



División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Caracterización de mecanismos de acción de la sitagliptina
en la reducción de la esteatosis y esteatohepatitis”.**

T e s i s

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud.

P r e s e n t a

M.B.E. LESLYE SAMANO HERNANDEZ

2161800971

orcid:0000-0002-9424-326X

lessamhe@gmail.com

Comité tutorial:

Codirectora: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Codirectora: Dra. Rosa María Guéant Rodríguez

Asesora: Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Jurado

Presidenta: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Secretaria: Dra. Rosa María Guéant-Rodríguez

Vocal: Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Vocal: Dr. Norberto Carlos Chávez Tapia

Vocal: Dr. Tarik Issad

Iztapalapa, Ciudad de México, a 08 de noviembre de 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 08 de noviembre del año 2024, quien suscribe **Leslye Sámano Hernández**, alumna del **Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana**, manifiesta que es autora intelectual de la tesis titulada “**Caracterización de mecanismos de acción de la sitagliptina en la reducción de la esteatosis y la esteatohepatitis**”, bajo la dirección del Comité tutorial conformado por las Doctoras. **Reyna Carmen Fierro Pastrana** (como codirectora interna), **Rosa María Guéant-Rodríguez** (como codirectora externa) y **Elizabeth Hernández Pérez** (como asesora), cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso de la autora o del Comité tutorial del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico **lessamhe@gmail.com**; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Leslye Sámano Hernández

2161800971

Nombre del alumno

Matrícula



UNIDAD CUAJIMALPA

Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA

Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO

Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

http://posgradocbs.uam.mx

Realización y Financiamiento

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de “Andrología” del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección del Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana. Y el **“INSERM UMRS 1256, Nutrición, Genética y Exposición a Riesgos Ambientales (NGERE)”**, Facultad de Medicina, Lorena, Francia, bajo la dirección del Dra. Rosa María Guéant-Rodríguez. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Elizabeth Hernández Pérez.

El autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (**CONAHCyT**) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro **428518**, que comprendió del periodo del **01 de enero del 2016 al 31 de diciembre del 2019**. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONAHCyT y, además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

Jurado de examen de grado

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Leslye Sámano Hernández
El día 08 de noviembre del 2024

JURADO:



Presidenta

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana



Secretaria

Dra. Rosa Maria Guéant-Rodriguez



Vocal

Dr. Fausto Sánchez Muñoz



Vocal

Dr. Norberto Carlos Chávez Tapia



Vocal

Dr. Tarik Issad

Comité tutorial

Codirectora

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Codirectora

Dra. Rosa María Guéant Rodríguez

Unité Inserm 1256

Nutrición, genética y riesgos ambientales

Faculté de Médecine

Université de Lorraine. (Francia)

Asesora

Dra. Elizabeth Hernández Pérez.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Agradecimientos

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

Por aceptarme entre sus filas, como estudiante de Licenciatura, Maestría y Doctorado.
Por el apoyo y ser mi casa durante tantos años.

AI INSERM UMRS 1256, Nutrición, Genética y Exposición a Riesgos Ambientales (NGERE)”, Facultad de Medicina (Lorena, Francia).

Por abrirme las puertas de su laboratorio durante 1 año, por orientarme en los experimentos, aclarar dudas y brindarme su amistad. Jérémie Raso, Tunay Kokten, Amélia Julien, Darlen Antoine y Viola Kosgei. También a todo el personal del laboratorio, por aceptarme y brindarme su hospitalidad

Pero especialmente a Lorena González Fierro y Lázaro Calles, por salvarme en un país que no conocía, por brindarme apoyo, darme su cariño, su confianza, integrarme a su vida, presentarme personas maravillosas y regalarme recuerdos hermosos de esa experiencia, fueron mi familia durante esa estancia, los quiero mucho y los llevo en mi corazón por siempre....

Al Dr. Jean-Louis Guéant

Estimado Dr. Agradezco su amabilidad durante mi estancia en su laboratorio, sus correcciones durante el proyecto y su disposición a compartir su conocimiento conmigo. Sus aportaciones y opiniones fueron fundamentales para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Humberto González Márquez

Lo conozco desde hace muchos años, en cada etapa siempre obtuve consejos y apoyo que me han permitido crecer tanto personal como profesionalmente Sus enseñanzas han marcado mi vida de la mejor manera. Agradezco mucho su tiempo (horas, aún en vacaciones), opiniones y correcciones que fueron imprescindibles para desarrollar el proyecto, el artículo y la tesis. Deseo que siga siendo mi guía durante muchos años más.

A la Dra. Rosa María Guéant- Rodríguez

Agradezco mucho su hospitalidad, amabilidad y ayuda durante mi estancia en Francia. Sus consejos, guía y apoyo en situaciones profesionales y personales fueron muy valiosas, para tomar decisiones importantes. Por compartir su amplio conocimiento en el tema del proyecto, su dedicación, sabiduría y paciencia han sido pilares fundamentales para la realización de mi tesis. También por brindarme confianza para desarrollar este trabajo. Soy afortunada de conocerla.

A la Dra. Reyna Fierro Pastrana

Quiero expresar un sincero agradecimiento por todo el apoyo, orientación y confianza que me ha brindado a lo largo de este proceso, cada una de sus enseñanzas ha dejado una huella profunda en mi crecimiento académico y personal. Gracias por esa capacidad para guiar con claridad y empatía, y por ser una fuente constante de inspiración. Siempre recordaré con mucho cariño todo lo que me ha enseñado y el impulso que me dio en varias situaciones para salir de problemas y alcanzar mis metas. Gracias por ser la mejor mamá académica que pueda existir.
“Enfrentamos mil obstáculos, pero lo logramos”

Gracias por ser unas mentoras excepcionales.

A, Iván, Paola, Óscar, Karla, Gabriela y Ramsés.

Gracias por ser mis compañeros, colegas, familia. Por estar en esas etapas difíciles y fáciles que la vida me ha presentado a lo largo de este proyecto. Por los consejos, por la ayuda y compañía en los experimentos, por guiarme en las presentaciones, por escuchar mis problemas y alentarme a continuar, aunque mil veces intenté desistir, gracias por esas charlas eternas, por aguantar mis lágrimas y por creer en mí, cuando yo no lo hacía. Todos de alguna manera me apoyaron para lograr terminar esta aventura. Algunos ya no somos tan cercanos, pero los llevaré siempre en mi mente y corazón.

A mi familia

Por estar a mí lado en el proceso. Fueron varios años y muchos sucesos, algunos difíciles, algunos tristes, otros preocupantes, otros muy felices. Con su apoyo logré enfrentar cada uno de ellos y lograr ese sueño que alguna vez les compartí. Somos diferentes, algo disfuncionales, pero el cariño está y eso es lo que importa.

Agradezco mucho el apoyo por parte del personal encargado del **Bioterio** de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA, así como el de la Dra. Selene Ángeles Mejía.

Mi admiración infinita para todos....

Dedicatorias

A mi hermosa hija, Nicté

Eres la luz que ilumina mis días, lo que me inspira y me motiva cada día a alcanzar mis metas. Llegaste en condiciones especiales y complicadas, pero juntas hemos salido adelante, tienes tanta fortaleza, que eres un ejemplo para mí. Gracias por tantas experiencias, tristes y felices, por tantos recuerdos y momentos, por tus sonrisas, por tus historias y por esas veces que me dices, mamá te amo tanto. Por mostrarme que un diagnóstico por difícil que sea, lleva una enseñanza, felicidad y agradecimiento. Esta tesis es para ti, para que siempre recuerdes que puedes lograr todo lo que te propongas. Te amo con todo mi corazón, you are my universe...

A mi hija, Regina

Pequeña hermosa, llegaste en el momento correcto. Haces mis días más bellos, gracias por tu alegría, tus dibujos, ocurrencias, abrazos y cariño. Este trabajo es para ti, nunca olvides que eres maravillosa y puedes alcanzar tus metas, solamente debes esforzarte. Te amo mucho.

A mi mamá, Guadalupe

Gracias por apoyarme, cuidar de mi hija en esos días largos de trabajo, por decir te amo con tus acciones. El camino no fue fácil, pero lo logré. Te dedico este trabajo, que lleva, noches sin dormir, lágrimas y mucho esfuerzo, lo sabes. Seguiremos juntas Nicté, tú y yo avanzando y disfrutando de mil cosas. Gracias por ser nuestro tesoro.

Índice

Carta de Cesión de Derechos	i
Realización y Financiamiento.....	ii
Jurado de examen de grado.....	iii
Comité tutorial.....	iv
Agradecimientos	v
Dedicatorias	viii
Índice.....	ix
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tablas	xviii
Lista de abreviaturas	xix
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1 Introducción.....	3
2 Marco teórico	5
2.1 Hígado y sus funciones.....	5
2.2 Anatomía del hígado.....	6
2.2.1 Histología del hígado	8
2.2.2 Patologías hepáticas.....	14
2.3 Esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD).....	15
2.4 Esteatohepatitis no alcohólica.....	17
2.4.1 Fibrosis	17
2.4.2 Cirrosis.....	18
2.4.3 Carcinoma hepatocelular	19
2.5 Manifestaciones clínicas y diagnóstico de la NAFLD	21

2.6	Modelos de estudio	24
2.7	GLP-1 y su regulación por la DPP4	29
3	Antecedentes	34
3.1	Carencia de donadores de grupos metilo	34
3.2	Alteraciones implicadas en la NAFLD	38
3.3	Sitagliptina como atenuador de los efectos del hígado graso	40
4	Pregunta de investigación	43
5	Hipótesis	43
6	Objetivo general	43
7	Objetivos específicos	43
8	Materiales y métodos	44
8.1	Diseño experimental	44
8.1.1	Animales	44
8.2	Objetivo 1. Inducción de hígado graso en ratas tratadas con una dieta deficiente en metionina/colina (MCD).	45
8.3	Objetivo 2. Caracterizar el modelo de estudio determinando los niveles séricos de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, leptina, transaminasas, creatinina, ácido metilmalónico, homocisteína, ácido úrico y metionina en ratas alimentadas con MCD y sitagliptina.	46
8.3.1	Glucosa.....	46
8.3.2	Insulina	46
8.3.3	Creatinina, homocisteína, metionina, ácido úrico, ácido metilmalónico ácidos grasos, colesterol, triglicéridos, transaminasas, SAM, SAH y acilcarnitinas.	47
8.3.4	Leptina e incretinas.....	47

8.3.5	Objetivo 3. Caracterizar la esteatosis hepática del modelo de estudio desde el punto de vista histológico para determinar visualmente la acumulación de lípidos.....	47
8.3.6	Objetivo 4. Caracterización de la expresión de proteínas.....	49
8.3.7	Análisis estadístico	50
9	Resultados	51
9.1.1	Inducción del hígado graso no alcohólico mediante la dieta MCD y tratamiento con sitagliptina.....	51
9.1.2	Curva de incremento de peso de las ratas tratadas con la dieta MCD y tratadas con sitagliptina.....	52
9.1.3	Determinación de parámetros metabólicos sanguíneos de las ratas tratadas con la dieta MCD y tratadas con sitagliptina	53
9.1.3.1	Glucosa, insulina, índice Homa-IR y Leptina.	53
9.1.3.2	Perfil lipídico, ácidos grasos libres y acilcarnitinas.	58
9.1.3.3	Creatinina y ácido úrico	60
9.1.3.4	Transaminasas	61
9.1.4	Metabolismo de mono carbonados	63
9.1.5	Aspecto macroscópico e Histológico	69
9.1.6	Expresión proteica	74
10	Discusión	75
11	Conclusiones	87
12	Perspectivas	88
13	Referencias bibliográficas.....	89
14	Productos derivados del trabajo de tesis doctoral	100

Índice de Figuras

Figura 1. Lóbulos del hígado, derecho e izquierdo, funciones generales del órgano.	7
Figura 2. Anatomía del hígado. Segmentos del hígado para su estudio.	8
Figura 3. Lóbulo y acino hepático, BD, conducto biliar; HA, arteria hepática; PV, vena porta; THV, vénula hepática terminal. Zonas del acino hepático (micrografía H&E).	10
Figura 4. Zonas del acino hepático (micrografía H&E) y sus funciones. tomada de (Ben-Moshe y Itzkovitz, 2019).	11
Figura 5. Células que conforman el hígado. tomado de (Iwai <i>et al.</i> , 2019).....	13
Figura 6. Historia natural de la enfermedad, son posibles rutas alternativas (líneas de puntos) que conducen directamente al carcinoma hepatocelular (CHC) a partir de la NAFLD o NASH. La NAFLD y la NASH a veces pueden llegar a ser reversibles (flechas discontinuas). Tomada de (Seghieri <i>et al.</i> , 2018).	19
Figura 7. Fibrosis: El parénquima hepático normal contiene, células epiteliales (hepatocitos) y células no parenquimatosas: endotelio sinusoidal fenestrado, células estelares (HSC) y células de kupffer (KC). Después de un daño hepático, las células estelares se activan y secretan grandes cantidades de matriz extracelular generando una cicatriz fibrosa, esta acumulación en el espacio de Disse produce pérdida de fenestraciones endoteliales y microvellosidades de hepatocitos. La alteración de la arquitectura del hígado provoca un mal funcionamiento (Puche <i>et al.</i> , 2013; Akcali y Akçali, 2018).	20
Figura 8. La metionina es un aminoácido proteinogénico esencial y forma parte del donante del grupo metilo S-adenosilmetionina (SAM), indispensable en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios. Por otro lado, la colina es una parte integral de la fosfatidilcolina y la esfingomielina, y también es precursora de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina. Tomada de (Ramadori <i>et al.</i> , 2015). 27	
Figura 9. Cuando la ingesta de colina y metionina es insuficiente para mantener la síntesis de fosfatidilcolina, la síntesis y exportación de VLDL se ven afectadas (representado por taches rojos), lo que resulta en acumulaciones de triacilglicerol en forma de gotitas de lípidos. Modificada de (May <i>et al.</i> , 2018).	28

Figura 10. Se han desarrollado muchos modelos in vivo diferentes para NAFLD-NASH en el intento de imitar las características de la patología humana en la medida de lo posible y, entre ellas, dos tipos diferentes prevalecen en los modelos animales: el genético y el nutricional. Modificada de (Berardo <i>et al.</i> , 2020).....	29
Figura 11. La forma soluble carece de los dominios transmembrana, el citoplásmico y el tallo flexible. Tomada de (Mulvihill y Drucker, 2014)	32
Figura 12. DPP4 degrada a GLP-1, aumenta la secreción de insulina. El inhibidor de DPP4, no permite que DPP4 degrade a GLP-1, aumentando su nivel y así la secreción de insulina. Tomada de (Singh <i>et al.</i> , 2020).....	33
Figura 13. Metabolismo de 1C; Tetrahidrofolato (THF), Metilen-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH). Modificada de (Moral, 2006).....	34
Figura 14. Los modelos genéticos de ratones ob/ob (deficiencia de leptina) y db/db (mutación del receptor de leptina), así como las dietas altas en grasa muestran alteraciones metabólicas y esteatosis grave, pero sin inflamación hepática ni fibrosis. Sin embargo, la dieta deficiente en metionina y colina (MCD) y sus dietas derivadas como la deficiente en colina con suplemento de etionina (CDE) y la dieta deficiente en colina y definida por aminoácidos (CDAA), promueven la inflamación y la fibrosis del hígado. El modelo animal estético (STAM) resulta en el desarrollo de HCC. Modificada de (Soret <i>et al.</i> , 2020).....	37
Figura 15. La disminución de la expresión y actividad de la Sirtuina 1 (SIRT1), es una característica de las dietas altas en grasa y deficientes de donadores de grupos metilo. Sirtuina 1 tiene como blanco la acetilación de PGC1- α (proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas), en conjunto con GCN5 acetilasa (proteína 5 del control general no represible), AMPK (proteína cinasa activada por AMP) y PRMT1 (proteína arginina N-metiltransferasa 1) regulan a PGC1- α y la activación de receptores nucleares como PPAR α (receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa), ERR α (receptor relacionado con estrógenos alfa), HNF-4 α (factor nuclear 4 alfa de hepatocito) y VDR (receptor de vitamina D). PGC1- α es fosforilado y acetilado por AMPK, GCN5 acetilasa y SIRT1 desacetilasa. Una dieta alta en grasas La dieta alta en grasas disminuye la actividad de la AMPK, a través de niveles elevados	

de ATP (adenosín trifosfato) intracelular, lo que lleva a una disminución de la fosforilación de PGC-1 α . La hiperacetilación de PGC-1 α se produce a través de un aumento de la expresión de GCN5 y disminución de la expresión y actividad de SIRT1. La deficiencia en donadores de grupos metilo produce efectos similares a través de la disminución de SIRT1 y PRMT1. Tomada de (Kosgei *et al.*, 2020) 38

Figura 16. La obesidad, genera que el tejido adiposo se expanda, disminuyendo su capacidad de almacenaje de energía. La disfunción de los adipocitos y la resistencia a la insulina aumentan, lo que produce lipólisis. Los ácidos grasos libres (FFA) circulantes y la leptina aumentan, la adiponectina disminuye resultando en la acumulación de grasa intrahepática. Al expandirse el tejido adiposo es infiltrado por células inmunitarias que producen citocinas e interleucinas. Si la obesidad no se logra controlar, las células inmunitarias también, se infiltran en el hígado que provoca un proceso inflamatorio crónico. Cuando el cuadro de inflamación se prolonga, se produce fibrosis, que con el paso del tiempo puede ser más grave y producir cirrosis o carcinoma hepatocelular (Polyzos *et al.*, 2019). Tomada de (Koříňková *et al.*, 2020). 39

Figura 17. Marcaje de ratas mediante perforación auricular con alicatas especiales. En la oreja izquierda se realizaron perforaciones circulares correspondientes a los números 1 (región superior), 2 (región media) y 3 (región inferior). En la oreja derecha, las perforaciones circulares correspondieron a los números 10, 20 y 30. Los números 4, 5 y 6 se identificaron mediante muescas simples en la oreja izquierda; los números 7, 8 y 9 mediante muescas dobles en la misma oreja. Los números 40, 50 y 60 se marcaron con muescas en la oreja derecha..... 44

Figura 18. Diseño experimental..... 45

Figura 19. Diferencia entre ratas de grupo Control (flecha verde) y grupo MCD (flecha blanca). 51

Figura 20. Peso de ratas tratadas con MCD (dieta deficiente en metionina y colina) y sitagliptina. Se observa una disminución de peso en los grupos alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina. * diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos a partir de la semana 3..... 52

Figura 21. Análisis de glucosa en plasma. Determinación de niveles de glucosa del plasma obtenido al finalizar el tiempo de estudio. Niveles inferiores en los grupos con dieta deficiente (MCD, MCD+sita). * diferencia significativa ($p<0.05$) entre grupos control. ** diferencia significativa ($p<0.005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15	54
Figura 22. Análisis de insulina. Disminución en los niveles plasmáticos de los grupos MCD y MCD+sita. *** diferencia significativa ($p<0.0005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.	55
Figura 23. 23a) Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), valor menor a 3 en los grupos con dieta MCD y MCD+sita; indicando así que ambos grupos no presentan insulino-resistencia. ***diferencia significativa ($p<0.0005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. 23b) Incretinas, la dieta MCD disminuyó el nivel de GLP-1 y la sitagliptina no revirtió el efecto. 23c) El nivel sérico de GIP no fue modificado por la dieta MCD y la sitagliptina aumentó leve pero no significativamente su concentración en grupos MCD. (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, * $p < 0,05$). Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.	56
Figura 24. Niveles séricos de Leptina después de seis semanas de estudio. Niveles bajos en grupo MCD. *diferencia significativa ($p<0.05$) entre grupo Control+sita y MCD+sita, control+sita y MCD. **diferencia significativa ($p<0.005$) entre grupo control y grupos MCD. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.....	57
Figura 25. 25a) Perfil lipídico en plasma de los cuatro grupos de estudio, no observamos un efecto fuerte de sitagliptina. 25b) Ligero aumento, aunque no significativo de los ácidos grasos libres en el grupo MCD+sita. 25c) Niveles plasmáticos elevados de carnitinas de cadena larga en un grupo con una dieta deficiente y suplementados con sitagliptina. *diferencia significativa ($p<0.05$) entre grupos con dieta deficiente MCD. **diferencia significativa ($p<0.0005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15. ACs (acilcarnitinas), ACs SC (acilcarnitinas de cadena corta), ACs MC (acilcarnitinas de cadena media), ACs LC (acilcarnitinas de cadena larga).....	59

Figura 26. Creatinina. Los grupos MCD presenta una diferencia significativa * ($p<0.05$) y **($p<0.005$) con respecto a los grupos control. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.	60
Figura 27. Ácido úrico. Los grupos alimentados con dieta MCD no presentan una diferencia significativa * ($p<0.05$) y **($p<0.005$) con respecto a los grupos control. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.....	61
Figura 28. Transaminasas, 28a) ALT y 28b) AST, muestran el comportamiento esperado en casos de NAFLD. *diferencia significativa ($p<0.05$) entre grupos con dieta deficiente MCD. ** Diferencia significativa ($p<0.005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.	62
Figura 29. La evaluación de la relación de transaminasas AST/ALT nos muestra bajos valores séricos en las medias de los grupos con dieta deficiente en metionina y colina. ** diferencia significativa ($p<0.005$), *** diferencia significativa ($p<0.0005$) entre grupos. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.....	63
Figura 30. Metionina. Niveles bajos en plasma del grupo Control+sitagliptina. Así como diferencias significativas *($p<0.05$) y ** ($p<0-005$) entre los grupos de estudio MCD y MCD+sitagliptina. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15 ...	64
Figura 31. Niveles séricos de Ácido metilmalónico (MMA), valores bajos en los grupos con dieta deficiente en metionina y colina con diferencia significativa * ($p<0.05$), ** ($p<0.005$) entre grupos control+ sita y los grupos MCD. Control n=14, Control+sita n= 15.	64
Figura 32. La homocisteína, presentó bajos niveles séricos en ambos grupos control. *diferencia significativa ($p<0.05$) entre los grupos control y MCD. ** diferencia significativa ($p<0.005$) entre los grupos control y dieta deficiente MCD. *** diferencia significativa ($p<0.0005$) entre los grupos Control+sita y grupo MCD. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.....	65
Figura 33. Al analizar 33a) SAM y 33b) SAH observamos un aumento en los grupos MCD. *diferencia significativa ($p<0.05$) entre los grupos. ** sin diferencia significativa ($p<0.005$) entre los grupos. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n= 15.	66

Figura 34. 34a) Altos niveles séricos en los grupos control en la Relación SAM/SAH. Correlación lineal negativa, homocisteína vs relación SAM/SAH. 34b) Correlación lineal negativa, homocisteína vs relación SAM/SAH. **diferencia significativa ($p<0.005$) entre los grupos control y los grupos MCD. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n=15.	67
Figura 35. 35a) Diferencias de coloración y tamaño del hígado entre los grupos. 35b). Relación entre el peso del hígado y el peso corporal, se observa que el hígado presenta un mayor porcentaje en los grupos de MCD (dieta deficiente en metionina y colina), la sitagliptina no tiene un efecto significativo. Control n=14, Control+sita n=14, MCD n=15, MCD+sita n=15.	70
Figura 36. Micrografías, 36a) con tinción Hematoxilina-eosina (H&E) 100X. 36b) Micrografías con tinción Rojo sirio 100X. 36c) prominente esteatosis de tipo macrovesicular (asteriscos), leve infiltrado inflamatorio linfocitario (flecha amarilla). 36d) b) esteatosis macrovesicular (asteriscos), acentuado infiltrado inflamatorio neutrofilico (flecha amarilla), cuerpos de Mallory-Denk intracitoplasmáticos (flecha verde), células balonizadas (flechas azules).	73
Figura 37. Análisis por Western blot de la expresión de marcadores de fibrosis.....	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Diagnóstico histológico de NAFLD. Tomada de (Rovira et al., 2017)	18
Tabla 2. Estudios usando sitagliptina en animales	41
Tabla 3. Datos comparativos de niveles plasmáticos.	68
Tabla 4. Resultado, diagnóstico histológico de NAFLD. Tomada de (Rovira et al., 2017)	71

Lista de abreviaturas

1C: metabolismo de un carbono.

A. Úrico: ácido úrico.

AASLD: asociación americana para el estudio de las enfermedades del hígado

ACs LC: acilcarnitinas de cadena larga

ACs MC: acilcarnitinas de cadena media.

ACs SC: acilcarnitinas de cadena corta.

ACs: acilcarnitinas.

AFP: α -fetoproteína

Ahcy: S-Adenosil-L-homocisteína hidrolasa.

ALT: alanina aminotransferasa

AMP: Adenosín monofosfato

AMPK: Proteína Quinasa Activada por AMP

APC: células presentadoras de antígeno.

