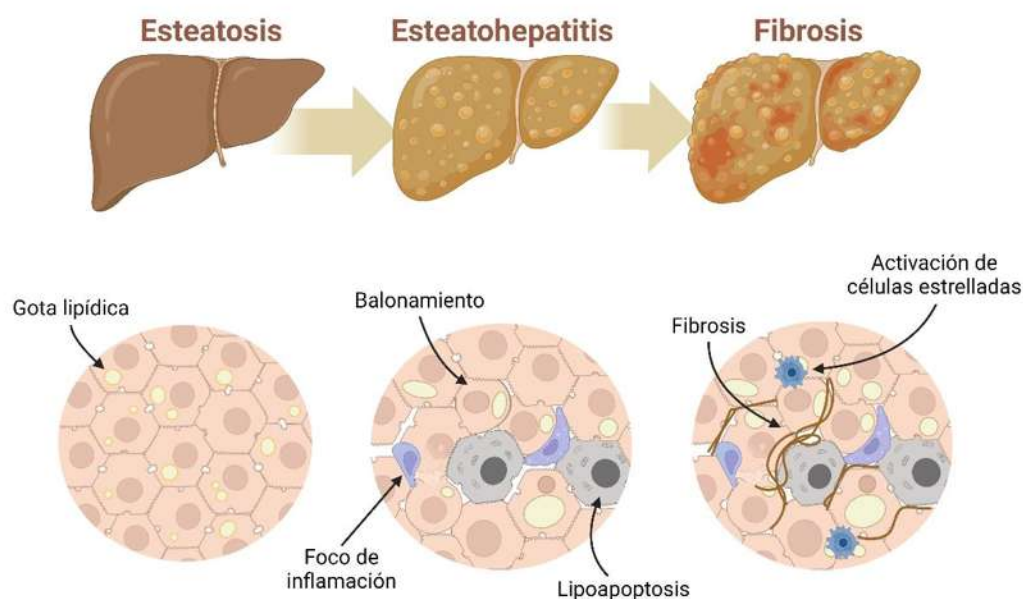


Figura. 7. Etapas de MASLD. La enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica es un espectro de condiciones que va de su estado más benigno al más avanzado de la enfermedad. La esteatosis se caracteriza por la presencia de gotas lipídicas en los hepatocitos; esta puede progresar a esteatohepatitis, en la cual existe la presencia a de focos de inflamación, células apoptóticas y los hepatocitos pierden su forma poligonal tomando una forma redondeada por la presencia de las gotas lipídicas. La fibrosis se caracteriza por la presencia de fibras de colágeno y la activación de las células estrelladas. Imagen realizada en BioRender.

El hígado es un órgano central en la regulación sistémica del metabolismo de glucosa y lípidos, por lo tanto, cuando existe una acción aberrante de la señalización de insulina hepática se le considera el principal impulsor de la resistencia a la insulina (Santoleri & Titchenell, 2018).

La resistencia a la insulina es un factor importante de la etiología de la esteatohepatitis (Godoy-Matos et al., 2020). La elevación aguda de ácidos grasos en circulación provoca resistencia a la insulina periférica, inhibiendo la señalización de la insulina, por la fosforilación errónea de tirosina en los sustratos del receptor a la insulina; estos ácidos grasos libres también pueden acumularse en los islotes pancreáticos, lo que altera la secreción de insulina (Tarantino et al., 2010). El aumento en las tasas de gluconeogénesis hepática y lipogénesis son eventos bien documentados en condiciones de resistencia a la insulina; además de que los pacientes que padecen MASLD tienen tasas 3 veces mayores de lipogénesis *de novo* y mayores niveles plasmáticos de ácidos grasos libres e insulina (Santoleri & Titchenell, 2018).

La hiperglucemia en ayunas normalmente observada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico es resultado de una reducción en la absorción de glucosa en tejidos periféricos y un incremento en la gluconeogénesis en hepatocitos resistentes a la insulina. Modelos animales con una delección específica del receptor de insulina en hepatocitos muestran una severa intolerancia; por otra parte, cuando la delección se realiza en tejidos como músculo esquelético o tejido adiposo, los niveles de glucosa e insulina permanecen normales, lo cual demuestra la importancia de la sensibilidad a la insulina hepática en la homeostasis de glucosa (Meshkani & Adeli, 2009).

En condición de resistencia a la insulina, se liberan más ácidos grasos provenientes del tejido adiposo los cuales llegan a hígado; el estado de hiperinsulinemia induce la transcripción de genes que promueven la lipogénesis *de novo*. La proteína 1c de unión de elementos regulador de esteroides (SREBP-1c) es un factor de transcripción que induce a genes lipogénicos como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Pan & Zhang, 2022). Estudios realizados en humanos y roedores han demostrado que la

acumulación excesiva de lípidos en el tejido hepático es en mayor parte resultado de una mayor entrega de ácidos grasos libres derivados del tejido adiposo y mayor síntesis de novo (Cazanave & Gores, 2010).

Los ácidos grasos libres ingresan a las células tanto por difusión pasiva como transporte facilitado por transportadores como la translocasa de ácidos grasos CD36. La modificación en la expresión de estos transportadores contribuye directamente a la acumulación de triacilglicéridos (Cazanave & Gores, 2010)

1.4.1.2 Estrés oxidativo en MASLD

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de eliminación de los sistemas antioxidantes (Chen et al., 2020).

Las especies reactivas de oxígeno pueden producirse de manera endógena o exógena; las fuentes endógenas más importantes son el metabolismo del citocromo P450, peroxisomas, microsomas, reacciones catalizadas por metales y reacciones en el transporte de electrones catalizadas por la mitocondria en los complejos I y III (Li et al., 2015). Otras fuentes mitocondriales son la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la piruvato deshidrogenasa, la glicerol fosfato deshidrogenasa y la monoaminoxidasa (Chen et al., 2020).

Dentro de las fuentes exógenas se encuentra por ejemplo la contaminación del aire, la irradiación ultravioleta, los rayos X y rayos gamma (Valko et al., 2006). Por sus características químicas, los radicales libres son capaces de iniciar la peroxidación lipídica, provocar daños al ADN y oxidar de forma indiscriminada todas las moléculas presentes en las membranas y tejidos biológicos generando daños (Li et al., 2015).

Los antioxidantes tienen la capacidad de donar electrones a los radicales libres para reducir su reactividad y mantener el equilibrio celular prooxidante/antioxidante (Casas-Grajales & Muriel, 2015). Las especies reactivas como $O_2^{\cdot-}$, $NO^{\cdot}$ y H_2O_2

cumplen funciones importantes como moléculas de señalización redox al regular tanto funciones fisiológicas como patológicas, al ser también las primeras en formarse (Chen et al., 2020).

El hígado presenta una importante producción de especies reactivas de oxígeno por su alta actividad metabólica y desintoxicante. De igual forma, el hígado tiene diversos mecanismos de defensa antioxidante que consisten en componentes enzimáticos y no enzimáticos, permitiendo mantener las especies reactivas de oxígeno en niveles fisiológicos (Allameh et al., 2023)

Dentro de los mecanismos de defensa antioxidantes se encuentran: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GRX), peroxiredoxinas (PRX), tioredoxinas (TRX) y catalasa (CAT); y en los no enzimáticos se encuentra el glutatión (GSH), bilirrubina, ubiquinona (coenzima Q10) y ácido úrico (Allameh et al., 2023).

La CAT y GPX se encuentran funcionalmente relacionadas con la SOD, debido a que el producto de la reacción catalizada por SOD: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el sustrato de CAT y GPx (Irato & Santovito, 2021).

Las especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido ($O_2 \cdot^-$) y el peróxido de hidrógeno surgen de la reducción incompleta del oxígeno molecular en las mitocondrias durante la respiración aeróbica o se pueden generar en las células mediante reacciones enzimáticas (Allameh et al., 2023). El $O_2 \cdot^-$ se puede transformar en H_2O_2 mediante la superóxido dismutasa, y el H_2O_2 se descompone a H_2O y O_2 mediante la glutatión peroxidasa utilizando glutatión como donante de electrones (Chen et al., 2020).

Dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos se encuentra el glutatión, el cual es utilizado por la glutatión peroxidasa, que lo convierte en glutatión oxidado (GSSG), que para regenerarse debe reducirse nuevamente a glutatión reducido (GSH) para lo cual requiere a la glutatión reductasa y NADPH (Fig. 8) (Guija-Guerra & Guija-Poma, 2023). La importancia de sus funciones dentro de los sistemas biológicos ha dado lugar a la existencia de un sistema GSH que incluye además

enzimas relacionadas con su metabolismo, responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas. La oxidación enzimática del GSH se produce como producto de la actividad del glutatión peroxidasa (GPx)

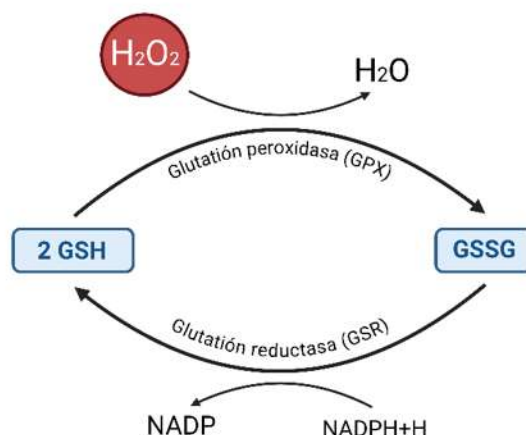


Figura. 8. Glutatión. GSSG: glutatión oxidado. El sistema antioxidante glutatión utiliza al glutatión reducido (GSH) para convertir el peróxido de hidrógeno en agua obteniendo glutatión oxidado (GSSG) por medio de la enzima glutatión peroxidasa. Para la regeneración de GSH se requiere de NADPH+H y a la enzima glutatión reductasa. Imagen realizada en BioRender.

En estado fisiológico, GSH es la forma predominante y representa hasta el 98% del glutatión total; la mayor parte de el se almacena en el citosol (80-85%) y otra pequeña cantidad en las mitocondrias (10-15%) (Santacroce et al., 2023).

El hígado es la principal fuente de glutatión que exporta a través del plasma y la bilis. Esto se debe a su capacidad de sintetizar cisteína un precursor de forma endógena de glutatión, o también, se puede obtener a partir de la degradación de proteínas y alimentos, aunque un gran porcentaje se obtiene de forma indirecta de la metionina (Vairetti et al., 2021). El primer paso para la síntesis de glutatión esta catalizado por la L-glutamato L-cisteína γ-ligasa (GCL) un heterodímero constituido por un monómero catalítico (GCLC) y un monómero modificador (GCLM); la expresión de GCL responde al estrés oxidativo y está regulado de forma positiva por el factor nuclear eritroide 2 (Nfr2) (Vairetti et al., 2021).

El glutatión elimina directamente especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como: $\text{HO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$, $\text{RO}_2^\bullet$, HOCl , O_2 y ONOO^- (Vairetti et al., 2021).

Estudios indican que los niveles séricos de glutatión y SOD son más altos en pacientes con fibrosis hepática que en los pacientes sanos, sugiriendo que el sistema antioxidante tiene un papel importante en la patogénesis de MASLD y su progresión (Vairetti et al., 2021).

Las especies reactivas de oxígeno y los productos de la peroxidación lipídica afectan la función y viabilidad de los hepatocitos, y promueven la diferenciación y activación de las células estrelladas lo que conduce a la producción y secreción de colágeno y otros componentes de matriz extracelular característicos de un estado de fibrosis (Allameh et al., 2023).

La peroxidación lipídica se define como el ataque de los radicales libres a los lípidos que contienen dobles enlaces carbono – carbono, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (Ayala et al., 2014). Biomarcadores de estrés oxidativo como los productos de daño lipídico (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) aumentan sus niveles en MASLD. Por otro lado, los productos antioxidantes como GPX y no enzimáticos como glutatión disminuyen en la enfermedad MASLD pero aumentan en algunos casos (Chen et al., 2020).

El estrés oxidativo contribuye a la fibrogénesis al aumentar las citocinas proinflamatorias, así como al factor de crecimiento transformante β , interleucina 6 y factor de necrosis tumoral α (Chen et al., 2020).

El Nrf2 juega un papel importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo. En condiciones fisiológicas, el Nrf2 está inactivo y se degrada mediante la ubiquitinación mediada por Keap1, ante estrés oxidativo o químico, Nrf2 se disocia de su inhibidor Keap1 y transloca al núcleo donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) ubicado en el promotor de genes diana, iniciando la transcripción y expresión de enzimas antioxidantes (Lu et al., 2020).

Recientemente se ha descrito el papel de Nrf2 en la patogénesis asociada a inflamación. En un modelo de ratón con la eliminación de Nrf2 estimulado por

lipopolisacáridos se identificó a Nrf2 como un regulador esencial de genes antiinflamatorios por medio de una inhibición del factor nuclear kappa-B (NF-κB) y la expresión de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNFα), la interleucina 1 beta (IL-1β) y la interleucina 6 (IL-6) (Qin et al.,2015).

El Nrf2 regula los niveles de glutatión y mantiene la relación glutatión reducido/oxidado (Arroyave-Ospina et al., 2021).

Ante una mayor ingesta de lípidos hay una sobrecarga de ácidos grasos en las mitocondrias lo cual puede llevar a un aumento en la permeabilidad de la membrana interna, conduciendo a la disipación del potencial de membrana y la consecuente pérdida de la producción de ATP, producto de una fuga de electrones. El resultando es un deterioro de la función mitocondrial y aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (Masarone et al., 2018).

1.4.2 Fibrosis

La matriz extracelular es un componente que se encuentra presente en todos los tejidos, su remodelación en la cual, las moléculas viejas o dañadas se degradan y son reemplazadas por componentes recién sintetizados es necesaria para poder mantener la homeostasis del tejido. Existe un equilibrio entre los componentes de la matriz extracelular y sus células integradas; ante un estímulo inflamatorio y profibrótico, el recambio se desequilibra y da como resultado alteraciones cualitativas y cuantitativas de la matriz extracelular y en consecuencia la composición y cantidad de colágeno y desarrollo de fibrosis.

En hígado sanos se pueden encontrar principalmente tres tipos de colágenos fibrilares de tipo intersticial; el tipo I, III y V, en concentraciones bajas, suficientes para poder llevar a cabo sus funciones fisiológicas; que predominantemente están localizados en el espacio de Disse en el tracto portal y las paredes de las venas centrales. Tras la progresión de la fibrosis, los colágenos fibrilares aumentan, reemplazando zonas donde anteriormente se encontraban hepatocitos. En hígados cirróticos se encuentra un aumento de hasta 10 veces de colágenos tipo I, III y V;

no solo cambiando la cantidad si no también la localización del colágeno (Luangmonkong et al., 2023). La acumulación sostenida de colágeno distorsiona el parénquima hepático y la arquitectura del tejido, resultando en un deterioro de la función hepática, depósito de cicatrices y fibrosis hepática (Zhang et al., 2016).

Al iniciar el proceso de fibrogénesis, las células estrelladas pasan de un estado quiescente a uno activo, en el cual adquieren un fenotipo miofibroblástico y pierden las gotas lipídicas intracelulares (Zhang et al., 2016).

1.4.3 Diagnóstico de MASLD

Aunque la reducción de la carga de la mortalidad a través de la prevención parece obvia, esto no ha sido logrado. Además, aunque se espera que las farmacoterapias estén disponibles en el futuro, ninguna de estas ha sido aprobada hasta la fecha (Eslam et al., 2020).

Los hepatocitos secretan proteínas vitales, siendo la albúmina la principal de ellas; esta es la proteína plasmática circulante más abundante y convirtiéndola en un indicador importante de función hepática (Mancina et al., 2022). La albúmina juega un papel importante en la regulación homeostática y tiene funciones antioxidantes y antiinflamatorias; también desempeña un rol importante en el transporte de sustancias resultantes de catabolismo celular de su lugar de producción a órganos excretores como hígado y riñones; así como en el transporte y eliminación de sustancias tóxicas que se acumulan en condiciones patológicas agudas y crónicas, por lo tanto, en condiciones de hipoalbuminemia se encuentra limitada la capacidad del organismo de eliminar sustancias tóxicas, además de alterar la capacidad farmacocinética de los fármacos (Sun et al., 2019; Arroyo & Fernández, 2011).

La síntesis de albúmina aumenta cuatro veces estimulada por la insulina y factores de crecimiento; por otra parte, el aumento crónico de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β inhiben su síntesis, es por ello que en pacientes con MASLD disminuye su cantidad sérica siendo un indicativo de disfuncionalidad hepática (Sun et al., 2019).

El uso de métodos de imagen no invasivos juega un papel importante en el diagnóstico de MASLD, de acuerdo con la AGA las modalidades de imagen en combinación con los índices bioquímicos ofrecen una mejor precisión a la hora del diagnóstico (Martinou et al., 2022).

Se ha demostrado que la extensión de la fibrosis hepática es un sólido predictor de la mortalidad relacionada con el hígado, es por ello que diferenciar a pacientes con esteatosis de aquellos con enfermedad más avanzada es fundamental para un mejor manejo de la enfermedad. Dentro de este contexto, la biopsia hepática representa un estándar de oro, pero también ha sido un motivo de debate; considerándolo un método no apropiado para los pacientes debido a la baja accesibilidad, eventos adversos y costos (Arab et al., 2018).

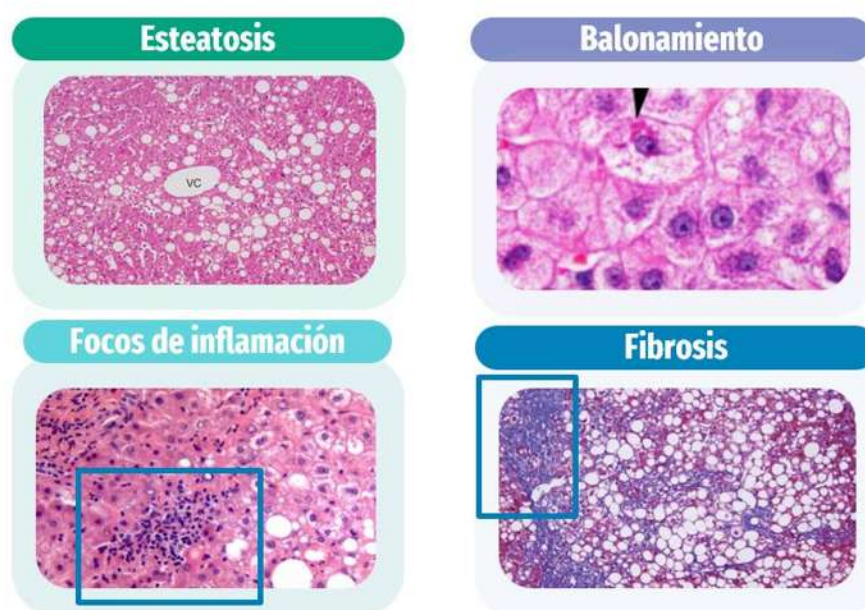


Figura. 9. Hallazgos histopatológicos de MASLD. Se evalúan principalmente cuatro hallazgos histopatológicos: 1. Esteatosis, la presencia de gotas lipídicas (círculos color blanco). 2. Balonamiento, la pérdida de la forma poligonal del hepatocito por una forma más redondeada. 3. Focos de inflamación: aglomeraciones de células del sistema inmunológico (cuadrado azul). 4. Fibrosis: presencia de fibras de colágeno (cuadrado azul). Imagen realizada en Canva.

A pesar de sus desventajas claras, la biopsia hepática sigue siendo el estándar de oro en el diagnóstico de estados avanzados como esteatohepatitis e incluso carcinoma hepatocelular debido a que permite caracterizar y evaluar el grado de

daño hepático como no lo permitiría una técnica no invasiva (Carreres et al., 2021). Sin embargo, la biopsia sigue teniendo una incidencia relativamente alta de falsos negativos, ya que el fragmento analizado solo presenta alrededor del 1/50 000 del órgano (Martin-Grau et al., 2022).

La red de investigación clínica en esteatohepatitis no alcohólica (CRN por sus siglas en inglés) patrocinada por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK) propuso una puntuación para MASLD la cual permite clasificar las biopsias basándose en la suma de las siguientes características:

Característica Histológica	Definición	Puntaje
Esteatosis	<5%	0
	5-33%	1
	34-66%	2
	>66%	3
Balonamiento	Ninguna	0
	Algunas células	1
	Muchas células	2
Inflamación	Ausente	0
	<2 focos por campo a 20x	1
	2-4 focos por campo a 20x	1
	>2 focos por campo a 20x	2
	>4 focos por campo a 20x	3

Cuadro. 2. Evaluación NAS. (Xu et al. 2022)

La principal característica de la fibrosis es la acumulación excesiva de matriz extracelular en el tejido afectado, dando como resultado una destrucción de la arquitectura normal y causando disfunción en su actividad. La fibrosis, típicamente es el resultado de una inflamación crónica, siendo, en sus primeras etapas beneficiosa como parte del mecanismo de reparación posterior a un daño tisular; sin embargo, cuando no se lleva a cabo una contención de la inflamación puede resultar como la producción acentuada y sostenida de factores de crecimiento fibrogénico, quimiocinas y citocinas (Biernacka et al. 2011).

1.4.4 Tratamiento para MASLD

La enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica es la enfermedad hepática crónica más común en el mundo. Se sabe que la esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis e incluso carcinoma hepatocelular son de las principales causas de trasplante de hígado; la progresión a esteatohepatitis ocurre en el 10% a 20% de los pacientes con MASLD; considerando que las personas no obesas tienen menos probabilidad de desarrollar esteatohepatitis, el riesgo de este grupo es del 3%. En el caso del carcinoma hepatocelular, al menos el 10% de los pacientes con MASLD (Kosmalski et al., 2023).

La prevalencia de MASLD en pacientes delgados es del 13.11% en la población mundial; incluso, el 20% de los pacientes diagnosticados no tienen sobrepeso. En cuanto a la población general, la prevalencia se encuentra dentro del 25 al 35%, mientras que en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y obesidad se encuentra en el 70%; observando una tendencia ascendente en la prevalencia a nivel mundial. A pesar de ello, actualmente no existe ningún medicamento aceptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para su tratamiento (Kosmalski et al., 2023).

Por el complejo mecanismo que subyace a la MASLD, en el cual se involucran numerosos factores de riesgo, órganos, diferentes tipos de células y la interacción de múltiples vías de señalización, que aún no se han dilucidado por completo,

actualmente no existe un tratamiento unificado, claro y eficaz para esta enfermedad (Wang et al., 2022). Tomando en cuenta su naturaleza multifacética, relacionada con otras patologías como obesidad, diabetes y/o síndrome metabólico; la ventaja en esto es que una mejora en cualquiera de estas condiciones tendrá de igual forma un impacto en MASLD (Kosmalski et al., 2023).

Diversos estudios han demostrado que la pérdida de peso igual o mayor al 7% de la masa corporal permite obtener una mejoría significativa en la puntuación “NAS” (Moctezuma-Velázquez, 2018). El Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK por sus siglas en inglés) recomienda perder peso gradualmente eligiendo alimentos más saludables, limitando el tamaño de las porciones y siendo activo físicamente; indicando que el perder al menos del 3% al 5% del peso corporal puede reducir la grasa hepática, y perder del 7% al 10% reducirá la inflamación y fibrosis del hígado (Chalasani et al., 2018).

Es fácil relacionar el ejercicio con la pérdida de peso, sin embargo, hay diversos estudios que muestran un efecto beneficioso independientemente de los cambios en el peso corporal, especialmente ejercicio aeróbico. Una revisión concluyó que el ejercicio con un protocolo promedio de 40 a 45 min, 3 veces por semana por 12 semanas es un método eficaz para reducir la esteatosis (Moctezuma-Velázquez, 2018).

El tipo de dieta que logre una reducción en el peso corporal tendrá potenciales efectos beneficiosos, sin embargo, la Asociación Europea del Hígado apunta a la dieta mediterránea, siendo la más estudiada y beneficiosa para el tratamiento de MASLD. Dentro de los beneficios de esta dieta se encuentran, pérdida de peso, mejor sensibilidad a la insulina y reducción de la grasa hepática (Kosmalski et al., 2023). La dieta mediterránea consiste en el consumo de grasas no saturadas como cereales integrales, frutas y verduras, pescado, frutos secos y legumbres (Yang et al., 2022).

Existen actualmente muchos fármacos en desarrollo para MASLD; hasta ahora, los recomendados por la AASLD son la vitamina E y pioglitazona en pacientes con esteatohepatitis (Moctezuma-Velázquez, 2018).

Los antioxidantes naturales como la vitamina E pueden disminuir el daño hepático mediado por los radicales libres; se ha demostrado que la vitamina E inhibe la expresión intrahepática de TGF- β y la activación de las células estrelladas; disminuyendo de esta forma la fibrosis hepática (Cobo et al., 2008).

La pioglitazona es un antagonista de PPAR- γ el cual mejora la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo promoviendo el depósito de ácidos grasos libres en este y no de forma ectópica; también incrementa la secreción de adiponectina favoreciendo la β oxidación (Moctezuma-Velázquez, 2018). Dentro de sus efectos secundarios se encuentra el aumento de peso y se ha asociado a disminución de la densidad ósea (Kosmalski et al., 2023).

PPAR γ se expresa en el tejido adiposo, donde acelera la captación de ácidos grasos en el adipocito y aumenta la sensibilidad a la insulina, reduciendo así el flujo de ácidos grasos al hígado. Un estudio demostró que PPAR γ reduce el estrés y la inflamación del retículo endoplásmico al mismo tiempo que mejora la sensibilidad a la insulina; además altera la polarización M1 a M2 de los macrófagos, esto, a su vez afecta la inflamación de los hepatocitos y metabolismo de lípidos. PPAR γ también puede revertir la fibrosis al reducir la proliferación de las células estrelladas hepáticas, por medio una regulación a la baja del factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1) (Pan et al., 2022).

1.4.5 Marcadores moleculares en MASLD

1.4.5.1 Proteínas GTPasas RAS

Las proteínas G o GTPasas (denominadas así por su capacidad de hidrolizar GTP a GDP y Pi) pueden ser de dos tipos: monoméricas o heterotriméricas (Kramer, 2016). Los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas son proteínas integrales de membrana constituidas por una cadena de aminoácidos con un extremo amino-terminal que se localiza en la zona extracelular y un extremo carboxilo localizado en el citoplasma, esta cadena de aminoácidos atraviesa siete

veces la membrana celular y las proteínas G están conformadas por tres subunidades (α , β , γ) (García, 2011). Por otra parte, las proteínas G monoméricas están conformadas por 5 subfamilias: Arf, Rab, G α , Ras y Rho (Kramer, 2016).

Las proteínas Ras (H-Ras, K-Ras4A y 4B, y N-Ras) son una superfamilia de pequeñas proteínas de unión e hidrolización de GTP (GTPasas), reguladoras de la transducción de señales. Los genes de RAS se expresan de forma ubicua, aunque en distintos niveles específicos de cada tejido (Repasky et al., 2010).

Las proteínas RAS son llamadas “interruptores moleculares” ya que pueden alternar entre estados unidos a guanosina trifosfato (GTP) activos y estados unidos a guanosina difosfato (GDP) inactivo (Simanshu et al., 2017). Esta alternancia entre GDP y GTP requiere de la ayuda de dos tipos de proteínas: las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) y los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) (Bos, 2007); esto permite que ambos procesos estén altamente regulados y respondan a múltiples señales de entrada (Simanshu et al., 2017).

Las proteínas GEF y GAP activan y desactivan RAS cuando se reclutan en la membrana plasmática y se colocan en la proximidad a RAS, este, parece ser un paso crítico en el proceso de activación; incluso, la activación diferencial de RAS puede estar determinada por la composición lipídica local dentro de la membrana (Zhou et al., 2017).

En células de mamíferos los principales efectores de RAS son las cinasas RAF (ARAF, BRAF y CRAF), participando a través de estas en la proliferación, supervivencia y migración. Las proteínas RAS también regulan vías como RAS-MAPK (Simanshu et al., 2017). Sin embargo, las proteínas RAS en mamíferos tienen otros efectores importantes, de los cuales la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) es la mejor validada (Downward et al., 2008).

La proteína activadora de RAS tipo 2 (RASAL2) es una GAP, codificada por el cromosoma número 1, su expresión es ubicua en esófago, tejido adiposo, hígado y otros órganos. En el año 2008 Thorleifsson y colaboradores realizaron un estudio de asociación del genoma humano, en el cual se relacionó el polimorfismo de un

solo nucleótido SNP rs10913469 (RASAL2) con un mayor índice de masa corporal en humanos (Thorleifsson et al., 2008). Ding y colaboradores identificaron un aumento en la expresión de RASAL2 en biopsias realizadas a pacientes con MASLD (Ding et al., 2023).

La vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK permite la integración de señales extracelulares desde los receptores de superficie hasta la expresión génica, jugando un papel importante en la proliferación, diferenciación, adhesión, migración y supervivencia celular; en el caso de MASLD es fundamental para promover la fibrogénesis hepática (Foglia et al., 2019).

Las proteínas GAP para Ras se encuentran constitutivamente regulados de forma negativa en hepatocarcinoma celular humano; por lo que se sugiere que la inactivación de las GAP para Ras conduce a la activación de la vía MAPK/ERK (Yang & Liu, 2017). La inactivación de RASAL 2 promueve la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (ERK) (Jia et al., 2017).

En un estudio murino *in vivo* se determinó que la deficiencia de RASAL2 conduce a una menor adiposidad y resistencia a la obesidad inducida por una dieta alta en grasas, además de mejorar diversos trastornos metabólicos asociados a la obesidad como la intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y esteatosis hepática. La deficiencia de RASAL2 da como resultado una mayor actividad de RAS y sus efectores río abajo como ERK, la cual juega un papel importante en la adipogénesis al promover la expresión de C/EBP α y PPARY (Zhu et al., 2017).

A pesar de que el papel específico de RASAL2 en el metabolismo hepático no está determinado, en un estudio utilizando modelo murino de MASLD, se identificó que la deficiencia de RASAL2 disminuía la acumulación de lípidos intrahepáticos incrementando la producción hepática y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (vLDL), y de esta forma disminuyendo la esteatosis hepática por medio de la vía AKT/TET1/MTTP (Ding et al., 2023).

1.4.5.2 Proteínas GTPasas ARF

La familia de GTPasas del factor de ribosilación de ADP (ARF) son proteínas de unión a nucleótidos de guanina de bajo peso molecular, cada miembro de la familia ARF está regulado a través de un ciclo de unión de GTP e hidrólisis de GTP que activa (unido a GTP) e inactiva (unido a GDP) la proteína G. Dentro de las funciones de las proteínas ARF se encuentra el reclutamiento de proteínas de la cubierta que promueven la clasificación de la carga en vesículas, el reclutamiento y la activación de enzimas, como las quinasas de fosfatidilinositol que altera la composición de los lípidos de membrana. Hay seis proteínas ARF en mamíferos que se pueden clasificar en tres clases: clase I (ARF1, ARF2 y ARF3), clase II (ARF4 y ARF5) y clase III (ARF6) (Donaldson et al., 2011).

El ciclo de GDP a GTP está altamente regulado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) y las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) esto garantiza la especificidad de la señalización. Los GEF inducen la liberación de GDP para ser reemplazado por GTP más abundante y las GAP que generalmente proporcionan un grupo catalítico esencial para la hidrólisis de GTP (Bos, 2007).