AST: aspartato aminotransferasa

ATP: Adenosín Trifosfato.

B9: folato.

BCA: ácido bicinconínico.

BD: conducto biliar

BHMT: betaína-homocisteína S-metiltransferasa

BSA: albúmina de suero bovino.

Cbs: cistationina- β -sintasa ()

CH3: radical metilo.

Col1A2: colágeno tipo 1 alfa 2.

CRN NASH: red de investigación clínica de NASH.

DPP4 o CD26: dipeptidil peptidasa 4 o adenosina deaminasa proteína aComplejante 2.

ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.

ERR α : Receptor relacionado con estrógenos alfa.

FFA: ácidos grasos libres.

Fibroscan: Elastografía de transición.

FLI: índice de hígado graso.

Gcn5: proteína 5 del control general no represible

GIP: polipéptido inhibidor gástrico o péptido insulínico dependiente de glucosa.

GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1.

H&E: Hematoxilina y eosina.

HA: arteria hepática.

HCC: carcinoma hepatocelular

HCY: homocisteína.

HDL-C: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

HNF-4 α : factor nuclear 4 alfa de hepatocito.

HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina.

HSC: células estelares o estrelladas hepáticas

IMC: índice de masa corporal.

INR: índice internacional normalizado

IR: resistencia a la insulina

Kc: células de Kupffer.

LDH: lactato deshidrogenasa

LDL-C colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

LSEC: células endoteliales sinusoidales hepáticas

MAT1A: metionina adenosiltransferasa 1A.

MAT2A: metionina adenosiltransferasa 2A.

MCD: dieta deficiente en metionina-colina.

MDD: DL-metionina.

Met: metionina.

MMA: ácido metilmalónico.

MMP2: metaloproteinasas de matriz-2.

MS: Metionina sintetasa.

MTHFR: metilen tetrahidrofolato reductasa

NAFLD: Esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico.

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

NPC: Células no parenquimatosas.

NTP: nucleotidasa.

PAF: paraformaldehído.

PAGE-SDS: gel de poliacrilamida de sodio dodecil sulfato.

PBS: buffer fosfato salino.

PGC1- α : proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas.

PICP: péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I.

PIIINP: péptido amino terminal del procolágeno tipo III.

Pit: células natural killer hepáticas.

PKC: proteína cinasa C.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PPAR α : receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa.

PRMT1: proteína arginina N-metiltransferasa 1.

PT: tiempo de protrombina.

PV: vena porta.

RMN: Resonancia Magnética nuclear.

RTK: receptores tirosina quinasas.

SAH: S-Adenosil L-homocisteína.

SAM: S- Adenosil metionina.

SIRT1: sirtuina 1

SM: Síndrome metabólico.

SREBP1c: proteína de unión al elemento regulador del esterol.

TBS: amortiguador de bloqueo.

TC: Tomografía computarizada.

TG : triglicéridos.

THF: tetrahidrofolato.

THV: vénula hepática terminal.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .

VDR: receptor de vitamina D.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

α -SMA: α actina del Músculo Liso.

γ -GT: gamma glutamil transferasa.

Resumen

Las enfermedades metabólicas esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), son las formas más comunes de padecimientos hepáticos crónicos en todo el mundo, y su prevalencia ha aumentado de manera significativa debido a la creciente incidencia de obesidad, diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina. Entre el 10% y el 30% de los pacientes con NASH pueden progresar a cirrosis dentro de un período de 10 a 20 años si no reciben tratamiento adecuado. Actualmente, no existen fármacos aprobados específicamente para el tratamiento de la NAFLD o NASH. Por lo que el objetivo del presente trabajo, fue probar un fármaco que pertenece a los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4, conocido como sitagliptina. Utilizando un modelo de dieta deficiente en metionina y colina (MCD). La metionina y la colina, son nutrientes esenciales que desempeñan roles fundamentales en el metabolismo de un carbono y en el mantenimiento de la salud hepática. Se utilizó un modelo animal, ratas Wistar macho de 2 meses de edad, a los que se les alimentó con dieta MCD y se suplementó con sitagliptina durante 6 semanas. Se examinó el tejido hepático para estimar el efecto de la sitagliptina en el desarrollo de NASH. La dieta MCD disminuyó la relación SAM/SAH (S-adenosilmetionina/S-adenosilhomocisteína) y aumentó los niveles plasmáticos de homocisteína, ácidos grasos libres y acilcarnitinas de cadena larga en las ratas MCD. La expresión de cadena alfa2 del colágeno tipo I (Col1A2) también aumentó con la dieta MCD. El tratamiento con sitagliptina no revirtió estos efectos y aumentó la esteatosis y las acilcarnitinas de cadena larga. En conclusión, la sitagliptina no fue eficaz para prevenir la NAFLD en el modelo de rata MCD. Este resultado contradice los datos previos que informaban efectos beneficiosos y es coherente con los resultados negativos de los ensayos clínicos.

Palabras clave: MCD, Donadores de grupos metilo, NAFLD, NASH, sitagliptina, Ratras Wistar.

Abstract

Nonalcoholic liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) are the most common forms of chronic liver disease worldwide. Their prevalence has increased significantly due to rising incidences of obesity, type 2 diabetes, and insulin resistance. Between 10% and 30% of patients with NASH may progress to cirrhosis within a period of 10 to 20 years if not treated appropriately. Currently, there are no drugs specifically approved for the treatment of NAFLD or NASH. Thus, the present work aimed to test a drug belonging to the dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (DPP4i), sitagliptin, using a methionine-choline deficient diet (MCD) model. Methionine and choline are essential nutrients that play fundamental roles in one-carbon metabolism and maintaining liver health. A 2-month-old male Wistar rat model fed MCD and supplemented with sitagliptin for six weeks was used to estimate the effect of sitagliptin on the development of NASH. The MCD diet decreased the S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine (SAM/SAH) ratio and increased plasma levels of homocysteine, free fatty acids, and long-chain acylcarnitines in the MCD rats. The MCD diet also increased collagen alpha-2 type I (Col1A2) expression. Sitagliptin treatment did not reverse these effects and increased steatosis and long-chain acylcarnitines. In conclusion, sitagliptin was ineffective in preventing NASH in the MCD rat model. This result contradicts previous data reporting beneficial effects and is consistent with negative results from clinical trials.

Keywords: MCD, Methyl donors, NAFLD, NASH, Sitagliptin, Wistar rats

1 Introducción

El entendimiento de la etiología de una enfermedad es fundamental para poder implementar los programas de salud e investigación adecuados, que disminuya el impacto negativo de las consecuencias económicas y políticas que afectan a la sociedad. Las insuficiencias hepáticas (generadas por cualquier origen: infección viral, mala nutrición o problemas relacionados con cáncer) son un problema de salud mundial. Datos de estudios realizados en México entre los años 2001 a 2017 sobre la prevalencia de enfermedades hepáticas la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), la fibrosis, la cirrosis y otras enfermedades hepáticas inflamatorias, indican una disminución de la mortalidad durante la última década. Este descenso se atribuye principalmente al diagnóstico temprano y al uso de tratamientos adecuados (Martínez-Bohorquez *et al.*, 2023).

Las enfermedades hepáticas pueden generarse por depósito de metales, proteínas, lípidos y otras sustancias, también pueden deberse a trastornos metabólicos hereditarios o adquiridos; una de las enfermedades adquiridas más importantes es la esteatosis hepática no alcohólica, que se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en el hígado (Montoro y García, 2012).

*La esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) está afectando al 25% de la población mundial. La NAFLD está asociada con comorbilidades como son la obesidad, síndrome metabólico (SM), resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y la hipertrigliceridemia. Un punto importante es que la proliferación de dichas comorbilidades, además de permitir un aumento en la prevalencia de la NAFLD, también provoca que los pacientes se encuentren en una condición de mayor riesgo de enfermedad hepática progresiva (Younossi *et al.*, 2019). La relación estrecha entre la obesidad y la NAFLD está muy bien documentada, sin embargo, también se ha identificado un aumento en la prevalencia en sujetos no-obesos (Ye *et al.*, 2020).

* Es importante mencionar que después de un consenso entre médicos y hepatólogos expertos, se adoptó una nueva nomenclatura. La enfermedad por hígado graso no alcohólico ahora recibe el nombre de enfermedad hepática esteatósica asociada con

disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés), y la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH), reemplazará el término esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (Rinella *et al.*, 2023). Sin embargo, en el presente trabajo de tesis seguiremos utilizando la nomenclatura anterior NAFLD y NASH.

2 Marco teórico

2.1 Hígado y sus funciones

El hígado es un órgano metabólico presente en todos los vertebrados incluido el ser humano. En humanos adultos tiene un peso promedio de 1.5 kg, se encuentra en la parte superior derecha del abdomen debajo del diafragma está protegido por la parte inferior de la caja torácica. Recibe sangre oxigenada del corazón a través de la arteria hepática (HA), así como sangre rica en nutrientes proveniente del tracto gastrointestinal, a través de la vena porta. La sangre circula a través de los sinusoides hepáticos, desemboca en la vena central y las venas hepáticas le permiten salir del hígado. Aproximadamente el 20% de la sangre total, pasa a través del hígado cada minuto (Wang *et al.*, 2017).

Para mantener al organismo en condiciones óptimas realiza muchas funciones diferentes. Las más importantes son:

1. Síntesis: el hígado sintetiza la bilis y la secreta, como agente surfactante en la vesícula biliar para la digestión de lípidos; se ocupa de la síntesis de múltiples proteínas plasmáticas y enzimas digestivas. Por ejemplo, la albúmina que se considera una proteína transportadora, ya que permite a varias moléculas viajar por el torrente sanguíneo. En el hígado también se sintetizan todos los factores de la cascada de coagulación, así como muchas proteínas implicadas en la fibrinólisis (plasminógeno). Se encarga de modificar la composición de las proteínas y los aminoácidos de la sangre mediante procesos enzimáticos como la desaminación, transaminación y reaminación (North-Lewis, 2008) .

2. Depuración: Elimina sustancias que puedan ser nocivas, entre ellas el alcohol, excreta sustancias de desecho como los pigmentos biliares, colesterol modificándolas, tratando de hacerlas inocuas, o más solubles en agua para que puedan ser desechadas del organismo. Por ejemplo, el catabolismo de los aminoácidos produce gran cantidad de amoníaco, que se convierte en urea (en el ciclo urea, proceso que se da en el hígado) y, finalmente, se excreta por la orina (Trefts *et al.*, 2017). También se encarga de modificar medicamentos y compuestos químicos, así como combatir infecciones filtrando agentes nocivos que ingresaron por el intestino.

3. Almacenamiento: El hígado recibe los nutrientes que provienen del sistema digestivo para transformarlos en moléculas complejas. Participa en el metabolismo de glúcidos y lípidos. Puede almacenar los glúcidos en forma de glucógeno para liberar glucosa en función de las necesidades del organismo. Los lípidos son transformados en moléculas complejas (triglicéridos) a fin de almacenarlos en los adipocitos, sintetiza y degrada el colesterol. Juega un papel importante en el metabolismo, regula la síntesis y almacenamiento de glucosa, su ausencia o su falla de funcionamiento es incompatible con la vida (Gal *et al.*, 2007).(Figura1)

Está involucrado en la regulación de la energía, almacena una cantidad pequeña en forma de glucógeno. El hígado humano por lo tanto contiene pocas o ninguna gota de grasa, si se presentan más del 5% de gotas de grasa en el hígado se considera anormal (Francque *et al.*, 2021). Asimismo, regula la homeostasis del sistema inmunológico, pues contiene gran cantidad de fagocitos mononucleares y células “natural killer”; además de que las células de Kupffer representan la primera barrera de protección contra patógenos derivados del intestino (North-Lewis, 2008).

El hígado realiza sus actividades de manera silenciosa, no contiene muchos sensores del dolor, por ese motivo un daño crónico puede tardar varios años en ser diagnosticado (Francque *et al.*, 2021).

2.2 Anatomía del hígado

El hígado se encuentra ubicado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal por debajo del diafragma, por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos. En el humano adulto ocupa aproximadamente entre el 2-5 % del peso corporal; presenta una forma triangular, color marrón, además de una superficie lisa firme pero frágil. Está conectado al diafragma y a la pared anterior del abdomen por cinco ligamentos: falciforme, coronario, 2 triangulares y redondo. Se divide en dos lóbulos principales derecho e izquierdo separados por el ligamento falciforme (Figura 2) (Abdel-Misih y Bloomston, 2010; Sibal y Gopalan, 2015) . El lóbulo izquierdo al ser de menor tamaño es considerado lóbulo inferior, ahí se encuentran dos lóbulos adicionales, el lóbulo cuadrado y lóbulo caudado. Claude Couinaud clasificó al hígado en 8 segmentos funcionalmente independientes. Los segmentos se numeran en el sentido de las agujas del reloj. La clasificación en segmentos es muy útil para cirugías

y estudios de imagen del hígado, ya que permite localizar con exactitud lesiones.
(Figura 2) (Mahadevan, 2014).

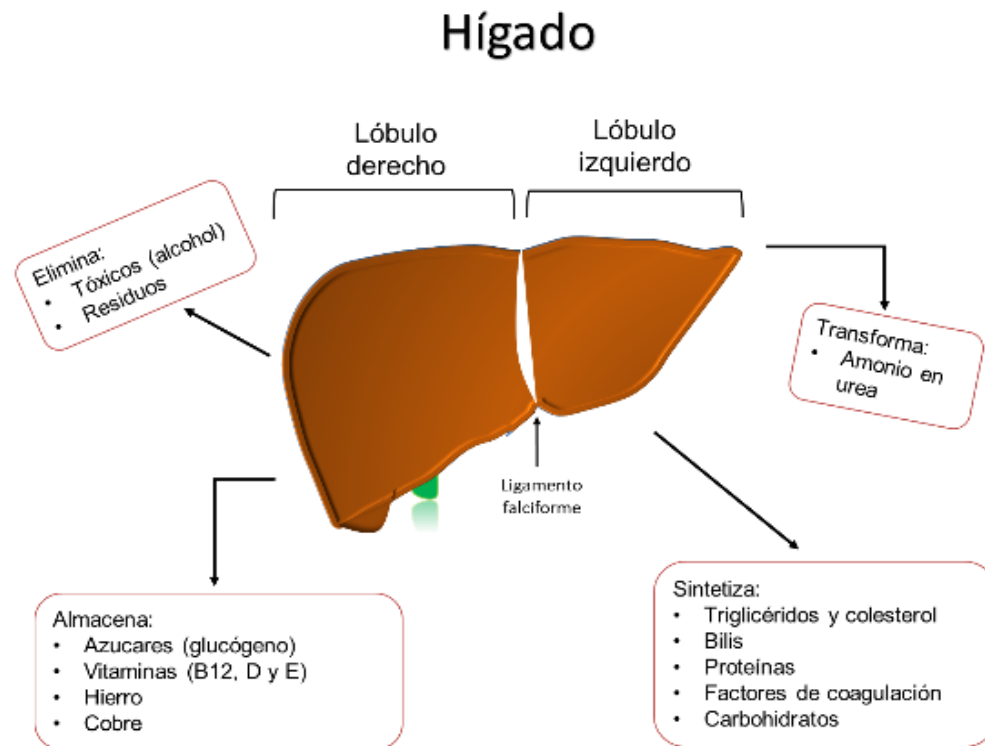


Figura 1. Lóbulos del hígado, derecho e izquierdo, funciones generales del órgano.

Lóbulos

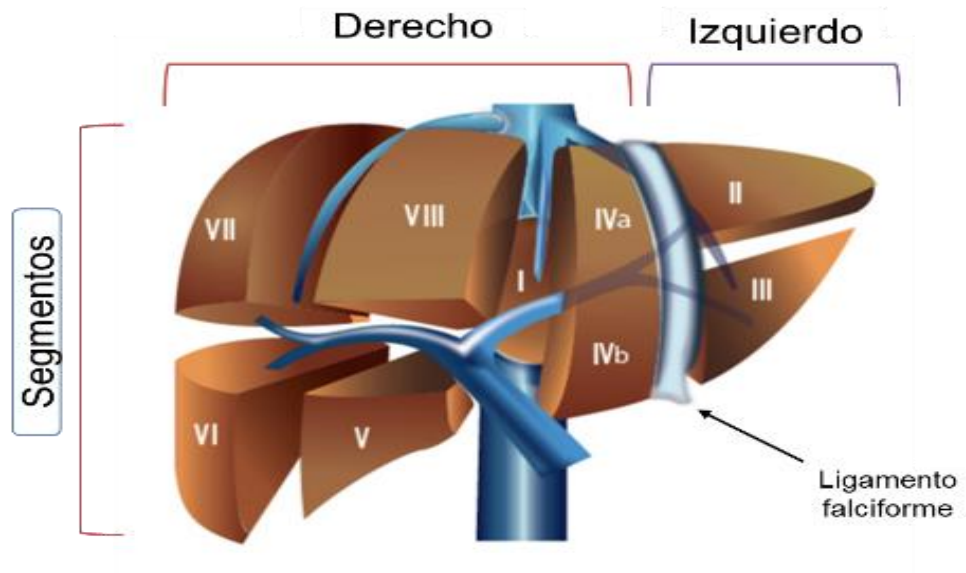


Figura 2. Anatomía del hígado. Segmentos del hígado para su estudio.

2.2.1 Histología del hígado

En la estructura microscópica del hígado existen 2 estructuras histológicas primordiales, primero se encuentran los lobulillos (unidad anatómica). Los hepatocitos tienen un acomodo en placas repetidas, dando lugar a los lobulillos, cada uno con forma hexagonal irregular rodeada de tejido conectivo y con una vena en el centro (vena central); en los ángulos de los lobulillos vamos a encontrar áreas triangulares que se conocen como triada portal o espacios porta, cada uno se conforma por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta hepática, un conductillo biliar y un capilar linfático (Ben-Moshe y Itzkovitz, 2019). La sangre oxigenada que va al hígado proviene de la arteria hepática, suministrando el 25% del total de la sangre en el hígado, el 75% corresponde al suministro de la vena porta. La sangre de la vena porta contiene los productos de la digestión que se absorben de los alimentos y van a ser metabolizados por células hepáticas. La vena porta y la arteria hepática trabajan juntas transportando la sangre que contiene oxígeno, así como metabolitos al hígado; posteriormente los hepatocitos los procesan y drenan a la vena central (Mulaikal y

Emond, 2012). Mientras que el flujo de la bilis va hacia afuera desde el centro del lóbulo y drena en el conducto biliar periférico (Figura 3) (Cunningham y Porat-Shliom, 2021). La segunda estructura se conoce como acino hepático (unidad funcional del hígado en términos de flujo sanguíneo) tiene forma de rombo, se divide en tres zonas (1,2,3). La zona 1 es la más cercana a la vena portal (zona periportal) contiene entre 6-8 hepatocitos, zona más oxigenada, primera en recibir oxígeno, nutrientes y toxinas; es la zona con menos riesgo de presentar necrosis y es la primera en regenerarse; presenta varias funciones metabólicas; la zona 3 centrolobular o pericentral) contiene 2-3 hepatocitos, más cercana a la vénula hepática, es menos rica en nutrientes y oxígeno, más susceptible al daño (necrosis) y la zona 2 o intermedia (media acinar) contiene 6-10 hepatocitos (Potter, 2007; Washabau y Day, 2012) (Figura 4). Las zonas que presenta el acino permiten, que el hígado tenga fisiología correcta y se adapte a desafíos nutricionales y demandas metabólicas. Los daños al hígado pueden afectar dichas zonas y generar alteraciones metabólicas (Ma *et al.*, 2020). La zonación del hígado es relevante para entender las enfermedades hepáticas, ya que las patologías pueden originarse o limitarse en zonas periportales o pericentrales. Por ejemplo, el hígado graso no alcohólico, inicialmente se desarrolla en zonas pericentrales en sus primeras etapas esteatosis e inflamación, posteriormente progresa hacia afuera (Cunningham y Porat-Shliom, 2021).

El hígado se compone del estroma (tejido de sostén) y el parénquima. El estroma incluye la cápsula de Glisson, rodeada de tejido conectivo, que se engrosa para formar una región cóncava que se conoce como hilio. Éste atraviesa el órgano, permitiendo la entrada de la arteria hepática y la vena porta, que se ramifican y dividen el parénquima en lobulillos (Rojas Lemus *et al.*, 2017).

Las células que conforman al hígado se dividen en dos categorías:

- 1) Células parenquimatosas: hepatocitos que representan aproximadamente el 60-65% del total de las células y el 80% del volumen hepático.
- 2) Células no parenquimatosas (NPC, por sus siglas en inglés): se conforman por células de Kupffer (Kc, por sus siglas en inglés), células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC, por sus siglas en inglés), células estelares o estrelladas hepáticas (HSC, por sus siglas en inglés) y tipos de células extrañas

Pit (células “natural killer” hepáticas). Representan el 5% del volumen del hígado, pero el 35 % del total de sus células (Otero y Sierra, 2003; Mulaikal y Emond, 2012).

- 3) Finalmente, el parénquima hepático se organiza de la siguiente manera, los hepatocitos están dispuestos en placas de forma poligonal, con un diámetro aproximado de 40 μm , y están rodeados de sinusoides que permiten el drenaje de las venas del centro. El espacio entre la pared de cada hepatocito y la pared del sinusoides se conoce como espacio de Disse, donde se encuentran las células de Kupffer y las células estelares o de Ito (Figura 5) (Iwai *et al.*, 2019).

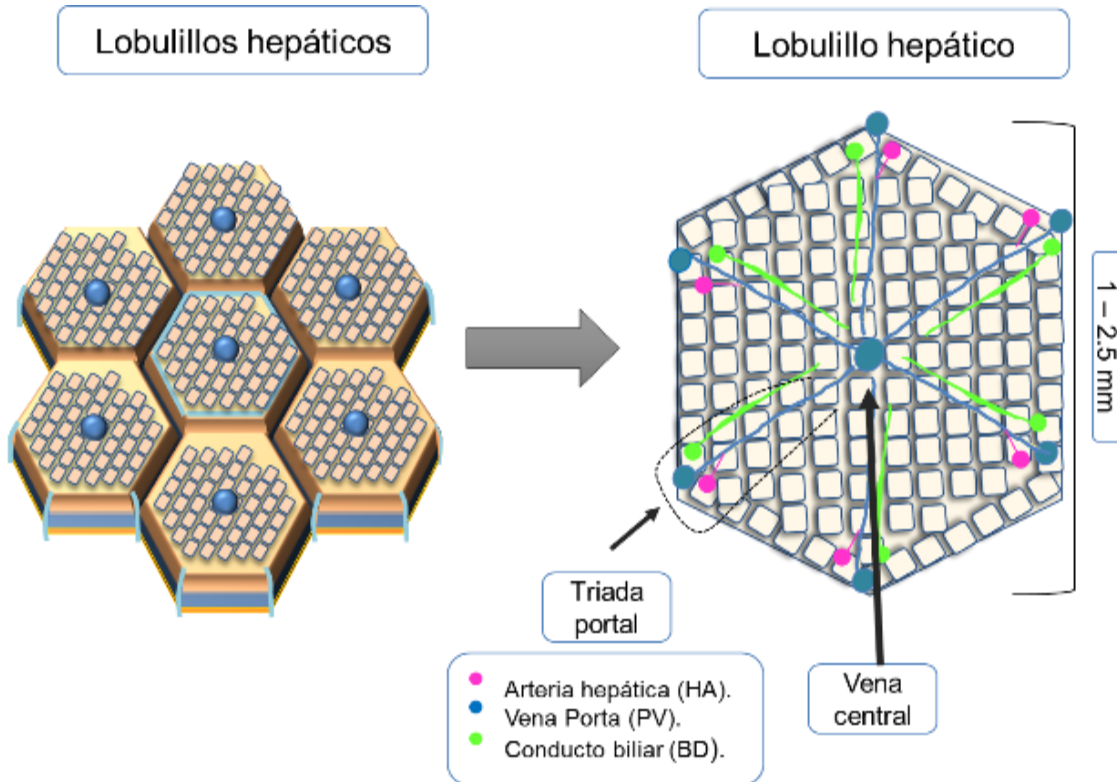
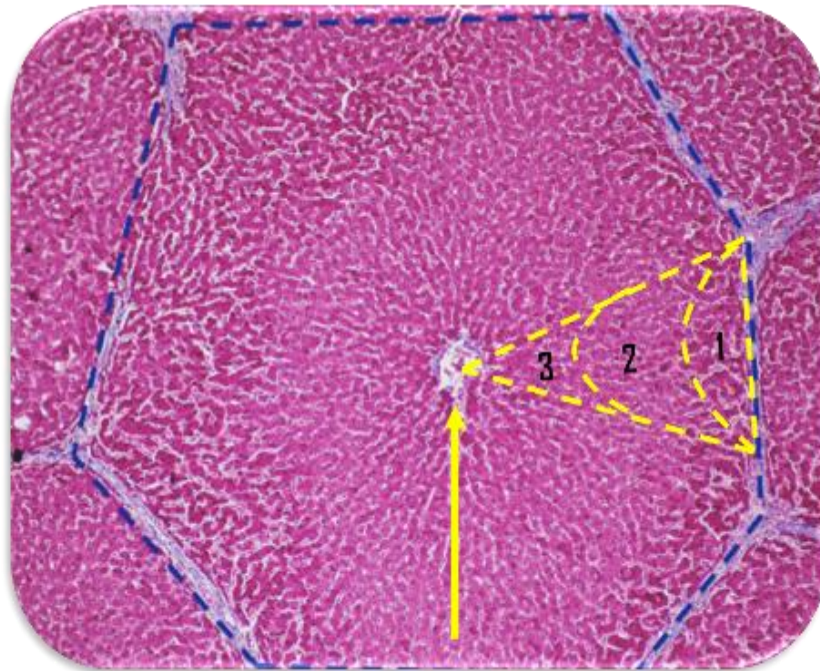


Figura 3. Lóbulo y acino hepático, BD, conducto biliar; HA, arteria hepática; PV, vena porta; THV, vénula hepática terminal. Zonas del acino hepático (micrografía H&E).



Acino hepático
Zona 1 rica en
oxígeno

Vena hepática

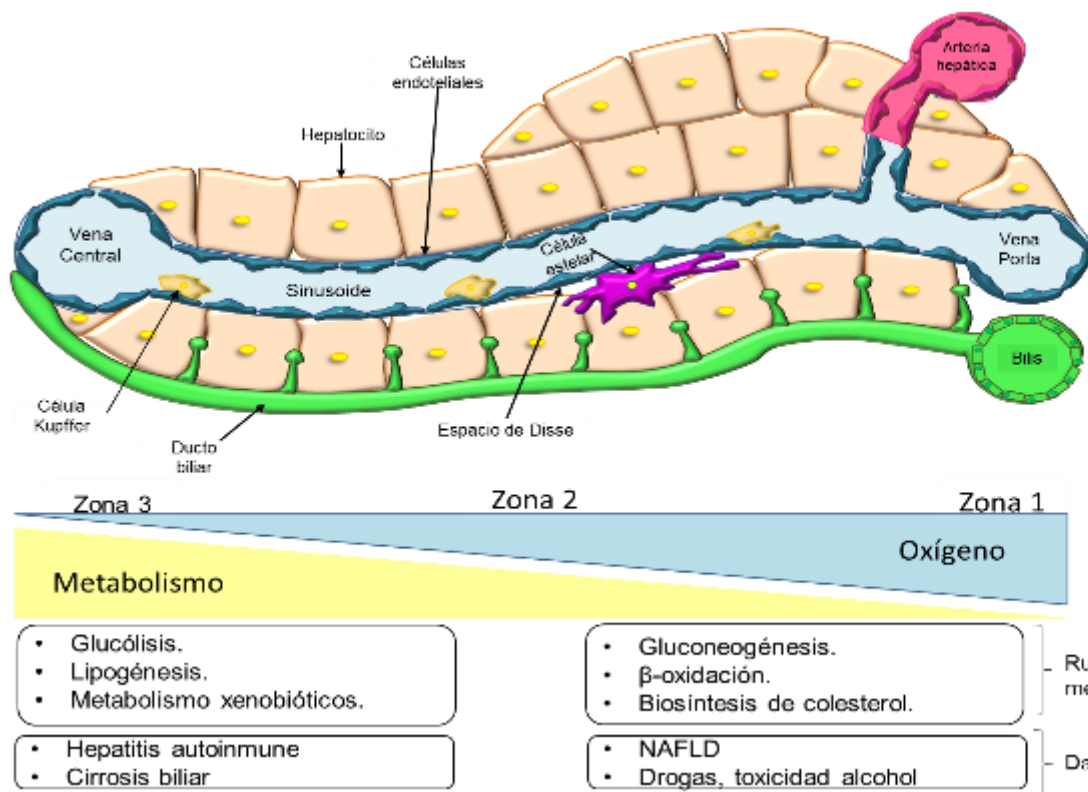


Figura 4. Zonas del acino hepático (micrografía H&E) y sus funciones. tomada de (Ben-Moshe y Itzkovitz, 2019).

Las células que forman cada lobulillo son:

1. **Hepatocitos**, se localizan en el parénquima, representan entre el 60 y el 80 % de la población celular hepática, pueden ser mono o polinucleados. Con citoplasma eosinofílico y un núcleo central redondo u ovalado. El citoplasma acidófilo. Además, en su citoplasma hay abundante retículo endoplásmico con inclusiones de glucógeno y lípidos. Cuando se encuentran en condiciones normales las preparaciones histológicas presentan un número reducido de gotas de lípidos. La vida promedio del hepatocito es de 5 a 6 meses. Algunas de sus funciones son, síntesis de proteínas, ácidos biliares, lípidos y colesterol. (Si-Tayeb *et al.*, 2010; Krishna, 2013; Rojas Lemus *et al.*, 2017).
2. **Células de Kupffer**, (Kc) son células macrofágicas, se encuentran sobre las células endoteliales (sinusoidales), que emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse, permitiéndoles tener contacto con los hepatocitos y las células estelares (estrelladas). Representan del 2% al 5% de la masa celular hepática. Su núcleo puede ser ovalado o en algunas ocasiones lobulado. En la superficie hay estructuras implicadas en el mecanismo de endocitosis, como las vermiformes, microvellosidades y seudópodos (Cubero y Nieto, 2006). Sus funciones principales, eliminan células sanguíneas viejas, bacterias, virus, células tumorales, así como desechos celulares. Producen citocinas, óxido nítrico, factor de necrosis tumoral, interleucina 1,6 o 10, interferón alfa y prostanoïdes (Iwai *et al.*, 2019).
3. **Células estelares (estrelladas) o de Ito**, (HSC) son mesenquimales, perisinusoidales ubicadas a lo largo de los sinusoides en el espacio de Disse, representan entre el 10 y 15 % del número total de células hepáticas; su citoplasma se caracteriza por presentar múltiples y prominentes «gotas» de lípidos de 1 a 2 μm de diámetro, y representan el principal sitio de almacenamiento de vitamina A (retinol). Tienen un papel crucial en el proceso de cicatrización y fibrogénesis, en la secreción de citocinas y en la regulación de resistencia vascular (Otero y Sierra, 2003; Sarem *et al.*, 2006; Nianan *et al.*, 2021).

4. **Células endoteliales**, representan el 3% del volumen hepático total, juegan un papel importante en la regulación del tono vascular, la secreción de moléculas vasoactivas y son células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) (Garcia *et al.*, 2011; Poisson *et al.*, 2017).
5. **Células pit**, están situadas en el lumen de los sinusoides, adheridas a las células de Kupffer y las células endoteliales. Tienen forma irregular y su función es atacar células tumorales y hepatocitos infectados con virus (Rojas Lemus *et al.*, 2017; Iwai *et al.*, 2019).

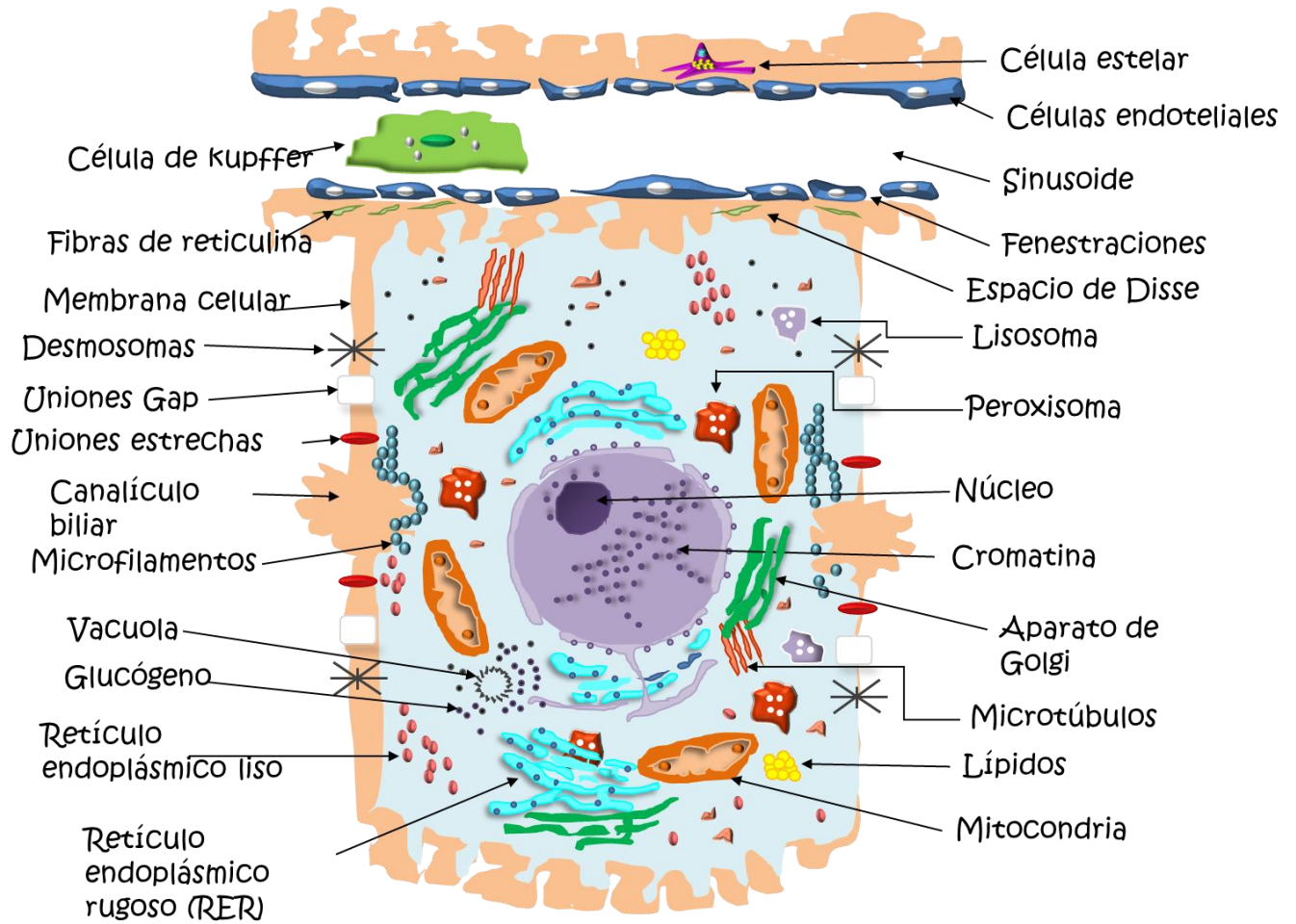


Figura 5. Células que conforman el hígado. tomado de (Iwai *et al.*, 2019).

2.2.2 Patologías hepáticas

Las patologías hepáticas son las enfermedades que impiden que el hígado funcione o evitan que trabaje bien. Se caracterizan por dolor abdominal, color amarillo de la piel o los ojos (ictericia) o por los resultados anormales de las pruebas de la función hepática. Sin embargo, pueden pasar desapercibidos cuando comienzan a desarrollarse y pueden incluir:

- Absceso hepático amebiano
- Absceso hepático piógeno
- Atresia biliar
- Carcinoma hepatocelular
- Cirrosis
- Cirrosis biliar primaria
- Coccidioidomicosis
- Colangitis esclerosante
- Colestasis inducida por medicamentos
- Deficiencia de alfa-1 antitripsina
- Enfermedad de Wilson
- Enfermedad de Gaucher
- Enfermedad del hígado graso no alcohólica
- Enfermedad del hígado graso por el consumo de alcohol
- Hemocromatosis
- Hepatitis A
- Hepatitis autoinmunitaria
- Hepatitis B
- Hepatitis C
- Hepatitis E
- Equinococosis
- Síndrome de Reye
- Virus delta (hepatitis D)

La cirrosis, la hepatitis viral y el carcinoma hepatocelular reportan 2 millones de muertes por año a nivel mundial, 1 millón por cirrosis, 1 millón por hepatitis viral y HCC. La cirrosis y el HCC en conjunto representan aproximadamente el 3.5% de las muertes.

La prevalencia de la hepatitis viral es alta, aunque la incidencia por consumo de fármacos va en aumento. Existen más de 2 mil millones de adultos obesos y más de 400 millones presentan diabetes, ambos factores de riesgo para desarrollar HCC y esteatosis hepática no alcohólica otra de las patologías más preocupantes por su gran prevalencia en la actualidad (Asrani *et al.*, 2019).

Algunas enfermedades presentan dificultades para su diagnóstico correcto, ya que los síntomas pueden ser imprecisos o pueden confundirse con los de otras patologías. Por ello, se ha implementado el uso de marcadores específicos para mejorar el diagnóstico. Algunas enzimas o productos finales de la vías metabólicas hepáticas son tan sensibles a las anomalías asociadas con ciertas enfermedades que se consideran buenos marcadores bioquímicos de enfermedades hepáticas (Patel y Preedy, 2017).

Los cuales se dividen en:

- ✚ **Marcadores de necrosis hepática:** aminotransferasas: aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), así como la lactato deshidrogenasa (LDH).
- ✚ **Marcadores de obstrucción hepática:** bilirrubina conjugada y no conjugada, fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa (γ -GT).
- ✚ **Marcadores de la capacidad biosintética del hígado:** albúmina, ceruloplasmina, pseudocolinesterasa, α -1antitripsina, tiempo de protrombina (PT) e INR (índice internacional normalizado).
- ✚ **Marcadores de esteatosis hepática:** ALT, ferritina, ultrasonido puntaje de esteatosis.
- ✚ **Marcadores de fibrosis hepática:** péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (PICP) y péptido amino terminal del procolágeno tipo III (PIIINP), relación AST/ALT, constituyentes de matriz extracelular (ácido hialurónico, dominio de colágeno 7S tipo IV, TGF- β 1, metaloproteinasa), Fibrotest.
- ✚ **Marcadores de tumor hepático:** α -fetoproteína (AFP), nucleotidasa 50 (NTP).

2.3 Esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD)

La asociación americana para el estudio de las enfermedades del hígado (AASLD, por sus siglas en inglés) define a la NAFLD como una acumulación excesiva de grasa hepática, > 5% en los hepatocitos. Sin consumo significativo de alcohol (< 30 g por día para hombres y < 20 g por día para mujeres) y sin otra causa simultánea de enfermedad crónica hepática como el uso de medicamentos, causas hereditarias y autoinmunes (Parameswaran *et al.*, 2021; Powell *et al.*, 2021; Martinou *et al.*, 2022).

La NAFLD a menudo se denomina como la manifestación hepática del síndrome metabólico, debido a que se relaciona estrechamente con otras enfermedades metabólicas y cardiovasculares, como obesidad, resistencia a la insulina (IR, por sus siglas en inglés), diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensión. La NAFLD es la afección hepática más frecuente en todo el mundo (Godoy-Matos *et al.*, 2020).

La NAFLD en algunos casos también se relaciona con enfermedades endocrinas como son el síndrome de ovario poliquístico, hipogonadismo, hipotiroidismo primario y deficiencia de hormona de crecimiento. Aunque la NAFLD se relaciona con la obesidad, también puede presentarse en personas no obesas (Zarghamravanbakhsh *et al.*, 2021).

La NAFLD se clasifica en dos categorías:

- Esteatosis simple
- Esteatohepatitis no alcohólica (NASH)

🌈 *Esteatosis simple.* Se observa esteatosis hepatocelular que, en algunos casos, nunca progresa. La esteatosis hepatocelular se clasifica en dos tipos:

- *Macrovesicular:* Es reversible, benigna y común en el hígado; una sola gran gota de lípidos o gotas de lípidos ocupan el citoplasma de los hepatocitos, empujando el núcleo a la periferia, dando lugar a la formación de células en anillo (Barba, 2008). Presenta poca frecuencia de progresión a fibrosis o cirrosis (Tandra *et al.*, 2011).
- *Microvesicular:* El citoplasma de los hepatocitos está lleno de pequeñas gotas de lípidos y el núcleo se encuentra en el centro de la célula. La deficiencia de la enzima acil-coenzima A oxidasa para la β -oxidación peroxisomal, se reconoce como una causa importante de este tipo de esteatosis. En las etapas iniciales, el proceso puede ser reversible al interrumpirse la causa primaria del SM (Santos *et al.*, 2010; Takahashi y Fukusato, 2014). Su presencia se asocia con enfermedades hepáticas avanzadas, suele confundirse con balonización y degeneración. Algunas veces se presenta de manera simultánea con la esteatosis macrovesicular (Chen y Yeh, 2021).

2.4 Esteatohepatitis no alcohólica.

NASH es un término que introdujeron por primera vez Jurgen Ludwig y su equipo en (1980), definieron una enfermedad hepática, hasta ese momento sin nombre, que histológicamente reproducía la hepatitis alcohólica y podía progresar a cirrosis, describieron la evolución de 20 pacientes durante 10 años; y propusieron su clasificación en dos tipos:

- NASH primaria, asociada con obesidad.
- NASH secundaria, en dónde se contemplan como factores etiológicos a las complicaciones de cirugía bariátrica, fármacos, o se asocia con condiciones congénitas como la enfermedad de Wilson y la Abetalipoproteinemia.

Se presentan reacciones necroinflamatorias, acumulación de lípidos y fibrosis, también puede avanzar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (Figura 6) (Ferrer *et al.*, 2008; Méndez *et al.*, 2010; Takahashi y Fukusato, 2014).

La red de investigación clínica de NASH (CRN NASH, por sus siglas en inglés), estableció y validó el primer índice de puntuación aceptado a nivel mundial que abordaba el espectro completo de lesiones de NAFLD y lo definió como la puntuación de actividad sumativa de NAFLD (NAS score, por sus siglas en inglés) (Geier *et al.*, 2021)

Lo definieron tomando en cuenta tres de las características histológicas más importantes de la NAFLD, también idearon un sistema de evaluación en conjunto con el score NAS para determinar la gravedad de las lesiones. (Tabla 1) (Barba, 2008; Caballería *et al.*, 2008; Rovira *et al.*, 2017).

2.4.1 Fibrosis

En 1951, se describió la fibrosis, como un proceso pasivo sin evidencia de proliferación de tejido fibroso, pero el aumento en la evidencia obligó a la organización mundial de la salud a modificar la definición como “la presencia de exceso de colágeno, debido a la formación de nuevas fibras”.

Finalmente, la fibrosis es el exceso de matriz extracelular que forma cicatrices como respuesta al daño hepático agudo, siendo la cirrosis la última etapa. El proceso inicia cuando la cantidad de colágeno y de otros componentes de la membrana basal

aumenta considerablemente, modificando la matriz extracelular del espacio subendotelial, generando una capilarización que lleva a la pérdida de las microvellosidades de los hepatocitos, la desaparición de las fenestraciones endoteliales y también la activación de las células estelares que pasan a un estado de miofibroblastos fibrogénicos que termina en una síntesis excesiva y depósito de matriz extracelular (Figura 7) (Puche *et al.*, 2013).

Tabla 1. Diagnóstico histológico de NAFLD. Tomada de (Rovira et al., 2017)

Índice de actividad		Índice de fibrosis	
Diagnostico histológico	Puntos	Tipo de fibrosis	Puntos
Esteatosis	0-3	Ninguna	0
Inflamación	0-3	Perisinusoidal zona 3	
		Leve	1A
		Moderada	1B
Balonización hepatocelular	0-2	Portal/periportal	1C
		Perisinusoidal + periportal	2
Puntuación máxima	8	Puentes	3
		Cirrosis	4
Puntuación ≥ 5 diagnóstico de NAFLD			
Puntuación ≤ 3 no diagnóstico de NAFLD			

2.4.2 Cirrosis

Anteriormente conocida como cirrosis criptogénica, se considera una etapa grave de NASH, presenta un daño fibrótico mayor, que afecta la arquitectura del hígado y, por tanto, la función del órgano. Este tipo de patología se caracteriza por no ser causada por enfermedad, como virus, por sustancias como alcohol o medicamentos. Pero los pacientes presentan varios de los factores que constituyen el síndrome metabólico. Los casos de cirrosis criptogénica a nivel mundial van en aumento (Bernal-Reyes *et al.*, 2019).

2.4.3 Carcinoma hepatocelular

La prevalencia de desarrollar carcinoma hepatocelular por acumulación de lípidos está en aumento, principalmente debido al incremento en los casos de NAFLD en la población mundial. El HCC se caracteriza por ser una neoplasia maligna que tiene origen en los hepatocitos; en algunos casos puede presentarse HCC en pacientes con NASH, pero sin presentar cirrosis subyacente y pueden afectar a sujetos no obesos (Berkan-Kawińska y Piekarska, 2019).

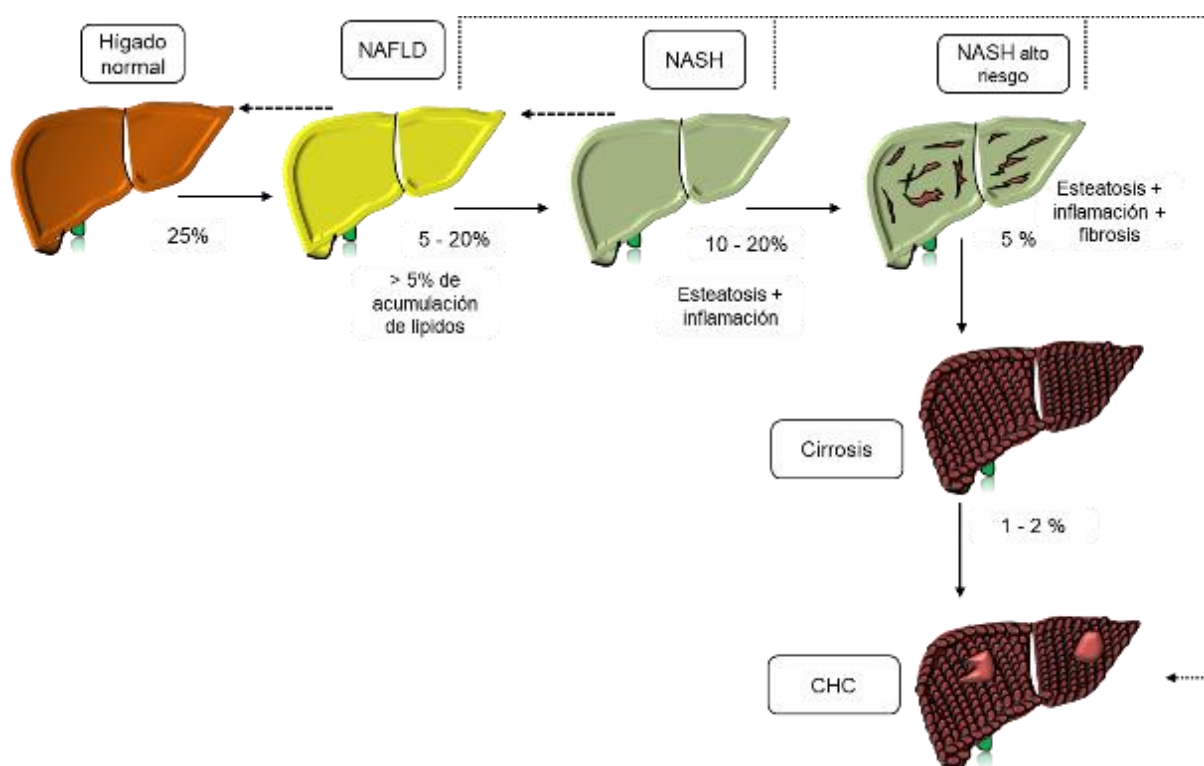


Figura 6. Historia natural de la enfermedad, son posibles rutas alternativas (líneas de puntos) que conducen directamente al carcinoma hepatocelular (CHC) a partir de la NAFLD o NASH. La NAFLD y la NASH a veces pueden llegar a ser reversibles (flechas discontinuas). Tomada de (Seghieri *et al.*, 2018).