La proteína ARF6 es miembro de la clase III, ubicado en la membrana plasmática y membranas endosómicas (Donaldson et al., 2005) cuya principal función es la de regula la composición de la membrana lipídica por medio de la activación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato quinasa y la fosfolipasa D (Suzuki et al., 2006).

La familia EFA6 (factor de intercambio para ARF6) /PSD (homología pleckstrin y dominio Sec7) son GEF para ARF6, es decir, promueven el paso de ARF6-GDP a ARF6-GTP; esta familia consta de 4 miembros; PSD1 y PSD2 tienen una expresión aumentada en cerebro, mientras que PSD3 y PSD4 se expresan ampliamente (Sakagami et al., 2008).

En el año 2017 Gong y colaboradores realizaron un estudio de asociación en Marshfield una ciudad ubicada en el condado de Wood en el estado estadounidense de Wisconsin; en el cual reportaron por primera vez la asociación del gen PSD3 con obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y niveles de HDL (Gong et al., 2017).

La actividad de la fosfolipasa D es la hidrólisis de fosfatidilcolina en ácido fosfatídico y colina; las concentraciones de colina no cambian en niveles apreciables por la actividad de esta enzima; por el contrario, el ácido fosfatídico juega un papel importante en la señalización celular, participando como un segundo mensajero (Wang et al., 2006). El ácido fosfatídico puede estar implicado en transporte de membrana y varias vías como es el caso de mTOR, y algunas especies de ácido fosfatídico también pueden jugar un rol importante en la señalización de insulina (Hur et al. 2016).

La actividad de la fosfolipasa D1 dependiente de ARF nuclear aumenta durante la fase de regeneración del hígado en ratas, desempeñando un rol importante en el desarrollo y progresión de la fibrosis hepática; también esta fosfolipasa es activada por insulina regulando la fusión de las vesículas que contienen el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) resultando en una mejor absorción de la glucosa en adipocitos (Hur et al. 2016).

En un estudio realizado por Wang y colaboradores en 2023 se identificó que la eliminación específica de la fosfolipasa D1 en hepatocitos disminuyó significativamente la acumulación de lípidos mediante la regulación negativa de CD36; sin embargo, otros estudios indican que la desactivación sistémica de la fosfolipasa D1 podría agravar la fibrosis hepática por medio de un aumento en la activación de las células estrelladas (Wang et al., 2023).

1.4.5.3 Vía PI3K/Akt/mTOR

El objetivo de la rapamicina en mamíferos (mTOR) es una quinasa Ser/Thr que es un regulador maestro del metabolismo y crecimiento celular; el ácido fosfatídico interactúa con mTOR estabilizando ambos complejos: mTORC1 y mTORC2. Se demostró que el ácido fosfatídico activa a mTORC1 al disociar a DEPTOR (DEP domain-containing mTOR interacting protein, por sus siglas en inglés) (Zhou et al., 2023).

El objetivo mecanicista del complejo rapamicina 1 (mTORC1) incluye a la proteína quinasa mTOR y varias proteínas relacionadas, como la proteína asociada a la regulación de mTOR: raptor, proteínas que contiene el dominio DEP: Deftor, entre otras. mTORC1 recibe señales sobre la disponibilidad sistémica y local de nutrientes; en su estado activo promueve la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos para el crecimiento celular, e inhibiendo procesos catabólicos como oxidación de ácidos grasos, carbohidratos y autofagia; realizando estas funciones mediante la fosforilación de múltiples objetivos posteriores incluida la proteína ribosoma p70 S6 quinasa (S6K1), la proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (4E-BPI) y la quinasa asociada a la autofagia 1 similar a Unc-51 (ULK1) (Zhu & Wang, 2020; Mao & Zhang, 2018).

Estudios han identificado que la obesidad puede desencadenar una activación crónica excesiva de la actividad de mTORC1 en múltiples tejidos, generando alteraciones en el metabolismo de órganos como cerebro, intestino, tejido adiposo, hígado, páncreas y músculo esquelético en pacientes obesos (Cao et al., 2022).

1.5 Ciclodipéptidos

Los ciclodipéptidos (CDPs) o dicetopiperazinas (DKP) corresponden son la forma cíclica de un péptido más simple y natural, producidos por una gran variedad de seres vivos, desde bacterias hasta el ser humano (Bojarska et al. 2021). Se ha identificado que tienen actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral, siendo un componente importante en la comunicación célula-célula, sirviendo como interruptores entre simbiosis y virulencia (Ogilvie & Czekster, 2023).

Se han detectado ciclodipéptidos en alimentos como la carne de vacuno, cerveza, pan, cacao, café tostado y quesos; los cuales pueden aparecer por contaminación con hongos, levaduras o bacterias en la producción y almacenamiento, pero también puede ser producto de reacciones secundarias de degradación de oligos y polipéptidos durante el procesamiento químico y térmico. De igual forma se encuentran en alimentos como productos naturales de la levadura utilizada para la

fermentación de cerveza y bacterias del ácido láctico utilizadas para la fermentación del pan y la maduración del queso. En estos alimentos pueden tener una función sensorial contribuyendo al sabor del producto final, otorgando notas saladas o amargas y siendo de naturaleza muy diversa (Borthwick et al., 2017). Se ha identificado que el 90% de los ciclodipeptidos presentes en alimentos contienen prolina, esto les brinda a los ciclodipeptidos en general un mayor valor conformacional y biofuncional haciéndolos una alternativa prometedora en el estudio de nuevas moléculas con potencial farmacéutico (Bojarska et al. 2021). En 1965 se reportó por primera vez un ciclodipeptido biológicamente activo de origen endógeno en muestras de orina humana, el ciclo (L-His-L-Pro) (Borthwick et al., 2017), el cual es derivado de la hormona liberadora de tirotrópina.

En el año 2017 Hernández Padilla y colaboradores estudiaron el efecto de los ciclodipeptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en mezcla y purificados, sobre células sanas. Como parte del experimento, se determinó el porcentaje de inducción de apoptosis en células sanas (fibroblastos de pulmón humano) a distintas concentraciones de ciclodipeptidos, siendo 100 mg/mL la concentración más alta. Los resultados indicaron que la mezcla de ciclodipeptidos inducía de forma mínima la apoptosis en estas células (Hernández - Padilla et al., 2017).

La actividad de los ciclodipeptidos implica la anulación de la fosforilación de las proteínas quinasas Akt S473 y S6k T389; la inhibición de la fosforilación por los ciclodipeptidos se muestra en tiempos cortos de exposición (5 a 60 min) y luego se recupera en tiempos largos de exposición (120 a 240 min) (Hernández-Padilla et al., 2020).

Durán-Maldonado y colaboradores en el 2020 reportaron que los ciclodipeptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 reducían la viabilidad de manera dependiente a la dosis de la línea celular de melanoma murino B16-F0. Fue así como se realizó un experimento *in vivo* con ratones C57BL/6, a los que se les indujo cáncer de melanoma. En este proyecto, se contaba con un grupo de ratones sanos inyectados con ciclodipeptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 a una dosis de 100 mg/kg, los cuales no mostraron cambios en el tamaño y morfología celular del bazo, hígado,

corazón, riñón, pulmón y piel con respecto al control; por lo tanto, la administración de ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA01 mostro ser segura en un modelo animal. Además, el grupo de ratones sanos tratados con CDPs no presento valores alterados en parametros sanguíneos y enzimas como la ALT, ASTy LDH (Durán-Maldonado et al., 2020).

Figueroa-Guzmán y colaboradores realizaron un estudio con ratas de la cepa Wistar alimentadas con una dieta alta en grasas, las cuales fueron tratadas con CDPs *Pseudomonas aeruginosa* PA01 a una dosis de 10 mg/kg cada 3 y 6 días durante 10 semanas. Los resultados indicaron una disminución en la ganancia de peso y contenido de grasa visceral, efecto que no se debió a una inhibición del apetito; también se reportó una disminución de marcadores de inflamación como es el caso de NFkB e IL-6; y el grupo que fue administrado cada 3 días mostró una disminución en su contenido de lípidos hepáticos; reportando un efecto antiobesidad por parte de los CDPs de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Figueroa-Guzmán et al., 2022).

En 2022 se realizó un análisis transcriptómico de células HeLa en el cual se confirmó que la exposición de esta línea celular a ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* conduce a la modificación significativa del perfil de expresión génica. En total, los datos identificaron 151 genes que se expresan diferencialmente con el tratamiento con CDPs, de los cuales aproximadamente el 34%, están asociados con metabolismo. Dentro de ellos se encuentran aquellos relacionados a la cascada de señalización de la insulina, vías asociadas a inflamación, la vía de PI3K/Akt/mTOR, la respuesta a estrés oxidativo y la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β . También se reportó que el tratamiento con CDPs modula la expresión de seis genes fundamentales dentro de la vía de mevalonato/colesterol; además de que los niveles de colesterol en las células con tratamiento disminuían de forma considerable, indicando un bloqueo de esta vía por parte de los CDPs (Lázaro-Mixteco et al., 2022).

Los ciclodipéptidos tienen ventajas fisiológicas en comparación con otras moléculas debido a que poseen una mayor estabilidad, resistencia a proteasas y rigidez

conformacional. Se ha demostrado que en células cancerosas los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 detienen el ciclo celular en la transición G0 a G1 al bloquear la vía PI3K/ Akt/ mTOR inhibiendo los complejos mTORC1 Y mTORC2 de manera dependiente de TSC1/TSC2 (Lázaro-Mixteco et al., 2022).

En el año 2023, De Masi y colaboradores evaluaron la actividad del ciclo (His-Pro) en un modelo de ratón de MASLD en estado fibrótico inducido por CCl_4 y alimentados con una dieta occidental alta en grasa y sacarosa. El tratamiento consistió en tres dosis por semana del ciclo (His-Pro) a 20 mg/kg por vía oral. Como resultado del tratamiento se mostró una disminución del 8% de la masa grasa, una disminución de la acumulación de grasa hepática, citocinas proinflamatorias, un fenotipo mitocondrial mejorado y una disminución en la señalización de la vía ERK la cual se encuentra sobreexpresada en pacientes con MASLD (De Masi et al., 2023).

2. Justificación

La enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica (MASLD) es la enfermedad crónica hepática más común en el mundo, siendo la obesidad el principal factor de riesgo para su desarrollo y progresión. Se ha descrito que los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 tienen múltiples actividades biológicas. Recientemente se determinó la capacidad de estos ciclodipéptidos para modular la expresión de genes relacionados a procesos metabólicos. En un modelo de obesidad animal se determinó que el tratamiento con ciclodipéptidos redujo la ganancia de masa corporal, así como la acumulación de lípidos hepáticos. Por lo anterior es de nuestro interés estudiar el efecto de los CDPs utilizando un modelo de MASLD para poder elucidar el mecanismo molecular de estos compuestos en la evolución de la enfermedad.

3. Hipótesis

Los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 protegen contra la progresión de la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica en un modelo de obesidad en ratas de la cepa *Wistar*.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA01 sobre el daño generado por la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica en un modelo de obesidad en ratas de la cepa *Wistar*.

4.1 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del tratamiento con ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en los parámetros bioquímicos relacionados a la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica.
2. Evaluar el estrés oxidativo en tejido hepático de ratas con la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica bajo tratamiento con ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA01.
3. Analizar la expresión de genes relacionados a la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica en ratas obesas *Wistar* bajo tratamiento con ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA01.
4. Determinar el efecto del tratamiento con ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en la histopatología relacionados a la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica.

5. Metodología

5.1 Experimentos con animales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 6 semanas de edad; estas fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos de cinco individuos cada uno; el cual fue alimentado con una dieta obesogénica (previamente descrita por Figueroa-Guzmán y colaboradores) durante 45 semanas.

El alimento administrado en la dieta regular fue “Rodent Laboratory Chow Purina 5001”, este mismo fue utilizado para preparar el alimento en la dieta alta en grasas, junto con galletas con tapas sabor vainilla–chocolate tipo sándwich con lleno de crema sabor vainilla, pan molido, manteca animal y vegetal, en las siguientes proporciones:

Alimento	Galletas	Pan	Manteca vegetal	Manteca animal
30%	35%	10%	12.5%	12.5%

Cuadro 3. Porciones para la preparación de la dieta obesogénica.

El análisis bromatológico del alimento indica, que la dieta regular muestra un mayor contenido de grasas y carbohidratos, y menor contenido de proteína y fibra.

Dieta obesogénica

Ceniza	Grasa	Proteína	Fibra	Carbohidratos
3.56 g	25.19 g	14.00 g	0.63 g	56.54 g

Cuadro 4. Composición dieta obesogénica.

Dieta regular

Ceniza	Grasa	Proteína	Fibra	Carbohidratos
7.3 g	11.2 g	25.1 g	5.3 g	48.7 g

Cuadro 5. Composición dieta regular.

La dosis y vía de administración se determinaron por medio de pruebas realizadas previamente (anexo) proyecto en el cual se contó con los siguientes grupos:

	DR	DR+CDPs (5-IP)	DR+CDPs (10-IP)	OBS	OBS+CDPs (5-IP)	OBS+CDPs (10-IP)	OBS+CDPs (10-OR)
Dieta	DR	DR	DR	OBS	OBS	OBS	OBS
Dosis	-	5 mg/kg	10 mg/kg	-	5 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg
Días de admin.	-	c/3 días	c/ 6 días	-	c/ 3 días	c/ 6 días	c/ 6 días
Vía de admin.	-	IP	IP	-	IP	IP	OR
Vehículo	-	βCD	βCD	-	βCD	βCD	βCD

Cuadro 6. Distribución de los grupos en anexos. Admin: administración. DR: dieta regular. CDPs: ciclodipeptidos. OBS: dieta obesogénica. IP: intraperitoneal. OR: oral. βCD: β-ciclodextrinas.

El tratamiento con ciclodipéptidos se administró por vía intraperitoneal a una concentración de 5 mg/kg cada tres días durante 10 semanas. La distribución de los grupos fue la siguiente:

	CTRL	CTRL+CDPs	MASLD	MASLD+CDPs
Dieta	Regular	Regular	Obesogénica	Obesogénica
Dosis	-	5 mg/kg	-	5 mg/kg
Días de administración	-	c/2 días	-	c/ 2 días
Vía de administración	-	Intraperitoneal	-	Intraperitoneal
Vehículo	-	B ciclodextrinas	-	B ciclodextrinas

Cuadro 7. Organización de los grupos. MASLD: enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica. CTRL: control. CDPs: ciclodipéptidos.

Diariamente las ratas fueron pesadas, al igual que el alimento sobrante y las nuevas porciones para calcular el consumo de alimento. Una vez por semana se midieron parámetros murinométricos como circunferencia abdominal, circunferencia torácica y longitud.

5.1.1 Pruebas de tolerancia metabólica

Se realizaron pruebas de tolerancia metabólica antes del tratamiento, durante y en la última semana de tratamiento; basado en la metodología reportada por Zhou y colaboradores en 2021. Para la prueba de resistencia a la insulina las ratas eran sometidas a un ayuno matutino de 4 horas, terminado el periodo de ayuno se

median las concentraciones de glucosa con ayuda de un glucómetro Accu-Chek © Active ©, posteriormente se administró una dosis de insulina (0.4 u/kg a las ratas normales y 0.75 u/kg a las ratas obesas) y se midieron las concentraciones de glucosa cada 30 minutos durante 120 minutos.

En cuanto a la prueba de tolerancia a la glucosa se midieron las concentraciones basales de glucosa con ayuda de un glucómetro Accu-Chek © Active ©, después se administró dextrosa en una dosis de 3 g/kg en 3 mL de agua por vía oral y se midieron las concentraciones de glucosa cada 30 minutos durante 120 minutos.

Por último, se graficaron y analizaron los datos con ayuda del programa GraphPad Prism, también se calculó el área bajo la curva (AUC) el cual representa el nivel de glucemia.

5.2 Análisis histopatológico

Posterior a la eutanasia de las ratas se extrajeron muestras de los hígados y fueron fijados inmediatamente en paraformaldehído al 4% donde permanecieron hasta la deshidratación. En el caso del hígado se obtuvieron muestras por cortes longitudinales del lóbulo medial derecho. Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación de 4 horas en intervalos de 15 a 30 minutos en distintas concentraciones de etanol y xileno, en el último pase en parafina histológica permanecieron durante 12 horas para posteriormente ser incluidos. Se realizaron cortes de 4 micras de tejido y fueron colocados en portaobjetos para la posterior tinción con hematoxilina – eosina y tricrómica de Masson. Por último, se realizó el montaje con resina y se tomaron fotos en el microscopio.

5.3 Análisis de la expresión de genes

Se realizó un homogenado de hígado en TRIzol, posteriormente se añadieron 300 µL de cloroformo y se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm a 4°C durante 10

minutos. Para extraer el ARN se añadieron 500 µL de propanol y se incubaron en hielo durante 15 minutos para posteriormente centrifugar las muestras a 12 000 rpm a 4°C durante 10 minutos; se realizaron tres lavados con etanol para finalmente resuspender la pastilla en 10 µL de agua. Se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos y la pureza en 1 µL de muestra; añadiendo agua si era necesario hasta llegar a una concentración de 1500 µg/mL y una pureza mayor a 1.6.

Se utilizó DNAg Wipeout Buffer para la eliminación de ADNg y posteriormente se realizó la transcripción inversa 15 min a 42°C. Para la RT-PCR se utilizó el kit quantinova SYBR green PCR KIT (208056). Añadió en la placa de 96 pocillos, 7.5 µL de SYBER green, 1 µL de ROX, 0.5 µL buffer amarillo, 1 µL de cada oligo y 3 µL de agua para obtener un volumen final de 14 µL. El RT-qPCR se llevó a cabo con amplificaciones de 45 ciclos a 95°C durante 5s y 60°C durante 30 s, para posteriormente hacer el análisis de los datos por medio de la formula Delta Delta Ct. Como gen constitutivo se utilizó 18s.

GEN	TM	FW	REV	CITA
PSD3	54	CATCAGCACATTCCCAGAGT	GTGGGAGTAAAGTGCTTCC T	
ACC1	54	TGAGGAGGACCGCATTTATC	AAGCTTCCTTCGTGACCAGA	(Li et al., 2016)
PPAR a	55	CATCACCCGAGAGTTCCTAA AG	ATCCAGTTCGAGGGCATTG	(Elekofehi nti & Akinjiyan, 2021)
TSC1	56	CCCTCTACCTCCCCAATGGA	GGAGGGTCCGGATCTCATC T	
TSC2	57	TGTGACAAGAAACGGCACCT	CACAAGGCCCTCCATGTCTT	
FAS	57	TGCTGTGGATCATGGCTGTC	GGTTTCACGAACGCTCCTCT	
ACOX 1	57	TGTCTGTCACTTCTGTGCGCC	CGGACTGCCATCCAAGATG T	(Ebihara et al., 2022)

RASAL2	57	GGGCAGAGAGCTGTCAGTTT	AGAGGTCCCAATTTTGCCACA	
TGFB1	57	AGTGGCTGAACCAAGGAGAC	CAGGAAGGGTCGGTTCATGT	
CD36	58	GGCTAGCTGATTACTTCTGTGTAGT	CCTCCTCGTGCAGCAGAATCA	
APOB	58	CTGCTGAATGGTGCGCAAAC	CAGAGGGCTTTGCCACTAGC	
SREBP-1C	59	CGC TAC CGT TCC TCT ATC AAT GAC	AGT TTC TGG TTG CTG TGC TGT AAG	(Kaviarasan & Pugalendi, 2009)
MTTP	60	AAGGCCAATATGGACATCCAGGGT	TGTTATTACCACAGCCACC CGAT	(Dettlaff-Pokora et al., 2015)

Cuadro 8. Oligos para análisis de RT-PCR

5.4 Análisis del estrés oxidativo

5.4.1 Análisis de peroxidación lipídica

Se realizó la cuantificación de proteína por método de Bradford en homogenado de hígado; posteriormente se añadió lo equivalente a 500 mg de proteína, aforando con buffer de fosfatos para tener un volumen final de 500 µL. Posteriormente se añadió 1.5 mL de solución ácida (ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico y ácido clorhídrico); los tubos se colocaron en baño María a 94°C durante 20 min, para después dejar enfriar 5 min a temperatura ambiente y 5 min en hielo. Por último, se centrifugaron a 7 500 rpm durante 5 min y se leyeron en el espectrofotómetro a 532 nm.

5.4.2 Determinación de glutatión

Se realizó la cuantificación de proteína por método de Bradford en homogenado de hígado, para añadir 500 mg de proteína por muestra; posteriormente se desproteinizó con 200 μ L de ácido sulfosalicílico al 5%; los tubos fueron congelados y descongelados dos veces y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 min. Para realizar la lectura en el espectrofotómetro se añadieron 90 μ L de muestra, 250 μ L de DTNB, 400 μ L de buffer de fosfatos y 23 μ L de glutatión reductasa; se dejó incubando 5 min en oscuridad y posteriormente se leyó a 412 nm. Se realizó el análisis de los datos y de esta forma se obtuvo glutatión total.

Para glutatión oxidado se añadieron 3 μ L de 4-vinil-piridina y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se realizó la lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 412 nm, de igual forma que con el glutatión total. Para obtener el glutatión reducido, únicamente se obtuvo la diferencia entre el glutatión total y el glutatión oxidado.

6. Resultados

6.1 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la ganancia de peso de ratas con MASLD

Con el objetivo de desarrollar un modelo de MASLD en un estado avanzado de la enfermedad se alimentaron a dos de los cuatro grupos con una dieta obesogénica mientras que los grupos restantes de animales se alimentaron con dieta regular. En ambos casos la dieta de los animales fue la misma durante las 55 semanas que tuvo de duración el experimento. A partir de la semana 45 y durante las 10 semanas siguientes, se llevó a cabo la administración con CDPs tres veces por semana en una dosis de 5 mg/kg por vía intraperitoneal.

Durante todo el periodo experimental se registró de forma diaria la masa de los animales para así poder calcular la ganancia de peso por rata por semana, también se pesaron las porciones de alimento nuevas y sobrantes para calcular el consumo de alimento diario por rata (Fig. 11).

La ganancia de peso corporal medida en la última semana de tratamiento indico que la mayor ganancia se encuentro en el grupo MASLD; mientras que el grupo MASLD que fue administrado con CDPs (MASLD+CDPs) mostro una menor ganancia de peso e incluso pérdidas. Por otra parte, los grupos CTRL mantuvieron una ganancia de peso estable sin presentar diferencia significativa entre ellos (Fig. 11-A). En la figura 10 se pueden observar fotografías representativas de los individuos de cada uno de los grupos.

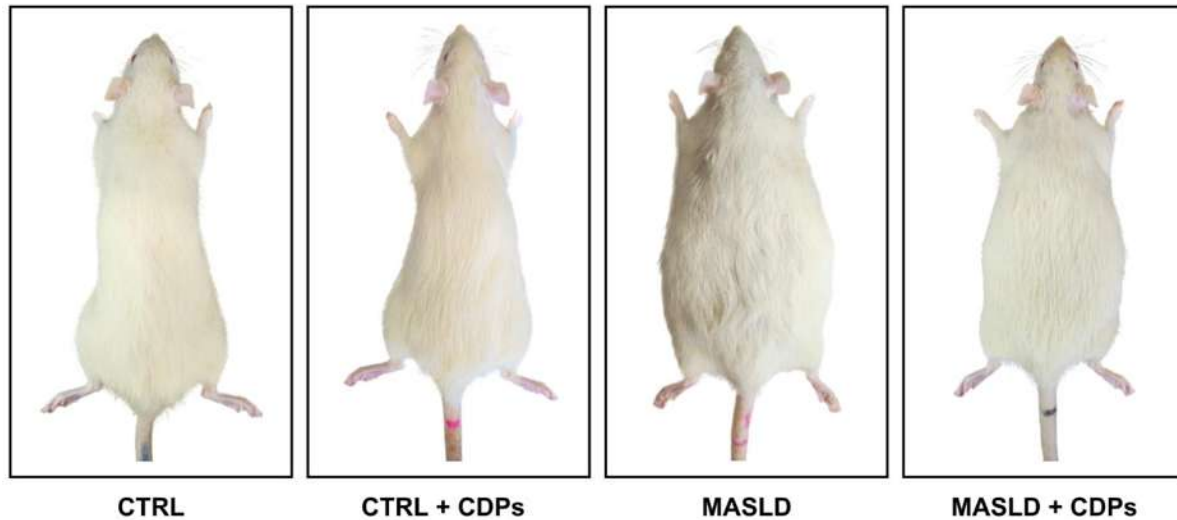


Figura. 10. Fotografías representativas de individuos en cada grupo.

En cuanto al consumo de alimento, se muestra que el grupo MASLD tuvo un menor consumo de alimento respecto a los otros grupos; el grupo MASLD+CDPs presento un consumo de alimento similar al de los grupos CTRL, indicando que las ratas pertenecientes a este grupo no disminuyeron su consumo de alimento durante el tratamiento (Fig. 11-B).

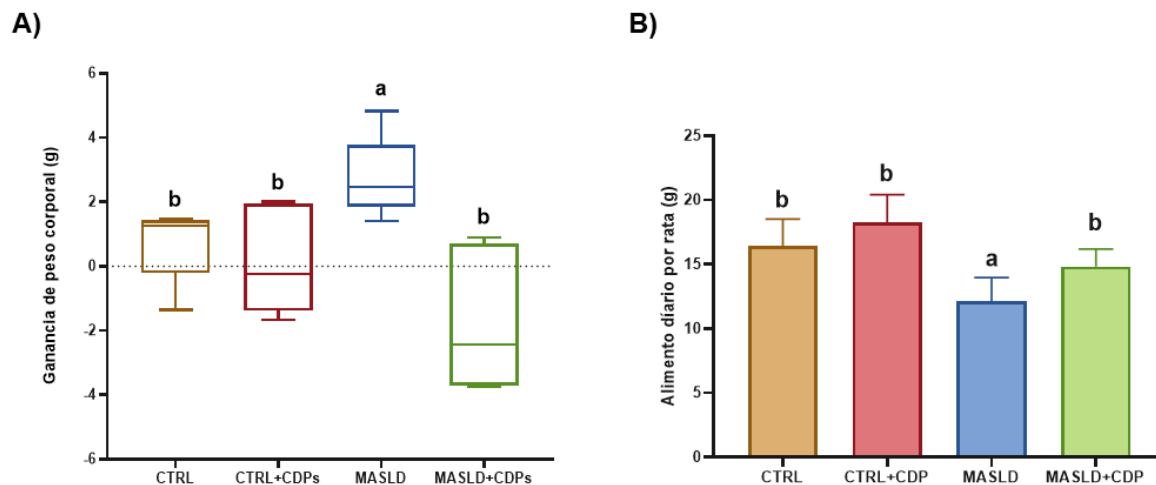


Figura. 11. Ganancia de peso y consumo de alimento. **A)** Ganancia de peso en gramos por rata por semana durante el periodo de tratamiento, es decir, de la semana 45 a la semana 55. El grupo MASLD+CDPs muestra una disminución de su ganancia de peso en comparación a MASLD. Los grupos CTRL y CTRL+CDPs se encuentran sin cambios significativos. **B)** Consumo de alimento diario por rata en gramos. El grupo MASLD muestra el menor consumo de alimento en comparación con los otros grupos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$.

Durante el periodo de tratamiento se midieron semanalmente los parámetros murinométricos que permitieron un monitoreo de las características físicas de los animales; los cuales fueron circunferencia abdominal y longitud. La circunferencia abdominal fue significativamente mayor para el grupo MASLD en comparación con los otros grupos (Fig. 12-A). Con el objetivo de comprobar que esta pérdida de peso y disminución de la circunferencia abdominal no fuera debida a una discrepancia en cuanto al crecimiento se realizó la medición de la longitud; la cual indico que los grupos MASLD no mostraron diferencias entre ellos, descartando que las diferencias previamente observadas, hayan sido a causa de un distinto crecimiento de los animales. De igual manera, los grupos CTRL no mostraron diferencias significativas entre ellos (Fig. 12-B).

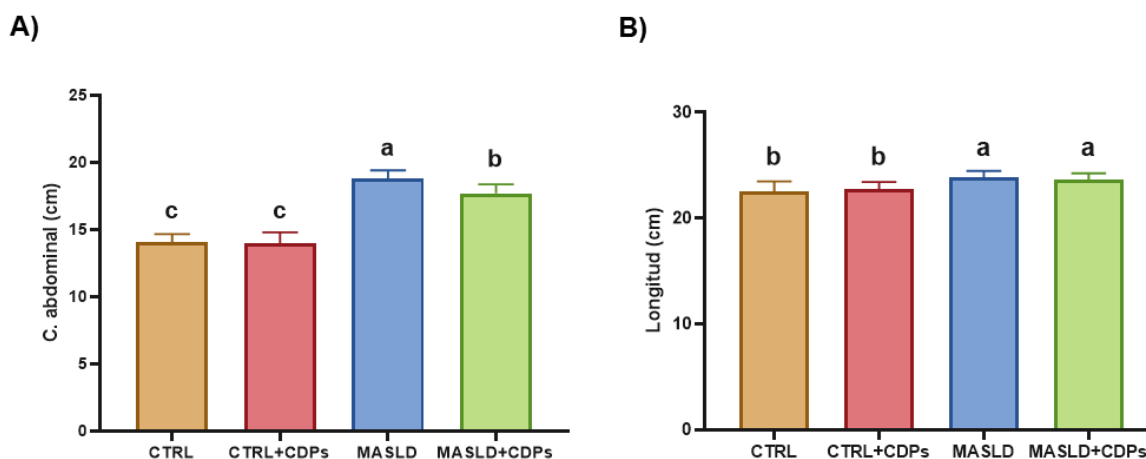


Figura. 12. Circunferencia abdominal y longitud. **A)** Circunferencia abdominal en centímetros. Los grupos CTRL y CTRL+CDPs muestran los valores más bajos, la circunferencia abdominal del grupo MASLD+CDPs tiene valores significativamente menores respecto al grupo MASLD. **B)** Longitud naso-anal en centímetros. Los grupos CTRL no muestran diferencias entre ellos, al igual que los grupos MASLD. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas (P < 0.05). n=6.

6.2 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre el metabolismo energético en ratas con MASLD

Durante el periodo del tratamiento se realizaron pruebas de resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa, antes del tratamiento (semana 1), durante el tratamiento (semana 5) y final del tratamiento (semana 10) (Fig. 13 y 14).

Este tipo de pruebas se evalúan a partir del área bajo la curva (AUC) el cual indica la concentración de glucosa en relación al tiempo. La AUC de las pruebas de resistencia a la insulina indicaron que el grupo CTRL no mostro diferencias significativas entre la prueba realizada antes del tratamiento y las que se realizaron posteriormente (Fig. 13-A). Por otra parte, el grupo CTRL+CDPs presento una disminución en su AUC durante el tratamiento y al final del tratamiento comparado con la prueba realizada antes del tratamiento; indicando que el tratamiento con CDPs disminuyó este parámetro incluso en ratas sanas (Fig. 13-B).

El grupo MASLD empeoró su estado de resistencia a la insulina comparando la prueba que se realizó antes del tratamiento con las pruebas realizadas posteriormente (Fig. 13-C). El grupo MASLD+CDPs presento una disminución en el estado de resistencia a la insulina comparando la evaluación realizada antes del tratamiento con las realizadas posteriormente, indicando un efecto en este parámetro que está presente desde la semana 5 de tratamiento y permaneció en el tiempo hasta la semana 10 (Fig. 13-D).

Los resultados obtenidos de prueba de tolerancia a la glucosa mostraron que, en el caso del grupo MASLD no se observaron diferencias significativas entre el inicio, durante y el final del tratamiento (Fig. 14-D). Esta misma observación se replicó para los grupos CTRL (Fig. 14-A y 14-B). destacando que los valores más altos para AUC se encontraron en el grupo MASLD. En el caso del grupo que recibió el tratamiento con CDPs se observó una mejora en la tolerancia a la glucosa a partir de la semana 5 y que permaneció hasta la semana 10 (Fig. 14-C).

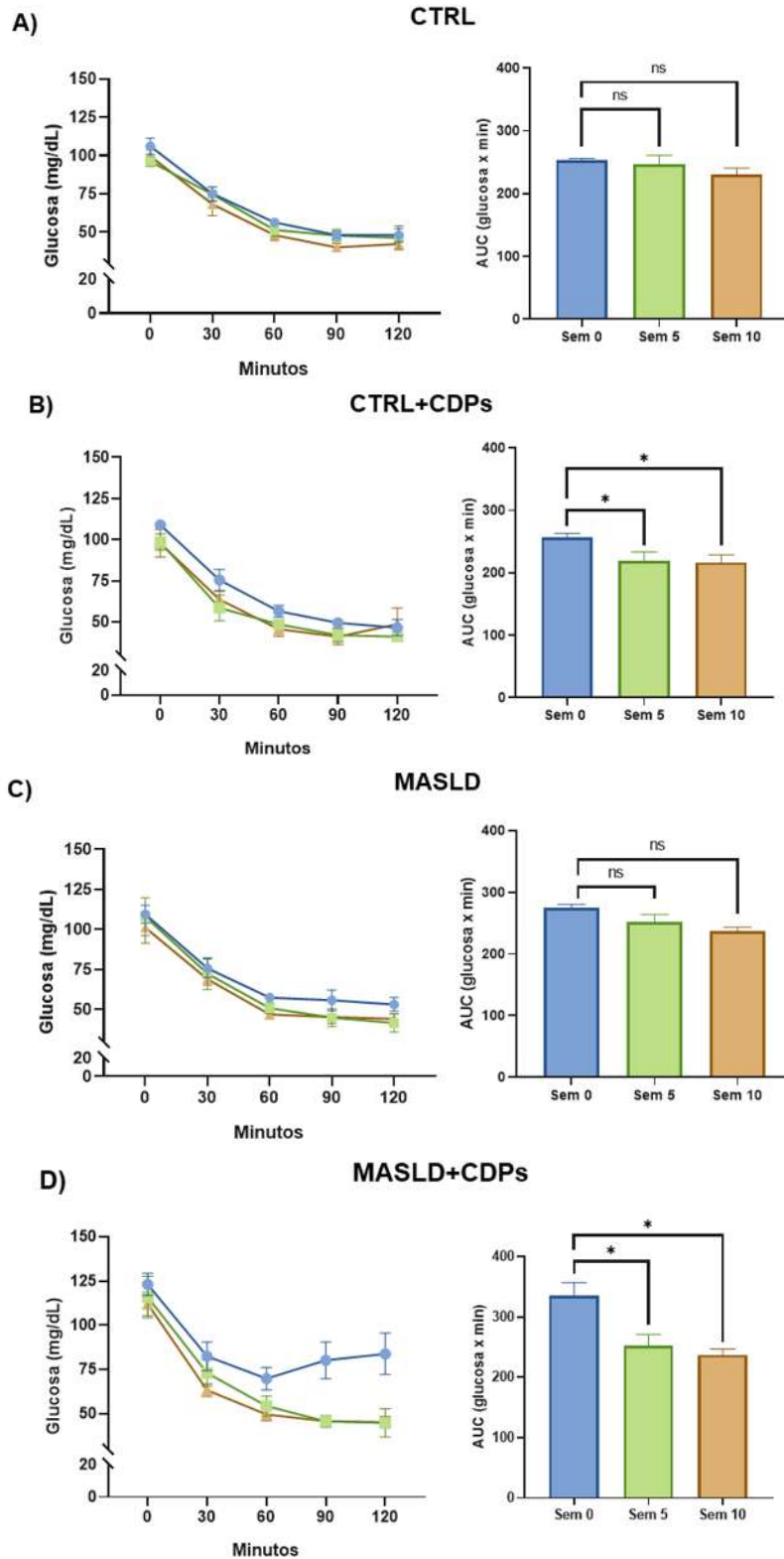


Figura. 13. Prueba de resistencia a la insulina. Azul: antes del tratamiento (semana 0). Verde: durante el tratamiento (semana 5). Naranja: final del tratamiento (semana 10). El análisis de la AUC indica diferencias significativas para los grupos CTRL+CDPs y MASLD+CDPs, comparando antes del tratamiento con durante y después del tratamiento. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Dunnet. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$.

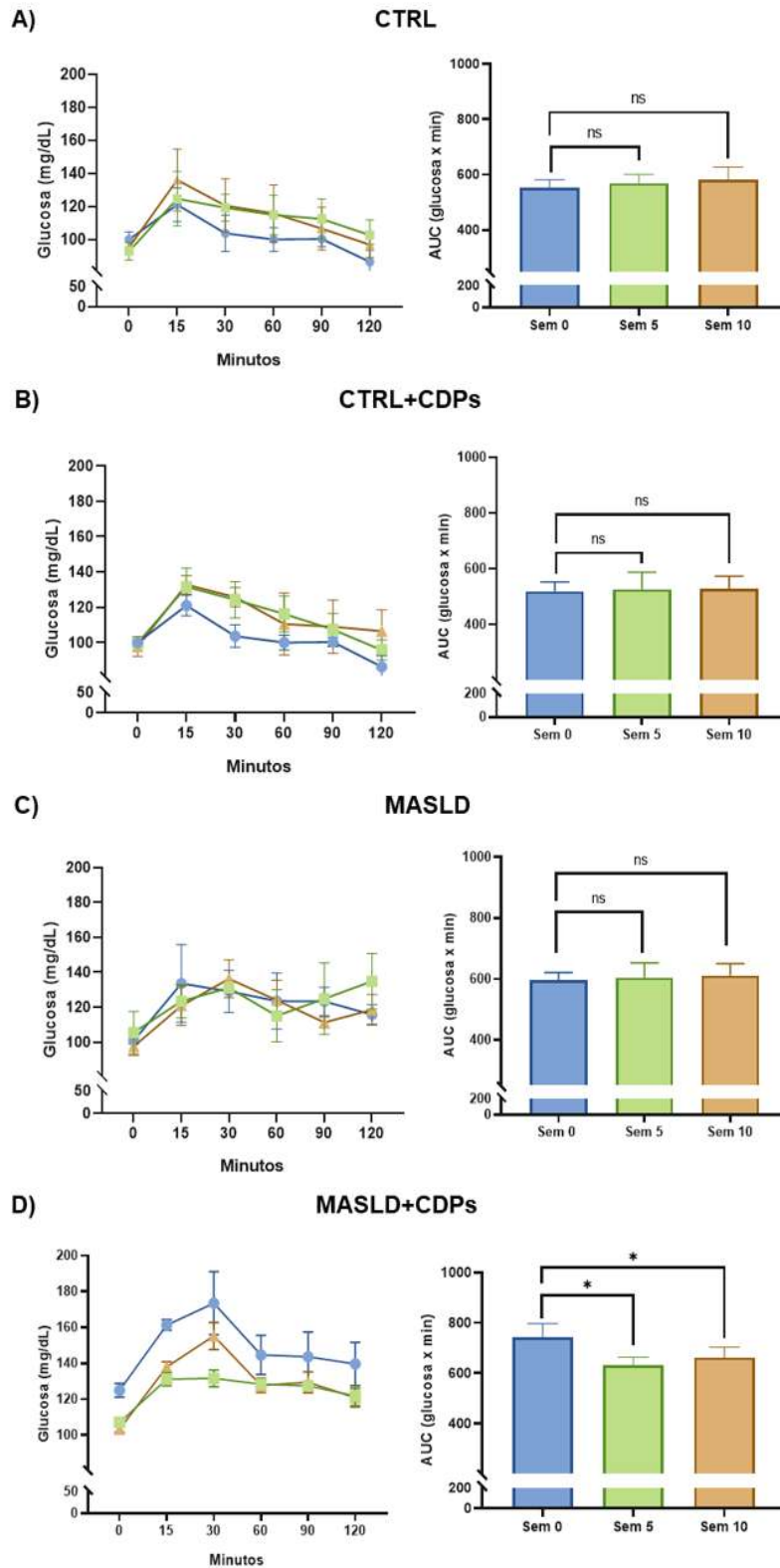


Figura. 14. Prueba de tolerancia a la glucosa. Azul: antes del tratamiento (semana 0). Verde: durante el tratamiento (semana 5). Naranja: final del tratamiento (semana 10). La AUC del grupo MASLD+CDPs es el único en mostrar diferencias significativas antes del tratamiento comparado con durante y después del tratamiento. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Dunnet. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$.

6.3 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la supervivencia de ratas con MASLD

Durante el periodo de tratamiento se registró la muerte súbita de dos individuos pertenecientes al grupo MASLD, uno en la semana 4 de tratamiento (es decir, la semana 49 de alimentación con la dieta obesogénica) y otro en la semana 7 (semana 52 de la dieta obesogénica); mientras que en el resto de los grupos la supervivencia permaneció en 100% (Fig. 15-A).

6.4 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre los órganos de ratas con MASLD

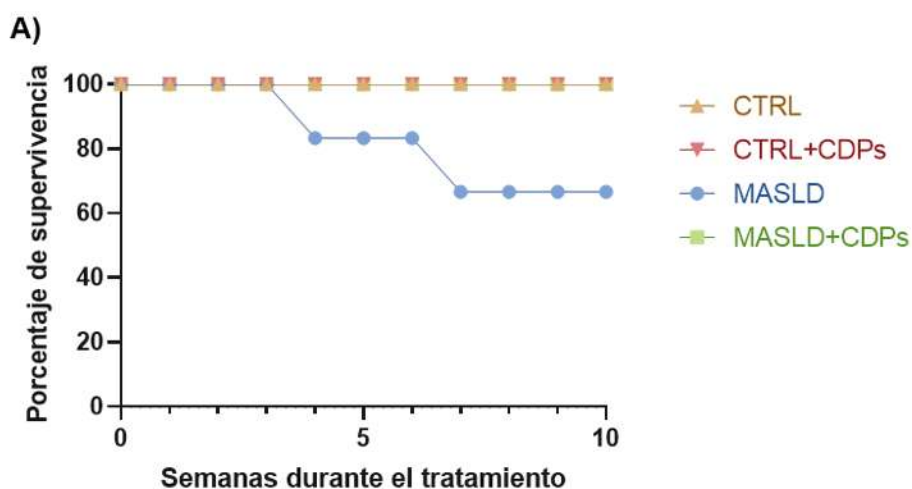


Figura. 15. Supervivencia. Porcentaje de supervivencia por grupo durante el periodo de tratamiento; indicando dos pérdidas del grupo MASLD, la primera a la semana 4 de tratamiento y la segunda en la semana 7 de tratamiento. Los demás grupos permanecieron en un porcentaje de supervivencia del 100%.

Posterior a la eutanasia de las ratas se extrajeron diversos órganos como bazo, riñones, corazón, hígado y tejido adiposo, los cuales fueron pesados y fotografiados.

El peso del hígado de las ratas correspondientes al grupo MASLD fue significativamente mayor comparado con los hígados de los animales de los demás

grupos. El grupo MASLD+CDPs presento pesos similares a los hígados de las ratas correspondientes a los grupos CTRL (Fig. 16-A).

En la figura 16-B se pueden observar fotografías representativas de los hígados de los animales correspondientes a cada grupo; en la fotografía del grupo MASLD se puede observar una zona fibrótica resaltada en un cuadrado rojo.

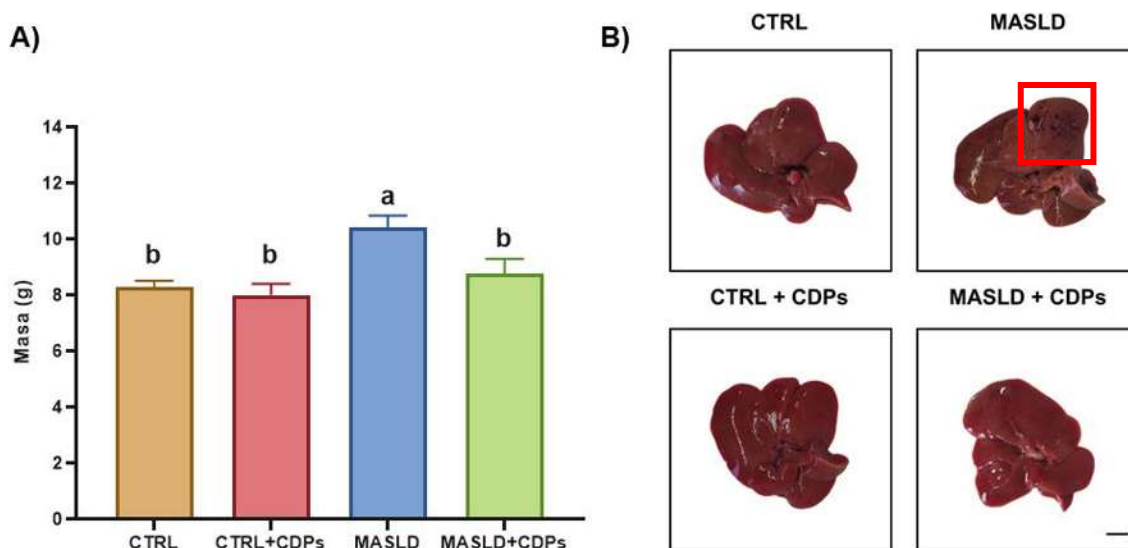


Figura. 16. Peso del hígado. A) Masa del hígado en gramos. El grupo MASLD muestra una masa en el hígado significativamente mayor comparada con los demás grupos. El grupo MASLD muestra una masa similar a la de los grupos CTRL. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$. **B)** Fotografías representativas de hígados de ratas pertenecientes a cada grupo. Zona fibrótica señalada con cuadro rojo. Escala: 1 cm.

El grupo MASLD mostro la mayor masa de tejido adiposo, seguido por el grupo con MASLD que fue tratado con CDPs, el cual es significativamente menor que el grupo que no recibió tratamiento. Los grupos CTRL presentaron la menor masa de tejido adiposo sin mostrar diferencias significativas entre ellos (Fig. 17-A).

En la figura 17-B se muestran fotos representativas del tejido adiposo de los animales pertenecientes a cada grupo, destacando que la cantidad de tejido adiposo fue significativamente menor para los grupos CTRL en comparación con los grupos MASLD.

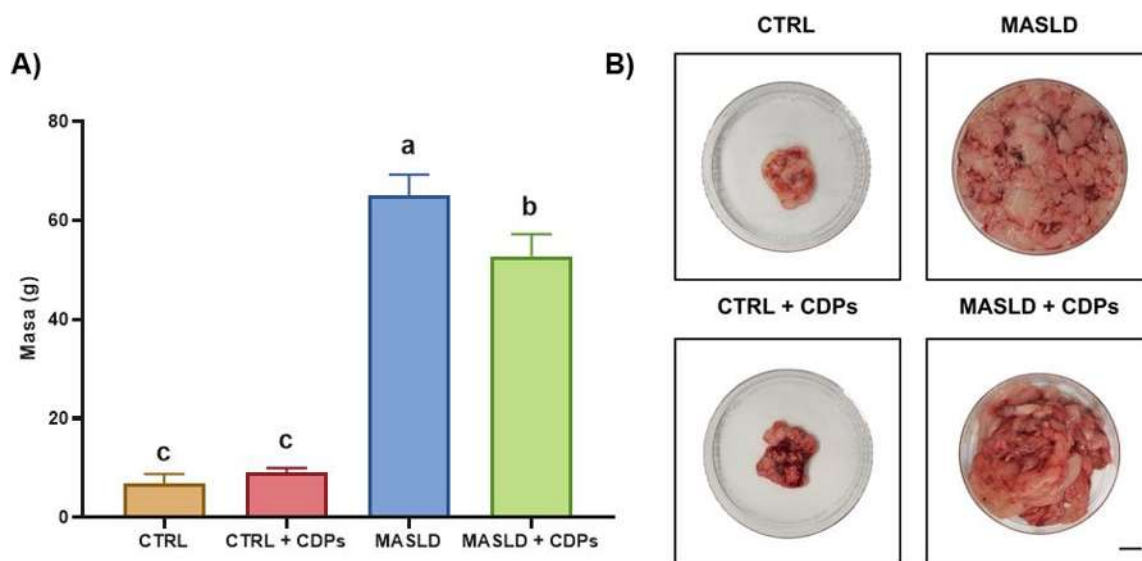


Figura. 17. Peso del tejido adiposo. A) Masa del tejido adiposo en gramos. El grupo MASLD muestra la mayor masa para el tejido adiposo, el grupo MASLD+CDPs muestra una masa en tejido adiposo significativamente menor en comparación con el grupo sin tratamiento. Los menores valores se encuentran en los grupos CTRL los cuales son similares entre ellos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$. **B)** Fotografías representativas de hígados de ratas pertenecientes a cada grupo. Escala: 1 cm.

En cuanto al peso de otros órganos como el bazo, riñones y corazón, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales (Fig. 18-A).

En la figura 18-B se pueden observar fotografías representativas de los órganos pertenecientes a cada uno de los grupos, en las cuales no se observan diferencias macroscópicas aparentes; sin embargo, en el corazón del grupo MASLD se pudo visualizar una zona obscurecida con características propias de un infarto, anomalía que no se encuentra en ninguno de los otros grupos.

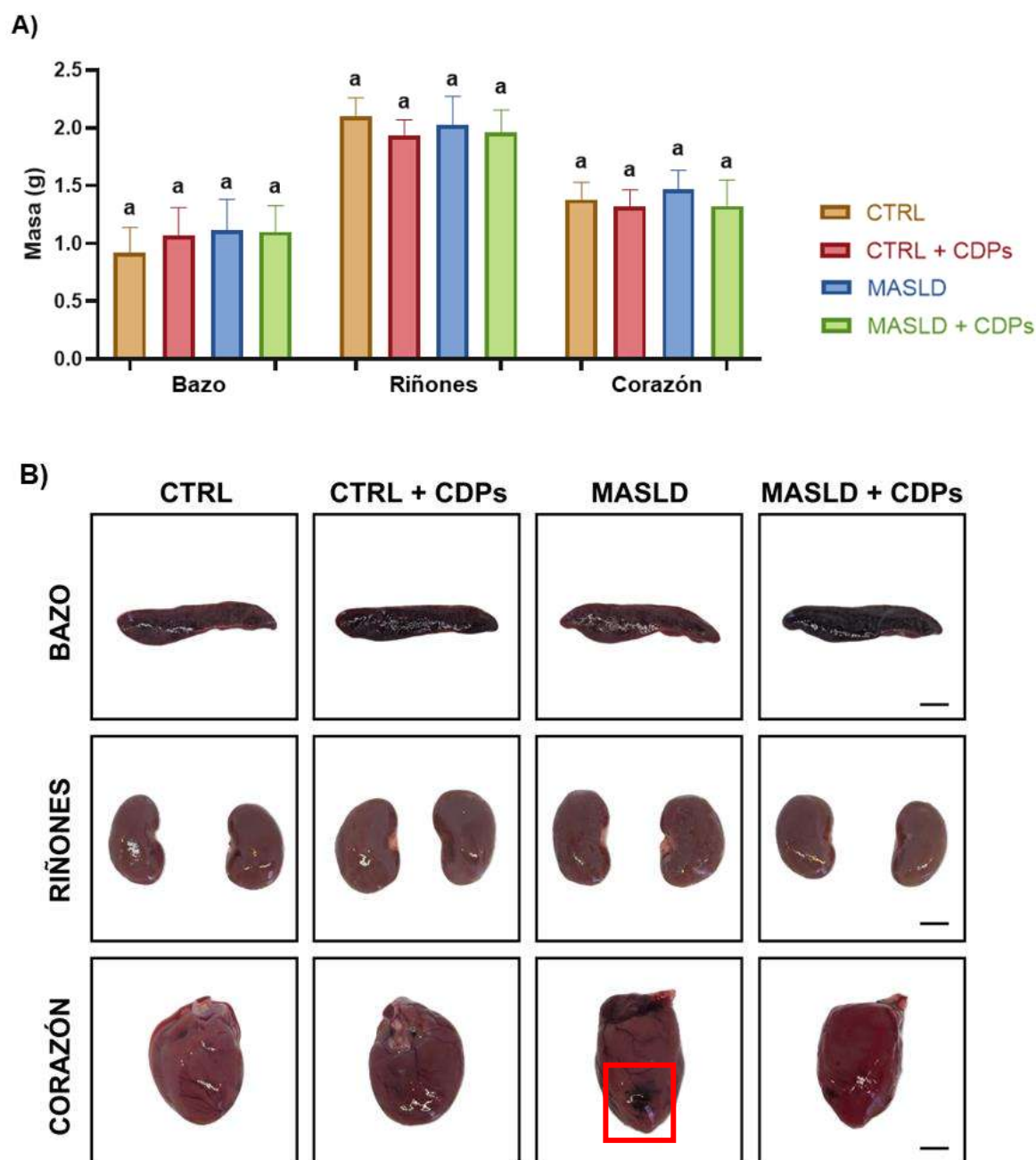


Figura. 18. Peso de órganos. A) Masa del bazo, riñones y corazón en gramos. La masa de los diferentes órganos no muestra diferencias significativas entre los grupos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$. **B)** Fotografías representativas de bazo, riñones y corazón de ratas pertenecientes a cada grupo. Infarto señalado con cuadrado rojo. Escala: 1 cm.

6.5 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre estrés oxidativo presente en el hígado de ratas con MASLD

En un fragmento del hígado obtenido de los animales se realizó un análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Fig. 19-A) en el cual se observan los mayores niveles en el grupo MASLD, con una reducción de las TBARS para el grupo MASLD que recibió el tratamiento con CDPs. El grupo MASLD muestra diferencias significativas respecto a todos los grupos, tanto el que recibió tratamiento como los grupos CTRL, siendo estos últimos los que presentan menores niveles de TBARS.

El estrés oxidativo ocurre cuando se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) o cuando la capacidad de las defensas antioxidantes celulares se ve reducida. Las células generan ERO como consecuencia de un aumento en el metabolismo o como respuesta al estrés. El glutatión es un sistema antioxidante que juega un rol importante en el mantenimiento del estado redox en la célula, por lo que se realizó la cuantificación del glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG). Representando la relación entre estos dos como GSH/GSSG. En estado fisiológico esta relación es baja, indicando que hay una mayor cantidad de glutatión reducido respecto al oxidado; así es como se observaron los niveles para los grupos CTRL. El grupo MASLD+CDPs no mostro diferencias significativas respecto a los grupos CTRL, sin embrago, en el caso del grupo MASLD se observaron mayores niveles de glutatión oxidado versus glutatión reducido indicando un estado de estrés oxidativo (Fig. 19-B).

Posteriormente se analizó la expresión relativa de ARNm para el factor nuclear 2 derivado de eritroide (Nrf2) factor de transcripción que desempeña un papel muy importante en la respuesta antioxidante; los resultados del análisis muestran una tendencia al aumento en el grupo MASLD, pero sin llegar a mostrar diferencias significativas en comparación con el grupo que recibió el tratamiento con CDPs. Los grupos CTRL son los que muestran los niveles más bajos de la expresión de este gen (Fig. 19-C).

De igual forma, se analizó la expresión de glutatión peroxidasa 1 (GPX1) y Cisteína-glutamato ligasa (GCLG) en las cuales los mayores niveles de expresión fueron para el grupo MASLD, mostrando diferencias significativas respecto a los demás grupos; sugiriendo que este aumento en la respuesta antioxidante funciona como un mecanismo compensatorio (Fig. 19-C).

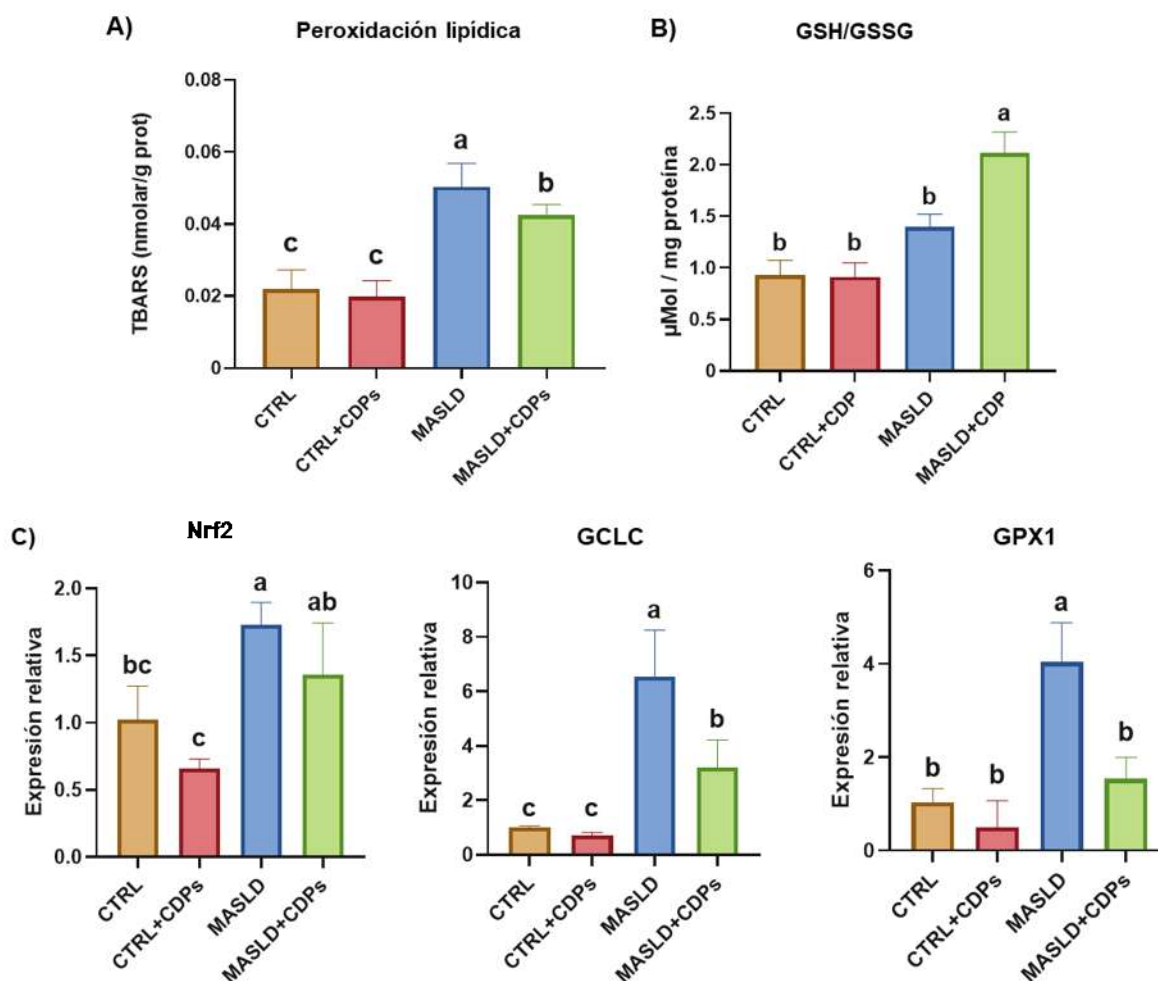


Figura. 19. Estrés oxidativo y respuesta antioxidante. A) Peroxidación lipídica en hígado. La mayor cantidad de TBARS se registró en el grupo MASLD, seguido del grupo MASLD+CDPs sin embargo, este muestra una disminución significativa en los niveles de TBARS. Los grupos CTRL no muestran diferencias significativas entre ellos. B) Relación entre glutatión oxidado y reducido (GSH/GSSG). El grupo MASLD+CDPs indica altas concentraciones de GSH/GSSG, siendo un marcador de un aumento en la respuesta oxidativa. C) Niveles de expresión relativa de ARNm, con 18s como gen constitutivo. GCLG: Cisteína-glutamato ligasa. Nrf2: Factor nuclear 2 derivado de eritroide. GPX1: Glutatión peroxidasa 1. El grupo MASLD presenta un aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante los cuales son significativamente mayores comparados con los demás grupos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$.

6.6 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la expresión de componente de la Vía Akt/mTOR en el hígado de ratas con MASLD

Se realizó el análisis de la expresión de genes relacionados con la vía de mTOR por RT-qPCR. El análisis de los datos indica una reducción en la expresión de TSC1 (hamartina) en el grupo que recibió el tratamiento con CDPs con valores similares al grupo CTRL (Fig. 20-A). En el caso de TSC2 (tuberina) no se muestra diferencias significativas entre el grupo MASLD y CTRL, pero los grupos que recibieron tratamiento con CDPs muestra una reducción en la expresión para ambos grupos (Fig. 20-B). Para Akt no se muestran diferencias significativas entre los grupos (Fig. 20-C). Por último, la evaluación de mTOR indicó una reducción en su expresión en respuesta al tratamiento con ciclodipeptidos en comparación al grupo MASLD; los datos del grupo MASLD+ CDPs son similares a los de los grupos CTRL (Fig. 20-D).

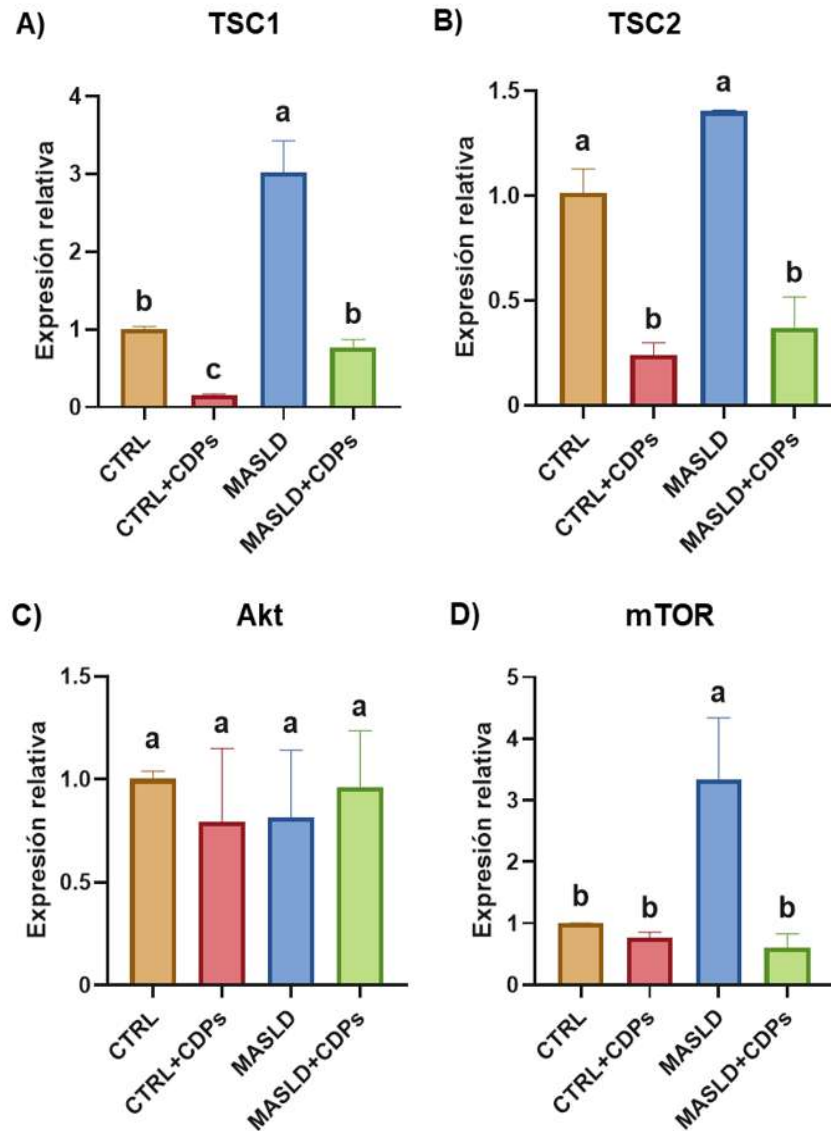


Figura. 20. Vía mTOR. A) Esclerosis tuberosa 1 (TSC1) **B)** Esclerosis tuberosa 2 (TSC2). La expresión de TSC1 y TSC2 se ve aumentada en el grupo MASLD, disminuyendo en el grupo MASLD+CDPs y los grupos CTRL. **C)** Cinasa serina-treonina (AKT) no mostró diferencias significativas en su expresión en los diferentes grupos. **D)** Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) aumento de forma significativa su expresión en el grupo MASLD, disminuyendo en el . Niveles de expresión relativa con 18s como gen constitutivo. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=4$.