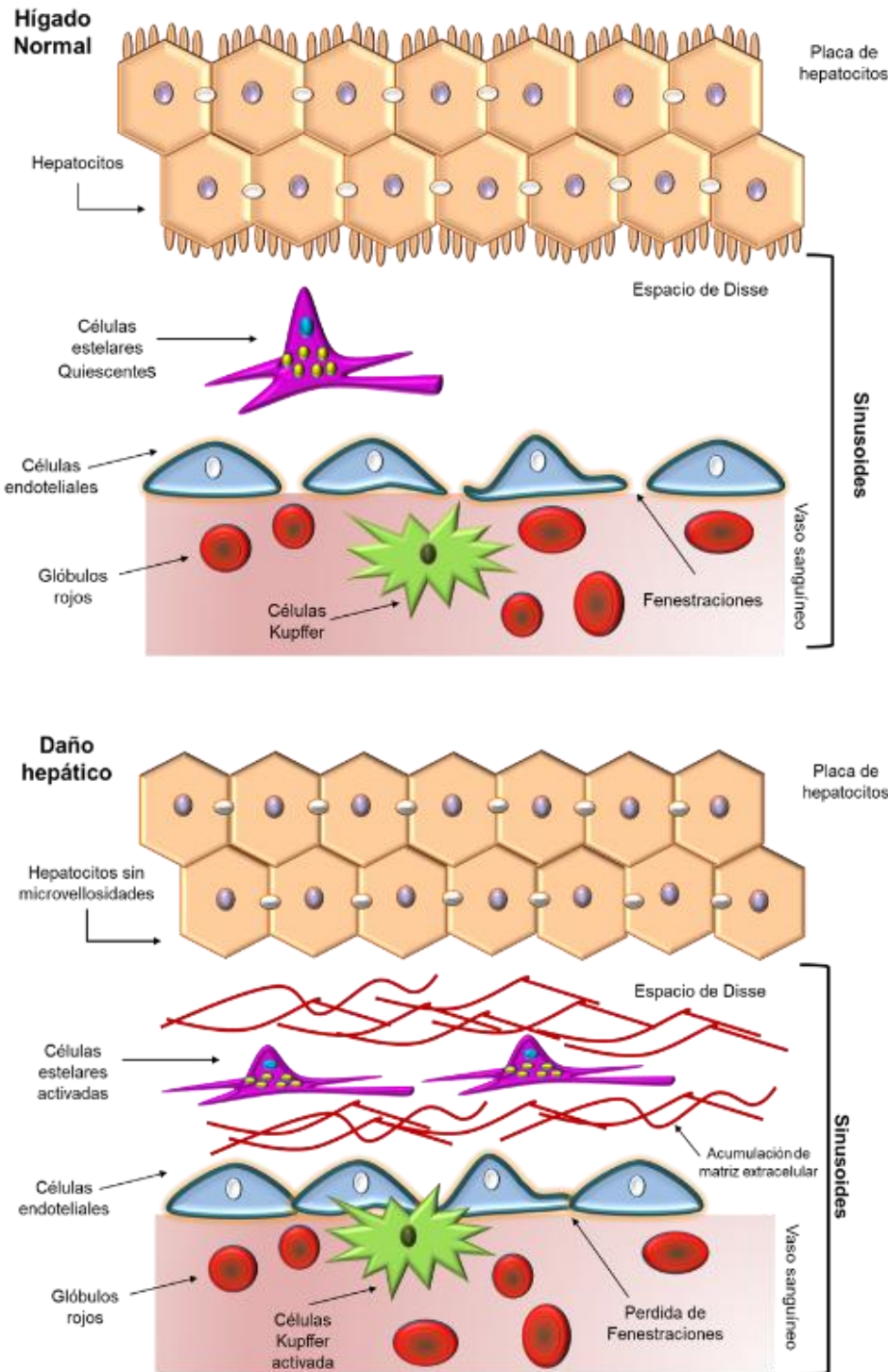


Figura 7. Fibrosis: El parénquima hepático normal contiene, células epiteliales (hepatocitos) y células no parenquimatosas: endotelio sinusoidal fenestrado, células estelares (HSC) y células de kupffer (KC). Después de un daño hepático, las células estelares se activan y secretan grandes cantidades de matriz extracelular generando una cicatriz fibrosa, está acumulación en el espacio de Disse produce pérdida de fenestraciones endoteliales y microvellosidades de hepatocitos. La alteración de la arquitectura del hígado provoca un mal funcionamiento (Puche *et al.*, 2013; Akcali y Akçali, 2018).

2.5 Manifestaciones clínicas y diagnóstico de la NAFLD

Cuando hay problemas en el hígado, el metabolismo se altera. Por ejemplo, las sustancias tóxicas pueden permanecer en el cuerpo e incluso producir otras sustancias dañinas; por lo que la presencia de una enfermedad como la NAFLD no daña solamente al hígado, sino que también impacta otros órganos y exacerba otras enfermedades como la diabetes tipo 2, problemas renales y cardíacos debido a la acumulación de minerales o calcificaciones en las paredes de los vasos lo que causa daño en el músculo cardíaco y el ritmo (Francque *et al.*, 2021).

La NAFLD presenta una prevalencia de 31.8% en Medio oriente y de 30.4% en América del sur (las más altas a nivel mundial), también se ha reportado que esa prevalencia aumenta conforme lo hace el índice de masa corporal, así como en pacientes que realizaron cirugía bariátrica, o que presentan diabetes tipo 2. Además de estos factores influyen el grupo étnico, la edad y el género, por ejemplo, hay un aumento en la prevalencia en hombres hispanos mayores (Younossi *et al.*, 2019). Desafortunadamente, en México existen pocos estudios sobre la prevalencia de la NAFLD, por ejemplo, en el año 2019 en una clínica se analizaron 1500 pacientes mediante ultrasonido y pruebas de laboratorio obteniendo una prevalencia de 39.5% (Bernal-Reyes *et al.*, 2022). La NAFLD puede afectar también a niños y adolescentes, evaluar, de manera específica, sigue siendo un reto, pues la mayoría de los pacientes son asintomáticos (Aguilera-Méndez, 2019). La importancia de un diagnóstico temprano permitirá evitar la progresión a etapas más graves como la fibrosis o cirrosis. El diagnóstico contempla 4 etapas:

1. Evaluación clínica.

- Exploración física: la mayoría de los casos de NAFLD no presentan síntomas, pero algunos podrían ser malestar general, dolor en el hipocondrio derecho, hepatomegalia y astenia.
- Exclusión de consumo de alcohol: >20 g/día mujeres, >30 g/día hombres.
- Exclusión de otras causas de NAFLD: como virales, metabólicas, autoinmunes o tóxicas.

2. Marcadores séricos e índices de esteatosis:

- Índice de hígado graso (FLI, por sus siglas en inglés): incluye índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura, prueba sérica de triglicéridos y GGT. Este estudio necesita ser validado por resonancia magnética o ecografía hepática.
- Fibrotest: se compone de un análisis bioquímico de 10 elementos, alpha 2-macroglobulin, haptoglobina, apolipoproteína A1, bilirrubina total, GGT, ALT, AST, glucosa en ayunas, triglicéridos y colesterol. También se toma en cuenta parámetros como el género, la edad y el IMC. Un valor de 0,3 tiene sensibilidad del 85% para poder diagnosticar esteatosis. Una biopsia hepática puede apoyar el resultado para el diagnóstico.
- Índice de esteatosis hepática (HSI): toma en cuenta el IMC, prueba de diabetes y la relación ALT/AST. Un valor <30 con 90% de sensibilidad diagnostica esteatosis mientras que un valor >36 la descarta. Se ha observado que la precisión del estudio disminuye en niños obesos y no distingue claramente entre esteatosis moderada o severa.
- Score de detección de NAFLD: utiliza el IMC, la edad, la glucosa en ayunas, triglicéridos, ácido úrico y la relación ALT/AST (Graffigna *et al.*, 2017; Bhatt *et al.*, 2020).
- Aminotransferasas: se encargan de catalizar la transferencia del grupo amino (proveniente de los aminoácidos L-aspartato y L-alanina) (McGill, 2016).
 - ALT, se encuentra principalmente en el hígado (en el citosol del hepatocito), pero también en menor cantidad en otros órganos como los riñones, el corazón, cerebro, próstata, colon y el páncreas, (Liu *et al.*, 2014). Cuando hay presencia de necrosis celular, la ALT se encuentra en niveles elevados en suero, utilizándose como una medida de función hepática.
 - AST, se encuentra en casi todos los tejidos, con altos niveles tanto en el hígado (citosol y mitocondria) como en el músculo esquelético, se pueden elevar las concentraciones de AST

cuando hay presencia de hematomas, traumatismos, necrosis, infección o neoplasia de hígado o músculo (Suckow *et al.*, 2012).

- La relación AST/ALT, predice daño hepatocelular que tiende a cirrosis, pues cuando hay muerte celular aumentan los niveles de AST en comparación con ALT (Lambis *et al.*, 2016).
- La bilirrubina y albumina presentan niveles elevados en etapas avanzadas de daño hepático, con niveles superiores de ferritina y saturación de transferrina. Desafortunadamente ningún parámetro sérico es suficiente para establecer diagnóstico de NAFLD o en que etapa de gravedad se encuentra (Martín-Domínguez *et al.*, 2013).
- Citoqueratina 18.
- Biomarcadores inflamación.

3. Pruebas de imagen:

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">○ Ultrasonografía○ Tomografía computarizada (TC)○ Resonancia Magnética nuclear (RMN) | } | Evalúan la presencia de esteatosis con sensibilidad entre un 60 |
| <ul style="list-style-type: none">○ Elastografía de transición (Fibroscan): evalúa la fibrosis hepática y es más sensible que los marcadores serológicos. | | |

4. Biopsia hepática: clasifica a los pacientes de acuerdo con la intensidad de esteatosis, grado de inflamación y fibrosis, permitiendo pronosticar su evolución a cirrosis.

Los mecanismos de la patogénesis de la NAFLD todavía no se aclaran por lo que es vital realizar más investigaciones sobre las rutas metabólicas involucradas, así como de los posibles tratamientos farmacológicos; dado el marcado aumento en la prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial. Es necesario utilizar modelos animales que puedan reflejar la fisiología e histología de las etapas fundamentales de la enfermedad para tener un mejor entendimiento de su progresión en los humanos.

2.6 Modelos de estudio

Los modelos animales preclínicos son indispensables y se han utilizado durante mucho tiempo intentando reproducir los aspectos histológicos, metabólicos y fisiológicos de la NAFLD. Esto permite comprender los mecanismos involucrados en la enfermedad y experimentar con nuevos fármacos con el fin de proponer nuevas terapias (Ayala *et al.*, 2008; Kucera y Cervinkova, 2014; Jahn *et al.*, 2019).

Los modelos utilizados son:

🚦 Genéticos:

- **Ratones Acil-CoA oxidasa $-/-$:** Ratones deficientes de la enzima acil-CoA oxidasa desarrollan esteatosis hepática masiva y hepatomegalia a los dos meses del nacimiento, debido a que dicha enzima participa como limitante en la velocidad de la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos. A los 7 días presentan esteatosis microvesicular, a los 30 días presentan mayor gravedad de esteatosis y células inflamatorias, a los 15 meses de edad hay adenomas hepatocelulares y HCC (Takahashi *et al.*, 2012).
- **Ratones ob/ob:** Este tipo de animales presentan una mutación espontánea del gen que impide la síntesis de leptina (pero no tienen receptores alterados), hormona que inhibe la conducta alimentaria e incrementa el gasto energético. Debido a que los ratones ob/ob pierden la leptina, tienen hiperfagia y se hacen obesos presentando hiperinsulinemia, hiperglucemia (ejemplo de resistencia a la insulina) e hiperlipidemia. Desarrollan esteatosis macrovesicular grave espontáneamente cuando se alimentan con dieta normal. Estos ratones no presentan fibrosis.
- **Ratones PPAR α $-/-$:** El PPAR α (receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa) es un factor hepático que regula la transcripción de genes implicados en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, los animales con falta de PPAR- α al ser sometidos a estrés, como un ayuno prolongado o una ingesta de una dieta rica en lípidos durante varias semanas, aumenta la liberación de ácidos grasos hacia el hígado, desarrollando esteatosis hepática masiva (Kořínková *et al.*, 2020)

Nutricionales

- **Dieta alta en lípidos:** Dieta rica en lípidos entre el 30 – 50 % de la proporción de sustratos energéticos totales de la dieta, en la mayoría de los casos se utilizan roedores y se alimentan *ad libitum*. Se logran reproducir componentes del síndrome metabólico y, por otro lado, histológicamente se logra observar esteatosis micro y macrovesicular. Este tipo de dieta no produce inflamación significativa, ni fibrosis a menos que se administre por períodos muy largos (años), por ese motivo no es un modelo recomendado para estudiar etapas avanzadas de NASH (Kořínková *et al.*, 2020).
- **Dieta alta en fructosa y sacarosa:** Se ha observado que las ratas alimentadas con este tipo de dieta pueden reproducir esteatosis y, en algunos casos esteatohepatitis. La fructosa promueve la síntesis hepática de triacilglicerol y su liberación en plasma en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las dietas altas en fructosa generan estrés oxidante, expresión de citocinas proinflamatorias y aumento de SREBP1c (proteína de unión al elemento regulador del esterol) en el hígado. Sin embargo, esta dieta no produce lesiones hepáticas tan graves como las producidas por otras dietas (Kanuri y Bergheim, 2013). Es relevante precisar que una dieta alta en fructosa administrada *ad libitum* no reproduce el fenotipo de la NAFLD (Santhekadur *et al.*, 2018).
- **Dieta aterogénica (alta en colesterol y colato):** una dieta con 0.1% de colesterol y 0.3 % de colato de sodio en ratas Wistar, resulto en aumento de peso, niveles elevados de AST y ALT, esteatosis aumentada en el hígado, infiltración de macrófagos, fibrosis y también incluye el balonamiento hepatocelular. Esta dieta no reproduce el estado metabólico característico de la NAFLD en humanos (Santhekadur *et al.*, 2018; Kořínková *et al.*, 2020).
- **Dieta deficiente en metionina y colina:** Dieta con 40% de sacarosa y 10% de grasa, pero deficiente en metionina y colina. Tanto la metionina como la colina son importantes donadores de grupos metilo, por lo que son considerados importantes para funciones fisiológicas diferentes, entre ellas el metabolismo de los lípidos. La metionina es un aminoácido esencial

necesario para la síntesis de glutatión que, además de ser antioxidante, también se involucra en la proliferación celular. Cumple una función relevante en la formación de S-adenosilmetionina (SAM), que sirve como donante de grupos metilo, además de ser indispensable para la síntesis de cisteína, lecitina, fosfatidilcolina y otras macromoléculas. Se ha observado en roedores, que la falta de metionina se asocia con un aumento del estrés oxidante, aumento de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) y profibróticos en el hígado, así como aumento de la ALT y AST hepáticas. Por otro lado, la colina participa en la síntesis de fosfolípidos como fosfatidilcolina y esfingomielina, además de ser un precursor de la acetilcolina (Figura 8) (Ramadori *et al.*, 2015). La falta de estos metabolitos no permite la formación de fosfatidilcolina que es esencial para la formación normal de la lipoproteína VLDL y su secreción del hígado, alterando la beta oxidación mitocondrial en roedores, observándose una acumulación rápida de triglicéridos en el hígado con un desarrollo posterior de esteatohepatitis y fibrogénesis (Figura 9) (May *et al.*, 2018). Veteläinen *et al.*, (2007) describieron histológicamente el desarrollo del daño causado por la dieta MCD. Después de una semana, observaron esteatosis macrovesicular; a las tres semanas, inflamación; a las 5 semanas, esteatosis microvesicular difusa y extensa, inflamación y necrosis irregular ocasional; a las 7 semanas, además de lo antes mencionado, notaron aumento de fibrosis. Está dieta provoca desnutrición en los roedores, además de disminución proporcional en el peso del hígado. Por otro lado, la dieta MCD provocó esteatosis a las dos semanas, fibrosis a las 7 semanas de administración, más rápido que con la dieta HFD (dieta alta en grasas) y las dietas occidentales que tardan aproximadamente 50 semanas (Chua *et al.*, 2022). Aunque la dieta MCD replica muy bien las características histológicas de la enfermedad, causa inflamación severa, estrés oxidante, apoptosis y fibrogénesis, no reproduce el clásico perfil metabólico que presenta la NAFLD, ya que los roedores alimentados con la dieta MCD presentan peso bajo, disminución de glucosa en ayunas, niveles de leptina e insulina bajos, además, no hay resistencia a

la insulina (Santhekadur *et al.*, 2018; Jahn *et al.*, 2019; Kořínková *et al.*, 2020)

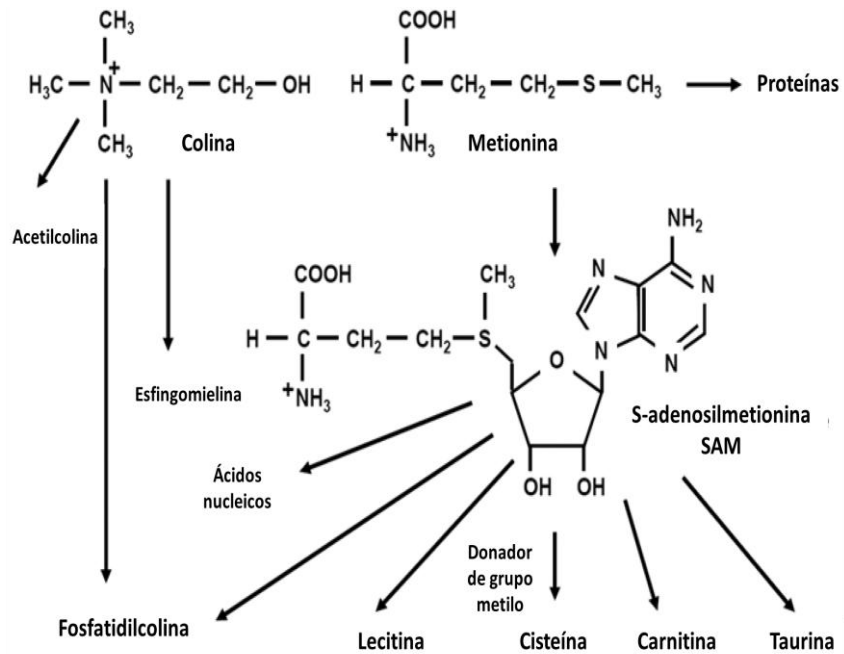
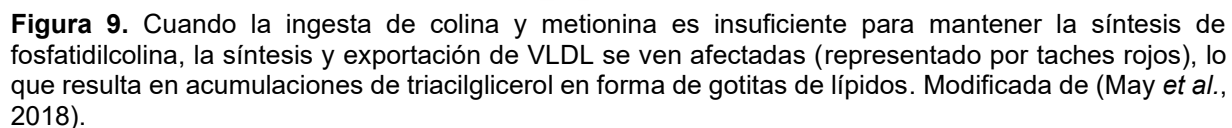


Figura 8. La metionina es un aminoácido proteinogénico esencial y forma parte del donante del grupo metilo S-adenosilmetionina (SAM), indispensable en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios. Por otro lado, la colina es una parte integral de la fosfatidilcolina y la esfingomielina, y también es precursora de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina. Tomada de (Ramadori *et al.*, 2015)



28

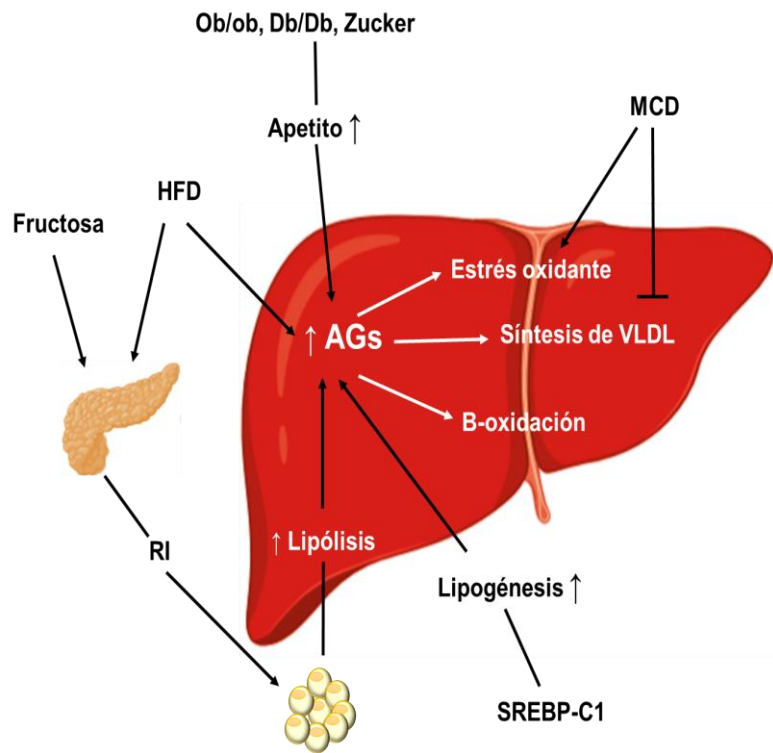


Figura 10. Se han desarrollado muchos modelos in vivo diferentes para NAFLD-NASH en el intento de imitar las características de la patología humana en la medida de lo posible y, entre ellas, dos tipos diferentes prevalecen en los modelos animales: el genético y el nutricional. Modificada de (Berardo *et al.*, 2020)

2.7 GLP-1 y su regulación por la DPP4

Las incretinas (Intestine secretion of insulin, por sus siglas en inglés) son hormonas, producidas en el intestino después de la ingesta de alimentos, principalmente carbohidratos. Estos nutrientes actúan a nivel pancreático estimulando el aumento en la secreción y liberación de insulina, además de disminuir la secreción de glucagón generando el efecto incretina (Abdelhamid *et al.*, 2022). En cuanto a su función hipoglucemiante las 2 hormonas incretinas más relevantes son:

- Péptido similar al glucagón tipo 1 (**GLP-1**), compuesto por 30 residuos de aminoácidos, es producido por las células L ubicadas en el intestino delgado distal y el colon proximal. Ambos presentan receptores acoplados a proteína G (receptor GLP-1R), que son receptores heptahelicoidales de 463 aminoácidos.

Estos receptores se encuentran en las células β y α de los islotes pancreáticos, así como en otros tejidos como son estómago, intestino, pulmones, corazón, riñones, tallo cerebral, hipotálamo e hipófisis (Zazueta, 2007) (Drucker, 2006). Se encarga de inhibir la liberación de glucagón, el vaciamiento gástrico y reduce la ingesta de comida y el apetito (Quintanilla-García y Zúñiga-Guajardo, 2010).

- Péptido insulínotropo dependiente de la glucosa (**GIP**), compuesto por 42 residuos de aminoácidos, es producido por las células K del intestino delgado proximal. Los receptores de GIP (GIPR) son expresados en células β de los islotes del páncreas. En los seres humanos, existen dos isoformas de estos receptores con longitudes de 466 y 493 aminoácidos. Además de encontrarse en el intestino, los receptores de GIP también se localizan en tejido adiposo, hueso, corazón, hipófisis, corteza adrenal y diversas regiones del cerebro. El GIP promueve la secreción de hormonas del adipocito como la resistina, y también aumenta la secreción de glucagón por las células β del páncreas (Quintanilla-García y Zúñiga-Guajardo, 2010).

El efecto insulínotropo de las incretinas depende de las concentraciones de glucosa en plasma; en presencia de hiperglucemia, se observa un mayor efecto insulínotropo de estas hormonas. Por otro lado, en caso de hipoglucemia, la secreción de incretinas será menor. Tanto el GLP-1 como el GIP tiene una vida media corta, ya que son degradadas en cuestión de minutos por la enzima DPP4 (Lazo Roblejo y Lores Delgado, 2012).

Tanto GLP-1 como GIP estimulan la síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo, y esta acción se potencia con la presencia de insulina. Además, las incretinas están presentes en terminaciones nerviosas de regiones del SNC en funciones homeostáticas diversas, incluyendo la conducta alimentaria, la motilidad gástrica, la glucorregulación y la función cardiovascular (Bayón *et al.*, 2010). Las incretinas estimulan la secreción de insulina al unirse a sus receptores en la superficie de las células β del páncreas. Sin embargo, este proceso se ve alterado cuando un paciente es diagnosticado con diabetes mellitus tipo 2. En este punto, las células β han perdido aproximadamente el 50% de su capacidad secretora, y las células α producen concentraciones elevadas de glucagón. Esto conlleva a una mayor síntesis de glucosa

por parte del hígado, resultando en un estado de hiperglucemia (Blumenfeld, 2009). En pacientes con diabetes tipo 2, se observa una disminución del efecto incretina debido a que la producción y secreción de GLP-1 se reduce, mientras que los niveles de GIP permanecen normales, aunque su acción se encuentra alterada. Esto puede deberse a una desensibilización de sus receptores o a su expresión incorrecta en los islotes de Langerhans (Kazakos, 2011). También existe evidencia que sugiere que la acción y secreción de las incretinas está relacionada con el aumento de peso corporal. Se ha observado que el índice de masa corporal (IMC) está asociado con la reducción de la secreción de GLP-1 y un efecto incretina alterado. Algunos estudios sugieren que la resistencia a la leptina, la alteración de la secreción de grelina y la hiperinsulinemia que ocurren en la obesidad pueden causar déficits funcionales en la señalización de GLP-1. Por otro lado, las concentraciones de GIP son más altas en personas obesas. Algunos estudios *in vitro* han determinado que los hepatocitos humanos expresan GLP-1R, aunque la expresión de GLP-1 ha arrojado resultados controversiales (Michałowska *et al.*, 2021). Se han desarrollado algunas estrategias enfocadas en el tratamiento y manejo de la diabetes. Una de ellas reproduce el efecto de las incretinas utilizando agonistas de GLP-1, mientras que la otra, potencia la acción de las incretinas endógenas mediante la incorporación de inhibidores de la DPP-4 (Lazo Roblejo y Lores Delgado, 2012).

La dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) o adenosina deaminasa proteína acompañante 2 (CD26), es una proteína transmembrana de tipo II. Presenta una masa molecular de 110 kDa. Existen dos formas, ubicada en la superficie de muchas células y también puede separarse de la membrana generando una forma soluble que carece de dominio citoplásmico y dominio transmembrana, se puede liberar en el plasma y otros fluidos corporales sCD26/DPP4 (Enz *et al.*, 2019). La proteína unida a la membrana se compone principalmente, de 4 dominios: un dominio citoplásmico corto N terminal, un dominio transmembrana, un segmento flexible y un dominio extracelular terminal c (Figura 11) (Mulvihill y Drucker, 2014; Huang *et al.*, 2022).

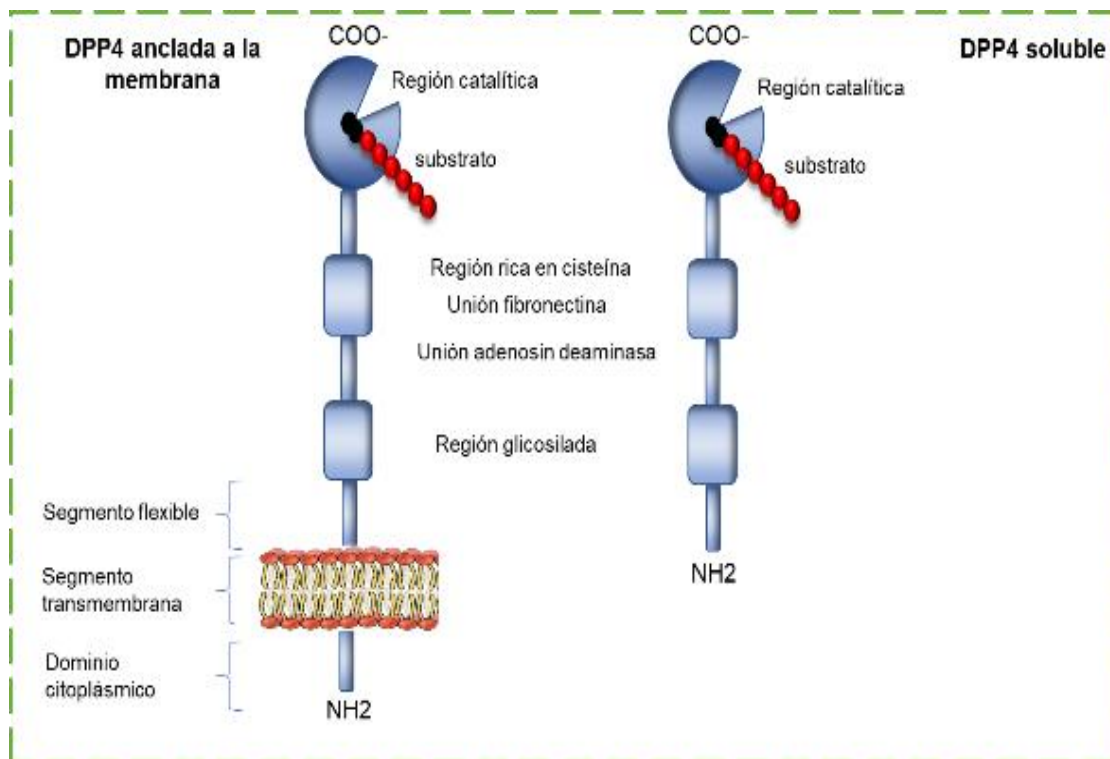


Figura 11. La forma soluble carece de los dominios transmembrana, el citoplásmico y el tallo flexible. Tomada de (Mulvihill y Drucker, 2014)

CD26 se encarga de degradar varios sustratos como las hormonas incretinas el polipéptido inhibidor gástrico o péptido insulínotropo dependiente de glucosa (GIP) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), factores de crecimiento y citocinas.

La actividad DPP4 se puede medir en plasma y en el epitelio intestinal, endotelio vascular, linfocitos, monocitos, riñón, hígado, pulmón, timo, bazo, próstata, etc. Niveles elevados de DPP4 se han encontrado en varias enfermedades metabólicas como diabetes, obesidad, enfermedad cardiovascular e hígado graso no alcohólico (Matteucci y Giampietro, 2009; Klemann *et al.*, 2016; Nargis y Chakrabarti, 2018; Huang *et al.*, 2022).

Debido a su actividad regulatoria sobre la glucosa posprandial a través de la degradación de GLP-1, se implementó el uso de inhibidores de la DPP4 como tratamiento contra la diabetes tipo 2 (Yin *et al.*, 2022).

La DPP4 escinde el extremo N de GLP-1 que es de importancia en el almacenamiento y regulación de la glucosa en sangre. Esta escisión de GLP-1 lo inactiva contribuyendo a la hiperglucemia. Entonces, estos inhibidores no permiten la inactivación de GLP-1 por la DPP4, manteniéndolo activo y permitiendo la secreción de insulina, pero

inhibiendo la secreción de glucagón resultando en una disminución de los niveles de glucosa en sangre (Figura 12) (Bar-Or *et al.*, 2019).

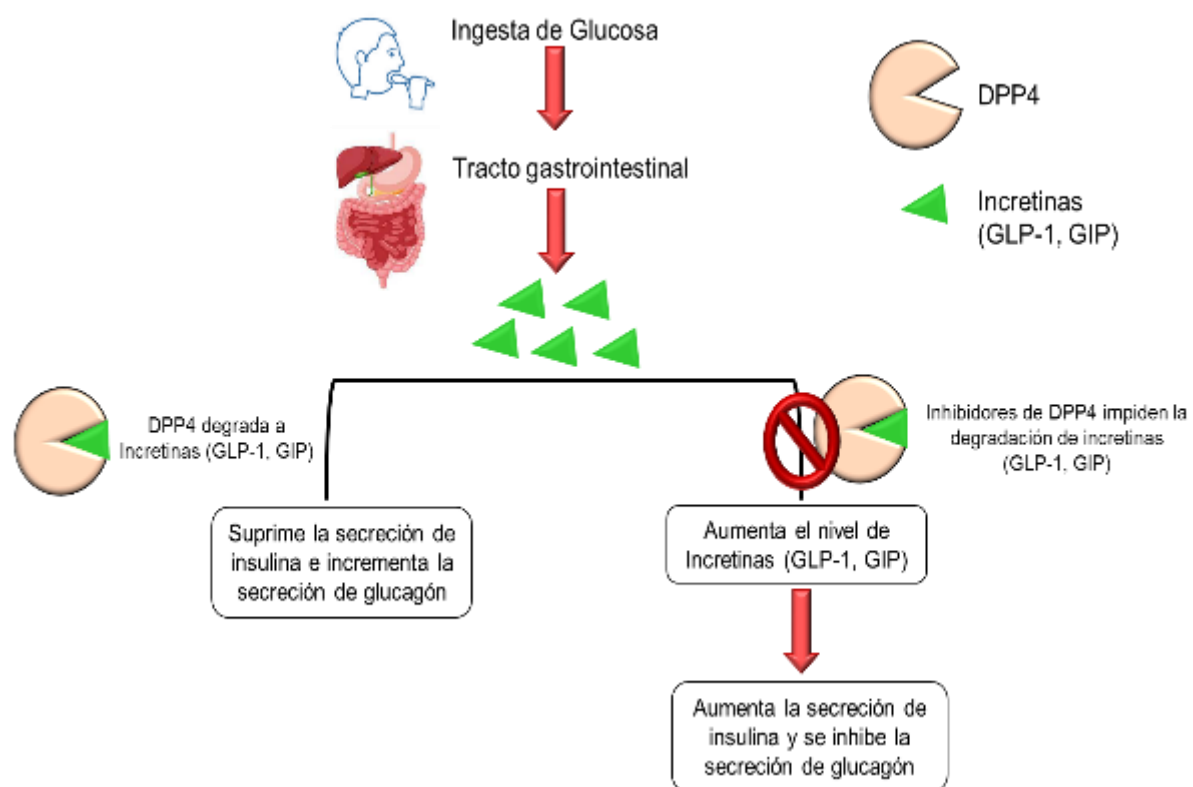


Figura 12. DPP4 degrada a GLP-1, aumenta la secreción de insulina. El inhibidor de DPP4, no permite que DPP4 degrade a GLP-1, aumentando su nivel y así la secreción de insulina. Tomada de (Singh *et al.*, 2020)

3 Antecedentes

3.1 Carencia de donadores de grupos metilo

El metabolismo de un carbono (1C), comprende el ciclo del folato, la remetilación de la metionina y la vía de la transulfuración (Figura 13); se caracteriza por una serie de reacciones bioquímicas que permiten la transferencia de 1C, en forma de grupos metenilo, metilo y formilo necesarios para muchos procesos celulares como la síntesis molecular (de proteínas, poliaminas y fosfolípidos); el control epigenético de la expresión de ADN, ARN e histonas y en la síntesis de ácidos nucleicos. El metabolismo de 1C implica la transferencia de grupos metilo provenientes de fuentes dietéticas y de la biosíntesis endógena para la formación del donante universal de grupos metilo, la S-adenosilmetionina. Dentro de los nutrientes que regulan el metabolismo de 1C (como donadores de grupos metilo) encontramos al folato (B9), las vitaminas B2, B6 y B12, y la metionina y la colina (Clare *et al.*, 2019).

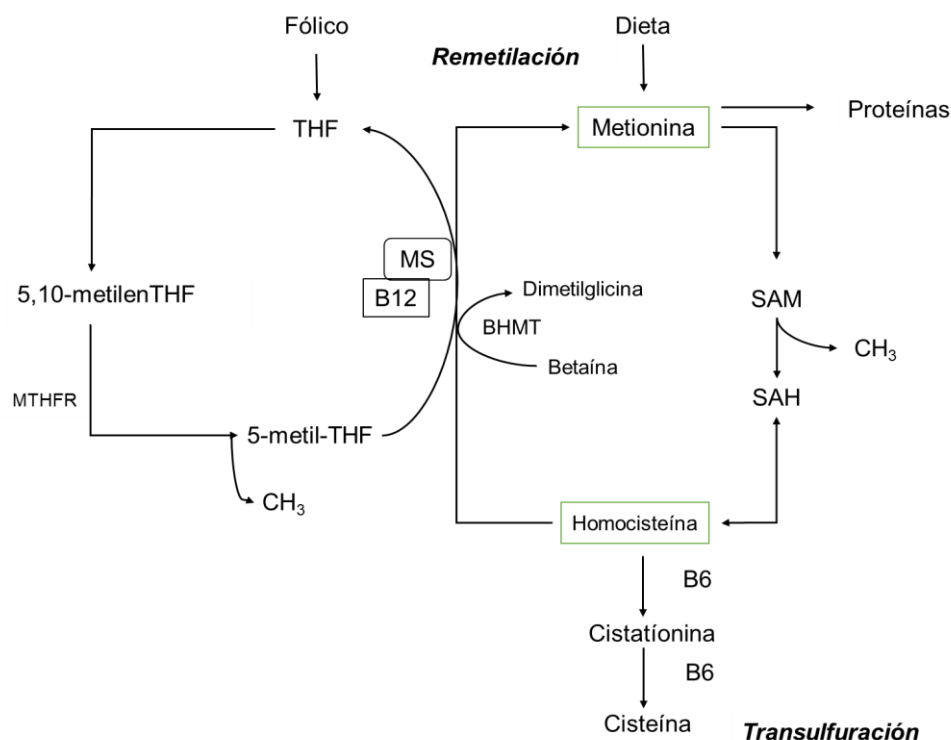


Figura 13. Metabolismo de 1C; Tetrahidrofolato (THF), Metilen-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH). Modificada de (Moral, 2006)

Siendo el hígado y los músculos los lugares principales para el metabolismo de 1C. En los humanos la deficiencia en el metabolismo de 1C se ha encontrado involucrado en el daño hepático por alcohol, NAFLD, nutrición materna y programación fetal (que se define como proceso de adaptación por el que la nutrición y otros factores ambientales alteran las vías de desarrollo durante el período de crecimiento prenatal, induciendo con ello cambios en el metabolismo postnatal y la susceptibilidad de los adultos a la enfermedad crónica) (Reyes y Carrocera, 2015), cáncer y fertilidad (Obeid, 2013; Antwi *et al.*, 2020). Se han realizado, investigaciones con diferentes formulaciones de dietas deficientes en donadores de grupos metilo, como deficiente en colina, en metionina-colina, metionina-colina-ácido fólico, las cuales han provocado alteraciones en el metabolismo de los lípidos, estrés oxidante y de anomalías epigenéticas que generan daño hepático, permitiendo estudiar la patogenia de enfermedades que finalizan en HCC. (Pogribny *et al.*, 2012). El estrés oxidante puede inactivar metabolitos y estructuras de nutrientes, además de una absorción deficiente de vitaminas como B12, niveles bajos de dicha vitamina se han relacionado con pacientes con NAFLD y fibrosis (Costa *et al.*, 2021). El ácido metilmalónico (MMA), metabolito de ácidos grasos y catabolismo de varios aminoácidos, se convierte en ácido succínico, proceso catalizado por metilmalonil-CoA mutasa y la coenzima vitamina B12, por lo tanto, una deficiencia de B12 genera acumulación de MMA, considerándolo como un indicador de deficiencia de B12 y un marcador de disfunción mitocondrial y estrés oxidante (Li *et al.*, 2022).

Un modelo dietético clásico de NASH que muestra los efectos de una alteración del metabolismo de 1C es la dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Además, MCD contiene sacarosa (40%) y grasa (10%) altos. Asimismo, la metionina y la colina se consideran esenciales en la dieta de humanos y animales. La colina actúa como precursor de la fosfatidilcolina, que está involucrada en la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Berardo *et al.*, 2020). Dicho complejo de lipoproteínas permite el transporte de triglicéridos (TG) desde el hígado hasta el tejido adiposo y los músculos. Mientras que la metionina es necesaria para la síntesis de glutatión (agente antioxidante). Debido a lo anterior, los animales con una dieta MCD desarrollan rápidamente esteatosis hepática como consecuencia de mayor captación de ácidos

grasos y menor secreción de VLDL. Después de dos semanas, el desarrollo de la esteatosis es seguido por muerte celular, inflamación y fibrosis pericelular; se produce estrés oxidante y un aumento de citocinas y adipocinas, lo que contribuye al daño hepático. La dieta MCD es fácil de obtener y usar, e induce una forma más grave de esteatohepatitis que otros modelos dietéticos, pero también tiene marcadas limitaciones (Figura 14) (Soret *et al.*, 2020). El modelo MCD ha sido criticado ya que los perfiles metabólicos que produce son distintos a los que presenta la NAFLD en humanos (Li *et al.*, 2018). En varios estudios se ha observado que después de cuatro a seis semanas de dieta MCD, el parénquima hepático presenta esteatosis, abombamiento de hepatocitos, muerte celular, inflamación, estrés oxidante/RE, sin desarrollar resistencia a la insulina o comorbilidades relacionadas. Otro de los inconvenientes de utilizar dicha dieta para inducir NAFLD, es la pérdida de peso grave, exhiben una distribución de grasa marcadamente reducida y la atrofia hepática, que no son características de la NASH humana (Fang *et al.*, 2023). La ausencia de las comorbilidades del síndrome metabólico y la falta de una dieta directamente comparable en humanos limitan la aplicabilidad del modelo de dieta MCD para estudiar de manera similar la NAFLD en humanos (Fu *et al.*, 2024).

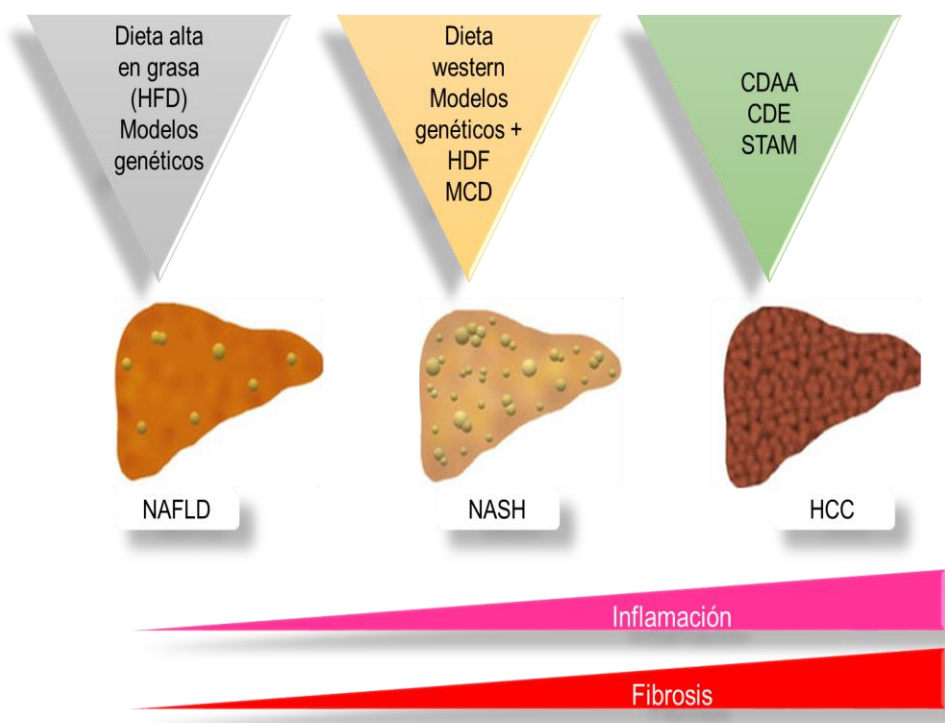


Figura 14. Los modelos genéticos de ratones ob/ob (deficiencia de leptina) y db/db (mutación del receptor de leptina), así como las dietas altas en grasa muestran alteraciones metabólicas y esteatosis grave, pero sin inflamación hepática ni fibrosis. Sin embargo, la dieta deficiente en metionina y colina (MCD) y sus dietas derivadas como la deficiente en colina con suplemento de etionina (CDE) y la dieta deficiente en colina y definida por aminoácidos (CDAA), promueven la inflamación y la fibrosis del hígado. El modelo animal estético (STAM) resulta en el desarrollo de HCC. Modificada de (Soret *et al.*, 2020).

Se sabe que una dieta deficiente en metionina induce esteatosis hepática y predispone al SM; también, se encontró hipometilación de PGC1- α (proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas), lo que alteró la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial y la deficiencia de donadores de grupos metilo provoca la desregulación epigenómica del metabolismo energético, lo que abre nuevos caminos en la patogénesis del NAFLD (Pooya *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha visto que la expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) en el hígado disminuye significativamente en un modelo de ratas alimentadas con dietas altas en lípidos (Figura 15) (Deng *et al.*, 2007) y que la sobreexpresión de *SIRT1* protege a ratones de desarrollar NAFLD (Colak *et al.*, 2011).

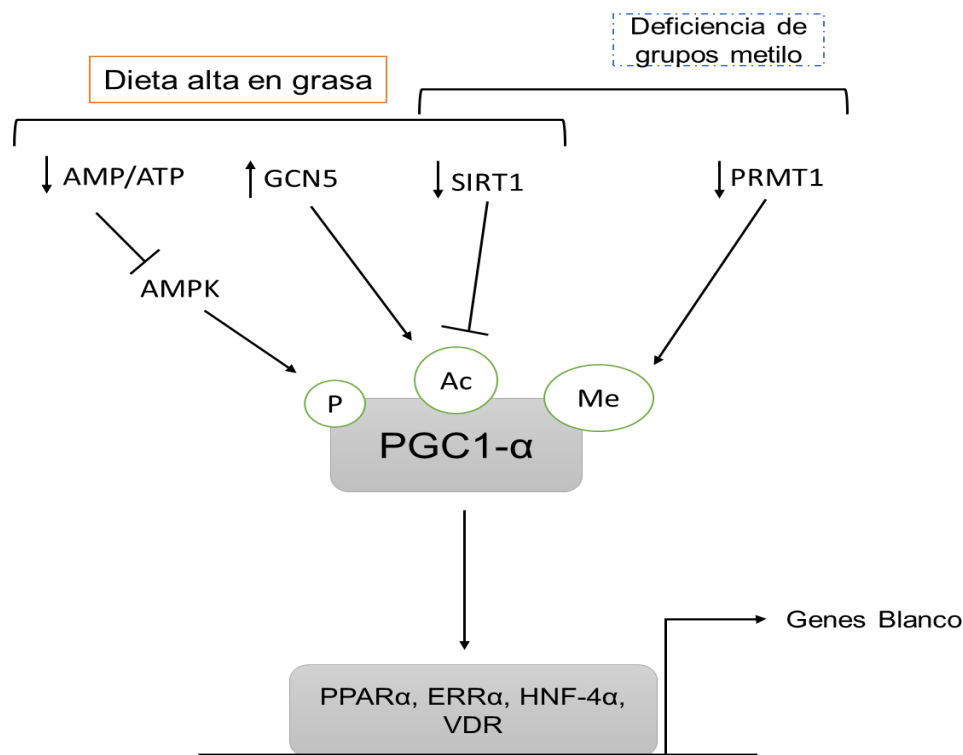


Figura 15. La disminución de la expresión y actividad de la Sirtuina 1 (SIRT1), es una característica de las dietas altas en grasa y deficientes de donadores de grupos metilo. Sirtuina 1 tiene como blanco la acetilación de PGC1- α (proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas), en conjunto con GCN5 acetilasa (proteína 5 del control general no represible), AMPK (proteína cinasa activada por AMP) y PRMT1 (proteína arginina N-metiltransferasa 1) regulan a PGC1- α y la activación de receptores nucleares como PPAR α (receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa), ERR α (receptor relacionado con estrógenos alfa), HNF-4 α (factor nuclear 4 alfa de hepatocito) y VDR (receptor de vitamina D). PGC1- α es fosforilado y acetilado por AMPK, GCN5 acetilasa y SIRT1 desacetilasa. Una dieta alta en grasas La dieta alta en grasas disminuye la actividad de la AMPK, a través de niveles elevados de ATP (adenosín trifosfato) intracelular, lo que lleva a una disminución de la fosforilación de PGC-1 α . La hiperacetilación de PGC-1 α se produce a través de un aumento de la expresión de GCN5 y disminución de la expresión y actividad de SIRT1. La deficiencia en donadores de grupos metilo produce efectos similares a través de la disminución de SIRT1 y PRMT1. Tomada de (Kosgei *et al.*, 2020)

3.2 Alteraciones implicadas en la NAFLD

La obesidad es considerada hoy en día la epidemia mundial del siglo XXI, convirtiéndose en uno de los factores de riesgo principales para desarrollar problemas cardiovasculares y hepáticos como NAFLD, o carcinoma hepatocelular. Por lo que se ha propuesto que, mientras siga el aumento en la prevalencia de la obesidad, los casos de NAFLD podrían convertirse en la primera causa de disfunción hepática (Anstee *et al.*, 2019). Además de la obesidad, se han determinado otras enfermedades metabólicas como factores de riesgo para desarrollar NAFLD, tales como la diabetes,

hipertensión e hiperlipidemia. Existen formas avanzadas de la NAFLD como son NASH, fibrosis o cirrosis, que podrían llegar a convertirse en un problema de salud grave y causa de trasplante en el futuro. (Figura 16) (Schwabe *et al.*, 2020).