6.7 efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la exportación de vLDL y β -oxidación en el hígado de ratas con MASLD

Se realizó el análisis de la expresión de genes relacionados con la síntesis y exportación de lipoproteínas de muy baja densidad (vLDL) y la β -oxidación. La proteína microsomal transportadora de triacilglicéridos (MTTP) mostro una disminución en su expresión por el tratamiento con CDPs siendo estadísticamente significativo respecto al grupo MASLD. La lipoproteína APOB también mostro una disminución en su expresión en los grupos que fueron tratados con CDPs, siendo los valores más altos para el grupo MASLD, que muestra diferencias significativas respecto a los otros grupos. Para RASAL2 se puede identificar el mismo comportamiento, teniendo los valores más alto en la expresión para el grupo MASLD y mostrando diferencias significativas respecto a los demás grupos (Fig. 21-A).

PPAR α (receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa) muestra una disminución en su expresión en el grupo MASLD+CDPs en comparación al grupo MASLD, siendo este último el que mostro los valores más elevados con diferencias significativas respecto a los otros grupos. Para el caso de ACOX1 (acil-coenzima A oxidasa 1 peroxisomal) se mostró una disminución en su expresión en el grupo MASLD teniendo los niveles más altos para el grupo CTRL. El grupo MASLD que recibió el tratamiento mostro un aumento en la expresión de ACOX1 siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo MASLD (Fig. 21-B).

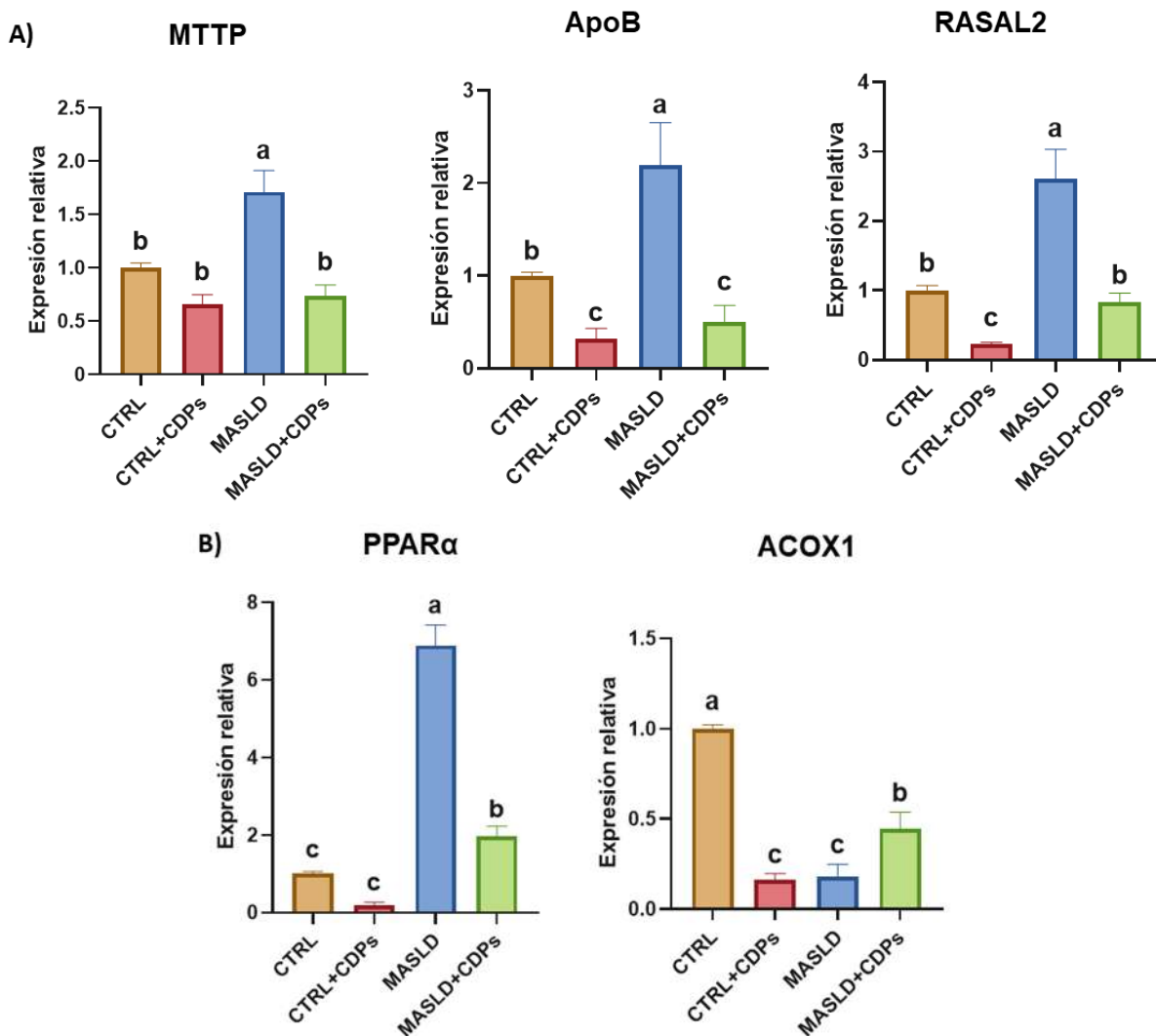


Figura. 21. Síntesis de vLDL y β -oxidación. **A)** Genes relacionados con la síntesis y exportación de vLDL. MTTP: proteína microsomal de transferencia de triacilglicéridos. APOB: apoproteína B. RASAL2: proteína activadora de RAS. De forma general se muestra un aumento en la expresión de genes relacionados con la exportación de vLDL en el grupo MASLD, la cual disminuye de forma significativa con el tratamiento con CDPs. **B)** Genes relacionados con la β -oxidación. PPAR α : receptor activado por proliferadores peroxisomales Alpha. Acox1: acil-CoA oxidasa. El grupo MASLD muestra una disminución en la expresión de genes relacionados con la β -oxidación, aumentando la expresión en el grupo MASLD+CDPs. Expresión relativa tomando como gen constitutivo 18s. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=4$.

6.8 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la lipogénesis *de novo* y transporte de ácidos grasos en el hígado de ratas con MASLD

Se analizó la expresión de genes relacionados a la lipogénesis *de novo*, SREBT 1C (proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides) y ACC1 (acetil-coA carboxilasa). En ambos casos se registró una disminución de la expresión de estos genes en los grupos con MASLD que fueron tratados con CDPs en comparación con el grupo MASLD (Fig. 22-A). En el caso de ACC1 este también disminuyó su expresión en el grupo CTRL+CDPs de forma significativa; en el caso de SREBT 1C no se muestran diferencias entre los grupos CTRL.

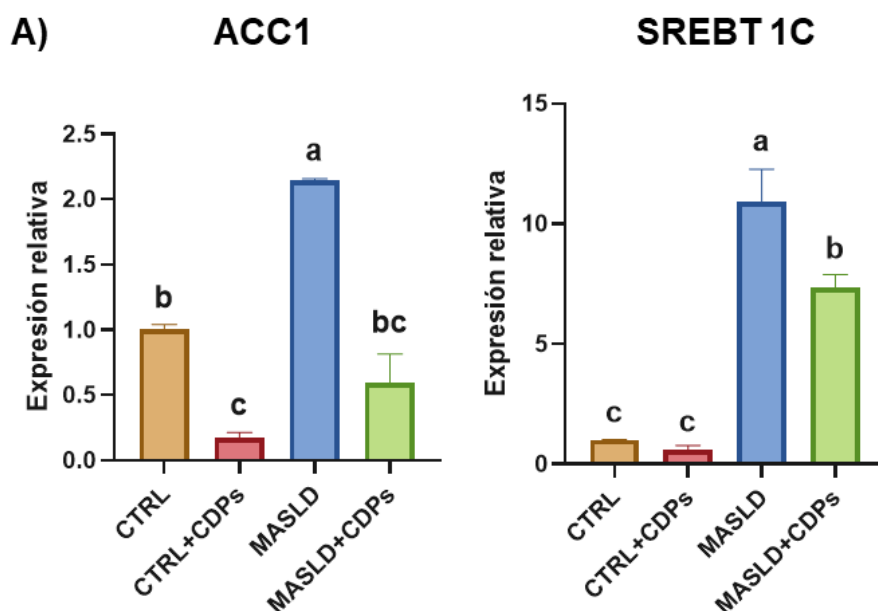


Figura. 22. Lipogénesis *de novo*. A) ACC1: acetil-coA carboxilasa. SREBT-1C: proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides. El grupo MASLD muestra un aumento significativo en la expresión de genes relacionados con la lipogénesis *de novo*, por otra parte, el grupo MASLD+CDPs disminuyó significativamente la expresión de estos genes, los grupos CTRL no indican diferencias significativas entre ellos. Expresión relativa tomando como gen constitutivo a 18s. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=4$.

Adicionalmente se evaluó la expresión de dos genes relacionados con el ingreso de ácidos grasos libres al hepatocito, PSD3 (pleckstrina y dominio Sec7) y CD36. PSD3 mostro un aumento en su expresión en el grupo de animales con MASLD en comparación con los animales de los grupos CTRL. La expresión de PSD3 disminuyo con el tratamiento con ciclodipéptidos mostrando diferencias significativas respecto al grupo de animales con MASLD. En el caso de CD36, este tuvo tendencia a aumentar en estado de MASLD, sin embargo, no es estadísticamente significativo; pero en el caso del grupo MASLD que fue tratado con CDPs disminuyo su expresión de forma significativa respecto al grupo sin tratamiento (Fig. 23-A).

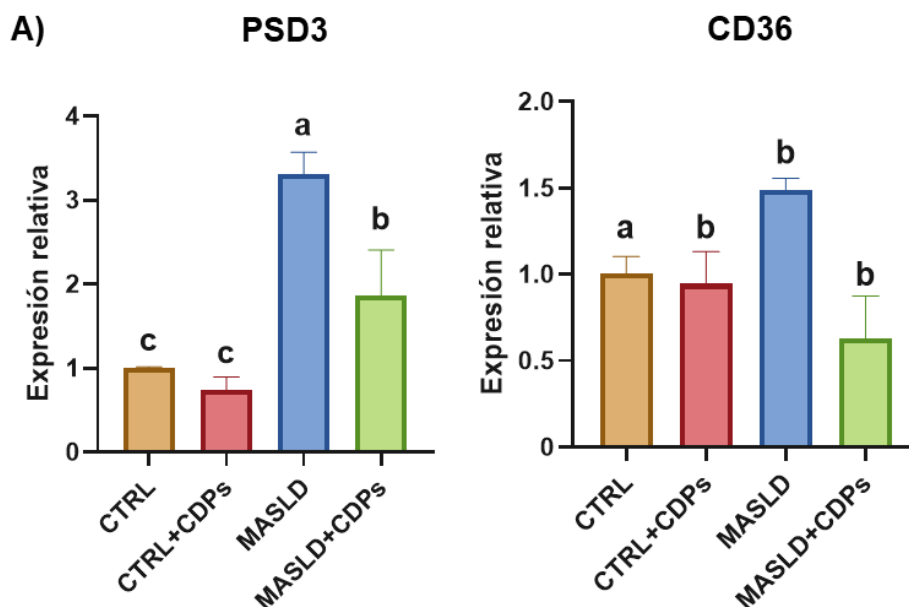


Figura. 23. Transporte de ácidos grasos. El grupo MASLD+CDPs indica una disminución en la expresión de genes relacionados al transporte de ácidos grasos, algunos siendo incluso similar al CTRL. Expresión relativa tomando como gen constitutivo 18s. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=4$.

6.9 Efecto de los CDPs producidos por PA01 sobre la inflamación y la fibrosis en el hígado de ratas con MASLD

El análisis de la expresión de TGF- β indica una disminución en hígados de ratas obesas tratadas con CDPs; mostrando los valores más altos para el grupo MASLD. Siendo este un importante marcador de fibrosis. La expresión de Fas () también se ve aumentada en la patología de MASLD, disminuyendo su expresión con el tratamiento con CDPs. Ambos genes mostraron diferencias significativas entre el grupo MASLD y los demás grupos; tanto los CTRL como el grupo MASDL+CDPs (Fig. 24-A).

En el caso de la expresión de los genes relacionados a la inflamación se observó el mismo comportamiento, encontrando en el grupo de animales con MASLD los valores más altos para la expresión de NF κ B e IL-6. El tratamiento con CDPs disminuyó la expresión de estos marcadores de inflamación a pesar de que las ratas tratadas siguieron siendo alimentadas con una dieta obesogénica (Fig. 24-B).

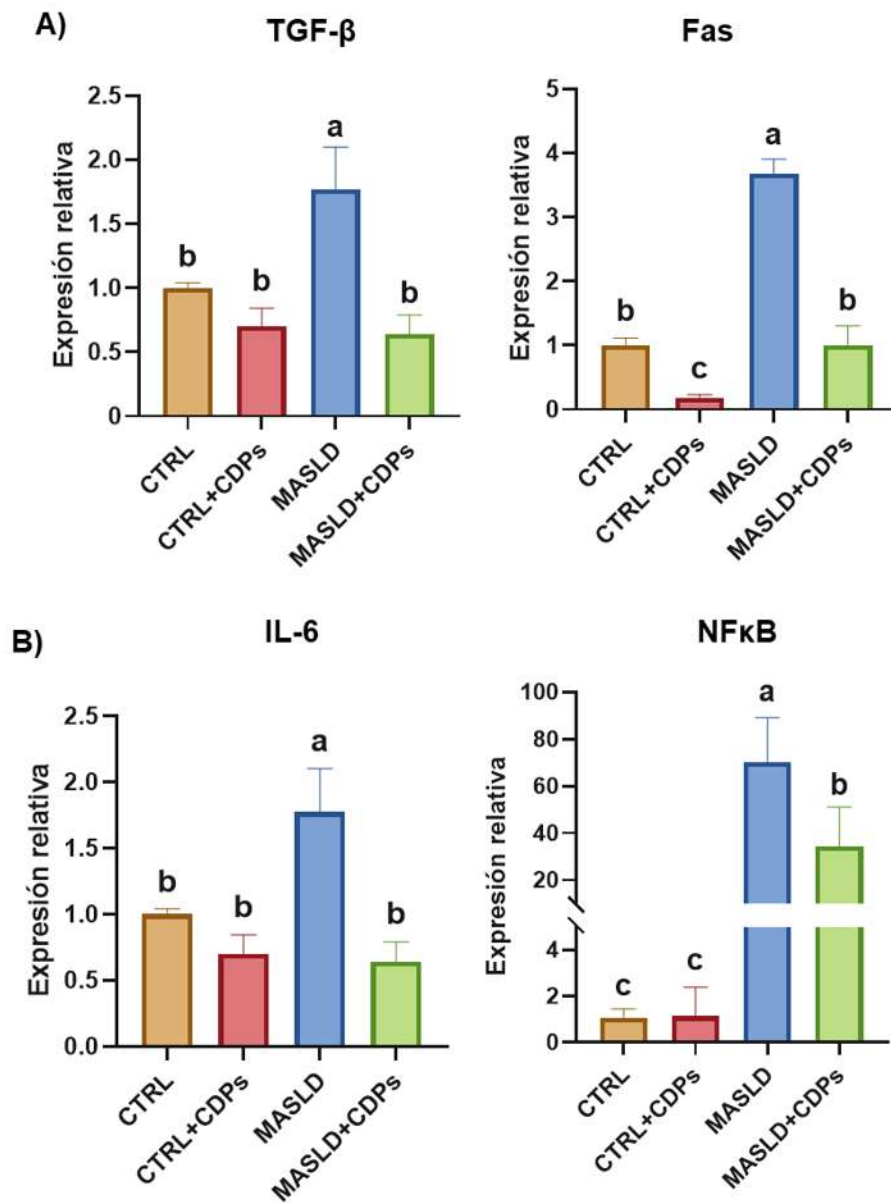


Figura. 24. Fibrosis e inflamación. **A)** Genes relacionados a fibrosis y muerte celular. TGF- β : Factor de crecimiento transformante β . El grupo MASLD muestra los niveles más altos en la expresión de marcadores de fibrosis y muerte celular, indicando una disminución en la expresión de estos ante el tratamiento con CDPs. **B)** Genes relacionados a inflamación. IL-6: interleucina 6. NF κ B: factor nuclear κ B. Expresión relativa tomando como gen constitutivo 18s. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=4$.

6.10 Efecto de los CDPs de PA01 sobre la funcionalidad del hígado en ratas con MASLD

Con el objetivo de determinar si los hallazgos encontrados corresponden con una mejora en el funcionamiento hepático, se realizó la cuantificación de albúmina en suero, la cual es considerado un marcador estándar de este parámetro. Los niveles cuantificados más bajos para las ratas pertenecientes al grupo MASLD, mientras que el grupo de animales MASLD+CDPs mostro niveles similares a los grupos CTRL. (Fig. 25).

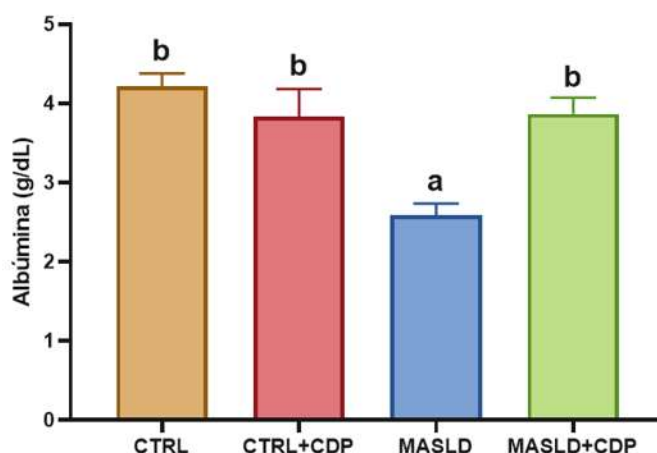


Figura. 25. Albúmina sérica. Los niveles de álbamina sérica se ven disminuidos en el grupo MASLD, los grupos CTRL y el grupo MASLD+CDPs no muestran diferencias entre ellos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=6$.

6.11 Efecto de los CDPs de PA01 sobre la histopatología del hígado en ratas con MASLD

Con la finalidad de determinar si la administración de CDPs disminuye los marcadores histológicos asociados a MASLD se realizó la tinción hematoxilina y eosina en cortes de hígado. El análisis histopatológico mostro que el grupo MASLD sin tratamiento presento una mayor cantidad de focos de inflamación (Fig. 28-A) en

comparación con los otros grupos. Una característica común encontrada a nivel histológico de la esteatosis hepática es la presencia de gotas lipídicas, por lo que se realizó un conteo con ayuda del software ImagenJ y se midió el diámetro de la gota más grande y la más pequeña de las diferentes fotografías tomadas de cada uno de los integrantes de los animales con MASLD (tratados y no tratados con CDPs); este análisis no se realizó para los grupos CTRL al no contener una cantidad de gotas lipídicas observable y cuantificable; de igual forma en estos grupos no se pudo obtener una puntuación NAS al presentar una ausencia de la enfermedad MASLD y por lo tanto no presentar las características histopatológicas representativas de esta.

El conteo de las gotas lipídicas indico que estas fueron más abundantes en el grupo MASLD en comparación con el grupo MASDL+CDPs (Fig. 26-A y 28-B). En cuanto al tamaño de las gotas, el grupo MASLD presento gotas de mayor tamaño, una característica representativa de la esteatosis hepática macrovesicular; por otra parte, el grupo MASLD que fue tratado con CDPs presento un menor diámetro en sus gotas lipídicas, una característica representativa de la esteatosis microvesicular (Fig. 26-B).

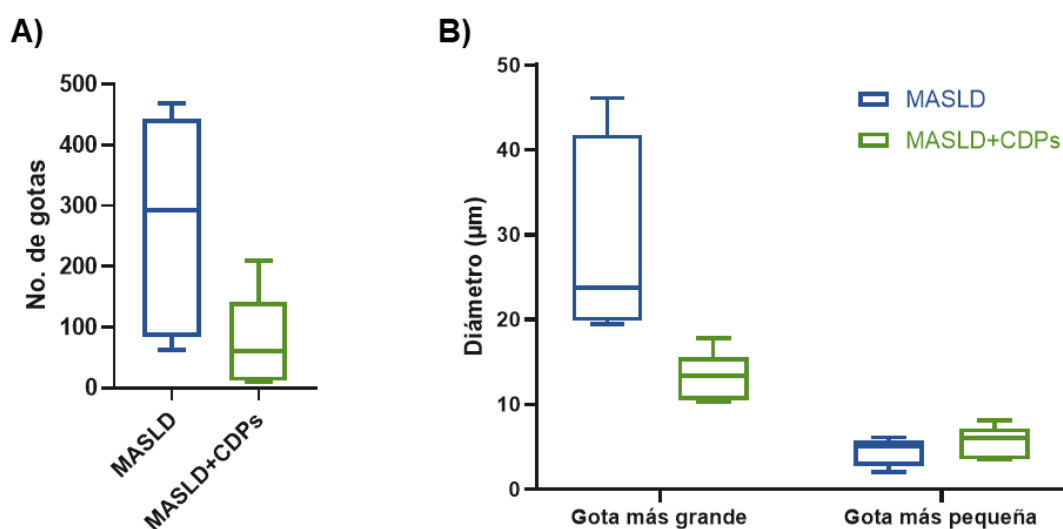


Figura. 26. Número y tamaño de las gotas lipídicas. A) Número de gotas lipídicas. B) Diámetro en µm de la gota más grande y más pequeña. Análisis realizado en el software ImagenJ, en fotografías tomadas a 10x. n=5

El análisis de la puntuación NAS, en la cual se evaluaron tres características: focos de inflamación, baloneamiento y esteatosis; indicó una mayor puntuación para el grupo de animales con MASLD en comparación al grupo que fue tratado con CDPs (Fig. 27-A).

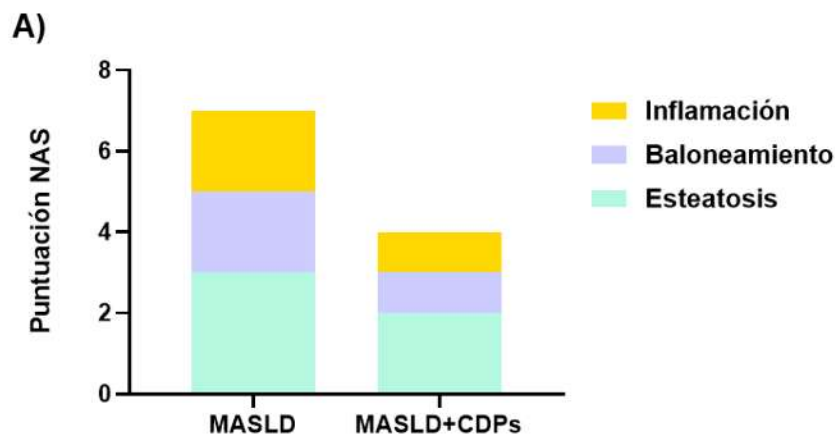


Figura. 27. Puntuación NAS. La puntuación NAS para el grupo MASLD se encuentra entre los 6 y 8 puntos mientras que para el grupo MASLD+CDPs en los 4 puntos. Lo que indica una menor puntuación para el grupo que recibió el tratamiento con CDPs.

Para realizar la evaluación de la fibrosis hepática se realizó la tinción tricrómica de Masson en la cual se tiñen las fibras de colágeno (visibles en color azul) que son características del estado de fibrosis. El análisis histopatológico indicó una mayor cantidad de fibras de colágeno para el grupo de animales con MASLD, en comparación con el grupo que recibió el tratamiento con CDPs y los grupos CTRL. Se puede observar que la acumulación de matriz extracelular comienza en la vena central y se extiende por los sinusoides a lo largo de la estructura hepática; mostrando una mayor conglomeración de fibras de colágeno en estas zonas (Fig. 29-A).

En los grupos CTRL únicamente se puede observar una pequeña cantidad de fibras de colágeno que presentes en el borde de la vena central y se encuentra delimitado sin extenderse por medio de los sinusoides (Fig. 29-B).

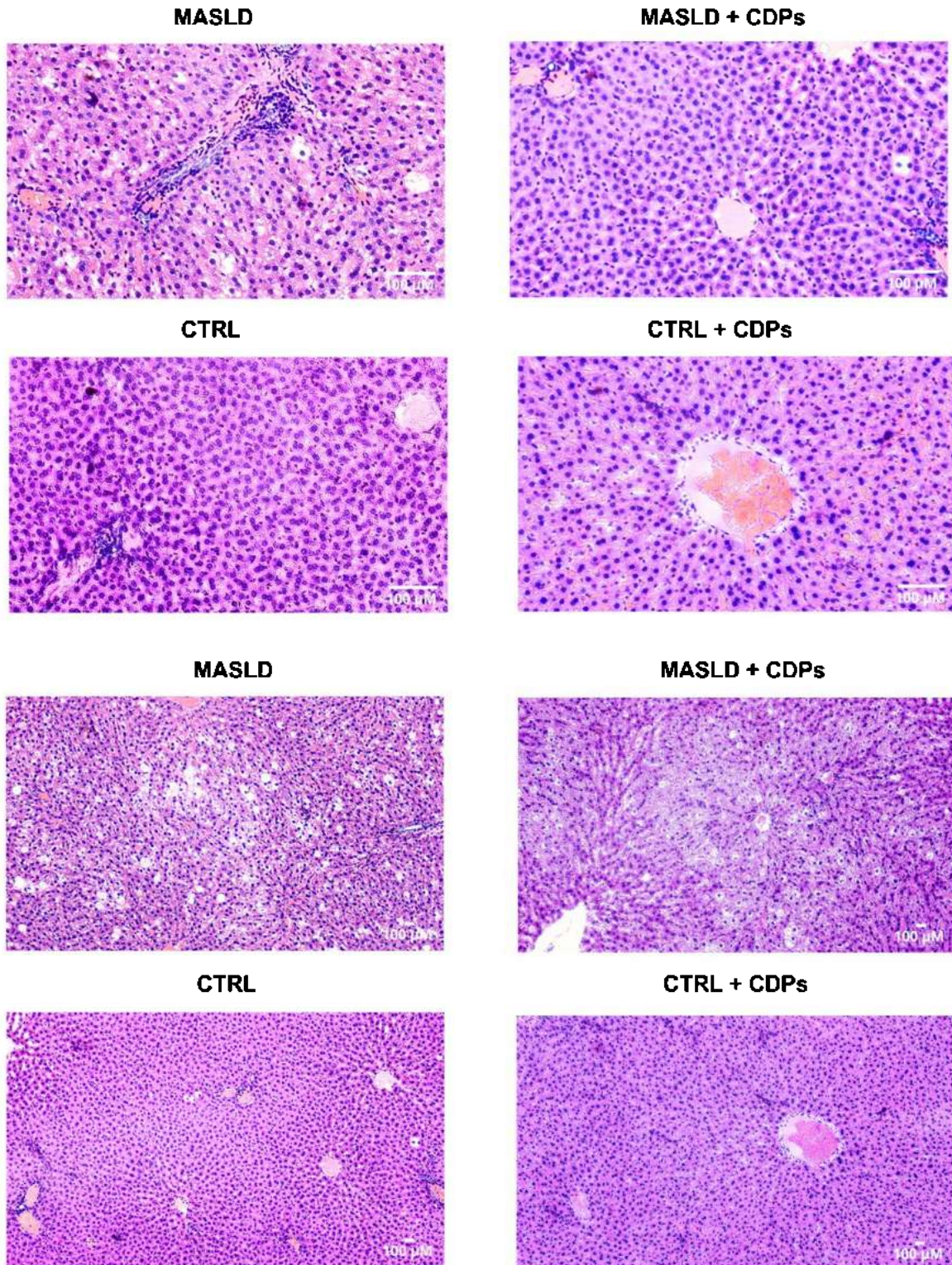


Figura. 28. Cortes histológicos hematoxilina y eosina. Fotografías representativas tomadas en microscopio óptico invertido **A)** 20x **B)** 10x.

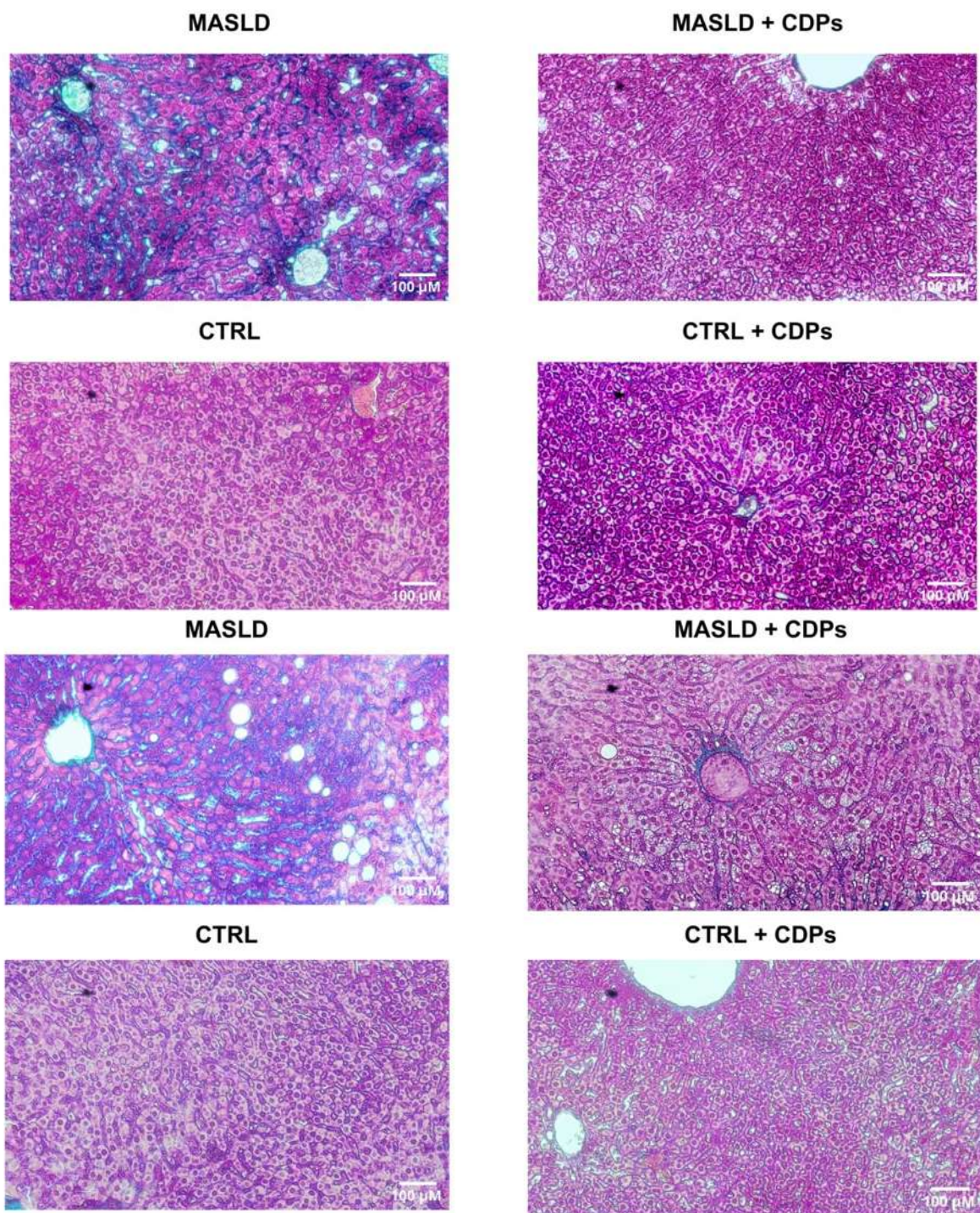


Figura. 29. Cortes histológicos tricrómica de Masson. Fotografías representativas tomadas en microscopio óptico invertido a 20x.