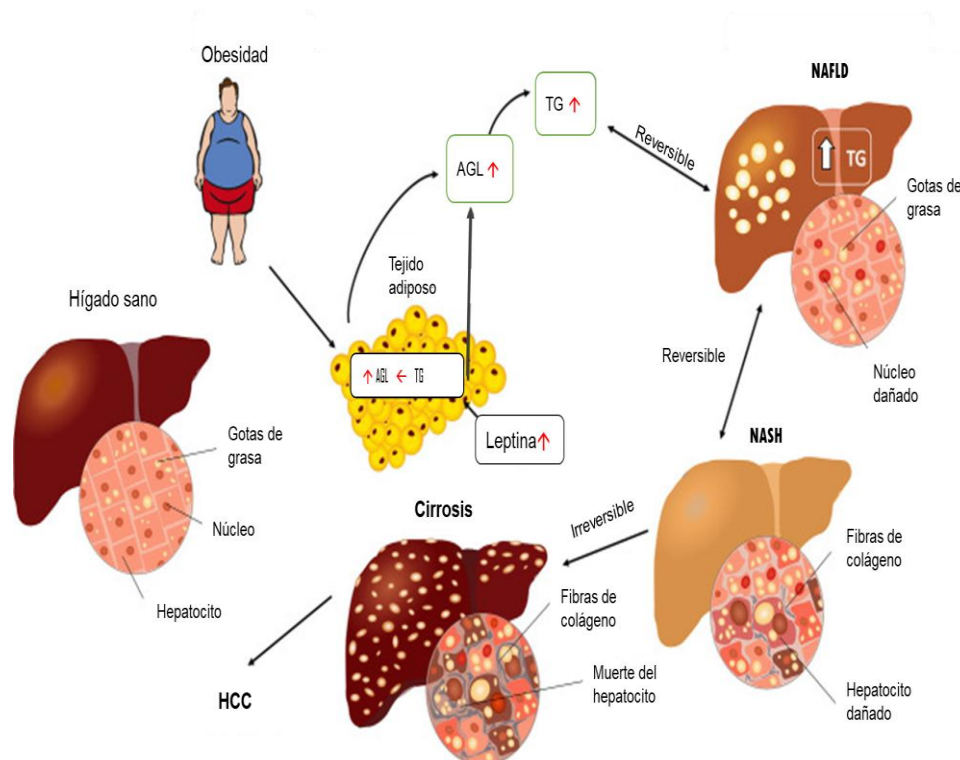


Figura 16. La obesidad, genera que el tejido adiposo se expanda, disminuyendo su capacidad de almacenaje de energía. La disfunción de los adipocitos y la resistencia a la insulina aumentan, lo que produce lipólisis. Los ácidos grasos libres (FFA) circulantes y la leptina aumentan, la adiponectina disminuye resultando en la acumulación de grasa intrahepática. Al expandirse el tejido adiposo es infiltrado por células inmunitarias que producen citocinas e interleucinas. Si la obesidad no se logra controlar, las células inmunitarias también, se infiltran en el hígado que provoca un proceso inflamatorio crónico. Cuando el cuadro de inflamación se prolonga, se produce fibrosis, que con el paso del tiempo puede ser más grave y producir cirrosis o carcinoma hepatocelular (Polyzos *et al.*, 2019). Tomada de (Kořínková *et al.*, 2020).

El tratamiento de la NASH incluye fármacos que se focalizan en los síntomas del SM: reducción de peso, los insulino-sensores, antioxidantes y como extremo el trasplante hepático. Los inhibidores de la DPP4 se han propuesto como posibles agentes terapéuticos. Una novedad terapéutica es el uso de la sitagliptina que pertenece a una clase de antidiabéticos orales relativamente nueva; produce un aumento en la concentración plasmática de las hormonas incretinas intactas, GLP-1, reduce la hiperglicemia y disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada (Leiva *et al.*, 2010; Olaywi *et al.*, 2013).

3.3 Sitagliptina como atenuador de los efectos del hígado graso

La sitagliptina es un inhibidor enzimático que se ha mostrado prometedor como tratamiento para la diabetes tipo 2 debido a su capacidad para reducir la resistencia a la insulina (Bernal-Reyes, 2012). Pertenece a los antidiabéticos orales inhibidores de la DPP4, los cuales aumentan los niveles de hormonas incretinas, como GLP1 y GIP, que ayudan a regular la glucosa en sangre (Carretero, 2008; Roldán *et al.*, 2011).

Recientemente, se descubrió que los hepatocitos también tienen receptores de GLP-1 y que un análogo de GLP-1 aumenta la captación de glucosa en estos hepatocitos mediante la activación de la vía de señalización adenosina monofosfato quinasa (Itou *et al.*, 2012). Esto ha abierto nuevas posibilidades en el uso de la sitagliptina más allá de su efecto antidiabético, mostrando potencial terapéutico contra la NAFLD.

Estudios clínicos recientes han revelado que los pacientes con NAFLD tienen niveles elevados de DPP4 en suero en comparación con grupos de control, y la sitagliptina ha demostrado ser prometedora para combatir la esteatosis hepática en seres humanos y modelos animales inducidos por la dieta (Jung *et al.*, 2014). Además, se ha observado que el tratamiento con sitagliptina reduce los niveles de triglicéridos, transaminasas y fibrosis hepática, lo que sugiere que podría ser una estrategia terapéutica eficaz para la NASH.

Algunos estudios en humanos mostraron la eficacia de la sitagliptina en el tratamiento de la NAFLD. La decisión de utilizarla en este trabajo se justificó tomando en cuenta que uno de los factores de riesgo principales para desarrollar daño hepático es la diabetes tipo 2 y la sitagliptina es una opción extendida para su tratamiento como adyuvante de la metformina son los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4, como la sitagliptina, entre otros. Los estudios en que se trató con sitagliptina a diabéticos, se encontró que los niveles séricos de HbA1c se redujeron, y mejoraron significativamente las pruebas de función hepática, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa) y γ -GTP (gamma-glutamyl transferasa). Concluyendo que la sitagliptina tenía un efecto doble, en la diabetes como en la salud hepática (Iwasaki *et al.*, 2011). En la tabla 2, se enlistan varios estudios en los que administró sitagliptina, mostrando mejoría relacionada con la NAFLD, utilizando varios modelos de dieta, en rata y ratón.

Tabla 2. Estudios usando sitagliptina en animales

Autor	Cepa	Modelo	Dosis	Resultado
Maiztegui <i>et al</i> 2011	Rata Wistar	HGRD	100mg/kg/día	Efecto hepatoprotector
Akaslan <i>et al</i> 2013	Rata Sprague-Dawley	HFD	3 mg/kg/día	↑Hepatomegalia ↑Transaminasas ↓Sensibilidad a la insulina ↓Perfil lipídico
Jung <i>et al</i> 2014	Ratón C57BL/6	MCD	20mg/kg/día	↓Grasa hígado ↓Inflamación ↓Fibrosis
Kaji <i>et al</i> 2014	Rata Fischer	SP	100 mg/kg/día 300 mg/kg/día	↓Inflamación ↓Fibrosis
Onoyama <i>et al</i> 2015	Ratón FLS-ob/ob	-----	2mg/kg/día	↓Peso corporal ↓Insulina ↓Glucosa ↓Fibrosis
Sujishi <i>et al</i> 2015	Ratones ob/ob	HCD	10mg/kg/día	↓Grasa hígado ↓Glucosa
Xu <i>et al</i> 2017	Ratones C57/BL6	HF	15 mg/kg/día	Efecto hepatoprotector

A pesar de estos resultados alentadores, los mecanismos precisos por los cuales la sitagliptina ejerce sus efectos beneficiosos en la NAFLD y la NASH aún no están completamente comprendidos. Dado que actualmente no existe un tratamiento eficaz para estas enfermedades, es crucial investigar los mecanismos moleculares y bioquímicos involucrados en ellas para desarrollar una estrategia terapéutica adecuada.

En este proyecto, se propone caracterizar el efecto de la sitagliptina en un modelo de esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica, con el objetivo de proporcionar una mejor comprensión de los mecanismos de acción y avanzar hacia una posible terapia efectiva para estas condiciones.

4 Pregunta de investigación

¿Cuáles son los mecanismos de acción por los cuales la sitagliptina disminuye el daño hepático, la esteatosis y la esteatohepatitis no alcohólica?

5 Hipótesis

La sitagliptina atenuará el daño hepático, la esteatosis y la esteatohepatitis regulando el metabolismo de los lípidos al inhibir a la DPP4 y quizá por otros mecanismos.

6 Objetivo general

Caracterizar algunos de los mecanismos de acción de la sitagliptina en la reducción de la esteatosis y la esteatohepatitis en ratas Wistar machos.

7 Objetivos específicos

1. Inducir hígado graso en ratas tratadas con una dieta deficiente en metionina/colina (MCD).
2. Caracterizar el modelo de estudio determinando los niveles séricos de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, acilcarnitinas, ácidos grasos, ácido metilmalónico, leptina, incretinas, transaminasas, creatinina, homocisteína, ácido úrico y metionina en ratas alimentadas con MCD y sitagliptina.
3. Caracterizar la esteatosis hepática del modelo de estudio desde el punto de vista histológico para determinar visualmente la acumulación de lípidos.
4. Caracterizar la expresión de las proteínas MMP2 (metaloproteinasas de matriz-2), Col1A2 (colágeno tipo 1 alfa 2) y α -SMA (α actina del músculo liso) en el contenido proteínico del hígado del modelo de estudio para determinar el posible mecanismo de acción de la sitagliptina.

8 Materiales y métodos

8.1 Diseño experimental

8.1.1 Animales

El bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa proporcionó los animales. Todos los experimentos y el cuidado de los animales se llevaron a cabo de acuerdo a la NORMA Oficial de México NOM-062 ZOO-1999, reglamento sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se utilizaron Ratas Wistar macho de 2 meses de edad divididas en 4 grupos con 15 animales cada uno. Al recibir a los animales, cada uno fue pesado y se inició su manipulación para que se fueran acoplando al proceso de ingesta forzada, medida de glucosa y pesaje. Posteriormente, se formaron los grupos y se marcaron para su identificación (Figura 17).

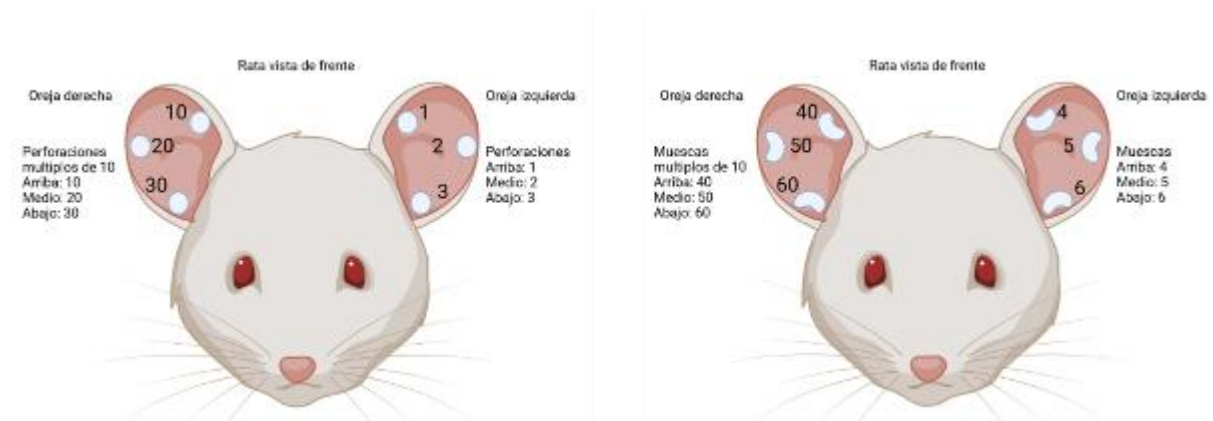


Figura 17. Marcate de ratas mediante perforación auricular con alicatas especiales. En la oreja izquierda se realizaron perforaciones circulares correspondientes a los números 1 (región superior), 2 (región media) y 3 (región inferior). En la oreja derecha, las perforaciones circulares correspondieron a los números 10, 20 y 30. Los números 4, 5 y 6 se identificaron mediante muescas simples en la oreja izquierda; los números 7, 8 y 9 mediante muescas dobles en la misma oreja. Los números 40, 50 y 60 se marcaron con muescas en la oreja derecha.

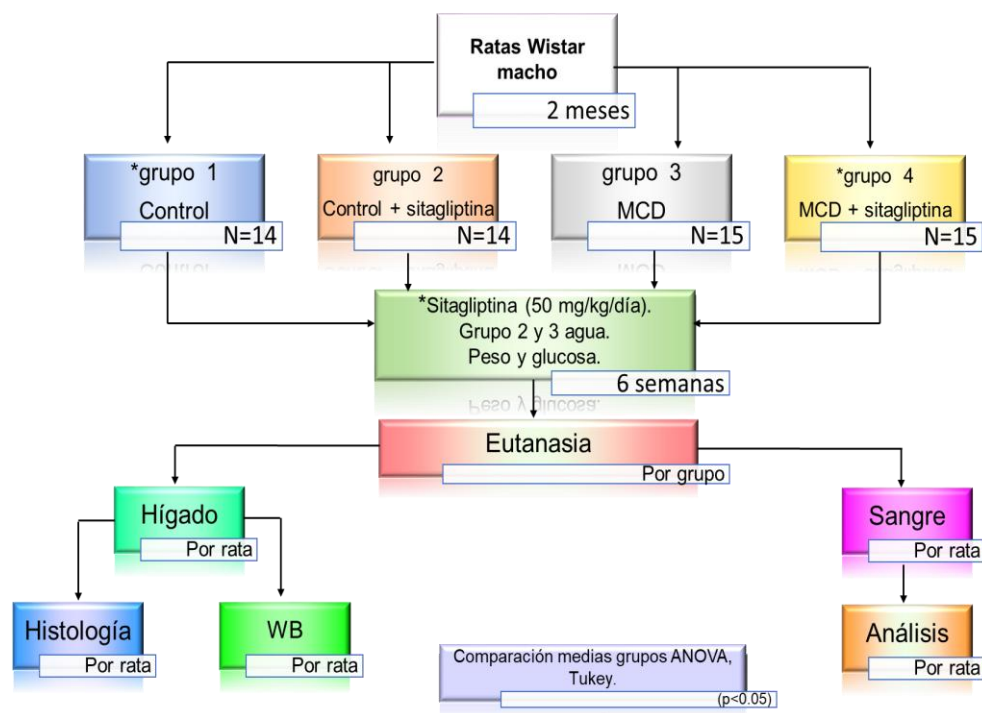


Figura 18. Diseño experimental.

8.2 Objetivo 1. Inducción de hígado graso en ratas tratadas con una dieta deficiente en metionina/colina (MCD).

Para desarrollar la NASH se utilizó una dieta sin los aminoácidos metionina y colina, que es una amina cuaternaria saturada cuya fórmula química es $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OHX^-$, donde X^- es un contraión como el cloruro, hidroxilo o tartrato. Es considerada como parte del complejo de la vitamina B. Diseño experimental (Figura 18).

Los grupos de estudio se conformaron de la siguiente manera:

Grupo 1 Control: Alimento New Purina Rodent Laboratory Chow* 5001 (Lab Dyet; Sant Luis, Misuri. USA) comercial, (Galef, 1981; Gaona, 2011).

Grupo 2 Control/sitagliptina (Control+sita): Dieta: Alimento New Purina Rodent Laboratory Chow* 5001 comercial. A este grupo se le suministró sitagliptina (50mg/Kg) (Januvia, Merck Sharp & Dohme Ltd. Cramlington; Reino Unido) por ingestión forzada mediante una cánula.

Grupo 3 MCD-Inducción de NASH: Dieta MCD (deficiente en metionina y colina). Marca Dyets Inc. (Easton Avenue Bethlehem, Pennsylvania, USA) (Jung *et al.*, 2014).

Grupo 4 MCD/sitagliptina (MCD+sita): Dieta MCD más sitagliptina (50mg/Kg). Marca Dyets Inc. Sitagliptina (50 mg/Kg) por ingestión forzada mediante una cánula.

A los animales se les mantuvo siempre con comida y agua *ad libitum*. Con un ciclo de luz/obscuridad de 12X12 horas. Después de 6 semanas los animales fueron sacrificados mediante eutanasia en una cámara de dióxido de carbono y se obtuvo la sangre y el hígado. Las muestras de los tres grupos fueron manipuladas de la misma manera. Los hígados se analizaron macroscópicamente y fueron colocados en solución de PBS (buffer fosfato salino marca Sigma Aldrich), se lavaron y se cortaron muestras para ser fijadas en PAF (paraformaldehído), formol al 10% y congeladas.

La sangre se obtuvo por decapitación y se colectó en un tubo con anticoagulante heparina. El plasma se obtuvo por centrifugación (800 g, 20 minutos) a 4°C.

Algunas muestras de tejido fueron congeladas con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

8.3 Objetivo 2. Caracterizar el modelo de estudio determinando los niveles séricos de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, leptina, transaminasas, creatinina, ácido metilmalónico, homocisteína, ácido úrico y metionina en ratas alimentadas con MCD y sitagliptina.

8.3.1 Glucosa

Se determinó la concentración de glucosa todos los días a la misma hora mediante la obtención de una gota de sangre de la cola de la rata después de 12-15 horas de ayuno nocturno, la cual se colocó en una tira reactiva y se leyó en un glucómetro digital (Accu-CheckPerforma®, Roche Diagnostics, SL.) (Urzúa, 2011).

8.3.2 Insulina

La determinación de los niveles de insulina en plasma se realizó mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), específico para esta hormona. Siguiendo el procedimiento establecido por el Kit comercial a utilizar (EZRMI-13K Rat/Mouse Insulin ELISA marca Merckmillipore). y el equipo lector de Epoch Microplate Spectrophotometer marca BioTek.

8.3.3 Creatinina, homocisteína, metionina, ácido úrico, ácido metilmalónico ácidos grasos, colesterol, triglicéridos, transaminasas, SAM, SAH y acilcarnitinas.

La determinación de creatinina y ácidos grasos libres se realizará utilizando kits específicos para espectrofotometría (Merck, Biosystems). Los triglicéridos, colesterol total, LDL-C (colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad), HDL-C (colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad) se determinaron por espectrofotometría, en un aparato multiparamétrico (con espectrofotómetro integrado, AU2700 Olympus, marca Beckman Coulter, Francia) con una absorbancia de 660-800 nm para triglicéridos, 540-600 nm para colesterol. Las transaminasas y ácido úrico se determinaron por espectrofotometría para una absorbancia de 340 nm, (AU2700 Olympus, marca Beckman Coulter). El ácido metilmalónico, SAM (S- Adenosil metionina) y SAH (S- Adenosil L-homocisteína) y acilcarnitinas fue analizado por cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a detección por espectrofotometría de masas. La homocisteína midió en espectrometría de masas en tándem LC/MSMS, Qtrap 4000 Sciex. La metionina se midió por cromatografía líquida con cambio de iones en un aparato JEOL.

8.3.4 Leptina e incretinas.

El análisis en plasma de leptina, GLP-1 y GIP, se realizó mediante ELISA específico. Siguiendo el procedimiento establecido por los Kits comerciales (Mouse/Rat Leptin ELISA marca ALPCO, 22-LEPMS-E01), (CliniSciences S.A.S.) y el equipo lector de Thermo Scientific™ Multiskan™ FC with incubator.

8.3.5 Objetivo 3. Caracterizar la esteatosis hepática del modelo de estudio desde el punto de vista histológico para determinar visualmente la acumulación de lípidos

El hígado disecado se cortó de la siguiente forma: el lóbulo mayor, se dividió en tres partes, quitando previamente la periferia. Una parte se conservó en PAF; otra, se conservó en Formol y la última, se congeló en nitrógeno líquido en criotubos. Se fijaron los tejidos en una solución de formalina al 10% durante 48 horas.

Después del tiempo de fijación el tejido de hígado:

- 3 lavados con PBS durante 10 minutos.
- Conservaron en etanol 70% tiempo indeterminado, hasta su procesamiento.

Los tejidos fueron lavados, deshidratados, aclarados y se hizo la inclusión en parafina para elaboración del bloque.

Con un micrótopo se cortaron las muestras con un espesor de 5 μm . Los cortes, se secaron durante 14 horas a 37°C. Después de esto, las muestras fueron hidratadas incubándolas 2 minutos en xilol, etanol absoluto, etanol al 70%, etanol al 50% y agua. Utilizamos la técnica de tinción Hematoxilina y Eosina, la hematoxilina, al ser un colorante básico tiñe los núcleos de azul, citoplasma en rosa, musculo en tonos rojos y la fibrina en rosa intenso. Por otro lado, la eosina es un colorante ácido lo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva, tiñe componentes y organelos citoplasmáticos, colágena y fibras musculares. La coloración resultante de la tinción con eosina es rosada anaranjada para citoplasmas y rojo intenso en el caso de eritrocitos.

Primero se colocaron las muestras en hematoxilina de Harris 5 minutos, después en agua corriente 7 segundos, agua destilada 7 segundos, alcohol acidulado 3 segundos, agua amoniacal 3 minutos, eosina Carnegie 20 segundos, después deshidratamos en alcohol al 96%, alcohol absoluto 2 veces. Realizamos el paso de aclarar muestras, colocamos en xilol 5 minutos, finalmente montamos en laminillas con medio de montaje Entellan para ser observadas al microscopio óptico (Axio Lab.A1, Zeiss). Se realizará el análisis mediante el analizador de imágenes ZEN PRO (Zeiss) y se tomarán fotografías con una cámara integrada al microscopio (AxioCamERc 5s, Zeiss).

El rojo sirio tiñe las fibras conectivas de un color rojo intenso y los núcleos y citoplasmas de las células tubulares de rojo débil y amarillo brillante.

Después de desparafinar e hidratar las muestras, lavamos con agua corriente durante 10 minutos, fueron teñidas con solución rojo sirio 30 minutos a temperatura ambiente, deshidratamos en alcohol absoluto, se realizó el aclaramiento se realizó en xilol dos pases durante 2 minutos cada uno y finalmente hicimos el montaje para ser observadas al microscopio óptico (Axio Lab.A1, Zeiss). Se realizó el análisis mediante

el analizador de imágenes ZEN PRO (Zeiss) y se tomarán fotografías con una cámara integrada al microscopio (AxioCamERc 5s, Zeiss).

El análisis histológico fue realizado utilizando elementos semicuantitativos centrados en lesiones necroinflamatorias, fibrosis y esteatosis, como suele hacerse para analizar la hepatitis C crónica en la patología humana. Se determinó el porcentaje de hepatocitos que muestra la acumulación de lípidos como sigue: 0 (ninguno), 1 (10%), 2(10-30%), 3 (30%) (Blaise *et al.*, 2007).

8.3.6 Objetivo 4. Caracterización de la expresión de proteínas.

Para cumplir con el objetivo 4, se obtuvo el hígado mediante disección, se realizaron varios lavados en PBS (frío) y el lóbulo de mayor tamaño fue seccionado en trozos de aproximadamente 1 cm. Cada trozo se colocó en un tubo debidamente rotulado y se congeló en nitrógeno líquido para después almacenarse a -80°C. De cada muestra de hígado, se pesaron 200 miligramos de tejido, y se colocaron 550 µL de amortiguador RIPA, conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma, St. Louis, MO) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), para realizar la lisis de los hepatocitos a 4°C. Fue macerada cada muestra de tejido en mortero con nitrógeno líquido. Incubamos 10 min en hielo, posteriormente homogeneizamos 10 veces con una jeringa de 1 ml. Realizamos 3 ciclos de congelación/descongelación (nitrógeno/baño de agua a 37 °C), finalmente centrifugamos a 12000 rpm - 30 min - 4°C. Recuperamos el sobrenadante, obtuvimos alícuotas y fueron almacenadas a -80 ° C.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de BCA (ácido bicinconínico) (Thermo Scientific™ Ensayo de proteínas Pierce™ BCA™), se analizó en espectrofotómetro Wallac 1420 Victor3 Microplate Reader se midió absorbancia a 570nm.

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de sodio dodecil sulfato (PAGE-SDS). Se preparará el gel de concentración al 4% y de separación a 12% de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970).

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa que se equilibró con amortiguador de Towbin (1X) por 30 minutos. Se colocará un sándwich dentro del casete compuesto por una esponja, la hoja de papel filtro, el gel, la membrana, la hoja

de papel filtro y la esponja. La transferencia corrió a 0.35A por 50 minutos en una cámara de transferencia con amortiguador frío. Utilizamos rojo de Ponceau para teñir las membranas durante 5 minutos, lavamos con amortiguador de bloqueo TBS-T20 (TBST20-5%)

Para el Western blot, se bloquearon las membranas con 20 mL de una solución de leche descremada al 5% en TBS-T20 (TBST20-5%) por 1h15 a temperatura ambiente, se eliminó la solución de bloqueo posteriormente agregamos los anticuerpos primarios anti MMP2, α -SMA, Col1-A2, respectivamente diluidos en leche o BSA (albúmina de suero bovino) (TBST20-5%); se incubaron durante 1 noche en movimiento continuo a 4°C. Se realizaron 4 lavados con TBS-T20 de 10 minutos cada uno. Se agregó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y se incubaron por una hora a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron cuatro lavados de 10 minutos.