7. Discusión

La MASLD es la enfermedad hepática crónica más común en el mundo. En México son pocos los estudios de prevalencia, los cuales tienen muchas limitantes al no encontrarse actualizados y mostrando resultados discordantes al tratarse de poblaciones seleccionadas lo cual representa sesgo; a pesar de ello, se estima que en 2023 al menos el 41.3% de la población adulta (mayores de 20 años) la padece (Bernal-Reyes et al., 2023). MASLD es una enfermedad altamente relacionada con trastornos metabólicos siendo pocos los pacientes que presentan defectos genéticos evidentes, por esta razón, los modelos dietéticos de MASLD son relevantes para modelar la enfermedad humana en animales de experimentación (Martin-Grau et al., 2022). La obesidad inducida por la dieta es el factor de riesgo más común para el desarrollo de MASLD, por lo que el uso de modelos dietéticos puede imitar el origen y progresión de la enfermedad (Carreres et al., 2021).

En el presente proyecto se utilizó la alimentación crónica de una dieta obesogénica (alta en grasas y carbohidratos) para generar el modelo de MASLD. Siendo importante destacar que, de acuerdo con la historia natural y patogenia de MASLD no existe un modelo ideal; el progreso de la esteatosis simple a fibrosis puede durar años y solo un porcentaje de los pacientes lo desarrollan; es por ello que los modelos de esteatohepatitis no reflejan este aspecto, teniendo en cuenta el tiempo de vida corto de las ratas. Desde este panorama, los modelos de sobre nutrición crónica con progresión espontánea de esteatosis a esteatohepatitis pueden ser los más válidos (Kucera et al., 2014).

Las ratas utilizadas en el proyecto fueron recibidas posterior al destete de 6 semanas de edad, a partir de su llegada permanecieron en un periodo de aclimatación durante una semana. Posteriormente fueron divididas en dos grandes grupos de los cuales, uno fue alimentado con una dieta regular Chow Purina y otro con una dieta obesogénica durante 45 semanas con la finalidad de desarrollar MASLD (en etapa de fibrosis). En la semana 46 fueron distribuidas al azar en cuatro grupos, con la continuación de las dietas anteriormente seleccionadas; para esta etapa las ratas tenían 11 meses de edad. Dos de los grupos fueron administradas

con ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 durante 10 semanas a una concentración de 5 mg/kg cada 3 días por vía intraperitoneal. En la semana 55 del experimento y con 15 meses de edad se realizó la eutanasia de las ratas por medio de la administración de pentobarbital sódico a dosis letal. Considerando que la vida promedio de la rata de laboratorio es de 2.5 a 3.5 años, estas se encontraban en un periodo de adultez media, equivalente a 35-55 años humanos de acuerdo con Ghasemi y colaboradores; siendo esta la edad con más prevalencia de la enfermedad (Ortega et al., 2020).

Las ratas administradas con una dieta alta en grasas desarrollan esteatosis después de 6 a 12 semanas; este tipo de modelo provoca un fenotipo similar a la enfermedad humana caracterizada por la obesidad. Con este modelo se puede desarrollar fibrosis después de una exposición prolongada a la dieta de 36 a 50 semanas de administración según lo reportado por Van Herck y colaboradores en 2017.

El monitoreo de la ganancia de peso corporal es un factor importante a considerar debido a que existen estudios que demuestran que una pérdida de peso mayor al 7% logra mejorar el estado de la enfermedad con una disminución del puntaje NAS (Carreres et al., 2021). El grupo de animales del grupo MASLD+CDPs mostró una pérdida de peso desde el inicio del tratamiento, indicando pérdidas que fueron de los 2 a 4 gramos por semana por rata; por otro lado, el grupo MASLD continuó ganando de 1 a 4 gramos semanales de peso, lo que nos indican que la tendencia del modelo en cuanto a su ganancia de peso es de forma continua al alza, ya que no se encontraron periodos de pérdida de peso en los animales que no recibieron tratamiento con ciclodipéptidos. Los grupos alimentados con una dieta regular mostraron una tendencia a permanecer dentro del mismo rango de peso, con ligeras pérdidas y ganancia de peso que no fueron significativas.

El monitoreo del consumo de alimento indico que los grupos MASLD tuvieron un menor consumo de alimento por rata. Este es un fenómeno que se ha observado en otros trabajos previos (Figuerola-Guzmán et al., 2022). El grupo MASLD que fue tratado con ciclodipéptidos, mostro un aumento en el consumo de alimento respecto al grupo MASLD, lo que nos indica que la pérdida de peso no se debe a la inhibición

del apetito por parte del tratamiento; esto coincide con lo anteriormente reportado por Figueroa-Guzmán y colaboradores, quienes indicaron que el tratamiento con CDPs en ratas obesas disminuía la ganancia de peso sin inhibir el apetito (Figueroa-Guzmán et al., 2022).

La circunferencia abdominal es un parámetro fuertemente relacionado con la resistencia a la insulina, debido a que existe un aumento en la producción de citocinas pro inflamatorias por parte del tejido adiposo visceral; es por ello que este parámetro es de suma importancia para identificar problemas metabólicos (Grundy, 2013). El grupo MASLD+CDPs mostró una disminución en su circunferencia abdominal en comparación con el grupo MASLD, siendo indicativo de una mejora en el estado metabólico de los animales bajo tratamiento.

Estudios en humanos han demostrado que la obesidad en la adultez mediana (40-60 años) puede acortar la esperanza de vida de 4 a 7 años (Uranga & Keller, 2019). De igual forma también se ha documentado que los pacientes diagnosticados con MASLD tienen una esperanza de vida inferior a la de la población general (Shang et al., 2022). Durante el periodo de 55 semanas de la administración de la dieta obesogénica (45 semanas de inducción de MASLD+ 10 semanas de tratamiento) en el grupo MASLD se registró la muerte súbita de dos individuos, el primero en la semana cuatro del tratamiento (semana 49 de consumo de dieta obesogénica), y el segundo en la semana siete (semana 52 de consumo de dieta obesogénica). Al momento de realizar la disección de los animales no se encontraron anomalías aparentes. En 2021, Rustin y colaboradores realizaron un estudio en el cual alimentaban a ratas con una dieta alta en grasa por varios días para de esta forma registrar el índice de mortalidad y causas de muerte; ellos reportan que la primera rata murió a los 60 días por un aumento en el estado de inflamación del tejido cardíaco y lesión en el mismo; remarcando la fuerte relación que existe entre una alimentación con una dieta alta en grasas y el infarto al miocardio de forma más recurrente (Rustin et al., 2021). Un metaanálisis exhaustivo de 34.043 personas con MASLD monitoreadas durante un periodo de 6.9 años demostró que la MASLD confería un riesgo del 64% mayor de desarrollar enfermedades cardiovasculares

(ECV) (Targher et al., 2016). La asociación entre MASLD y EVC parece depender de la gravedad de la enfermedad hepática, y algunos estudios sugieren que la asociación positiva puede limitarse a los pacientes con fibrosis avanzada (Ekstedt et al., 2015).

Relacionado a lo anterior también resulta importante destacar que a la semana 55 de consumo de dieta obesogénica, momento de la eutanasia de las ratas se pesaron y fotografiaron diversos órganos, entre los cuales se puede destacar la presencia de una zona oscurecida en un corazón de una rata perteneciente al grupo MASLD la cual se identificó como tejido dañado a causa de un infarto (fig. 18B). A diferencia de lo observado en los animales con MASLD, en el grupo MASLD que recibió administraciones de CDPs no se observaron descensos, ni alteraciones aparentes en tamaño y morfología de los órganos analizados.

Investigaciones en modelos murinos han evidenciado el papel que juega la resistencia a la insulina en el desarrollo y progresión de MASLD. En estos estudios, se ha observado que tanto la diabetes como la obesidad no solo aceleran la progresión de la enfermedad, sino que también agravan la fibrosis y la inflamación, lo que indica una relación directa entre el origen y la evolución de la enfermedad. Sin embargo, aún se debate si la resistencia a la insulina es una causa o una consecuencia de la misma (Hebbard & George 2011).

La resistencia a la insulina es un factor relevante de la etiología de MASLD; el cual provoca una lipólisis alterada por parte del tejido adiposo y un aumento de ácidos grasos libres que termina acumulándose de forma ectópica; además de un aumento en las tasas de gluconeogénesis hepática y lipogénesis. Debido a lo anterior se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina antes del tratamiento en la semana 0, durante el tratamiento en la semana 5 y posterior al tratamiento en la semana 10; los resultados fueron analizados por grupo, con el objetivo de poder comparar el estado general de los individuos de cada grupo antes del tratamiento, durante y después para un mejor análisis de los datos.

La prueba de tolerancia a la glucosa refleja la rapidez con la que la glucosa es eliminada de la sangre, teniendo en cuenta su tasa de absorción en los tejidos. Las alteraciones más características que pueden observarse en la diabetes es el aumento de los índices de glucemia en ayunas y un retraso en el retorno a la normalidad en la muestra de dos horas (James et al., 2013).

La prueba de tolerancia a la glucosa, deben de evaluarse tomando en cuenta el área bajo la curva (AUC) de los índices basales de glucosa para de esta forma poder determinar la sensibilidad a la insulina periférica. En este caso, el único grupo que mostró diferencias a través del tiempo fueron los animales del grupo MASLD+CDPs, quienes presentaban una disminución significativa en el AUC antes del tratamiento en comparación con los valores de AUC durante el tratamiento y posterior al tratamiento; esto parece indicar una mejora en la tolerancia a la glucosa resultado del tratamiento con CDPs, la cual tiene un efecto a partir de las 5 semanas y permanece en el tiempo hasta la semana 10.

La tolerancia a la insulina nos indica que el grupo MASLD+CDPs disminuyó su resistencia a la insulina a partir de la semana 5 con el tratamiento con CDPs, efecto que permaneció hasta la semana 10. Se sabe desde hace tiempo que la mayoría de las personas pueden contrarrestar la disminución de la sensibilidad a la insulina aumentando la secreción de insulina y la función de las células β pancreáticas, pero esto no es sostenible por periodos largos de tiempo y el resultado es una disminución en la función de las células β y un aumento progresivo de la hiperglucemia (Pacini et al., 2013). El grupo CTRL+CDPs también mostro una disminución en su AUC ante el tratamiento CDPs, lo que parece indicar que el efecto hipoglucemiante de los CDPs no se limita únicamente a individuos que presentan alteraciones metabólicas; sin embargo, en sujetos sanos no se podría llegar a un estado de hipoglucemia debido a que existen diversos mecanismos compensatorios que llevaría a regular los niveles de glucosa en sangre.

La evidencia indica que la vía de fosfoinositida-3-fosfato quinasa PI3K/Akt es clave en mediar los efectos de la insulina sobre el metabolismo anabólico en los organismos. Un objetivo importante de Akt es mTORC1, al cual activa mediante la

inhibición de TSC una proteína que inhibe la localización y activación de mTORC1 en el lisosoma mediante la inhibición de Rheb. Tras la activación de mTORC1 la célula cambia de un estado catabólico a uno anabólico y proliferativo en el que la síntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos aumenta de forma considerable (Santoleri & Titchenell, 2019). La expresión de Akt no se afectó por la administración de la dieta obesogénica y la generación de MASLD; sin embargo, los niveles más altos de expresión para mTOR estuvieron presentes en el grupo MASLD, el grupo que recibió tratamiento con ciclodipeptidos mostro una disminución significativa en sus niveles de expresión que incluso llegan a ser similares a los grupos CTRL. De forma general, TSC1/2 mostraron de igual manera un aumento significativo en sus niveles de expresión en comparación con los otros grupos.

FoxO1 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la producción de glucosa en el hígado y la respuesta al estrés celular. En condiciones de ayuno o baja insulina, FoxO1 es activo y promueve la gluconeogénesis (producción de glucosa) y la expresión de genes que participan en la resistencia al estrés oxidativo. Posterior a la unión de la insulina con su receptor, Akt es activado y este fosforila a FoxO1 resultando en su traslocación del núcleo al citoplasma suprimiendo sus efectos en la expresión de genes (Liu et al., 2019). FoxO1 mostró los niveles más altos de expresión en los hígados de los animales del grupo MASLD, mientras que el grupo MASLD+CDPs presento una disminución en la expresión de FoxO1 llegando incluso a valores similares a los grupos CTRL. En estado de resistencia a la insulina se ha reportado que la actividad de FoxO1 se ve aumentada, lo que conlleva a una producción excesiva de glucosa y al mismo tiempo un aumento en la señalización de Akt, con alteraciones en la expresión de PPAR α lo cual aumenta la síntesis de triacilglicéridos y suprime la oxidación de ácidos grasos (Matsumoto et al., 2006). Un dato que en conjunto coincide a lo también reportado en este trabajo para marcadores de oxidación y síntesis de triacilglicéridos.

De igual forma, en diversos estudios se ha demostrado que la interrupción de FoxO1 en el hígado restaura la tolerancia a la glucosa y la capacidad de la insulina para suprimir la producción de glucosa hepática (O-Sullivan et al., 2015).

Estudios recientes han defendido la hipótesis de la "diafonía múltiple", destacando que la esteatosis hepática relacionada con la obesidad puede ser el resultado de una "diafonía" desregulada entre múltiples órganos extrahepáticos y el hígado en la obesidad (Wang et al., 2023). Por lo que la MASLD no se encuentra limitada únicamente al hígado, es una enfermedad donde existe la interacción con otros órganos.

El bazo es el órgano linfoide más grande del cuerpo; se ha demostrado que la inflamación inducida por una dieta obesogénica causa cambios en la función y morfología del bazo, los cuales se relacionan con la patogénesis de diabetes, enfermedades cardiovasculares y renales asociadas a la obesidad, por lo tanto, las modificaciones terapéuticas que mantienen la morfología normal del bazo podrían ser beneficiosas para otras enfermedades asociadas a largo plazo (Buchan et al., 2018). Al momento de realizar la eutanasia de las ratas se extrajeron los bazos y se pesaron sin encontrar diferencias significativas entre ninguno de los grupos; sin embargo, cabe mencionar que este fue el único parámetro evaluado por lo que, para conocer más a fondo si existe algún tipo de daño se requeriría de más pruebas.

Por su parte los riñones también fueron extraídos y pesados, sin mostrar diferencias significativas entre grupos. En general, cualquier persona puede llegar a desarrollar enfermedad renal crónica, sin embargo, personas con obesidad, diabetes, presión arterial alta o predisposición genética tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades renales. Aunque la historia natural y el espectro clínico de la enfermedad renal crónica relaciona a la obesidad aún sigue siendo desconocido, se ha reportado que si existe una relación entre estos dos padecimientos (Prasad et al., 2022).

Está bien documentada la relación entre la esteatosis hepática y el peso del hígado (Gábor et al., 2020). Los hígados de las ratas MASLD que recibieron el tratamiento con CDPs fueron significativamente más ligeros que los de las ratas MASLD; por

otra parte, al momento de extraer los hígados fueron fotografiados y puede observarse que los grupos CTRL tienen hígados de un color más oscuro, con superficies lisas y uniformes, en contraste con los del grupo MASLD que tienen zonas de tonos más claros sin un color uniforme; destacando también que, uno de ellos presentaba una zona oscurecida en el lóbulo medial derecho, un posible indicativo de una zona fibrótica; y los hígados de las ratas que pertenecen al grupo MASLD+CDPs lucen más similares a las ratas sanas.

La patogénesis de varias enfermedades crónicas entre ellas MASLD, está relacionada con el estrés oxidativo. De forma general existen tres estrategias para medir el estrés oxidativo: 1.-cuantificación directa de los niveles de especies reactivas, 2.- medición del daño oxidativo a biomoléculas y 3.- evaluación del estado antioxidante. La detección directa de los niveles de especies reactivas de oxígeno resulta complicada debido a la vida corta de estas moléculas y a su rápida reactividad con otros componentes, es por ello que las otras dos estrategias son las más comunes en la investigación (Chen et al., 2020). En el presente trabajo se evaluó el sistema antioxidante glutatión, la expresión génica del regulador maestro de la respuesta antioxidante Nrf2, así como GCLC y GPX. Por último, se evaluó la peroxidación lipídica producto del daño oxidativo.

Los principales productos de la peroxidación lipídica son los hidroperóxidos lipídicos y diversos aldehídos que pueden formarse en reacciones secundarias, entre ellos el malondialdehído (MDA) es el producto más mutagénico y ha sido utilizado ampliamente como un biomarcador de peroxidación lipídica, siendo el más popular y fiable para determinar el estrés oxidativo en estudios clínicos. El MDA es capaz de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA); siendo esta la base para la prueba de “sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico” (TBARS) produciendo un cambio de color a rojo intenso que permite ser cuantificable (Ayala et al. 2014). El análisis de TBARS en hígado indicó un aumento en el grupo MASLD en comparación a los demás grupos; observación que ha sido anteriormente reportada como una consecuencia de MASLD (Koliaki et al., 2015). El grupo MASLD+CDPs

presento una disminución en las TBARS en comparación al grupo sin tratamiento. Estos datos indican un menor daño oxidativo en respuesta al tratamiento con CDPs.

A lo largo del tiempo se ha demostrado que las células son capaces de adaptarse en situaciones de estrés fisiológico y estímulos patógenos generando respuestas que les permitan alcanzar nuevos estados de equilibrio para poder sobrevivir, y para lograrlo deben alterar sus perfiles de expresión génica. En el presente proyecto se observó que la expresión de Nrf2 así como otros genes relacionados con respuestas antioxidantes como GPX1 y GCLC aumentaron su expresión en los hígados de animales con MASLD. Este comportamiento se podría asociar a una respuesta adaptativa al estrés oxidativo. Anteriormente se ha reportado que ante una fuente de estrés oxidativo crónica y repetitiva la célula tiene la capacidad de adaptarse a las necesidades fisiológicas para mantener el estado redox. Este mecanismo adaptativo previamente se había documentado en un estudio realizado por Sun y colaboradores en 2020, donde se registró un aumento en los niveles de la proteína Nrf2, así como la consiguiente elevación de ARNm en genes diana como SOD y GPX en tejido adiposo blanco de ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante 16 semanas (Sun et al., 2020).

En el año 2011 se realizó un estudio con ratones knockout para Nrf2 en el cual los animales eran alimentados con una dieta alta en grasas a largo plazo (180 días). Los resultados del estudio indicaron que la delección de Nrf2 protege parcialmente contra la obesidad; además de que los ratones mostraron una mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina que los de la cepa silvestre. Al presentarse un desacelero en la ganancia de peso; los autores sugirieron que, al haber un aumento en los niveles de estrés oxidativo en tejidos, podría haber un aumento de la biogénesis mitocondrial y activación de proteínas desacoplantes en las mitocondrias conduciendo a termogénesis (Chartoumpekis et al., 2011). En el mismo estudio realizado por Chartoumpekis y colaboradores se reportó que la exposición de los ratones a una dieta alta en grasas de forma crónica aumenta hasta en un 50% la expresión de Nrf2 en hígado y hasta 14 veces más en tejido adiposo blanco en comparación con ratones que son alimentados con una dieta regular. Este mismo

comportamiento se puede observar en los grupos MASLD, con y sin tratamiento con CDPs resultado de la alimentación crónica (55 semanas) de una dieta obesogénica. Santa-González y Camargo en el año 2016 realizaron un estudio en el cual utilizaron la línea celular mioblastoide C2C12 a la cual le añadían de forma repetida un tratamiento prooxidante basado en glucosa oxidasa. Los resultados que obtuvieron fue que ante la exposición crónica de este estímulo prooxidante las células alcanzaron un estado de adaptación que implicó cambios morfológicos, funcionales y de expresión génica intentado así recuperar la homeostasis y reducir el estrés celular (Santa-González & Camargo, 2016).

Sin embargo, a pesar de que el sistema antioxidante glutatión y el regulador de la respuesta antioxidante Nrf2 se encuentren elevados en el grupo MASLD, no se observó una disminución en la peroxidación lipídica. Contrario a lo observado en el grupo MASLD+CDPs el cual disminuyó de manera significativa su concentración de TBARS, indicando que a pesar de que los hepatocitos han logrado activar diversos mecanismos compensatorios al estado prooxidante originado por la obesidad y el consumo crónico de la dieta obesogénica su respuesta antioxidante no es efectiva para lograr disminuir el aumento de la peroxidación lipídica.

Lambert y colaboradores en 2014 publicaron un estudio, el cual indicaba ser la primera confirmación directa de la lipogénesis *de novo* en la etiología de MASLD. En este estudio analizaron a pacientes con síndrome metabólico y niveles alterados de transaminasas, también identificaron utilizando espectroscopia de resonancia magnética a aquellos que tenían esteatosis hepática. Reportando que los pacientes con altos niveles de triacilglicéridos intrahepáticos tenían tasas de más de 3 veces mayores de lipogénesis *de novo*. Sugiriendo que la lipogénesis *de novo* podría ser un objetivo terapéutico para MASLD (Lambert et al., 2014).

La proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP-1C) regula la transcripción de genes como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS), dos enzimas cruciales en la lipogénesis *de novo* y la síntesis de triacilglicéridos (Li et al., 2023). En análisis del presente proyecto reveló un aumento en la expresión de SREBP-1C en el grupo MASLD; observación reportada desde

hace más de dos décadas, donde SREBP-1C se encontraba en niveles elevados en hígados de ratones genéticamente obesos. Desde entonces se proponía que el aumento en la proteína SREBP-1C daba como resultado la activación transcripcional de genes responsables de la lipogénesis *de novo* resultando en la contribución al fenotipo de esteatosis hepática observada en estos ratones (Iichiro et al., 1999).

El modelo de MASLD aquí evaluado también presenta un estado de resistencia a la insulina; diversos estudios han demostrado que pacientes obesos con MASLD presentan un aumento de palmitato, producto final de la lipogénesis *de novo* en comparación con personas de peso normal, indicando que en condiciones de resistencia a la insulina la lipogénesis *de novo* se encuentra aumentada (Pettinelli et al., 2011). La contribución de la lipogénesis *de novo* a la producción hepática de triacilglicéridos en individuos sanos representa el 5% aproximadamente de los cuales son incorporados a las vLDL que son secretadas; por el contrario, la contribución de la lipogénesis *de novo* en pacientes con MASLD es del 25% (Gluchowski et al., 2017).

Las evaluaciones hechas indicaron que ACC1 también se encuentra elevado de forma significativa en el grupo MASLD. ACC1 cataliza la conversión de Acetil-CoA a Malonil-CoA, el primer paso de la síntesis de ácidos grasos (Li et al., 2023). Estos datos indican que el modelo de MASLD evaluado presenta un aumento en la tasa de lipogénesis *de novo* en comparación con su contraparte alimentado con una dieta regular; característica distintiva de pacientes con MASLD (Lambert et al., 2014).

En el grupo MASLD que fue tratado con ciclodipéptidos, se observó una disminución en la expresión de ambos genes evaluados, tanto SREBP-1C como uno de sus objetivos ACC1; lo cual se traduce en la disminución de la lipogénesis *de novo*. En un estudio en el cual se administraba un inhibidor alostérico de ACC1 a ratas alimentadas con una dieta con alto contenido de fructosa observaron que estas disminuían en un 20% la lipogénesis *de novo* hepática (Goedeke et al., 2018).

La ACC1 recientemente ha atraído la atención de la investigación como un objetivo para tratar MASLD (Huanyi et al., 2023). El tratamiento con ciclodipeptidos al disminuir su expresión generaría una mejora al estado de MASLD.

La ACC1 también disminuyó su expresión en las ratas CTRL+ CDPs, por lo que el efecto específico en este gen parece no discriminar. Estudios en ratones knockout para ACC1 específicos de hígado han revelado que hay un aumento de acetil-CoA, conduciendo a la elevación en la acetilación de histonas y alterando la regulación transcripcional (Galdieri & Vancura, 2012). Por lo que, la disminución de la expresión de ACC1 en las ratas CTRL+CDPs podría traer efectos adversos aún desconocidos.

La inflamación en hígado es una parte fundamental en la respuesta de curación del daño hepático; sin embargo, cuando se vuelve crónica da origen a la esteatohepatitis, y el proceso de regeneración se puede tornar en un estado de fibrosis que afecta la funcionalidad e integridad del hígado.

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (NF- κ B) es un regulador maestro de la inflamación que se encuentra activo en prácticamente todas las enfermedades hepáticas crónicas (Luedde & Schwabe, 2011). En este trabajo reportamos que los niveles en la expresión de NF- κ B se encontraron elevados en el grupo MASLD. La inducción de NF- κ B en respuesta al estrés asociado al exceso de nutrientes es algo previamente reportado en diversos estudios. Las demandas metabólicas pueden inducir la muerte celular del hepatocito generando una señal proinflamatoria con la activación de NF- κ B. Es por esto que el bloqueo de la acción de mediadores inflamatorios es actualmente un enfoque terapéutico muy atractivo (Baker et al., 2011).

Los niveles de expresión de NF- κ B. del grupo MASLD+CDPs mostraron una disminución estadísticamente significativa en relación al grupo que no recibió tratamiento; siendo muy similar al grupo CTRL.

Es bien conocido el efecto proinflamatorio de la IL-6 la cual es secretada principalmente por macrófagos, promoviendo la lesión hepatocelular y la fibrosis

hepática, además de que también puede inhibir la vía de señalización de la insulina. Es por ello que los niveles de IL-6 se considera un marcador fiable para describir el riesgo de MASLD (Duan et al., 2022). En nuestros experimentos los niveles de IL-6 se encontraron elevados en el grupo MASLD, mientras que el grupo que fue tratado con ciclodipeptidos mostró una disminución de su expresión a pesar de continuar ante el estrés de la alimentación con una dieta obesogénica. Por otra parte, en los grupos CTRL y CTRL+CDPs no se observaron diferencias entre ellos y sus niveles son significativamente más bajos en comparación a los grupos MASLD.

El receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa (PPAR α) abunda en hígado (Todisco et al., 2022). Los ácidos grasos que son absorbidos por el hepatocito se reesterifican o activan a PPAR α para inducir la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal. Los niveles de PPAR α aumentan en pacientes con MASLD y su eliminación conduce a un empeoramiento del estado de la enfermedad lo que refleja un mecanismo compensatorio contra la afluencia excesiva de ácidos grasos (Keles et al., 2023).

En 2010 se realizó un estudio en el cual utilizaban un modelo *knock out* para Acox1 en ratones, en los cuales observaron que varios de los genes diana de PPAR α eran regulados positivamente, implicando una hiperactivación sostenida de PPAR α causada por sustratos que no se metabolizaron en ausencia de Acox1 y funcionan como ligandos para PPAR α . Destacando el hecho de que la esteatosis hepática desarrollada en ratones Acox1 depende de PPAR α (Vluggens et al., 2010). Por otro lado también, ya se ha comprobado que los ratones que carecen de Acox1 desarrollan esteatohepatitis grave (Chun-Yang et al., 1996).

Se ha reportado que pacientes con adrenoleucodistrofia una enfermedad neurodegenerativa inflamatoria poco común causada por la deficiencia de Acox1 presentan hepatomegalia debido al deterioro de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga en los peroxisomas. Al igual que los ratones con deficiencia de Acox1 y mutaciones en el gen exhiben esteatosis y esteatohepatitis, e incluso

pueden llegar a desarrollar cáncer hepatocelular en el transcurso de un año (Meyer et al., 2002).

Moreno-Fernández y su equipo de trabajo en 2018 se propusieron estudiar el papel de Acox1 en la regulación de la respuesta inflamatoria no reportado anteriormente; indicando que la deficiencia de Acox1 junto con el estrés de la dieta obesogénica, conllevan a un aumento de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8, así como la progresión acelerada y exacerbada de MASLD y la inducción de genes relacionado a cáncer hepatocelular (Moreno-Fernández et al., 2018).

En este proyecto, se reporta que el grupo MASLD tiene los niveles más altos en la expresión de PPAR α , pero, una disminución en la expresión de Acox1. Posiblemente esto sea resultado de una hiperactivación de PPAR α por la ausencia de Acox1, que junto con los otros parámetros evaluados se puede indicar que fomenta la progresión de la enfermedad. Para el grupo MASLD+CDPs se muestra una disminución de PPAR α con un aumento de Acox1, mostrando este mismo comportamiento de regulación negativa entre estos dos elementos. Por otra parte, el grupo CTRL+CDPs mostro una disminución en ambos parámetros, lo cual podría traer consecuencias aún desconocidas, sin embargo, no lo suficientemente dañinas ya que no se observaron afectaciones graves a nivel sistémico o en los demás parámetros evaluados en el tejido hepático.

En cuanto a la absorción de ácidos grasos se midieron los niveles de expresión de la translocasa CD36; la cual muestra los niveles más altos para el grupo MASLD, siendo significativamente mayor en comparación de los demás grupos. Diversos estudios han analizado el papel de la expresión de CD36 en hígado y su relación con MASLD. Ya que se ha reportado que la expresión de CD36 aumenta en ratones que son alimentados con una dieta alta en grasa. Esta observación también ha sido reportada en pacientes con MASLD (Cazanave & Gores, 2010; Debby et al., 2007). En cuando al grupo MASLD+ CDPs se observó una disminución en la expresión de CD36, que incluso llego a ser igual a la de los grupos CTRL; esto nos indica que el tratamiento con ciclodipeptidos logro disminuir la absorción de ácidos grasos por parte del hepatocito a través de la modulación de CD36.

La administración de CDPs en los animales con MASLD también provocó una disminución en la expresión de PSD3 en comparación con el grupo que no recibió tratamiento. En el año de 2022, con el objetivo de identificar loci relacionados al contenido de grasa hepática, Mancina y colaboradores hicieron un estudio de asociación del genoma completo en participantes de diversas partes de Europa, en el cual, reportaron que la disminución en la expresión de PSD3 protege contra MASLD en ratones alimentados con una dieta que induce esteatohepatitis, por lo que se propone que PSD3 puede ser una futura opción terapéutica para tratar esta patología (Mancina et al., 2022).

Está bien reportado que una desregulación en el metabolismo de lípidos en estado de esteatosis se acompaña de una sobreproducción de vLDL, siendo una alteración metabólica clave relacionada a obesidad y síndrome metabólico (Fon & Rozman, 2011). En este trabajo se observó que la administración de CDPs redujo la exportación de vLDL en los animales con MASLD. La expresión de MTTP y ApoB se vieron aumentadas en el hígado de los animales con MASLD, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo alimentado con la dieta regular. El tratamiento con CDPs disminuyó la expresión de estos dos genes en el hígado de las ratas con MASLD mostrando niveles similares al grupo CTRL. La proteína microsomal de transferencia de triacilglicéridos desempeña un papel importante en la síntesis de lipoproteínas que contienen apoB. Estudios indican que para el ensamblaje y secreción de lipoproteínas se requiere de niveles adecuados de ApoB, MTTP y lípidos; por lo tanto, la reducción de dos de estos factores puede limitar la producción de lipoproteínas en la célula (Gordon et al., 2000).

La disminución en la expresión de ApoB se ha convertido en un objetivo clave en terapias para reducir el colesterol LDL. Mutaciones en ApoB interrumpidas en el extremo C-terminal muestran un fenotipo con una reducción en la secreción de vLDL reduciendo los niveles en sangre de LDL, que a su vez confiere protección contra la aterosclerosis (Petra et al., 2013). Se ha identificado recientemente una variante rara de MTTP asociada a la forma hereditaria de MASLD. Estos pacientes muestran una disminución en la secreción de lipoproteínas que contiene ApoB, lo cual provoca

un aumento en la acumulación de lípidos, mayor estrés en los hepatocitos y activación de vías de señalización proinflamatorias que incluyen a NF- κ B. También, estos pacientes presentan una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (Grove et al., 2023).

En 2023, se reportó que RASAL2 es capaz de modular la exportación de vLDL por medio de la vía PI3K/AKT/mTOR aumentando la transcripción de MTTP (Ding et al., 2023); sin embargo, los hallazgos aquí reportados indican que el tratamiento con ciclodipeptidos provocó una disminución en la expresión de RASAL2, pero también una disminución de MTTP y ApoB, por lo tanto, estos resultados resultan contradictorios a lo que anteriormente se había reportado respecto a RASAL2. Actualmente no se tienen más antecedentes sobre la disminución de RASAL2 sin un aumento de la exportación de vLDL, siendo un área en la que aún se tendría que hacer más estudios al respecto sobre otros mecanismos que pudieran estar implicados en este efecto. En los hígados de los animales del grupo CTRL+CDPs también se observó una disminución de RASAL2 en comparación al grupo CTRL, indicando que los CDPs provocan de forma consistente una disminución en la expresión de RASAL2 en hígado. Cabe señalar que existen estudios en los cuales se utilizan modelos con expresión a la baja de RASAL2 en los cuales no se reportan alteraciones que sean perjudiciales.

El aumento en la apoptosis de los hepatocitos es una manifestación patológica común. El receptor Fas pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y está presente en la mayoría de las células para facilitar la muerte celular programada. El aumento de la expresión de Fas es una característica común en las muestras de hígado de pacientes con MASLD. En este trabajo se reporta un aumento en la expresión de Fas en tejido hepático de ratas pertenecientes al grupo MASLD en comparación con el CTRL. Este hallazgo coincide con el estudio realizado por Li y su grupo de trabajo, quienes reportaron que los niveles en la expresión de Fas y FasL en ratas con MASLD aumenta a lo largo del tiempo en que padecen la enfermedad; e incluso proponen que los niveles de Fas pueden ser un método para evaluar la gravedad de MASLD (Li et al., 2014). El grupo

MASLD+CDPs muestra una disminución significativa en la expresión de Fas; indicando ser un marcador de la disminución de la apoptosis, por lo tanto, una mejoría al estado de MASLD.

El grupo CTRL+ CDPs mostró una disminución significativa en la expresión de Fas en comparación con el grupo CTRL. En un estado fisiológico, la apoptosis se encuentra altamente regulada; y el número de células que son eliminadas por apoptosis es equivalente al número de células que se generan por división celular. Estudios en ratas han reportado que la disminución en la expresión de Fas en hígado, corazón y pulmones no induce anomalías graves; siendo la principal anomalía la presencia de esplenomegalia (Guicciardi & Gores, 2006). Sin embargo, en este caso, no se reportó esplenomegalia en las ratas pertenecientes al grupo CTRL+CDPs; por lo que si esta disminución significativa en la expresión de Fas tiene efectos adversos para este grupo es aún desconocido.

TGF- β es un regulador del fenotipo y función de los fibroblastos; tras su estimulación estos se activan y experimentan una transición fenotípica a miofibroblastos (células efectoras clave en el estado fibrótico); es por ello que se ha sugerido como un importante marcador de estados fibróticos de MASLD (Biernacka et al., 2011).

Se han analizado posibles fármacos anti fibróticos por medio de su efecto en la disminución de TGF- β (Sun et al., 2022). En un estudio con pacientes asociados a factores de riesgo para MASLD, se encontró una relación estrecha entre la expresión de TGF- β y MASLD, con un patrón creciente a mayor grado de lesión hepática (Lambis et al., 2018).

El análisis de la expresión de TGF- β en hígado presento un aumento en sus niveles para el grupo MASLD, demostrado un estado avanzado de MASLD con presencia de fibrosis. Este dato es valioso para poder validar el modelo de MASLD aquí evaluado, en el que la alimentación con una dieta obesogénica durante 45 semanas en ratas es capaz de generar MASLD en un estado fibrótico. La expresión de TGF- β disminuyo a niveles basales en el grupo MASLD con el tratamiento con ciclodipéptidos, lo que indicaría una disminución en la progresión de la enfermedad,

donde a pesar de la alimentación crónica con la dieta obesogénica no se llegó a producir un estado más avanzado de la enfermedad.

El TGF- β es secretado por células no parenquimatosas del hígado normal, pero este se encuentra en una forma inactiva, es por ello que el nivel constitutivo para TGF- β está presente en niveles considerables (Brackzowski et al., 2024). En cuanto a los grupos CTRL y CTRL+CDPs se encontró en niveles basales e incluso, el grupo de animales MASLD+CDPs muestra niveles hepáticos iguales en la expresión de TGF- β .

El análisis histológico en biopsias de tejido hepático tomadas del lóbulo medial derecho tomando en cuenta la importancia de la estandarización de la ubicación del sitio de muestreo, a pesar de que estudios realizados en ratas indican una baja variación en las lecturas de biopsias tomadas de los diversos lóbulos; debido a que, en forma general la MASLD se distribuye de forma homogénea por todo el órgano (Jensen et al., 2020). Se realizaron dos tinciones; hematoxilina y eosina para realizar el conteo y medición de gotas lipídicas con ayuda del software ImagenJ, además de que esta tinción permite identificar focos de inflamación y alteraciones en la morfología celular. También se realizó la tinción tricrómica de Masson la cual se realiza para identificar zonas fibróticas.

El análisis de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina indica que no hay anomalías en los hígados de las ratas pertenecientes a los grupos CTRL y CTRL+CDPs.

Mientras que la evaluación de la presencia de gotas lipídicas en los hígados de animales enfermos, indicó que estas son más abundantes y más grandes para el grupo MASLD que no recibió ningún tipo de tratamiento, el promedio del diámetro de las gotas más grandes para este grupo se encuentra arriba de los 20 μm , siendo una característica de la esteatosis macrovesicular, en la cual el tamaño de las gotas es tal que llega a desplazar el núcleo del hepatocito ocupando gran parte del espacio en el citoplasma. El grupo MASLD+CDPs muestra un menor diámetro en sus gotas lipídicas, una característica distintiva de la esteatosis microvesicular en la

cual las gotas están dispuestas en el citoplasma del hepatocito sin provocar desplazamientos del núcleo del hepatocito.

En cuanto a la infiltración de células del sistema inmunológico, estas aglomeraciones fueron más abundantes en el grupo MASLD. Estos focos de inflamación se encontraron principalmente en el espacio sinusoidal que va de la vena central a la vena portal. En los grupos alimentados con dieta regular no se encontró esta característica de esteatoatohepatitis.

La tinción tricrómica de Masson permitió corroborar los datos que se encontraron con la evaluación de la expresión de TGF- β el cual sugería la presencia de fibrosis en el grupo MASLD. Las imágenes obtenidas indican la presencia de fibras de colágeno que van desde la vena central y se tribuyen en el sinusoides hepáticos, indicando un estado de fibrótico.

Los hígados de las ratas alimentadas con una dieta regular tienen un aspecto normal, sin ningún tipo de daño aparente, esta observación también es característica del grupo CTRL+ CDPs. En cuanto a los focos de inflamación que se pueden percibir en los análisis histológicos, estos son más abundantes en el grupo OBS, que van desde la vena central hasta la vena porta. El grupo MASLD+ CDPs en algunos casos llegó a presentar focos de inflamación, pero menos abundantes. En general, los hallazgos histopatológicos coinciden con los demás hallazgos aquí reportados.

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de la funcionalidad del hígado. La albúmina es la proteína plasmática más abundante, siendo un importante indicador de función hepática por lo que se analizó la cantidad de albúmina presente en suero. El grupo MASLD presentó el nivel más bajo de albúmina en comparación con los otros grupos. Considerando los decesos que se presentaron en el grupo de animales MASLD, resulta importante destacar que la concentración de albúmina sérica es un factor importante para predecir la muerte asociada a MASLD, y es que, la hipoalbuminemia es una característica frecuente en pacientes con cirrosis avanzada (D'Amico et al., 2006). Mientras que el grupo MASLD que fue tratado con CDPs reportó niveles de albúmina normales e incluso similares a los grupos CTRL.

Esto nos habla de una mejora en la funcionalidad hepática a pesar de la presencia de la enfermedad. Un estudio de cohorte realizado en 2023 por Takahashi reveló que los resultados clínicos de pacientes con MASLD podrían clasificarse según el nivel de albúmina sérica al momento de realizar la biopsia hepática, encontrando una relación entre los hallazgos histopatológicos y los niveles séricos de albúmina. Los niveles de albúmina sérica se presentan como un parámetro directo para poder predecir el estadio de fibrosis, y posible progresión a cirrosis (Takahashi et al., 2023). La disminución de los niveles de albúmina en suero del grupo MASLD nos podrían indicar un estado más avanzado.

En conjunto, el tratamiento con ciclodipeptidos no elimina a MASLD, pero si disminuye su progresión. Las ratas tratadas con los CDPs mostraron una disminución en la ganancia de peso sin disminuir su apetito; una mejora en el estado de resistencia a la insulina. Los análisis de la expresión relativa sugieren, una disminución de la lipogénesis de novo, la exportación de vLDL, marcadores de fibrosis e inflamación; mientras que sugieren un aumento en la β oxidación (Figura 30).

7.1 Mecanismo de acción propuesto del efecto de los CDPs en MASLD.

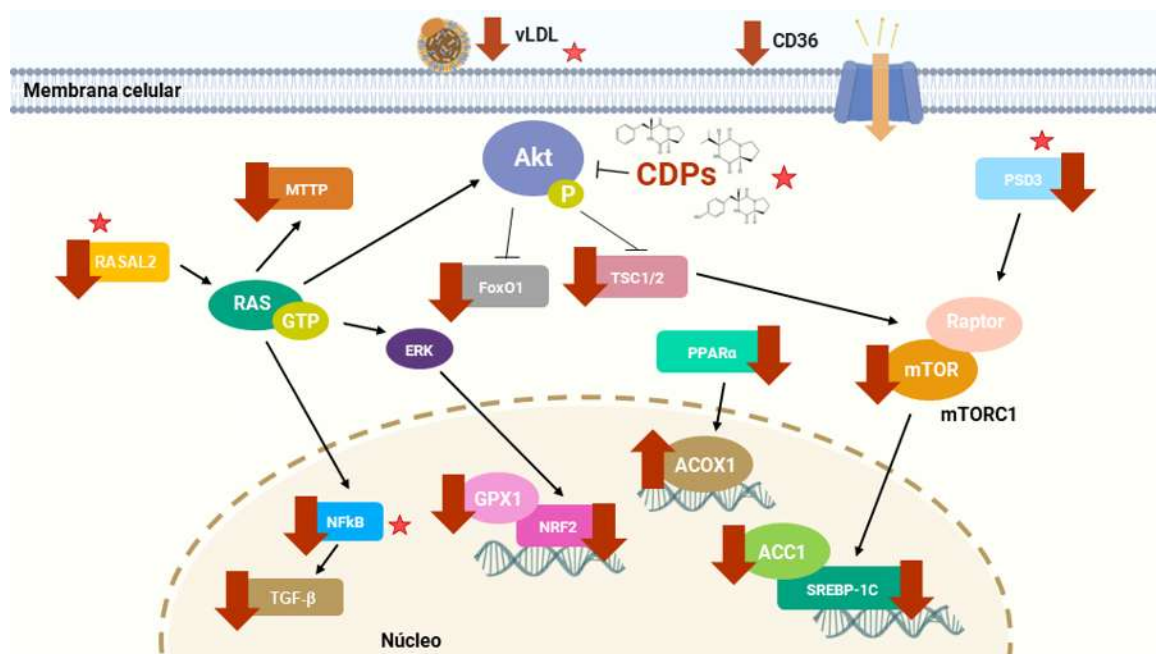


Fig. 30. Efectos del tratamiento con CDPs en MASLD. El presente esquema representa el posible mecanismo de acción de los CDPs sobre MASLD. Con flechas rojas se presentan los hallazgos aquí reportados indicando altas o bajas según el efecto que se presentó en el grupo MASLD+CDPs en comparación con el grupo MASLD. Con estrellas rojas se presenta los hallazgos que concuerda con lo anteriormente reportado sobre el efecto de los CDPs. Reportes previos indican que los CDPs tienen la capacidad de modular la vía Akt/mTOR por medio de la inhibición de la fosforilación de Akt en S473 y T389; el presente trabajo reportó una disminución en la expresión de elementos de esta vía como fueron TSC1/TSC2 y mTOR; en conjunto esto lleva a una disminución en la actividad de mTORC1 inhibiendo procesos anabólicos como es el caso de la lipogénesis *de novo* por medio de la disminución de SREBP-1C; dentro de esta vía PSD3 promueve la hiperactivación de mTORC1 por lo que la disminución en su expresión también llevaría a su inactivación. Aunado a ello, se presentó la activación de procesos catabólicos como la β -oxidación reportada como un aumento de la expresión de ACOX1. Previamente se ha reportado la modulación de elemento de la vía RAS por parte de los CDPs, coincidiendo con los hallazgos presentados en este trabajo, en el que se reporta una disminución de elementos río abajo como NfκB un modulador de la respuesta inflamatoria; NRF2 regulador maestro de la respuesta antioxidante; y MTTP traducido en la disminución de la exportación de vLDL. Por otra parte, la mejora en el estado de resistencia a la insulina es resultado de la disminución en la expresión de FoxO1.

8. Conclusión

Los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 protegen contra la progresión de la enfermedad esteatótica hepática asociada a disfunción metabólica.

9. Referencias

1. Abd El-Aziz, R.; Naguib, M. & Rashed, L.A. **Spleen size in patients with metabolic syndrome and its relation to metabolic and inflammatory parameters.** Egypt J Intern Med. Vol. 30. Pp. 78–82. Doi: 10.4103/ejim.ejim_86_17.
2. Abdel-Misih, S. R. & Bloomston, M. (2010). **Liver anatomy.** Surg Clin North Am. Vol. 90(4). Pp. 643-53. doi: 10.1016/j.suc.2010.04.017.
3. Adeva-Andany, M. M.; Pérez-Felpete, N.; Fernández-Fernández, C.; Donapetry-García, C. & Pazos-García, C. (2016). **Liver glucose metabolism in humans.** Biosci Rep. Vol: 36(6). doi: 10.1042/BSR20160385.
4. Al Shoyaib, A.; Archie, S. R.; & Karamyan, V. T. (2019). **Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?** Pharm Res. Vol. 37(1):12. Doi: 10.1007/s11095-019-2745-x.
5. Allameh, A.; Niayesh-Mehr, R.; Aliarab, A.; Sebastiani, G.; & Pantopoulos, K. (2023). **Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease.** Antioxidants. Vol. 12(9):1653. doi: 10.3390/antiox12091653.
6. Arab, J. P.; Barrera, F. & Arrase, M. (2018). **The evolving role of liver biopsy in non-alcoholic fatty liver disease.** Annals of Hepatology. Vol. 16 (6). Pp. 899 – 906. 10.5604/01.3001.0012.7188
7. Arroyave-Ospina, J. C.; Wu, Z.; Geng, Y.; & Moshage, H. (2021). **Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy.** Antioxidants. Vol. 10 (174). Doi: 10.3390/antiox10020174.
8. Arroyo, V. & Fernandez, J. (2011). **Pathophysiological basis of albumin use in cirrhosis.** Annals of Hepatology. Vol.10 (1). Pp. 6-14. 10.1016/S1665-2681(19)31600-X.
9. Ayala, A.; Muñoz, M. F.; & Argüelles, S. (2014). **Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal.** Oxid Med Cell Longev. Vol. 8. doi: 10.1155/2014/360438.

10. Baker, R. G.; Hayden, M. S.; & Ghosh, S. (2011). **NF- κ B, inflammation, and metabolic disease.** *Cell Metab.* Vol. 13(1):11-22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008.
11. Bardal, S. K., Waechter, J. E., & Martin, D. S. (2011). **Pharmacokinetics. Applied Pharmacology.** 17–34. doi:10.1016/b978-1-4377-0310-8.00002-6
12. Barsh, G. S.; Farooqi, I. S. & O'Rahilly, S. (2000). **Genetics of body-weight regulation.** *Nature.* Vol. 404. Pp. 644–651. DOI: 10.1038/35007519.
13. Biernacka, A.; Dobaczewski, M. & Frangogiannis, N. G. (2011). **TGF- β signaling in fibrosis.** *Growth Factors.* Vol. 29 (5). Pp: 196-202. 10.3109/08977194.2011.595714.
14. Biernacka, A.; Dobaczewski, M.; & Frangogiannis, N. G. (2011). **TGF- β signaling in fibrosis.** *Growth Factors.* Vol. 29(5):196-202. doi: 10.3109/08977194.2011.595714.
15. Bojarska, J.; Mieczkowski, A.; Ziora, Z. M.; Skwarczynski, M.; Toth, I.; Shalash, A. O.; Parang, K.; El-Mowafi, S. A.; Mohammed, E. H. M.; Elnagdy, S.; Alkhazindar, M. & Wolf, W. M. (2021). **Cyclic Dipeptides: The Biological and Structural Landscape with Special Focus on the Anti-Cancer Proline-Based Scaffold.** *Biomolecules.* Vol. 11(10). doi: 10.3390/biom11101515.
16. Borthwick, D. A. & Costa N. C. D. (2017). **2,5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity.** Vol. 57 (4). Pp. 718-742. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.911142>.
17. Bos, J. L.; Rehmann, H. & Wittinghofer, A. (2007). **GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins.** *Cell Press.* Vol. 129 (5). Pp: 865-877. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>
18. Brackowski, M. J.; Kufel, K. M.; Kulińska, J.; Dittmann, A.; Wiertelak, M.; Brackowski, R.; & Soszynski, D. (2024). **Pleiotropic Action of TGF-Beta in Physiological and Pathological Liver Conditions.** *Biomedicines.* Vol. 12(4):925. Doi: 10.3390/biomedicines12040925.

19. Buchan, L.; St Aubin, C. R.; Fisher, A. L.; Hellings, A.; Castro, M.; Al-Nakkash, L.; Broderick, T. L. & Plochocki, J. H. (2018). **High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment.** BMC Res Notes. Vol. 11(1). Pp. 752. doi: 10.1186/s13104-018-3862-z.
20. Buzzetti, E.; Pinzani, M. & Tsochatzis, E. A. (2016). **The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).** Metabolism. Vol. 65 (8). Pp. 1038–1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012.
21. Campos-Nonato, I.; Galván-Valencia, O.; Hernández-Barrera, L.; Oviedo-Solís, S. & Barquera, S. (2023) **Prevalencia de obesidad y factores de riesgo asociados en adultos mexicanos: resultados de la Ensanut.** ENSANUT. <https://doi.org/10.21149/14809>.
22. Cao, Y.; Han, S.; Lu, H.; Luo, Y.; Guo, T.; Wu, Q. & Luo, F. (2022). **Targeting mTOR Signaling by Dietary Polyphenols in Obesity Prevention.** Nutrients. Vol. 14(23). Pp. 5171. doi: 10.3390/nu14235171. PMID: 36501200; PMCID: PMC9735788.
23. Carreres, L.; Jílková, Z. M.; Vial, G.; Marche, P. N.; Decaens, T.; & Lerat, H. (2021). **Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review.** Biomedicines. Vol. 9(4):378. doi: 10.3390/biomedicines9040378.
24. Carreres, L.; Jílková, Z. M.; Vial, G.; Marche, P. N.; Decaens, T. & Lerat, H. (2021). **Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review.** Biomedicines. Vol. 9 (4). Pp: 378. 10.3390/biomedicines9040378. PMID: 33918467; PMCID: PMC8067264.
25. Casas-Grajales, S. & Muriel, P. (2015). **Antioxidants in liver health.** World J Gastrointest Pharmacol Ther. Vol. 6(3). Pp. 59-72. doi: 10.4292/wjgpt.v6.i3.59.
26. Cazanave, S. C.; & Gores, G. J. (2010). **Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis.** Clin Lipidol. Vol. 5(1):71-85. doi: 10.2217/clp.09.85.

27. Chalasani, N.; Younossi, Z. & Lavine, J. E. (2018). **The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases.** *Hepatology*. Vol. 67 (1). Pp: 328–357. 10.1002/hep.29367.
28. Chartoumpekis, D. V.; Ziros, P. G.; Psyrogiannis, A. I.; Papavassiliou, A. G.; Kyriazopoulou, V. E.; Sykiotis, G. P.; & Habeos, I. G. (2011). **Nrf2 represses FGF21 during long-term high-fat diet-induced obesity in mice.** *Diabetes*. Vol. 60(10):2465-73. Doi: 10.2337/db11-0112.
29. Chen, Z.; Yu, R.; Xiong, Y.; Du, F. & Zhu, S. (2017). **A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease.** *Lipids Health Dis.* Vol. 16 (203). <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0572-9>
30. Chun-Yang, F.; Jie, P.; Ruivin, C.; Sambasiva, R.; Nobuyo, M. & Janardan, K. (1996). **Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme a oxidase gene.** *Cell Biology and Metabolism*. Vol. 271(40). Doi: 10.1074/jbc.271.40.24698.
31. Cobo, M. M.; Fernández, Gil P. & Crespo, J. (2008). **Tratamiento de la enfermedad hepática por depósito de grasa.** *Gastroenterología y hepatología*. Vol. 31 (4). Pp. 229-238. 10.1157/13117902
32. Cornier, M.; Dabelea, D.; Teri, L.; Hernandez, R. C.; Lindstrom, A.; Stob, N. R.; Van Pelt, R. E. & Hong Wang, R. (2008). **The Metabolic Syndrome.** *Endocrine Reviews*. Vol. 29 (7). Pp. 777–822. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0024>
33. Cunningham, R. P. & Porat-Shliom, N. (2021). **Liver Zonation – Revisiting Old Questions With New Technologies.** *Frontiers in Physiology*. Vol. 12. doi: 10.3389/fphys.2021.732929.
34. D'Amore, S.; Palasciano, G. & Moschetta, A. (2014). **The Liver in Metabolic Syndrome.** *A Systems Biology Approach to Study Metabolic Syndrome*. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-319-01008-3_3

35. D'Amico, G.; Garcia-Tsao, G. & Pagliaro, L. (2006). **Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies.** *J Hepatol.* Vol. 44(1). Pp. 217-31. doi: 10.1016/j.jhep.2005.10.013.
36. De Masi, A.; Li, X.; Lee, D.; Jeon, J.; Wang, Q.; Baek, S.; Park, O.; Mottis, A.; Strotjohann, K.; Rapin, A.; Jung, H. & Auwerx, J. (2023). **Cyclo (His-Pro): A further step in the management of steatohepatitis.** *JHEP Reports.* Vol. 5 (9). <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100815>.
37. Debby, P. Y.; Koonen, R.; Febbraio, M.; Young, M.; Carrie-Lynn M.; & Jason R. B. (2007). **Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity.** *Diabetes* Vol. 56 (12): 2863–2871. Doi: 10.2337/db07-0907.
38. Dettlaff-Pokora, A.; Sledzinski, A. & Swierczynski, J. (2015). **Up-Regulation *Mttp* and *Apob* Gene Expression in Rat Liver is Related to Post-Lipectomy Hypertriglyceridemia.** Vol. 36 (5). Doi: 10.1159/000430149.
39. Dhirendra, K.; Simanshu, Dwight V. & McCormick, N. F. (2017). **RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease.** *Cell.* Vol. 170 (1). Pp: 17-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>.
40. Ding, H.; Yu, J. H.; Ge, G.; Ma, Y. Y.; Wang, J. C. & Zhang, J. (2023). **RASAL2 Deficiency Attenuates Hepatic Steatosis by Promoting Hepatic VLDL Secretion via the AKT/TET1/MTTP Axis.** *J Clin Transl Hepatol.* Vol. 11(2). Pp. 261-272. doi: 10.14218/JCTH.2022.00042.
41. Dobrowolski, P.; Prejbisz, A.; Kuryłowicz, A.; Baska, A.; Burchardt, P.; Chlebus, K.; Dzida, G.; Jankowski, P.; Jaroszewicz, J.; Jaworski, P.; Kamiński, K.; Kapłon-Cieślicka, A.; Kłoczek, M.; Kukla, M.; Mamcarz, A.; Mastalerz-Migas, A.; ... & Bogdański, P. (2022). **Metabolic syndrome - a new definition and management guidelines.** *Arch Med Sci.* Vol. 18 (5) 10.5114/aoms/152921.
42. Donaldson, J. & Jackson, C. (2011). **ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 12. Pp. 362–375. <https://doi.org/10.1038/nrm3117>

43. Donaldson, J. G. & Honda, A. (2005). **Localization and function of Arf family GTPases.** Biochemical Society Transactions. Vol. 33 (4). Pp. 639–642. doi:10.1042/bst0330639
44. Downward, J. (2008). **Targeting RAS and PI3K in lung cancer.** *Nat Med.* Vol. 14. Pp: 1315–1316. <https://doi.org/10.1038/nm1208-1315>
45. Duan, Y.; Pan, X.; Luo, J.; Xiao, X.; Li, J.; Bestman, P.; & Luo, M. (2022). **Association of inflammatory cytokines with non-alcoholic fatty liver disease.** *Front. Immunol.* Vol. 13. Doi: 10.3389/fimmu.2022.880298.
46. Durán-Maldonado M. X.; Hernández-Padilla L.; Gallardo-Pérez J. C.; Díaz-Pérez A. L.; Martínez-Alcantar L.; Reyes De la Cruz H.; Rodríguez-Zavala J. S.; Pacheco-Rodríguez G.; Moss J. & Campos-García J. (2020). **Bacterial Cyclodipeptides Target Signal Pathways Involved in Malignant Melanoma.** *Frontiers in Oncology.* <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01111>.
47. Ebihara, C., Aizawa-Abe, M. & Zhao, M. (2022). **Different sites of actions make different responses to thiazolidinediones between mouse and rat models of fatty liver.** *Sci Rep.* Vol. 12 (449). Doi: 10.1038/s41598-021-04036-7.
48. Ekstedt, M.; Hagstroom, H.; Nasr, P.; Fredrikson, M.; Stal, P.; & Kechagias, S. (2015). **Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up.** *Hepatology.* Vol. 61:1547–54.
49. Elekofehinti, O. & Akinjiyan, M. (2021). **Effects of *Momordica Charantia* Silver Nanoparticles on the expressions of Genes Associated With Lipid Metabolism and Nephrotoxicity in Streptozotocin-Induced Rats.** *Nigerian Journal of Biotechnology.* Vol. 37 (2). Doi: 10.4314/njb.v37i2.12.
50. Enjoji, M.; Kohjima, M. & Nakamuta, M. (2016). **Lipid Metabolism and the Liver.** In: Ohira, H. (eds). *The Liver in Systemic Diseases.* Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55790-6_6

51. Erpecum, K. J.; Kleef, L. A.; Beuers, U.; Knecht, R. J. (2023). **The new international nomenclature for steatotic liver disease: One step forward towards enhanced awareness for healthier life.** European Journal of Internal Medicine. Vol. 117. Doi: 10.1016/j.ejim.2023.09.006
52. Eslam, M.; Sanyal, A. J. & George, J. (2020). **MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease.** Gastroenterology. doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312.
53. Esteve-Lafuente, E. & Ricart-Engel, W. (2006). **Esteatosis hepática y resistencia a la insulina: ¿qué ocurre primero?** Clínica e Investigación en Arteriosclerosis. Vol. 18. Pp. 72-82, [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(06\)73708-1](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(06)73708-1).
54. Fahed, G.; Aoun, L.; Bou Zerdan, M.; Allam, S.; Bou Zerdan, M.; Bouferraa, Y. & Assi, H.I. (2022). **Metabolic syndrome: updates on pathophysiology and management in 2021.** *Int. J. Mol. Sci.* 23, 786. <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>.
55. Flores-Lázaro, J. R.; Rodríguez-Martínez, E. & Rivas-Arancibia, S. (2011). **Consecuencias metabólicas de la alteración funcional del tejido adiposo en el paciente con obesidad.** Rev Med Hosp Gen Méx. Vol. 73 (3). Pp. 157-165.
56. Foglia, B.; Cannito, S.; Bocca, C.; Parola, M. & Novo, E. (2019). **ERK Pathway in Activated, Myofibroblast-Like, Hepatic Stellate Cells: A Critical Signaling Crossroad Sustaining Liver Fibrosis.** *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2700. <https://doi.org/10.3390/ijms20112700>.
57. Fon, T. K.; & Rozman, D. (2011). **Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation.** *J Lipids.* doi: 10.1155/2011/783976.
58. Foster, M. T.; Shi, H.; Seeley, R. J. & Woods, S. C. (2011). **Removal of intra-abdominal visceral adipose tissue improves glucose tolerance in rats: role of hepatic triglyceride storage.** *Physiol Behav.* Vol. 104(5). Pp. 845-854. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.064.

59. Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). **Los colores del tejido adiposo.** *Gaceta médica de México*, 156(2), 143-150. Epub 26 de mayo de 2021. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005541>.
60. Fujita, T. & Narumiya, S. (2016). **Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: a new perspective.** *Inflamm Regener.* Vol 36 (1). Doi: <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0005-6>
61. Gábor, S.; Heckamann, V.; Tóth, D.; Dénes, P.; Petrus, K. & Molnár T. F. (2020). **The effect of hepatic steatosis and fibrosis on liver weight and dimensions.** *Legal Medicine.* Vol. 47. Doi: 10.1016/j.legalmed.2020.101781.
62. Gábor, S.; Veronika, H.; Dénes, T.; Dénes, P.; Karola, P.; & Tamás F. M. (2020). **The effect of hepatic steatosis and fibrosis on liver weight and dimensions.** *Legal Medicine.* Vol. 47. Doi: 10.1016/j.legalmed.2020.101781.
63. Galdieri, L.; & Vancura, A. (2012). **Acetyl-CoA carboxylase regulates global histone acetylation.** *J Biol Chem.* Vol. 287(28):23865-76. doi: 10.1074/jbc.M112.380519.
64. García, A. J. (2011). **Receptores acoplados a proteínas G y su desensibilización.** *Rev. Odont. Mex.* 15 (4).
65. García-Martínez, R.; Noiret, L.; Sen, S.; Mookerjee, R. & Jalan, R. (2014). **Albumin infusion improves renal blood flow autoregulation in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute kidney injury.** *Liver International.* Vol. 35 (2). Pp. 335-343. Doi: 10.1111/liv.12528
66. Ghasemi, A.; Jeddi, S. & Kashfi, K. (2021). **The laboratory rat: Age and body weight matter.** *EXCLI J.* Vol. 20. Pp. 1431-1445. doi: 10.17179/excli2021-4072.
67. Gjermeni, E.; Kirstein, AS; Kolbig, F.; Kirchhof, M.; Bundalian, L.; Katzmann, JL; Laufs, U.; Bluher, M.; Garten, A. & Le Duc, D. (2021). **Obesity—An Update on the Basic Pathophysiology and Review of Recent Therapeutic Advances.** *Biomolecules.* Vol. 11, Pp: 1426. <https://doi.org/10.3390/biom11101426>.
68. Gluchowski, N. L.; Becuwe, M.; Walther, T. C.; & Farese, R. V. (2017). **Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications.**

Nat Rev Gastroenterol Hepatol. Vol. 14(6):343-355. Doi: 10.1038/nrgastro.2017.32.

69. Godoy-Matos A. F., Silva Júnior W. S. y Valerio C. M. (2020). **NAFLD como un continuo: de la obesidad al síndrome metabólico y la diabetes.** *Diabetol Metab Syndr* Vol. 12 (60). <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00570-y>
70. Goedeke, L.; Bates, J.; Vatner, D.; Perry, R.; Wang, T.; Ramirez, R.; Li, L.; Ellis, M.; Zhang, D.; Wong, K.; Beysen, C.; Cline, G.; Ray, A.; & Shulman, G. (2018). **Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents.** *Hepatology*. Vol. 68(6): 2197-2211. Doi: 10.1002/hep.30097
71. Gong, S.; Xu, C.; Wang, L.; Liu, Y.; Owusu, D.; Bailey, B. A.; ... & Wang, K. (2017). **Genetic association analysis of polymorphisms in PSD3 gene with obesity, type 2 diabetes, and HDL cholesterol.** *Diabetes Research and Clinical Practice*. Vol. 126. Pp. 105–114. doi:10.1016/j.diabres.2017.02.006
72. González, J. E.; (2013). **Obesity: Etiologic and pathophysiological analisis.** *Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed.)*. Vol. 60 (1) . Pp: 17-24. 10.1016/j.endoen.2013.01.005
73. Gordon, K.; Leung, M. M.; Véniant, S. K.; Constance, H.; Björkegren, J.; Neese, R.; Hellerstein, M.; & Young, S. G. (2000). **A Deficiency of Microsomal Triglyceride Transfer Protein Reduces Apolipoprotein B Secretion.** *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275(11): 7515-7520. Doi: 10.1074/jbc.275.11.7515.
74. Grove, J. I.; Lo, P. C. K.; Shrine, N.; Barwell, J.; Wain, L. V.; Tobin, M. D.; Salter, A. M.; Borkar, A. N.; Cuevas-Ocaña, S.; Bennett, N.; John, C.; Ntalla, I.; Jones, G. E.; Neal, C. P.; Thomas, M. G.; Kuht, H.; Gupta, P.; Vemala, V. M.; Grant, A.; Adewoye, A. B.; Shenoy, K. T.; Balakumaran, L. K.; Hollox, E. J.; Hannan, N. R. F.; & Aithal, G. P. (2023). **Identification and characterisation of a rare MTTP variant**

- underlying hereditary non-alcoholic fatty liver disease.** JHEP. Vol. 5(8):100764. doi: 10.1016/j.jhepr.2023.100764.
75. Grundy, S. M.; Neeland, I. J.; Turer, A. T. & Vega, G. L. (2013). **Waist circumference as measure of abdominal fat compartments.** J Obes. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/454285>
 76. Guicciardi, M. E.; & Gores, G. J. (2006). **FasL and Fas in Liver Homeostasis and Hepatic Injuries.** In: Fas Signaling. Medical Intelligence Unit. Springer, Boston, MA. Doi: 10.1007/0-387-34573-6_8.
 77. Guija-Guerra, H. & Guija-Poma, E. (2023). **Free radicals and antioxidant systems.** Horiz Med. Vol. 23(2): e2158. Doi: 10.24265/horizmed.2023.v23n2.12.
 78. Harvey, I.; Boudreau, A. & Stephens, J. M. (2020) **Adipose tissue in health and disease.** Open Biol. Vol: 10 (12). 10.1098/rsob.200291.
 79. Hebbard, L.; & George, J. (2011). **Animal models of nonalcoholic fatty liver disease.** Nature reviews Gastroenterology & hepatology. Vol. 8(1): 35-44.
 80. Hernández-Padilla, L., Reyes de la Cruz, H. & Campos-García, J. (2020). **Antiproliferative effect of bacterial cyclodipeptides in the HeLa line of human cervical cancer reveals multiple protein kinase targeting, including mTORC1/C2 complex inhibition in a TSC1/2-dependent manner.** Apoptosis. Vol. 25. Pp. 632–647. <https://doi.org/10.1007/s10495-020-01619-z>
 81. Hernández-Padilla, L.; Vázquez-Rivera, D.; Sánchez-Briones, L.A.; Díaz-Pérez, A.L.; Moreno-Rodríguez, J.; Moreno-Eutimio, M.A.; Meza-Carmen, V.; Cruz, H.R. & Campos-García, J. (2017). **The Antiproliferative Effect of Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa Cells Involves Inhibition of Phosphorylation of Akt and S6k Kinases.** Molecules. Vol. 22. Pp. 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>

82. Hill, J. O.; Wyatt, H. R. & Peters, J. C. (2013). **The Importance of Energy Balance.** Eur Endocrinol. Vol. 9 (2). Pp. 111-115. doi: 10.17925/EE.2013.09.02.111
83. Huang, F.; Fan, J. & Wan, X. (2022). **The association between blood albumin level and cardiovascular complications and mortality risk in ICU patients with CKD.** BMC Cardiovasc Disord. Vol. 22 (322). Doi: 10.1186/s12872-022-02763-x
84. Huanyi, C.; Qingxian, Cai.; Wanrong, G.; Qiao, S.; Hancheng, Q.; Tian, W.; Yingxin, X.; Longyi, Z.; Mengyin, C.; Haixia, G.; Sifan, C.; Hua, L.; & Fen, X. (2023). **Malonylation of Acetyl-CoA carboxylase 1 promotes hepatic steatosis and is attenuated by ketogenic diet in NAFLD.** Cell Reports. Vol. 42(4):2211-1247. Doi: 10.1016/j.celrep.2023.112319.
85. Hur, J. H.; Park, S.; Dall'Armi, C.; Lee, J. S.; Paolo, G. D.; Lee, H. Y.; Yonn, M. Y.; Min D. S. & Choi, C. S. (2016). **Phospholipase D1 deficiency in mice causes nonalcoholic fatty liver disease via an autophagy defect.** Sci Rep. Vol. 6. <https://doi.org/10.1038/srep39170>.
86. Iichiro, S.; Yuriy, B.; & Jay, D. (1999). **Increased Levels of Nuclear SREBP-1c Associated with Fatty Livers in Two Mouse Models of Diabetes Mellitus.** Journal of Biological Chemistry. Vol. 274 (42): 30028-30032. Doi: 10.1074/jbc.274.42.30028.
87. INEGI (2019). **Principales causas de mortalidad.** Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <https://www.inegi.org.mx/programas/mortalidad/>.
88. Ipsen, D. H.; Lykkesfeldt, J. & Tveden-Nyborg, P. (2018). **Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease.** Cell. Mol. Life Sci. Vol. 75. Pp. 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>.
89. Irato, P. & Santovito, G. (2021). **Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function.** Antioxidants. Vol. 10 (4):579. doi: 10.3390/antiox10040579.

90. Ishibashi, H.; Nakamura, M.; Komori, A.; Migita, K. & Shimoda, S. (2009). **Liver architecture, cell function, and disease.** Semin Immunopathol. Vol. 31. Pp. 399–409. doi: 10.1007/s00281-009-0155-6.
91. James, W.; Donald, A.; Craig, S. & Nelson, L. (2013). **Diabetes Mellitus.** Little and Falace's Dental Management of the Medically Compromised Patient (Eighth Edition). Pp. 219-239. Doi:10.1016/B978-0-323-08028-6.00014-2.
92. Jia, Z.; Liu, W; Gong, L. & Xiao, Z. (2017). **Downregulation of RASAL2 promotes the proliferation, epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal cancer cells.** Oncol Lett. 13(3). Pp. 1379-1385. doi: 10.3892/ol.2017.5581.
93. Jin, X.; Qiu, H.; Li -Li, R. Y.; Chen X.; Li, C.; Orgulloso C. G. & Jiang, T. (2023). **Pathophysiology of obesity and its associated diseases.** Acta Pharmaceutica Sinica B. Vol. 13(6). Pp. 2403-2424. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.012>
94. Jin, X.; Qiu, H.; Li, L.; Yu, R.; Chen, X.; Li, C.; Proud, C. G. & Jiang, T. (2023). **Pathophysiology of obesity and its associated diseases.** Acta Pharmaceutica Sinica. Vol. 13 (6), Pp. 2403-2424. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.012>.
95. Kamm, D. R. & McCommis, K. S. (2022). **Hepatic stellate cells in physiology and pathology.** J Physiol. Vol. 600(8). Pp. 1825-1837. DOI: 10.1113/JP281061.
96. Kapalka, G. M. (2010). **Pharmacokinetics.** Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents. 13–46. doi:10.1016/b978-0-12-374927-7.00002-9
97. Kaviarasan, H. & Pugalendi, K. V. (2009). **Influence of flavonoid-rich fraction from Spermacoce hispida seed on PPAR-alpha gene expression, antioxidant redox status, protein metabolism and marker enzymes in high-fat-diet fed STZ diabetic rats.** Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. Vol 2 (20). Doi: 10.1515/JBCPP.2009.20.2.141.

98. Keles, U.; Ow, J. R.; & Kuentzel, K. B. (2023). **Liver-derived metabolites as signaling molecules in fatty liver disease.** *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 80, 4 Doi: 10.1007/s00018-022-04658-8
99. Kietzmann, T. (2017). **Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited.** *Redox Biology.* Vol. 11. Pp. 622-630. Doi: 10.1016/j.redox.2017.01.012.
100. Koliaki, C.; Szendroedi, J.; Kaul, K.; Jelenik, T.; Nowotny, P.; Jankowiak, F.; Herder, C.; Carstensen, M.; Krausch, M.; Knoefel, W. T.; Schlensak, M.; & Roden, M. (2015). **Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis.** *Cell Metabolism.* Vol. 21(5). Pp. 739-746. Doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.004.
101. Kosmalski, M.; Frankowski, R.; Ziółkowska, S.; Różycka-Kosmalska, M. & Pietras, T. (2023). **What's New in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD).** *J. Clin. Med.* Vol. 12. Pp: 1852. <https://doi.org/10.3390/jcm12051852>
102. Kovesdy, C. P. (2017). **Obesity and kidney disease: Hidden consequences of the epidemic.** *Nefrología Latinoamericana* Vol: 12(2). Pp. 47-55. Doi:10.1016/j.nefrol.2017.03.003.
103. Kramer, I. M. (2016). **An Introduction to Signal Transduction.** *Signal Transduction.* 53-183. doi:10.1016/b978-0-12-394803-8.00002-4.
104. Krishna, M. (2014). **Anatomía microscópica del hígado.** *Clin Liver Dis.* 2(5). Pp. 109-112. doi: 10.1002/cld.287.
105. Lambert, J. E.; Ramos–Roman, M. A.; Browning, J. D.; & Parks, E. J. (2014). **Increased De Novo Lipogenesis Is a Distinct Characteristic of Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *Gastroenterology.* Vol. 146(3): 726–735. Doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.049
106. Lambis, L.; Belisario J.; Suárez, A. (2018). **Expresión de TGF- β como indicio temprano de lesión del tejido hepático en la enfermedad de hígado graso no alcohólico.** *Acta Médica Colombiana.* Vol. 43(3).
107. Lang, J.; Katz, R.; Ix, J. H.; Gutierrez, O. M.; Peralta, C. A.; Parikh, C. R.; Satterfield, S.; Petrovic, S.; Devarajan, P.; Bennett, M.;

- Fried, L. F.; Cummings, S. R.; Sarnak, M. J. & Shlipak, M. G. (2018). **Association of serum albumin levels with kidney function decline and incident chronic kidney disease in elders.** *Nephrol Dial Transplant*. Vol. 33 (6). Pp. 986-992. doi: 10.1093/ndt/gfx229.
108. Lázaro-Mixteco PE; González-Coronel JM; Hernández-Padilla L; Martínez-Alcantar L; Martínez-Carranza E; López-Bucio JS; Guevara-García AA & Campos-García J. (2022). **Transcriptomics Reveals the Mevalonate and Cholesterol Pathways Blocking as Part of the Bacterial Cyclodipeptides Cytotoxic Effects in HeLa Cells of Human Cervix Adenocarcinoma.** *Front Oncol*. Vol. 12. 10.3389/fonc.2022.790537.
 109. Li, J. H.; He, S. Y.; Li, P.; Zhong, X. L. (2014). **Roles of Fas/FasL, Bcl-2/Bax, and Caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis.** *Genet. Mol. Res.* Vol. 13 (2): 3991-3999. Doi: 10.4238/2014.May.23.10.
 110. Li, M.; Ye, T.; Wang, X.; Li, X.; Qiang, O.; Yu, T.; Tang, C. & Liu, R. (2016). **Effect of Octreotide on Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obesity in Rats.** *PLoS ONE*. Vol.11(3): e0152085. Doi: 10.1371/journal.pone.015208.
 111. Li, N.; Li, X.; Ding, Y.; Liu, X.; Diggle, K.; Kisseleva, T.; & Brenner, D. A. (2023). **SREBP Regulation of Lipid Metabolism in Liver Disease, and Therapeutic Strategies.** *Biomedicines*. Vol. 11. Doi: 10.3390/biomedicines11123280.
 112. Li, S.; Tan, H. Y.; Wang, N.; Zhang, Z. J.; Lao, L.; Wong, C. W. & Feng, Y. (2015). **The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases.** *Int J Mol Sci*. Vol. 16(11). Pp. 26087-124. doi: 10.3390/ijms161125942.
 113. Liangyou, R. (2014). **Energy metabolism in the liver.** *Compr Physiol*. 4(1). Pp. 177–197. doi: 10.1002/cphy.c130024.
 114. Liu, X.; Wang, H.; Liang, X., & Roberts, M. S. (2017). **Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease.** *Liver Pathophysiology*. Pp. 391–400. doi:10.1016/b978-0-12-804274-8.00030-8

115. Liu, Y. Z.; Peng, W.; Chen, J. K.; Su, W. J.; Yan, W. J.; Wang, Y. X.; & Jiang, C. L. (2019). **FoxO1 is a critical regulator of hepatocyte lipid deposition in chronic stress mice.** Vol. 27. Doi: 10.7717/peerj.7668.
116. Lizarzaburu; R. J. C. (2013). **Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica.** *Anales de la Facultad de Medicina*, Vol: 74 (4), pp. 315-320. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000400009&lng=es&tlng=es..
117. Lonardo, A.; Leoni, S.; Alswat, K. A. & Fouad, Y. (202). **History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *Int J Mol Sci.* Vol. 21 (16):5888. doi: 10.3390/ijms21165888.
118. Lopez-Jimenez, F.; Almahmeed, W.; Bays, H.; Cuevas, A. & Wilding, J. (2022). **Obesity and cardiovascular disease: mechanistic insights and management strategies.** *European Journal of Preventive Cardiology.* Vol: 29 (17). Pp. 2218–2237. Doi: /10.1093/eurjpc/zwac187
119. Lu, L.; Jingqi, F.; Dan, L.; Jing, S.; Yongyong, H.; Chengjie, C.; Junbo, S.; Linlin, W.; Xin, W.; Rui Z.; Huihui, W.; Melvin, E; Andersen, Q.; Yuanyuan, X.; & Jingbo P. (2020). **Hepatocyte-specific Nrf2 deficiency mitigates high-fat diet-induced hepatic steatosis: Involvement of reduced PPAR γ expression.** *Redox Biology.* Vol. 30. Doi: 10.1016/j.redox.2019.101412.
120. Lu, M.; Wan, M.; & Leavens, K. (2012). **Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1.** *Nat Med.* Vol. 18: 388–395. Doi: 10.1038/nm.2686.
121. Luangmonkong, T.; Parichatikanond, W. & Olinga, P. (2023). **Targeting collagen homeostasis for the treatment of liver fibrosis: Opportunities and challenges.** *Biochemical Pharmacology.* Vol. 215. Doi 10.1016/j.bcp.2023.115740.
122. Luedde, T.; & Schwabe, R. F. (2011). **NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* Vol. 8(2):108-18. doi: 10.1038/nrgastro.2010.213.

123. Mancina, R. M.; Sasidharan, K.; Lindblom, A.; ... & Romeo, S. (2022). **PSD3 downregulation confers protection against fatty liver disease.** *Nat Metab.* Vol. 4. Pp. 60–75. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00518-0>
124. Manco, R. & Itzkovitz, S. (2021). **Liver zonation.** *Journal of Hepatology.* Vol: 74(2). Pp. 466–468. doi:10.1016/j.jhep.2020.09.003
125. Mao, J.; Chirala, S. & Wakil, S. (2003). **Human acetyl-CoA carboxylase 1 gene: Presence of three promoters and heterogeneity at the 5'-untranslated mRNA region.** *Biochemistry.* Vol. 100 (13). Pp. 7515-7520. Doi: 10.1073/pnas.1332670100.
126. Mao, Z. & Zhang, W. (2018). **Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism.** *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 19. Pp. 2043. <https://doi.org/10.3390/ijms19072043>
127. Marco, L.; Puchades, M. J.; Panizo, N.; Romero-Parra, M.; Gandía, L.; Giménez-Civera, E.; Pérez, E. & Gorriz, J. L. (2021). **Cardiorenal Fat: A Cardiovascular Risk Factor With Implications in Chronic Kidney Disease.** *Front. Med.* Vol. 8. Doi: 10.3389/fmed.2021.640814.
128. Martin-Grau, M.; Marrachelli, V. G. & Monleon, D. (2022). **Rodent models and metabolomics in non-alcoholic fatty liver disease: What can we learn?** *World J Hepatol.* Vol. 14 (2). Pp: 304-318. 10.4254/wjh.v14.i2.304.
129. Martinou, E.; Pericleous, M.; Stefanova, I.; Kaur, V. & Angelidi, A. M. (2022). **Diagnostic Modalities of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From Biochemical Biomarkers to Multi-Omics Non-Invasive Approaches.** *Diagnostics.* Vol. 12. Pp: 407. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020407>
130. Masarone, M.; Rosato, V.; Dallio, M.; Gravina, A. G.; Aglitti, A.; Loguercio, C.; & Persico, M. (2018). **Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Pp. 1–14. doi:10.1155/2018/9547613.
131. Matsumoto, M.; Han, S.; Kitamura, T.; & Accili, D. (2006). **Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism.** *J Clin Invest.* Vol. 116(9):2464-72. Doi: 10.1172/JCI27047.

132. Matsumoto, M.; Han, S.; Kitamura, T.; & Accili, D. (2006). **Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism.** *J Clin Invest.* Vol. 116(9):2464-72. doi: 10.1172/JCI27047.
133. Maynard, R. L., & Downes, N. (2019). **Liver.** *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research.* Pp. 159–168. doi:10.1016/b978-0-12-811837-5.00014-9.
134. Mende, C. & Einhorn, D. (2022). **Fatty kidney disease: The importance of ectopic fat deposition and the potential value of imaging.** *J Diabetes.* Vol.14(1). Pp. 73-78. doi: 10.1111/1753-0407.13232.
135. Mendez-Sanchez, N.; Cruz-Ramon, V.C.; Ramirez-Perez, O.L.; Hwang, J.P.; Barranco-Fragoso, B. & Cordova-Gallardo, J. (2018). **New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis.** *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19072034>
136. Meshkani, R. & Adeli, K. (2009). **Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease.** *Clinical Biochemistry,* Vol. 42(13-14). Pp. 1331–1346. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.05.
137. Meshkani, R. & Adeli, K. (2009). **Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease.** *Clinical Biochemistry.* Vol. 42. Pp: 1331-1346. 10.1016/j.clinbiochem.2009.05.018.
138. Meyer, K.; Jia, Y.; Cao, W. Q.; Kashireddy, P.; & Rao, M. S. (2002). **Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and PPARalpha regulated genes in spontaneously developed hepatocellular carcinomas in fatty acyl-CoA oxidase null mice.** *Int J Oncol.* Vol. 21(6):1175-80. PMID: 12429965.
139. Mingrone, G. & Castagneto, M. (2015). **The Pathophysiology of Obesity.** In: Lucchese, M., Scopinaro, N. (eds) *Minimally Invasive Bariatric and Metabolic Surgery.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15356-8_3.
140. Mingrone, G. & Castagneto, M. (2015). **The Pathophysiology of Obesity.** In: Lucchese, M., Scopinaro, N. (eds) *Minimally Invasive Bariatric*

- and Metabolic Surgery. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15356-8_3
141. Mittal, B. (2019). **Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue.** Indian J Med Res. Vol. 149(5). Pp. 571-573. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1910_18. PMID: 31417024; PMCID: PMC6702693.
 142. Moctezuma-Velázquez C. (2018). **Tratamiento actual de la enfermedad por hígado graso no alcohólico.** Revista de Gastroenterología de México. Vol. 83 (2). Pp. 125-133. 10.1016/j.rgmx.2017.10.003
 143. Moreno-Fernandez, M. E.; Giles, D.; Stankiewicz, T. E.; Sheridan, R.; Karns, R.; Cappelletti, M.; Lampe, K.; Mukherjee, R.; Sina, C.; Sallese, A.; Bridges, J. P.; Hogan, S. P.; Aronow, B. J.; Hoebe, K.; & Divanovic, S. (2018). **Peroxisomal β -oxidation regulates whole body metabolism, inflammatory vigor, and pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease.** JCI Insight. Vol. 3(6). doi: 10.1172/jci.insight.93626.
 144. Muralidhar, M.N.; Prasad, S.M.V.K.; Kiran K. B.; Giridharan, N. V. & Rajender R. K. (2017). **Differential response of rat strains to obesogenic diets underlines the importance of genetic makeup of an individual towards obesity.** Sci Rep. Vol. 7. Doi: 10.1038/s41598-017-09149-6.
 145. Nair, D. G. & Weiskirchen, R. (2024). **Recent Advances in Liver Tissue Engineering as an Alternative and Complementary Approach for Liver Transplantation.** Curr. Issues Mol. Biol. Vol. 46. Pp. 262-278. <https://doi.org/10.3390/cimb46010018>
 146. Nguyen, P.; Leray, V.; Diez, M.; Serisier, S.; Le Bloc'h, J.; Siliart, B. & Dumon H. (2008). **Liver lipid metabolism.** Journal of animal physiology and animal nutrition. Vol. 92 (3). Pp. 272-283. Doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x.
 147. Nguyen-Lefebvre, A. T. & Horuzsko, A. (2015). **Kupffer Cell Metabolism and Function.** J Enzymol Metab. Vol. 1(1)1. PMCID: PMC4771376.

148. Odena, G. & Bataller, R. (2012). **Fibrogénesis hepática: fisiopatología.** Gastroenterología y hepatología. Vol. 35 (2). Pp. 6-9. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-pdf-S0210570512700432>.
149. Ogilvie, C. E. & Czekster, C. M. (2023). **Cyclic dipeptides and the human microbiome: Opportunities and challenges.** Bioorganic & Medicinal Chemistry. Vol. 90.
150. Organización Mundial de la Salud (2023). **Obesidad y sobrepeso.** Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
151. Ortega, C. M. J.; Cornelio Rodríguez, G.; Rodríguez Weber, F. & Díaz Greene, E. (2020). **Prevalencia del hígado graso no alcohólico y su asociación con alteraciones bioquímicas en una población mexicana asintomática.** *Acta médica Grupo Ángeles*, Vol. 18 (2). Pp. 127-132. <https://doi.org/10.35366/93885>
152. Ortega, M. J.; Cornelio, G.; Rodríguez, R.; & Díaz, E. (2020). **Prevalencia del hígado graso no alcohólico y su asociación con alteraciones bioquímicas en una población mexicana asintomática.** *Acta médica*. Vol: 18(2), 127-132. Doi: 10.35366/93885
153. O-Sullivan, I.; Zhang, W.; & Wasserman, D. (2015). **FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization.** *Nat Commun*. Vol. 6. Doi: 10.1038/ncomms8079.
154. Oyekoya, T. A. (2021). **Historical narrative from fatty liver in the nineteenth century to contemporary NAFLD – Reconciling the present with the past.** *Reports Innovation in Hepatology*. Vol. 3 (3). Doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100261
155. Pacini, G.; Omar, B. & Ahrén B. (2013). **Animal Models of Diabetes and its Associated Complications.** *Methodology Report*. Vol. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/986906>.
156. Pan, X.; & Zhang, Y. (2022). **Hepatocyte nuclear factor 4 α in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease.** *Chinese Medical*

- Journal. Vol. 135(10). Pp. 1172-1181. Doi: 10.1097/CM9.0000000000002092.
157. Paschos, P. & Paletas, K. (2009). **Non alcoholic fatty liver disease two-hit process: multifactorial character of the second hit.** Hippokratia. Vol. 13 (2). Pp. 128. PMCID: PMC2683460.
 158. Patsouris, D.; K. Janardan.; Müller, M.; Kersten, S. (2006). **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Mediates the Effects of High-Fat Diet on Hepatic Gene Expression.** Endocrinology. Vol. 147 (3):1508–1516. Doi: 10.1210/en.2005-1132.
 159. Petra, D.; Raya, A.; Ellmerich, S.; Waddington, S.; Owen, J.; Simons, P.; & Khoo, B. (2013). **Exon Skipping of Hepatic APOB Pre-mRNA With Splice-switching Oligonucleotides Reduces LDL Cholesterol In Vivo.** Molecular Therapy. Vol. 21(3): 602-609. Doi: 10.1038/mt.2012.264.
 160. Pettinelli, P.; Obregón, A. M.; & Videla, L. A. (2011). **Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease.** Nutrición Hospitalaria. Vol. 26(3): 441-450.
 161. Pollak, C. F. (2016). **Resistencia a la insulina: verdades y controversias.** Revista Médica Clínica Las Condes. Vol. 27 (2). Pp. 171-178. 10.1016/j.rmcl.2016.04.006
 162. Polyzos, S. A.; Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2018). **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics.** Metabolism. Vol. 92. Pp. 82-97. doi:10.1016/j.metabol.2018.11.014
 163. Prasad, R.; Jha, R. K. & Keerti, A. (2022). **Chronic Kidney Disease: Its Relationship With Obesity.** Cureus. Vol. 14 (10). doi: 10.7759/cureus.30535.
 164. Qin, S.; Du, R.; & Yin, S. (2015). **Nrf2 is essential for the anti-inflammatory effect of carbon monoxide in LPS-induced inflammation.** Inflamm. Vol. 64. Pp. 537–548. Doi: 10.1007/s00011-015-0834-9.