Se revelaron con el kit Clarity and Clarity Max ECL Western Blotting Substrates, se analizaron con un fotodocumentador Fusion Fx7, (Timmons y Dunbar, 1990). Se llevará a cabo un análisis de densidad óptica con el que se podrá comparar la expresión de proteínas de cada muestra.

8.3.7 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado usando células de al menos 3 animales de experimentación. Las variables cualitativas fueron expresadas en número y porcentaje y las variables cuantitativas en promedio y desviación estándar (sd). Para la comparación de medias de diferentes grupos se utilizaron primero un análisis de varianza (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por la prueba de Tukey. Utilizamos el programa SPSS20.0 (IBM Corp. 2011, Armonk, NY, USA). El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

9 Resultados

9.1.1 Inducción del hígado graso no alcohólico mediante la dieta MCD y tratamiento con sitagliptina.

Las ratas macho de la cepa Wistar fueron solicitadas al Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa; y se mantuvieron bajo las reglas de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, en donde se encuentran las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Se mantuvieron bajo ciclo de 12 horas luz/obscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Se realizó un registro del peso y de las medidas de glucosa cada semana.

El efecto de la dieta se observa en la talla de las ratas (Figura 19).



Figura 19. Diferencia entre ratas de grupo Control (flecha verde) y grupo MCD (flecha blanca).

9.1.2 Curva de incremento de peso de las ratas tratadas con la dieta MCD y tratadas con sitagliptina

La relevancia de analizar el peso radica en la estrecha relación entre la NAFLD con la obesidad. Además, se busca verificar el posible efecto que la dieta MCD pueda tener sobre este parámetro.

Al obtener el resultado observamos, un incremento normal en los grupos de estudio control durante todo el estudio, mientras que los grupos alimentados con dieta MCD presentaron una disminución de peso a partir de la segunda semana de estudio, dicha disminución se hizo significativa en la tercera semana y mantuvo ese patrón hasta el final del estudio (Figura 20).

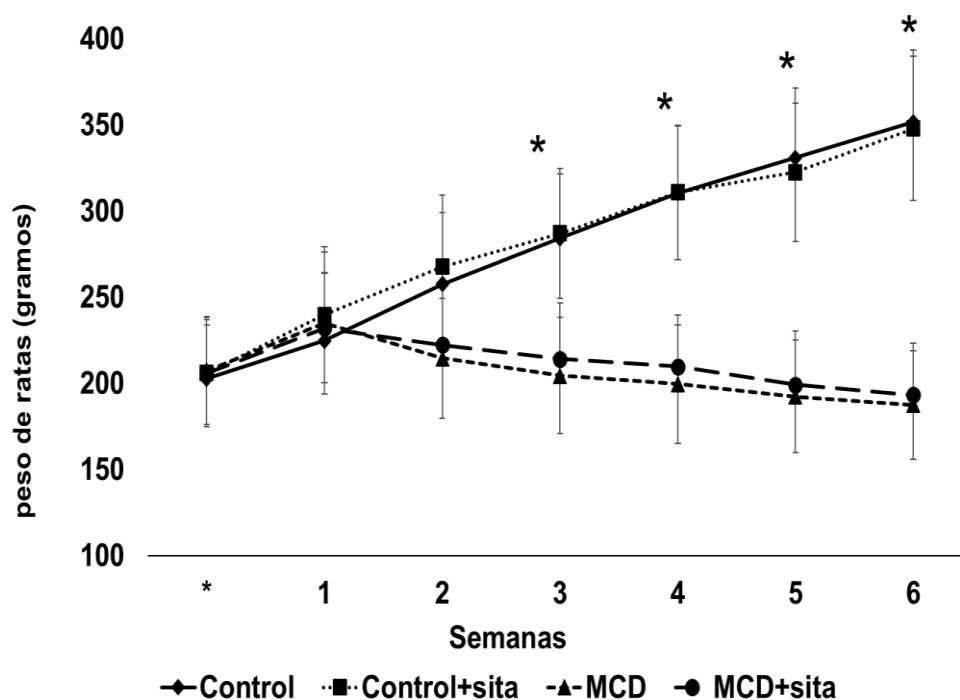


Figura 20. Peso de ratas tratadas con MCD (dieta deficiente en metionina y colina) y sitagliptina. Se observa una disminución de peso en los grupos alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina. * diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos a partir de la semana 3.

9.1.3 Determinación de parámetros metabólicos sanguíneos de las ratas tratadas con la dieta MCD y tratadas con sitagliptina

9.1.3.1 Glucosa, insulina, índice Homa-IR y Leptina.

El análisis de los parámetros metabólicos es esencial, dado que la NAFLD ha sido estrechamente relacionado con el aumento de glucosa en sangre, así como con la obesidad y la hiperinsulinemia. La resistencia a la insulina es la afección metabólica más vinculada con la NAFLD; se caracteriza por la disminución de la respuesta celular a la acción de la insulina. Esta situación conduce a la aparición de hiperglucemia e hiperinsulinemia, lo que activa factores de transcripción en el hepatocito, promoviendo así un aumento en la glucólisis y en la síntesis de lípidos. Podemos observar disminución en los niveles plasmáticos de glucosa en los grupos control y MCD (Figura 21). Los niveles de insulina en plasma disminuyeron drásticamente en los grupos de MCD y MCD+sitagliptina (Figura 22). La resistencia a la insulina, se calculó utilizando el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), utilizando la fórmula:

$$\frac{[\text{Glucosa en ayunas (mmol/l)} \times \text{Insulina en ayunas (mU/l)}]}{[22.5]}$$

Tomando como indicativo de insulino-resistencia un valor superior a 3.8. (La Corte *et al.*, 2008). El índice de resistencia a la insulina fue analizado debido a su amplio uso en aplicaciones clínicas en pacientes con NAFLD, ya que se correlaciona con el control de la glucosa en pacientes no diabéticos. Además, nos permite verificar el estado de respuesta de la insulina después de la administración de dieta y fármaco. Podemos observar valores menores a 3 correspondientes al índice HOMA-IR en los grupos con dieta MCD y MCD+sitagliptina; indicando así que ambos grupos no presentan insulino-resistencia.

Medir el nivel plasmático de las incretinas fue importante ya que este, este depende de las concentraciones de glucosa en plasma. Si se presenta hiperglucemia, habrá un mayor efecto de estas hormonas, lo que indica que en caso de hipoglucemia las incretinas serán secretadas en cantidad menor. Además, esta medición nos permitió corroborar si la sitagliptina, como inhibidor de la DPP4, tuvo algún efecto sobre las concentraciones de incretinas. La dieta MCD disminuyó significativamente la

concentración de GLP-1 y no produjo cambios en GIP, en comparación con la dieta de control. Se observa que la sitagliptina no tuvo efecto sobre GLP-1 y GIP ni en el control, ni en grupos con dieta MCD. El tratamiento con sitagliptina no modificó la disminución de GLP-1 producido por MCD. Por el contrario, agravó ligeramente el aumento de GIP observado en animales MCD, en comparación con los grupos controles. (Figura 23)

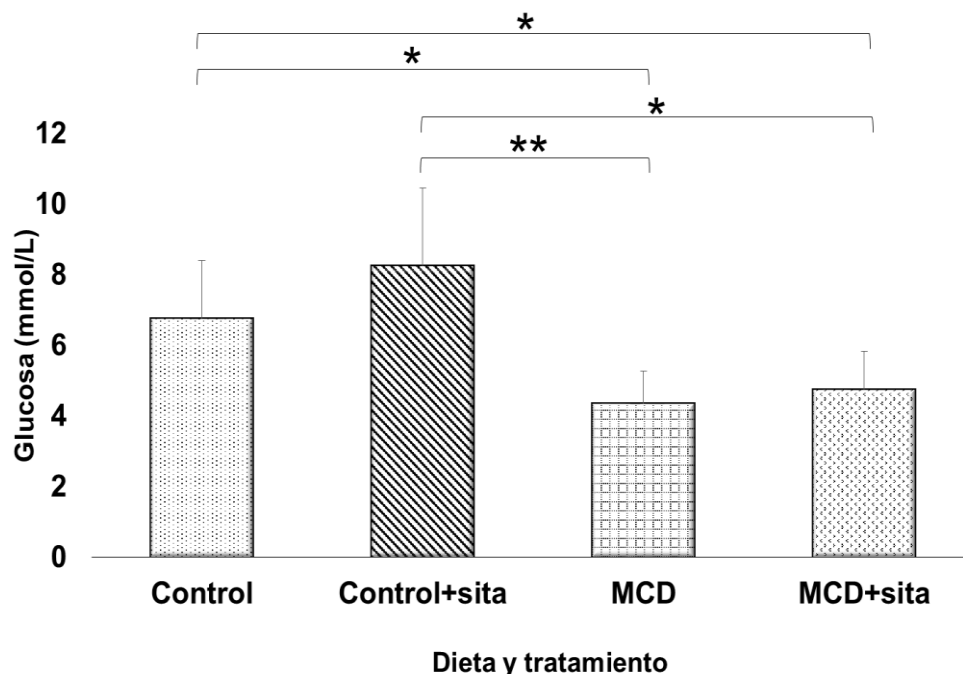


Figura 21. Análisis de glucosa en plasma. Determinación de niveles de glucosa del plasma obtenido al finalizar el tiempo de estudio. Niveles inferiores en los grupos con dieta deficiente (MCD, MCD+sitagliptina). * diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos control. ** diferencia significativa ($p < 0.005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control $n=14$, Control+sitagliptina $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sitagliptina $n=15$

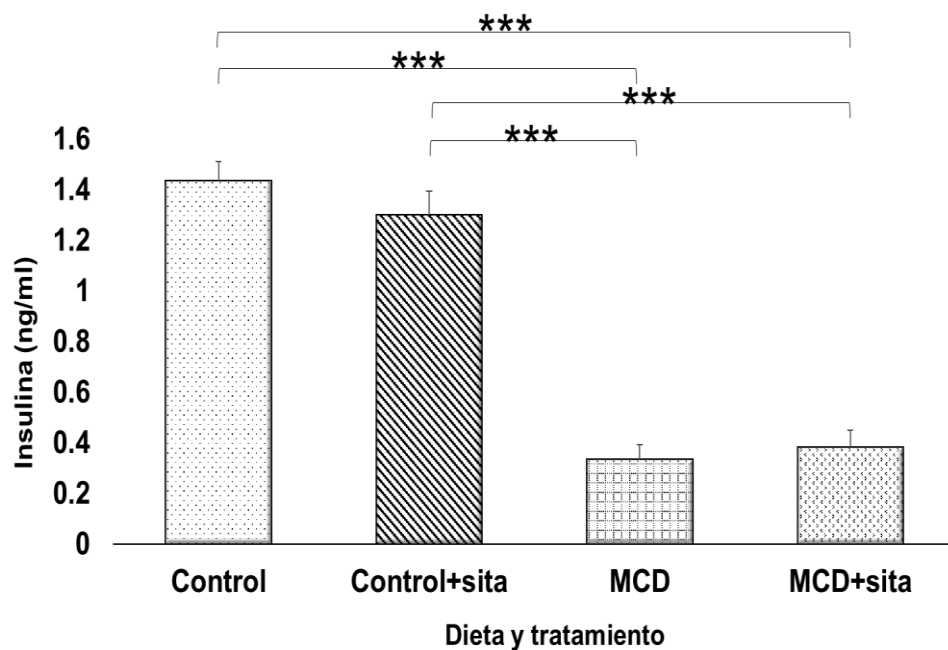
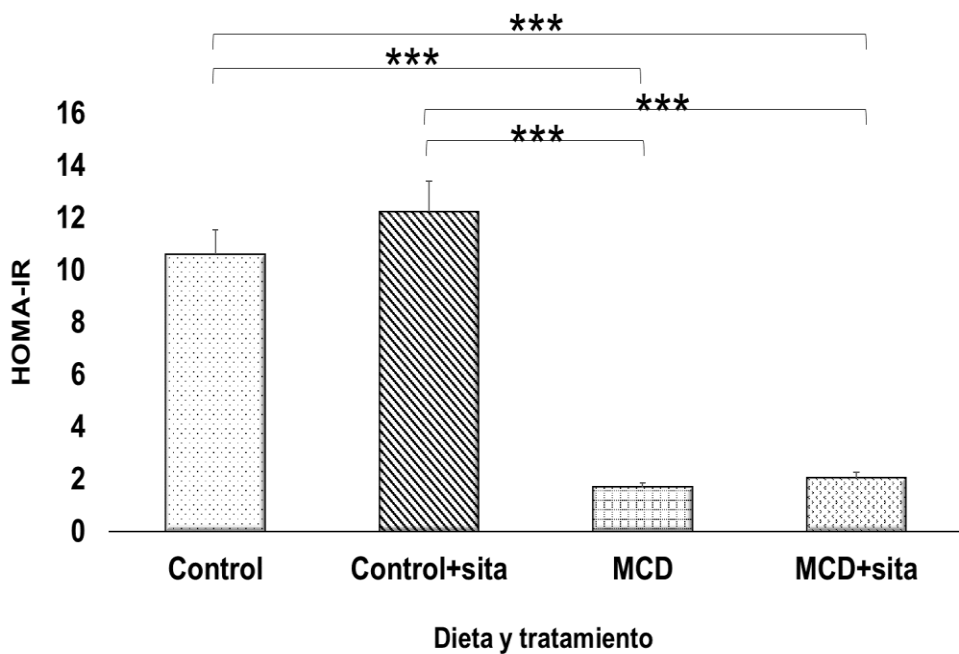


Figura 22. Análisis de insulina. Disminución en los niveles plasmáticos de los grupos MCD y MCD+sita. *** diferencia significativa ($p < 0.0005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

a)



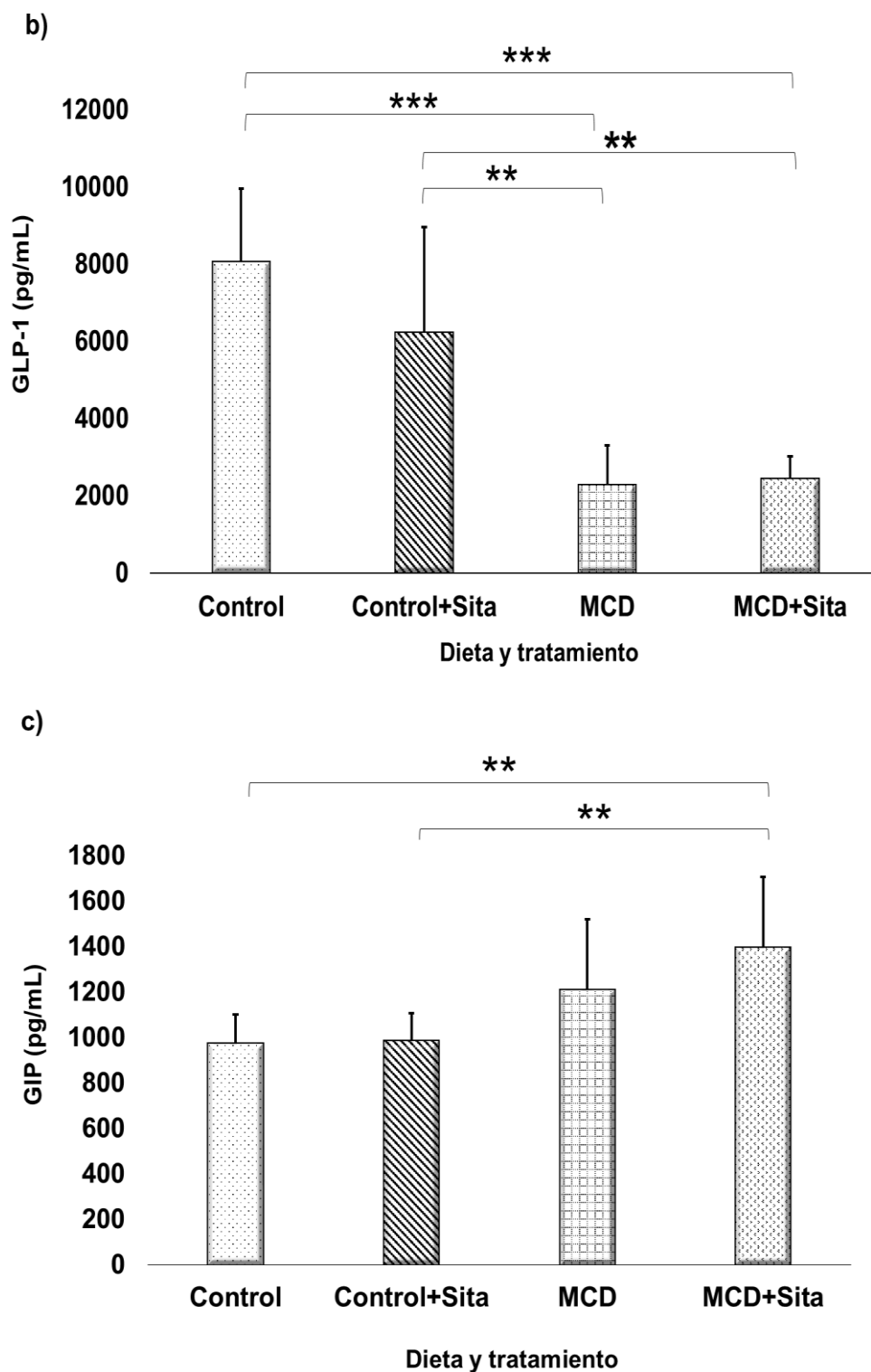


Figura 23. **23a)** Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), valor menor a 3 en los grupos con dieta MCD y MCD+sita; indicando así que ambos grupos no presentan insulino-resistencia. ***diferencia significativa ($p < 0.0005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. **23b)** Incretinas, la dieta MCD disminuyó el nivel de GLP-1 y la sitagliptina no revirtió el efecto. **23c)** El nivel sérico de GIP no fue modificado por la dieta MCD y la sitagliptina aumentó leve pero no significativamente su concentración en grupos MCD. (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, * $p < 0,05$). Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n= 15$.

Una función de la leptina está relacionada con la limitación del almacenamiento en los adipocitos y en tejidos no adiposos como el hígado, protegiéndolos de la lipotoxicidad y la lipoapoptosis. Dado que la leptina es secretada en proporción a la cantidad de tejido adiposo en el cuerpo y por el papel que se ha observado que desempeña en el desarrollo de la NAFLD, decidimos analizar los niveles séricos de dicha hormona. El análisis de leptina en plasma de ambos lotes arrojó como resultado, que el grupo MCD (dieta deficiente en metionina y colina) presenta niveles más bajos de esta hormona en comparación con el grupo MCD+sitagliptina; también podemos ver que la sitagliptina restituye de cierta manera los niveles de leptina en el grupo MCD suplementado con sitagliptina (Figura 24).

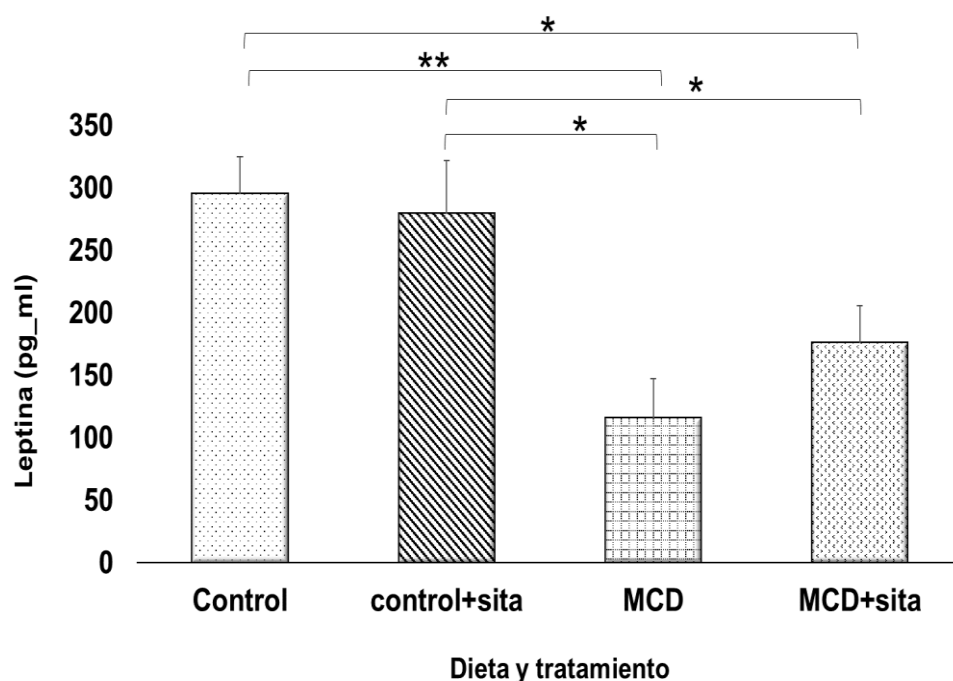
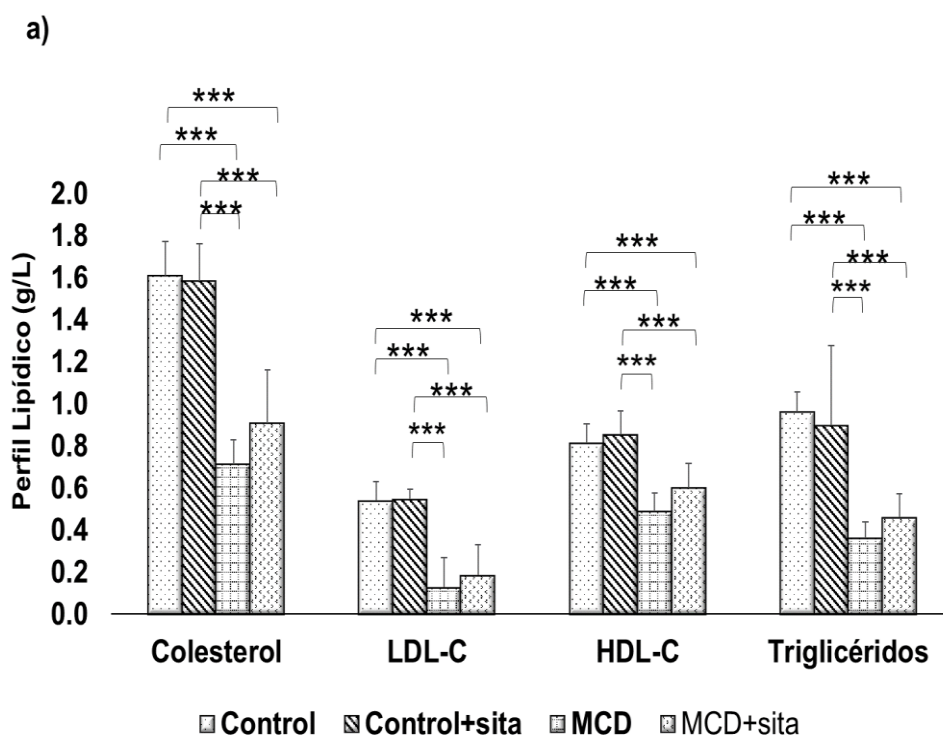


Figura 24. Niveles séricos de Leptina después de seis semanas de estudio. Niveles bajos en grupo MCD. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupo Control+sita y MCD+sita, control+sita y MCD. **diferencia significativa ($p < 0.005$) entre grupo control y grupos MCD. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

9.1.3.2 Perfil lipídico, ácidos grasos libres y acilcarnitinas.

Determinar el perfil lipídico de los animales de estudio, nos permitiría corroborar la relación de la dislipidemia con la NAFLD, que es una característica comúnmente asociada con la obesidad y, en algunos casos, con la diabetes. El perfil de lípidos en plasma de las ratas muestra una disminución dramática de los niveles de triglicéridos, HDL, LDL y colesterol total en los grupos que recibieron una dieta MCD. Observamos un ligero aumento, aunque no significativo de ácidos grasos libres en el grupo MCD+sita en comparación con los otros grupos. La cuantificación de las acilcarnitinas se debió a su importancia en el transporte de los ácidos grasos hacia la β -oxidación. Además, observamos en el mismo grupo un aumento de acilcarnitinas de cadena larga (Figura 25)