165. Rada, P.; González-Rodríguez, Á. & García-Monzón, C. (2020). **Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver?**. *Cell Death Dis.* Vol.11. 802. Doi: 10.1038/s41419-020-03003-w.
166. Ramírez-Mejía, M. M.; Qi, X.; Abenavoli, L.; Romero-Gómez, M.; Eslam, M. & Méndez-Sánchez, M. (2023). **Metabolic dysfunction: The silenced connection with fatty liver disease.** *Annals of Hepatology.* Vol. 28 (6). DOI: 10.1016/j.aohep.2023.101138.
167. Reddy, J. K.; & Hashimoto, T. (2001). **PEROXISOMAL β -OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR α : An Adaptive Metabolic System.** *Annual Review of Nutrition.* Vol. 21(1): 193–230. doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.193777.
168. Repasky, G. A.; Cox, A. D.; Hanker, A. B.; Mitin, N., & Der, C. J. (2010). **Role of R-Ras in Cell Growth.** *Handbook of Cell Signaling.* Pp. 1753–1762. doi:10.1016/b978-0-12-374145-5.00214-x.
169. Romero-Gomez, M. (2020). **NAFLD and NASH Biomarkers in Detection, Diagnosis and Monitoring.** Springer. 10.1007/978-3-030-37173-9
170. Ross, R.; Neeland, I.J. & Yamashita, S. (2020). **Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity.** *Nat Rev Endocrinol.* Vol. 16. Pp. 177–189. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0310-7>
171. Rustin, C.; Othman, Z. & Fakhruddin, M. (2021). **Mortality of Sprague Dawley (SD) Rat on Long Term High-Fat Diet (HFD).** *Int J Adv Life Sci Res.* Vol. 4(1). Pp. 31- 37. Doi: 10.31632/ijalsr.20.v04i01.005.
172. Sakagami H. (2008). **The EFA6 family: guanine nucleotide exchange factors for ADP ribosylation factor 6 at neuronal synapses.** *Tohoku J Exp Med.* Vol. 214 (3). Pp. 191-8. doi: 10.1620/tjem.214.191.
173. Sakers, A.; Krystel, M.; Seale, P. & Villanueva C. J. (2022). **Adipose-tissue plasticity in health and disease.** *Cell.* Vol. 185. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.016>

174. Santacroce, G.; Gentile, A.; Soriano, S.; Novelli, A.; Vincenzo, M.; Di Sabatino, A. (2023). **Glutathione: Pharmacological aspects and implications for clinical use in non-alcoholic fatty liver disease.** Front. Med. Vol. 10. Doi: 10.3389/fmed.2023.1124275.
175. Santa-González, G. & Camargo, M. (2016). **Protección celular antioxidante y respuesta adaptativa inducida por estímulos oxidativos crónicos.** Actual Biol. Vol. 38 (104): 71-80. Doi: 10.17533/udea.acbi.v38n104a07
176. Santoleri, D. & Titchenell, P. M. (2019). **Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance.** Cell Mol Gastroenterol Hepatol. Vol. 7 (2). Pp. 447-456. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.016.
177. Shang, Y.; Nasr, P.; Widman, L.; & Hagstrom, H. (2022). **Risk of cardiovascular disease and loss in life expectancy in NAFLD.** Hepatology. Vol. 76(5): 1495-1505.
178. Simanshu, D. K.; Nissley, D. V. & McCormick, F. (2017). **RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease.** Cell. Vol. 170 (1). Pp.17-33. 10.1016/j.cell.2017.06.009.
179. Singh, A.; Ghai, N. & Mohinder Singh Bedi, P. (2022). **Molecular Mechanisms Involved in Insulin Resistance: Recent Updates and Future Challenges.** Evolving Concepts in Insulin Resistance. 10.5772/intechopen.104806
180. Soar, J., & Standing, J. (2010). **Parenteral drug administration.** Medication Safety. 97–112. doi:10.1017/cbo9780511642272
181. Suárez, J. (2001). **Fisiopatología de la aterosclerosis, primera parte.** Revista Costarricense de Cardiología. Vol. 3 (2). Pp. 54-63.
182. Sun, L.; Yin, H.; Liu, M.; Xu, G.; Zhou, X.; Ge, P.; Yang H. & Mao Y. (2019). **Impaired albumin function: a novel potential indicator for liver function damage?.** Annals of Medicine. Vol. 51 (7). Pp. 333 - 344, DOI: [10.1080/07853890.2019.1693056](https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1693056).
183. Sun, X.; Li, X.; Jia, H.; Wang, H.; Shui, G.; Qin, Y.; & Li, X. (2020). **Nuclear factor E2-related factor 2 mediates oxidative stress-induced**

- lipid accumulation in adipocytes by increasing adipogenesis and decreasing lipolysis. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 32(3). Pp. 173-192.
184. Sun, Y.; Liu, B.; Xie, J.; Jiang, X.; Xiao, B.; Hu, X.; & Xiang, J. (2022). **Aspirin attenuates liver fibrosis by suppressing TGF- β 1/Smad signaling.** *Molecular medicine reports*. Vol. 23(181). Doi: 10.3892/mmr.2022.12697.
 185. Sung S. C.; Jin Y. H.; In Jae H.; Jong I. K. & Jae B. (2016). **Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders.** *Frontiers in Endocrinology*. Vol. 7. 10.3389/fendo.2016.00030.
 186. Suzuki, T.; Kanai, Y.; Hara, T.; Sasaki, J.; Sasaki, T.; Kohara, M.; ... & Kanaho, Y. (2006). **Crucial Role of the Small GTPase ARF6 in Hepatic Cord Formation during Liver Development.** *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 26 (16). Pp. 6149–6156. doi:10.1128/mcb.00298-06
 187. Takahashi, H.; Kawanaka, M.; Fujii, H.; Iwaki, M.; Hayashi, H.; Toyoda, H.; Oeda, S.; Hyogo, H.; Morishita, A. & Munekage, K. (2023) **Association of Serum Albumin Levels and Long-Term Prognosis in Patients with Biopsy-Confirmed Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** *Nutrients*. Vol.15. Doi: 10.3390/nu15092014.
 188. Tarantino, G.; Savastano, S. & Colao, A. (2010). **Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance.** *World J Gastroenterol*. Vol. 16(38):4773-83. doi: 10.3748/wjg.v16.i38.4773.
 189. Targher, G; Byrne, C. D.; Lonardo, A.; Zoppini, G.; & Barbui, C. (2016). **Non- alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: a meta-analysis.** *J Hepatol*. Vol. 65 :589–600.
 190. Thorleifsson, G.; Walters, G. B.; Gudbjartsson, D. F.; Steinthorsdottir, V.; Sulem, P.; Helgadottir, A.; ... & Stefansson, K. (2008). **Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity.** *Nature Genetics*. Vol. 41 (1). Pp. 18–24. doi:10.1038/ng.27

191. Todisco, S.; Santarsiero, A.; Convertini, P.; De Stefano, G.; Gilio, M.; Lacobazzi, V.; & Infantino, V. (2022). **PPAR Alpha as a Metabolic Modulator of the Liver: Role in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH).** *Biology (Basel)*. Vol. 11(5):792. doi: 10.3390/biology11050792.
192. Turner, P. V.; Brabb, T.; Pekow, C.; & Vasbinder, M. A. (2011). **Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider.** *J Am Assoc Lab Anim Sci*. Vol. 50(5):600-13.
193. Uranga, R. M. & Keller, J. N. (2019). **The Complex Interactions Between Obesity, Metabolism and the Brain.** *Front Neurosci*. Vol. 13. Pp. 513. doi: 10.3389/fnins.2019.00513.
194. Uranga, R. M. & Keller, J. N. (2019). **The Complex Interactions Between Obesity, Metabolism and the Brain.** *Front Neurosci*. Vol. 13. Pp. 513. doi: 10.3389/fnins.2019.00513.
195. Vairetti, M.; Pasqua, L. G.; Cagna, M.; Richelmi, P.; Ferrigno, A.; & Berardo, C. (2021). **Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update.** *Antioxidants* Vol. 10(3):364. doi: 10.3390/antiox10030364.
196. Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M. & Mazur, M. (2006). **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chem Biol Interact*. Vol. 160(1). Pp.1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
197. Van Herck, M. A.; Vonghia, L. & Francque, S. M. (2017). **Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide.** *Nutrients*. Vol. 9. 1072. <https://doi.org/10.3390/nu9101072>.
198. Virtue S. & Vidal-Puig A. (2010) **Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome: An allostatic perspective.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol. 1801 (3). Pp: 338-349. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.006>.
199. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. (2010). **Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective.**

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. Vol. 1801 (3). Pp. 338–349. doi:10.1016/j.bbalip.2009.12.006
200. Vluggens, A.; Andreoletti, P.; & Viswakarma, N. (2010). **Functional significance of the two ACOX1 isoforms and their crosstalks with PPAR α and RXR α** . Lab Invest. Vol. 90: 696–708. Doi: 10.1038/labinvest.2010.46.
201. Volpe, M. & Gallo, G. (2023). **Obesity and cardiovascular disease: An executive document on pathophysiological and clinical links promoted by the Italian Society of Cardiovascular Prevention (SIPREC)**. Front. Cardiovasc. Vol. 10. Doi: 10.3389/fcvm.2023.1136340.
202. Wajchenberg, B. L. (2000). **Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome**. Endocrine Reviews, Vol. 21 (6). Pp. 697–738, <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0415>.
203. Wang X.; Shivakumar D.; Zhang W. & Welti R. (2006). **Signaling functions of phosphatidic acid**. Progress in Lipid Research. Vol. 45 (3). Pp. 250-278. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.005>.
204. Wang, H.; Zhao, Y.; Pan, Y.; Zhu, Y.; Zhang, D. & Guangyong, S. (2023). **Inhibition of phospholipase D1 ameliorates hepatocyte steatosis and non-alcoholic fatty liver disease**. Vol. 5(6). doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100726.
205. Wang, M.; Li, L.; Xu, Y.; Du, J. & Ling, C. (2022). **Roles of hepatic stellate cells in NAFLD: From the perspective of inflammation and fibrosis**. Front. Pharmacol. Vol. 13. 10.3389/fphar.2022.958428
206. Wang, Y. D.; Wu, L. L.; Qi, X. Y.; Wang, Y. Y.; Liao, Z. Z. Liu, J. H., & Xiao, X. H. (2023). **New insight of obesity-associated NAFLD: Dysregulated “crosstalk” between multi-organ and the liver?**. Genes & Diseases. 10(3), 799-812.
207. Weiyang, L.; Chang, N. & Liying, L. (2022). **Heterogeneity and Function of Kupffer Cells in Liver Injury**. Frontiers in Immunology. Vol. 13. Doi: 10.3389/fimmu.2022.940867.

208. Wen, X.; Zhang, B. & Wu, B. (2022). **Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions.** *Sig Transduct Target Ther.* Vol. 7(298). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01149-x>
209. White, U. (2023). **Adipose tissue expansion in obesity, health, and disease.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* Vol. 11. 10.3389/fcell.2023.1188844
210. Wibmer, A. G.; Becher, T.; Eljalby, M.; Crane, A.; Andrieu, P. C.; Jiang, C. S.; ... & Cohen, P. (2021). **Brown adipose tissue is associated with healthier body fat distribution and metabolic benefits independent of regional adiposity.** *Cell Reports Medicine.* Vol: 2(7). doi:10.1016/j.xcrm.2021.100332
211. Xiaoping, Z. & Fajun, Y. (2012). **Regulation of SREBP-Mediated Gene Expression.** *Pub. Med. Central.* Vol. 28 (4). Pp. 287-294. doi: 10.3724/SP.J.1260.2012.20034.
212. Xu, X.; Poulsen, K. L. & Wu, L. (2022). **Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH).** *Sig Transduct Target.* Vol. 7. Pp. 287 <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01119-3>
213. Yang, M.; Liu, S. & Zhang, C. (2022). **The Related Metabolic Diseases and Treatments of Obesity.** *Healthcare.* Vol. 10. Pp: 1616. <https://doi.org/10.3390/healthcare10091616>.
214. Yang, S. & Liu, G. (2017). **Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma.** *Oncol Lett.* Vol. 13(3). Pp. 1041-1047. doi: 10.3892/ol.2017.5557.
215. Yang, X. & Smith, U. (2007). **Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer?.** *Diabetologia.* Vol: 50(6). Pp. 1127–1139. doi:10.1007/s00125-007-0640-1
216. Ze, C.; Ruifeng, T.; Zhigang, S.; Jingjing, C.; & Hongliang, L. (2020). **Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver**

- disease.** Free Radical Biology and Medicine. Vol. 152. Pp. 116-141. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025.
217. Zhang, C. Y.; Yuan, W. G.; He, P.; Lei, J. H. & Wang, C. X. (2016). **Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets.** World J Gastroenterol. Vol: 22(48). Pp. 10512-10522. doi: 10.3748/wjg.v22.i48.10512.
 218. Zhang, C. Y.; Yuan, W. G.; He, P.; Lei, J. H. & Wang, C. X. (2016). **Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets.** World J Gastroenterol. Vol. 22(48). Pp. 10512-10522. doi: 10.3748/wjg.v22.i48.10512.
 219. Zhou, B.; Zhang, Y.; Sainan, L.; Wu, L.; Fejes-Toth, G.; Naray-Fejes-Toth, A. & Soukas, A. A. (2021). **Serum- and glucocorticoid-induced kinase drives hepatic insulin resistance by directly inhibiting AMP activated protein kinase.** Cell Reports. Vol. 37. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109785>
 220. Zhou, H.; Huo Y.; Yang N. & Wei T. (2023). **Phosphatidic acid: from biophysical properties to diverse functions.** The Febs Journal. <https://doi.org/10.1111/febs.16809>
 221. Zhou, Y.; Prakash, P.; Liang, H.; Cho, K. J.; Gorfe, A. A. & Hancock, J. F. (2017). **Lipid-Sorting Specificity Encoded in K-Ras Membrane Anchor Regulates Signal Output.** Vol. 168 (1-2). Pp: 239-251. 10.1016/j.cell.2016.11.059.
 222. Zhu, M. & Wang, X. (2020). **Regulation of mTORC1 by Small GTPases in Response to Nutrients.** The Journal of Nutrition. Vol. 150 (5). Pp. 1004-1011. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz301>.
 223. Zhu, X.; Xie, S.; Xu, T.; Wu, X. & Han, M. (2017). **Rasal2 deficiency reduces adipogenesis and occurrence of obesity-related disorders.** Molecular Metabolism. Vol. 6(6). pp. 494–502. doi:10.1016/j.molmet.2017.03.003.

10. Anexos

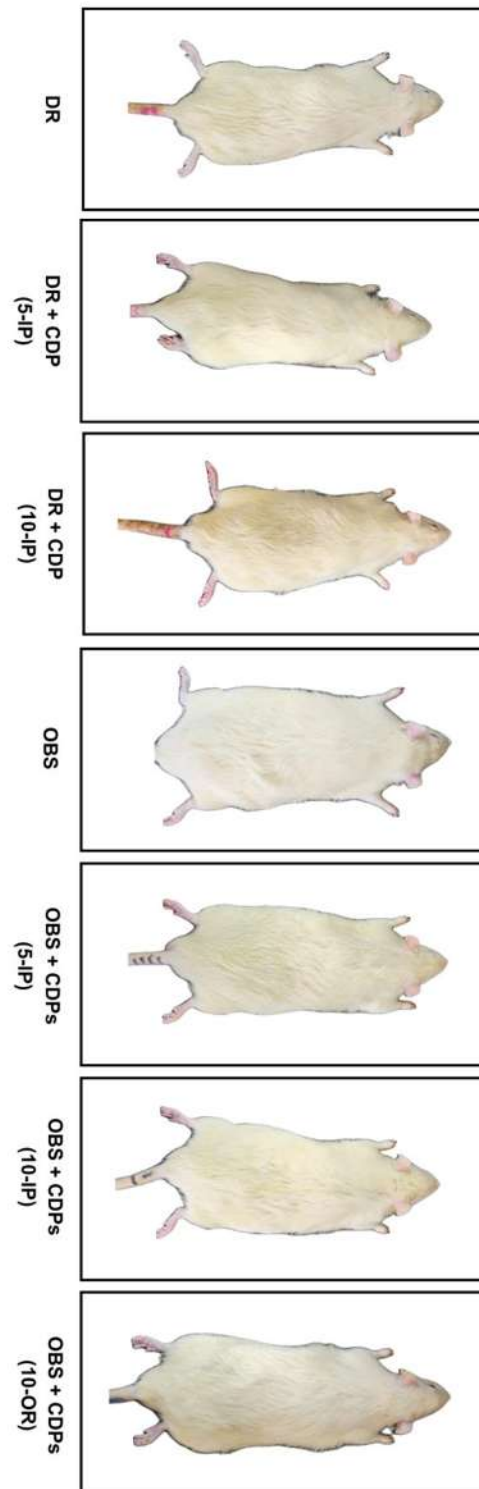


Figura. 10. Fotografías representativas de ratas pertenecientes a cada uno de los grupos. Para la determinación de la dosis y vía de administración necesaria se realizaron pruebas en siete grupos, con dosis de CDPs de 5 y 10 mg/kg y vía de administración oral (OR) e intraperitoneal (IP). OBS: dieta obesogénica. DR: dieta regular.

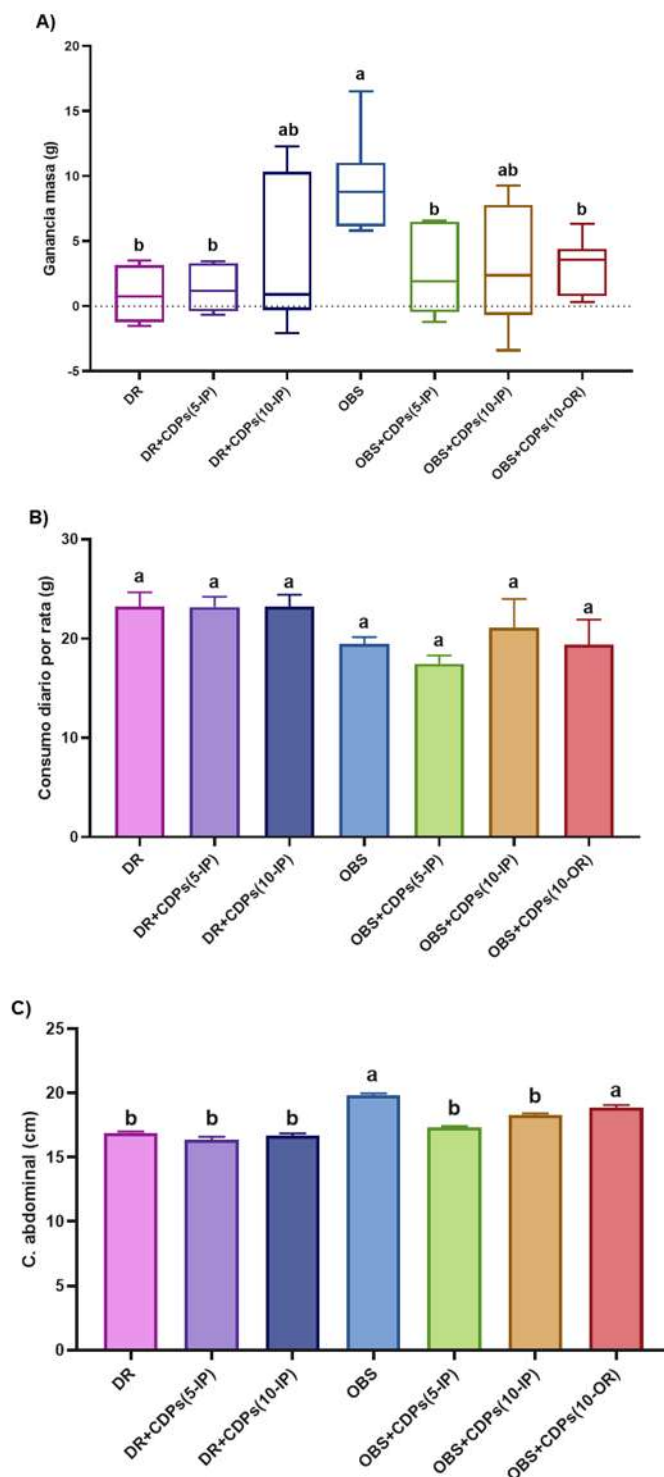


Figura. 32. Ganancia de masa, consumo de alimento y circunferencia abdominal. A) La ganancia de masa corporal fue significativamente mayor en el grupo OBS en comparación con los grupos DR y los grupos OBS que recibieron tratamiento. **B)** No se mostraron diferencias significativas en el consumo de alimento de los diferentes grupos. **C)** La circunferencia abdominal fue mayor para el grupo OBS en comparación con los demás grupos; indicando que los tratamientos con mejores resultados fueron aquellos que se administraron por vía IP. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=3$.

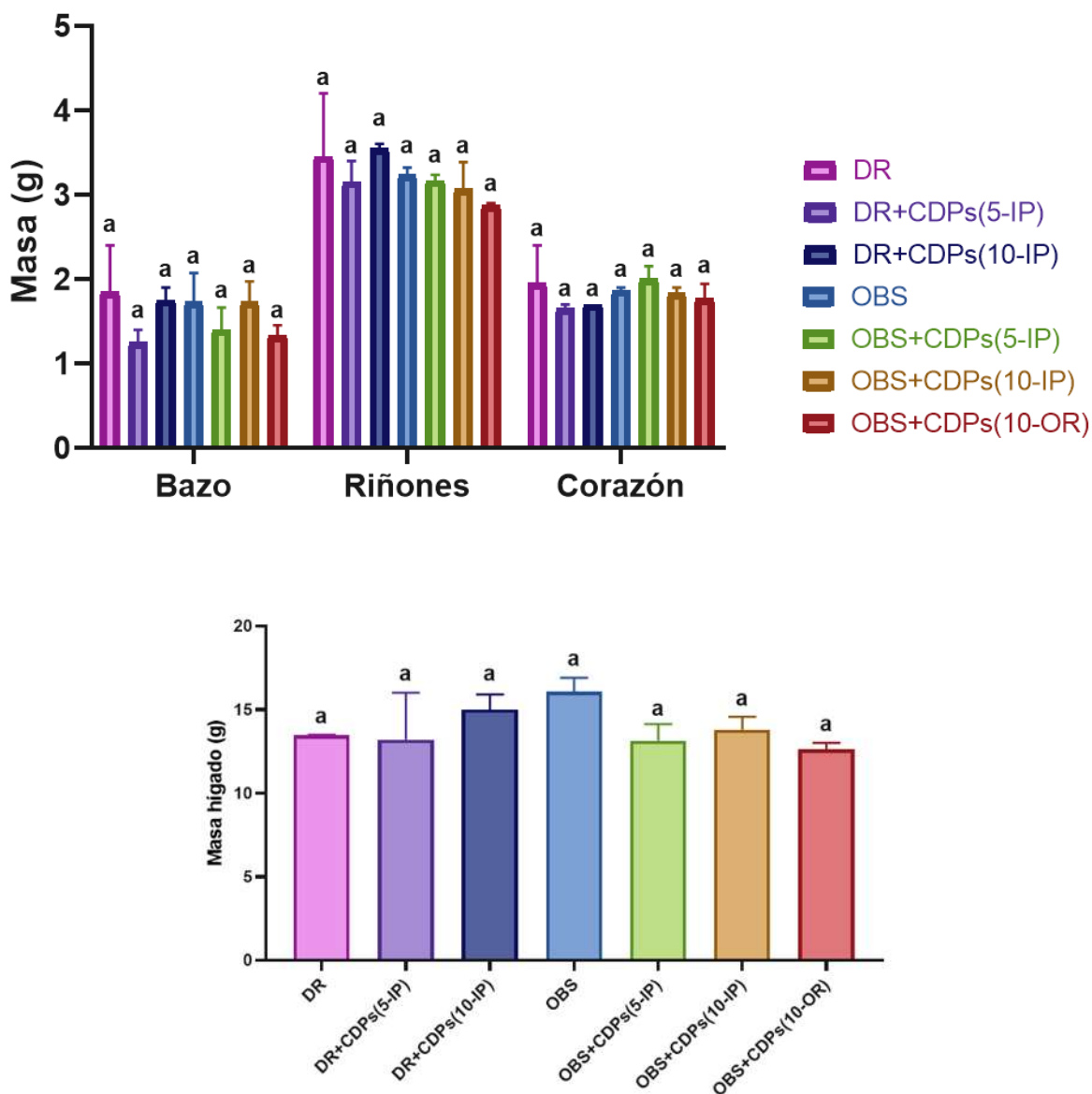


Figura. 33. Masa de órganos. A) La masa de bazo, riñones y corazón no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos. B) La masa del hígado no mostró diferencias significativas entre los grupos, pero si una tendencia mayor para el grupo OBS en comparación con los grupos que recibieron tratamiento con CDPs. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba Tukey. Diferencias significativas se presentan con letras distintas ($P < 0.05$). $n=3$.

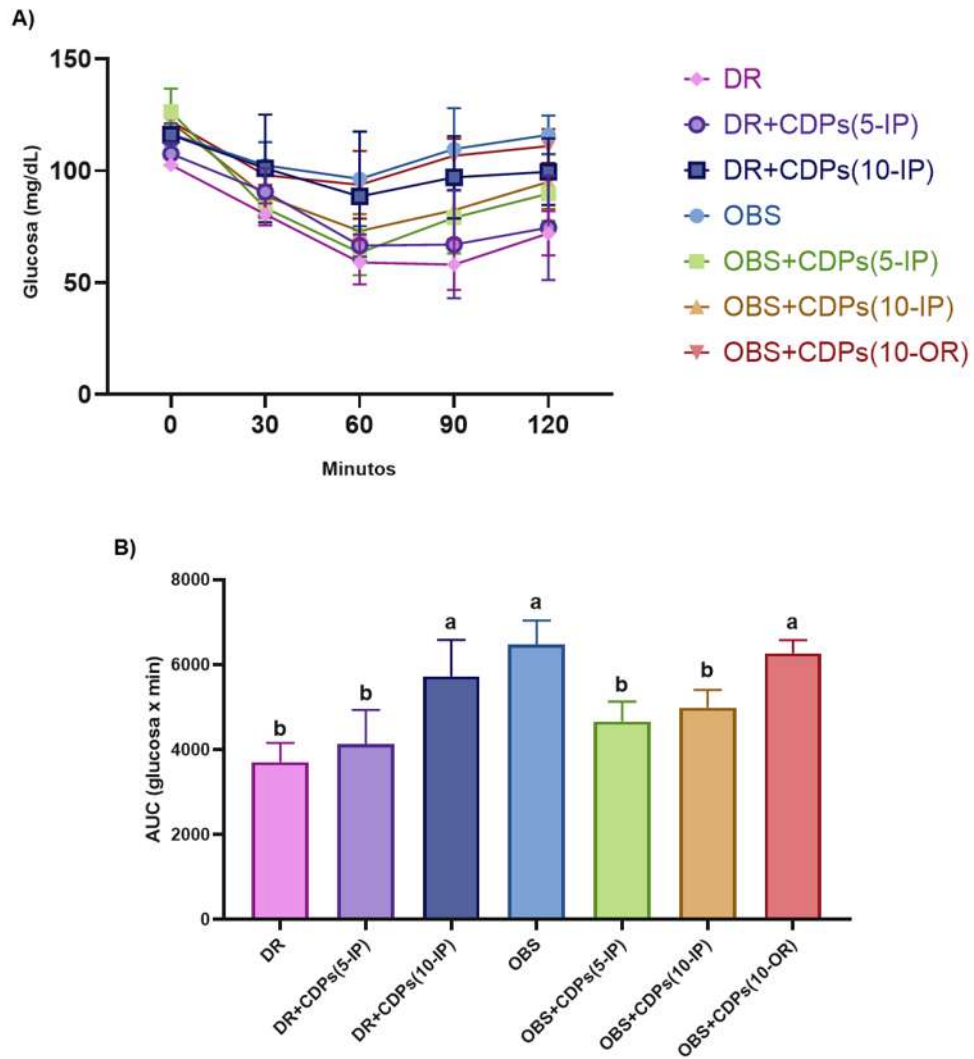


Figura. 34. Prueba de resistencia a la insulina. A) Curva de resistencia a la insulina. **B)** Área bajo la curva (AUC) obtenida a partir de la curva en la cual se muestran diferencias significativas entre el grupo OBS y los grupos que recibieron el tratamiento con CDPs administrado por vía IP, indicando una mejora en el estado de resistencia a la insulina como resultado del tratamiento con CDPs.

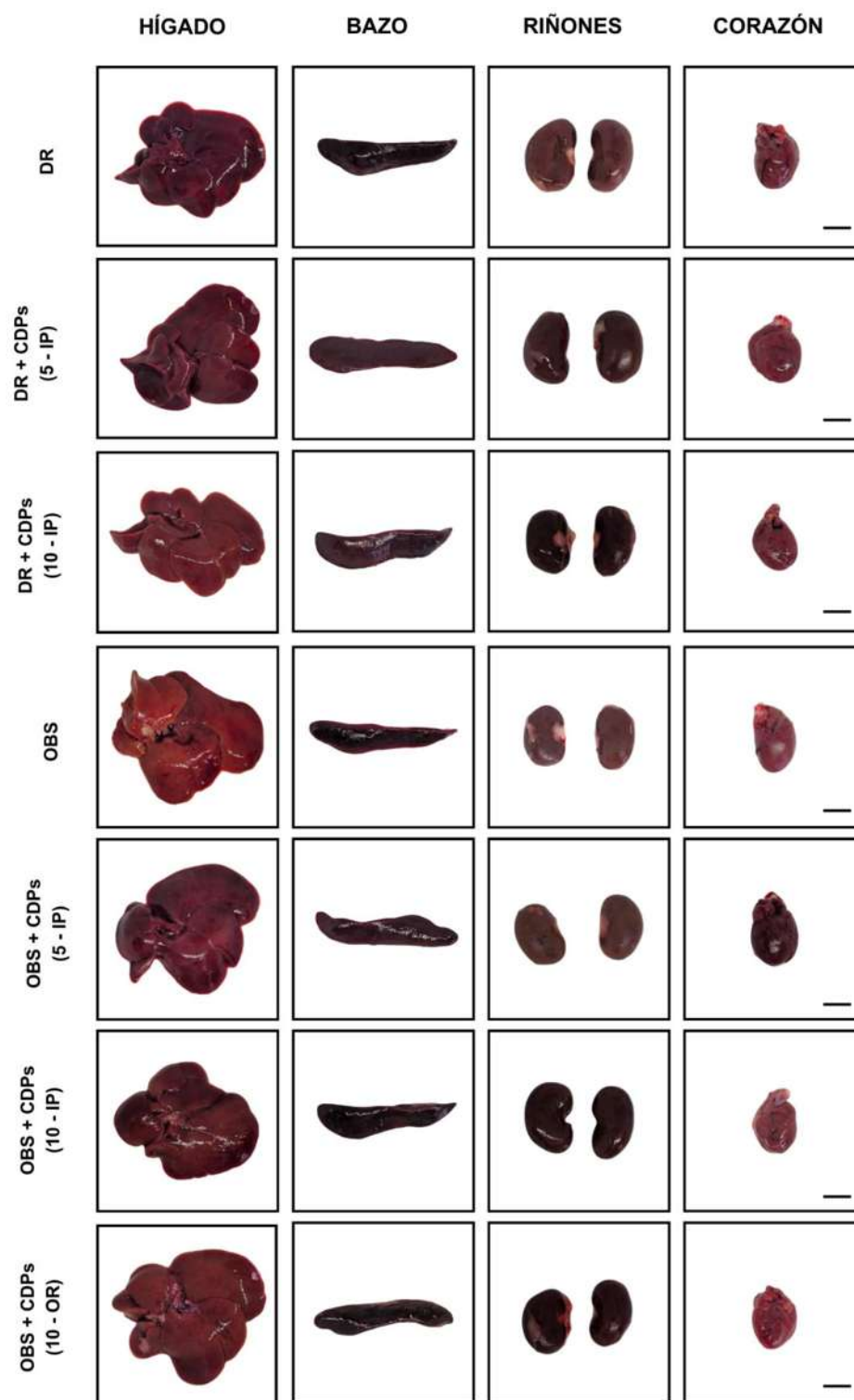
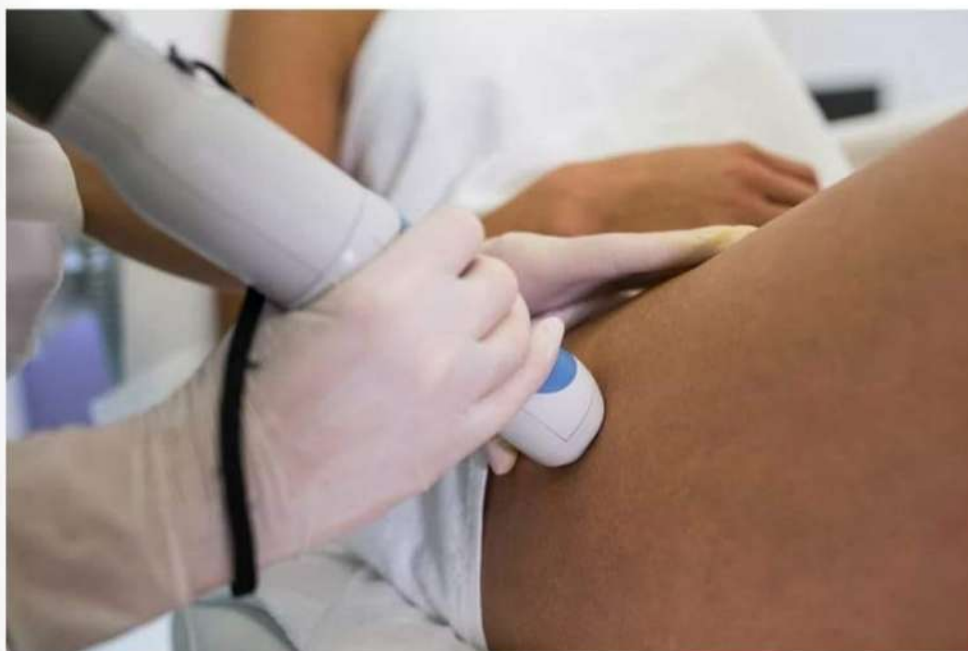


Figura. 35. Fotografías representativas de órganos. Fotografías de hígado, bazo, riñones y corazón de ratas pertenecientes a cada uno de los grupos sin anomalías aparentes.

ARTÍCULO

El tejido adiposo ¿Un simple almacén de grasa?

Citlali Figueroa-Guzmán, Lorena Martínez-Alcantar y Jesús Campos-García



Citlali Figueroa-Guzmán. Estudiante del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Experimental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

1634748e@umich.mx

Lorena Martínez Alcantar. Técnico Académico del Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

lorena.martinez@umich.mx

Jesús Campos García. Profesor e Investigador del Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

jesus.campos@umich.mx

Almacén de combustible biológico

Innumerables veces hemos utilizado la palabra energía para referirnos a diversas actividades relacionadas con la capacidad de realizar un trabajo, generar un cambio, o propiciar movimiento. No debemos olvidar entonces, que estamos frente a un recurso que permite cambios y transformaciones en los seres vivos.

Todas las actividades que realizamos diariamente requieren de energía, como respirar, caminar, estudiar, pensar e incluso dormir; esta ener-