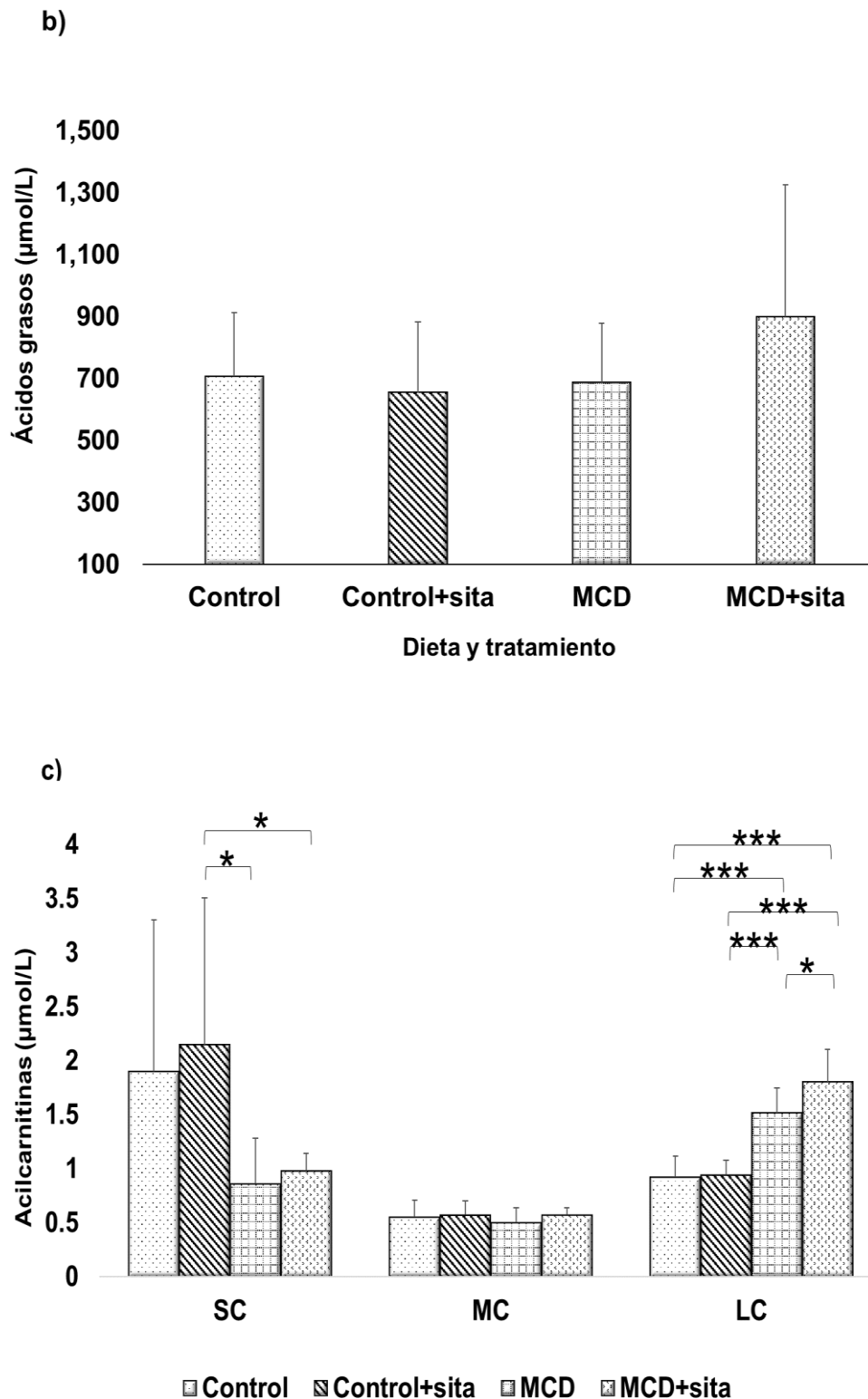


Figura 25. **25a)** Perfil lipídico en plasma de los cuatro grupos de estudio, no observamos un efecto fuerte de sitagliptina. **25b)** Ligeró aumento, aunque no significativo de los ácidos grasos libres en el grupo MCD+sita. **25c)** Niveles plasmáticos elevados de carnitinas de cadena larga en un grupo con una dieta deficiente y suplementados con sitagliptina. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos con

dieta deficiente MCD. **diferencia significativa ($p < 0.0005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$. ACs (acilcarnitinas), ACs SC (acilcarnitinas de cadena corta), ACs MC (acilcarnitinas de cadena media), ACs LC (acilcarnitinas de cadena larga)

9.1.3.3 Creatinina y ácido úrico

Algunas de las comorbilidades asociadas con la NAFLD incluyen la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares y posiblemente la enfermedad renal crónica (Sun *et al.*, 2021). Algunos estudios sugieren que los niveles elevados de ácido úrico pueden contribuir a la resistencia a la insulina, lo que está estrechamente relacionado con el síndrome metabólico y, por ende, con la NAFLD (Choi *et al.*, 2023). Teniendo en cuenta esta información, decidimos realizar el análisis de ambos parámetros. Los resultados indicaron que los niveles plasmáticos de creatinina aumentan en los grupos alimentados con dieta MCD. Por otro lado, el ácido úrico no se modifica significativamente, siendo los grupos control y control+sitagliptina los que presentan un aumento (Figura 26-27).

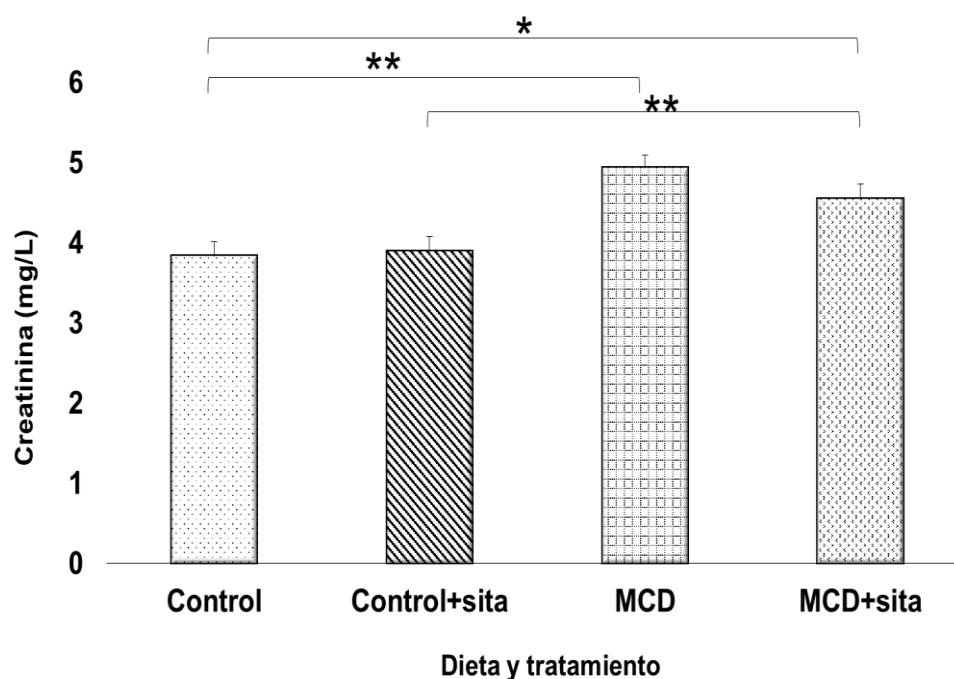


Figura 26. Creatinina. Los grupos MCD presenta una diferencia significativa * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.005$) con respecto a los grupos control. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

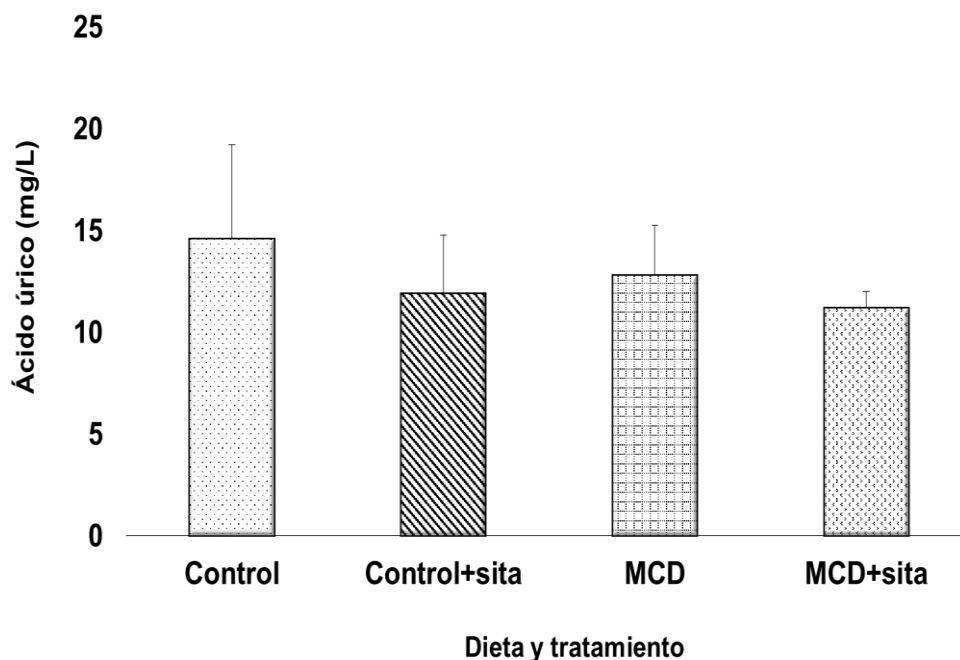


Figura 27. Ácido úrico. Los grupos alimentados con dieta MCD no presentan una diferencia significativa * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.005$) con respecto a los grupos control. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

9.1.3.4 Transaminasas

Debido a que las transaminasas, son biomarcadores de lesión hepática, es decir, sus niveles plasmáticos se elevan en el torrente sanguíneo en respuesta a una lesión en el hígado, incluimos la medición de estas enzimas en nuestros objetivos. Los niveles de AST (aspartato aminotransferasa) son mayores en los grupos de estudio, principalmente en el grupo MCD+sita (dieta MCD suplementada con sitagliptina), ALT (alanino aminotransferasa) presenta un gran aumento en el grupo MCD (Figura 28), por lo que la relación AST/ALT es un indicador exitoso de la gravedad de la lesión hepática, En este estudio, esta proporción se redujo en ambos grupos de MCD (Figura 29).

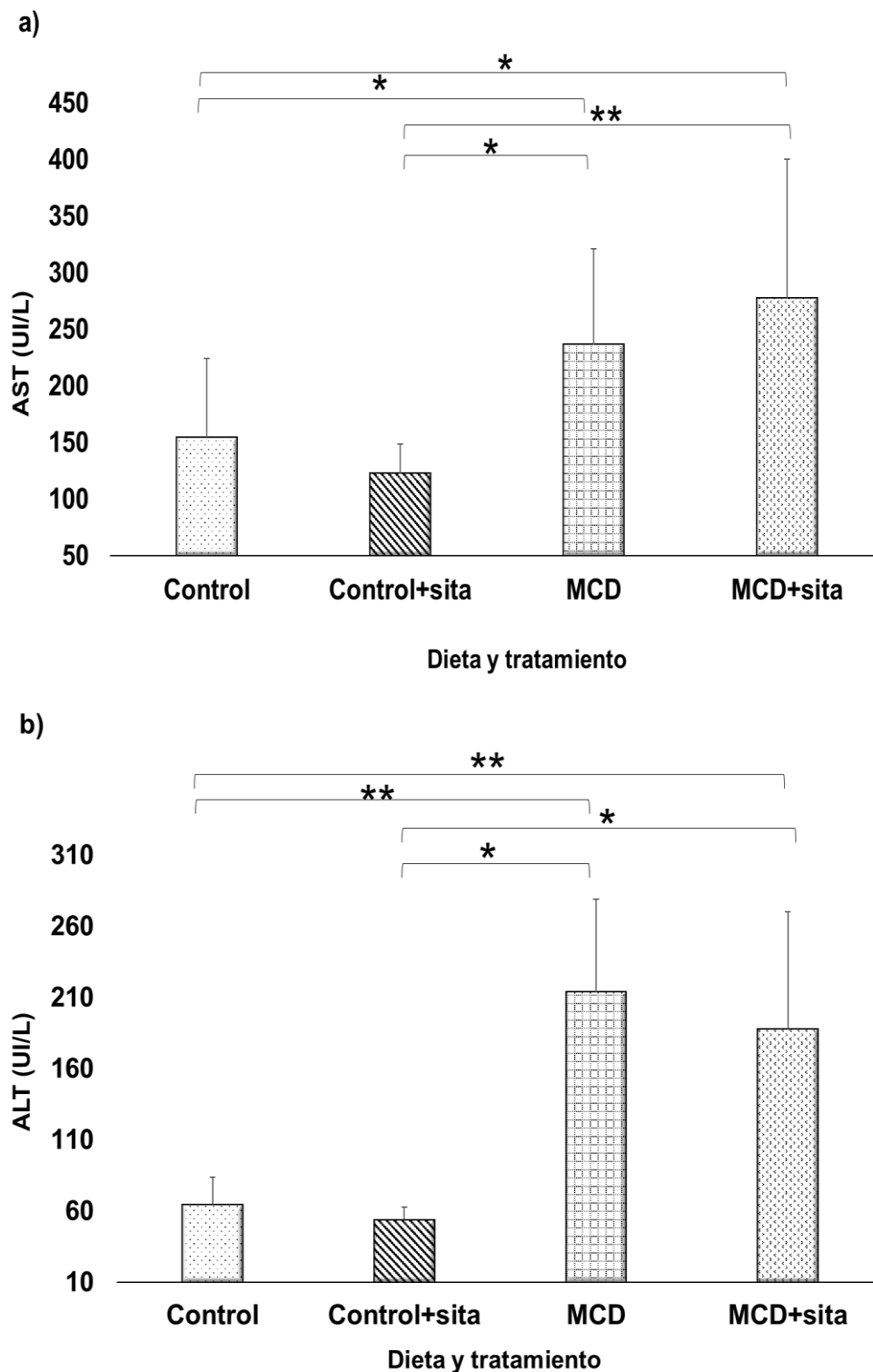


Figura 28. Transaminasas, **28a)** ALT y **28b)** AST, muestran el comportamiento esperado en casos de NAFLD. *diferencia significativa ($p<0.05$) entre grupos con dieta deficiente MCD. ** Diferencia significativa ($p<0.005$) entre grupos con dieta deficiente MCD. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

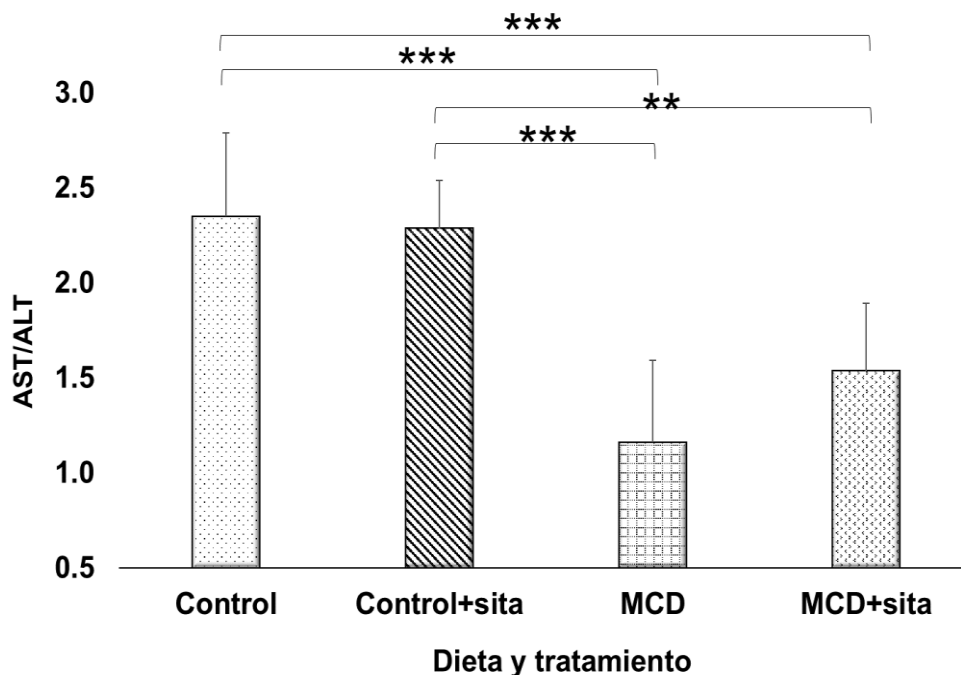


Figura 29. La evaluación de la relación de transaminasas AST/ALT nos muestra bajos valores séricos en las medias de los grupos con dieta deficiente en metionina y colina. ** diferencia significativa ($p < 0.005$), *** diferencia significativa ($p < 0.0005$) entre grupos. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

9.1.4 Metabolismo de mono carbonados

Se llevó a cabo el análisis del metabolismo de 1C se realizó, debido a que este proceso ocurre principalmente en el hígado y una deficiencia en él puede tener efecto en el daño hepático. Además, la dieta utilizada para inducir la acumulación de grasa en el hígado, provino de una dieta deficiente en metionina. Observamos un nivel mayor de metionina en el grupo MCD en comparación con el resto de los grupos (Figura 30). El ácido metilmalónico (MMA) después de ser analizado nos indica bajos niveles promedio en el grupo MCD y MCD+sita (Figura 31).

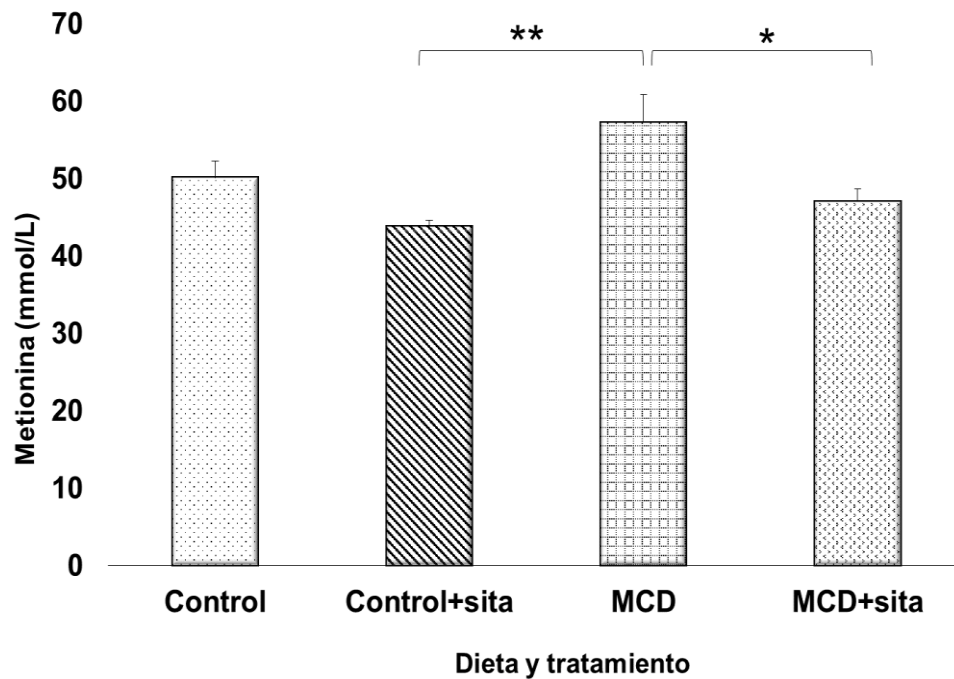


Figura 30. Metionina. Niveles bajos en plasma del grupo Control+sitagliptina. Así como diferencias significativas * ($p<0.05$) y ** ($p<0.005$) entre los grupos de estudio MCD y MCD+sitagliptina. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n= 15$

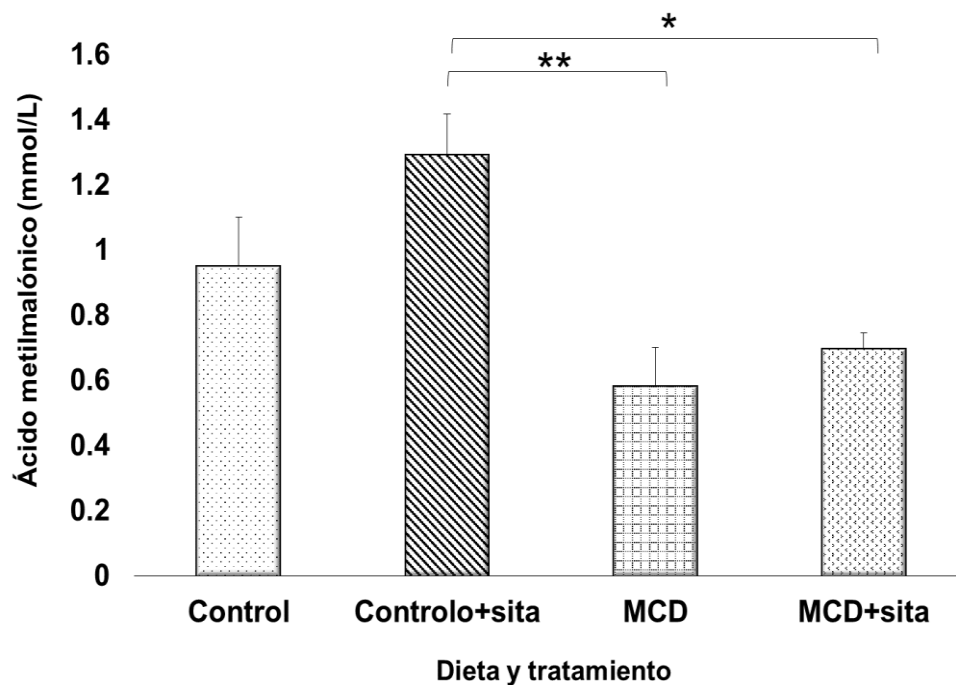


Figura 31. Niveles séricos de Ácido metilmalónico (MMA), valores bajos en los grupos con dieta deficiente en metionina y colina con diferencia significativa * ($p<0.05$), ** ($p<0.005$) entre grupos control+sita y los grupos MCD. Control $n=14$, Control+sita $n= 15$.

La homocisteína, presentó niveles altos en los grupos MCD+sitagliptina (MCD+sita) (Figura 32). Los niveles séricos de S-Adenosil L-homocisteína (SAH) y S-Adenosil metionina (SAM) son elevados en los grupos de estudio con dieta deficiente MCD y MCD+sitagliptina (MCD+sita) (Figura 33). La relación SAM/SAH presentó niveles bajos (anormales) en los grupos MCD+sitagliptina (MCD+sita). La correlación de la concentración de homocisteína frente a la relación SAM/SAH es negativa y lineal (Figura 34). En la tabla 3 podemos observar los niveles plasmáticos de los parámetros propuestos en el segundo objetivo.

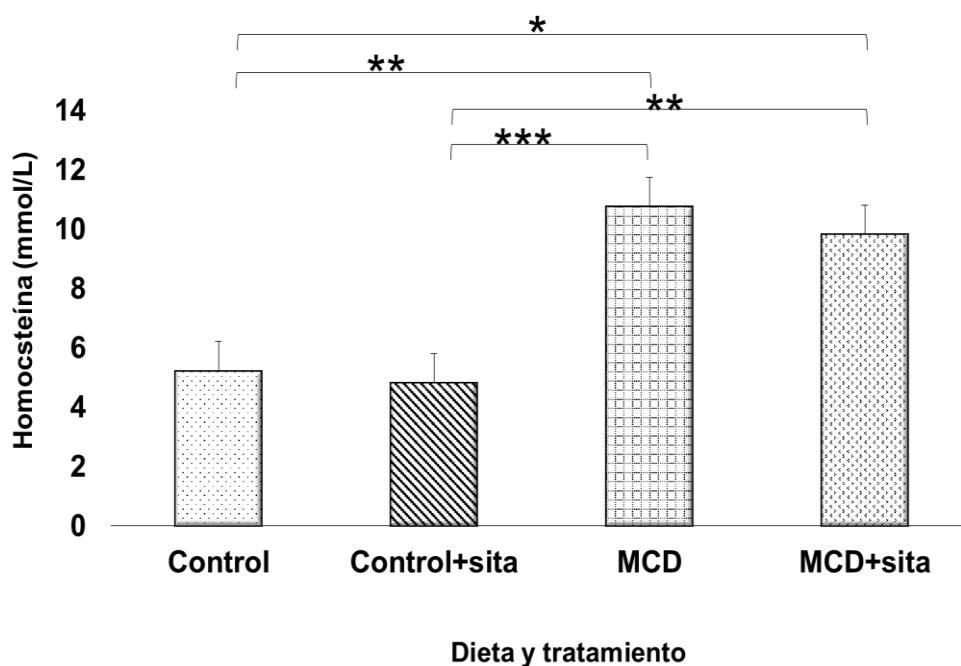


Figura 32. La homocisteína, presentó bajos niveles séricos en ambos grupos control. *diferencia significativa ($p<0.05$) entre los grupos control y MCD. ** diferencia significativa ($p<0.005$) entre los grupos control y dieta deficiente MCD. *** diferencia significativa ($p<0.0005$) entre los grupos Control+sita y grupo MCD. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

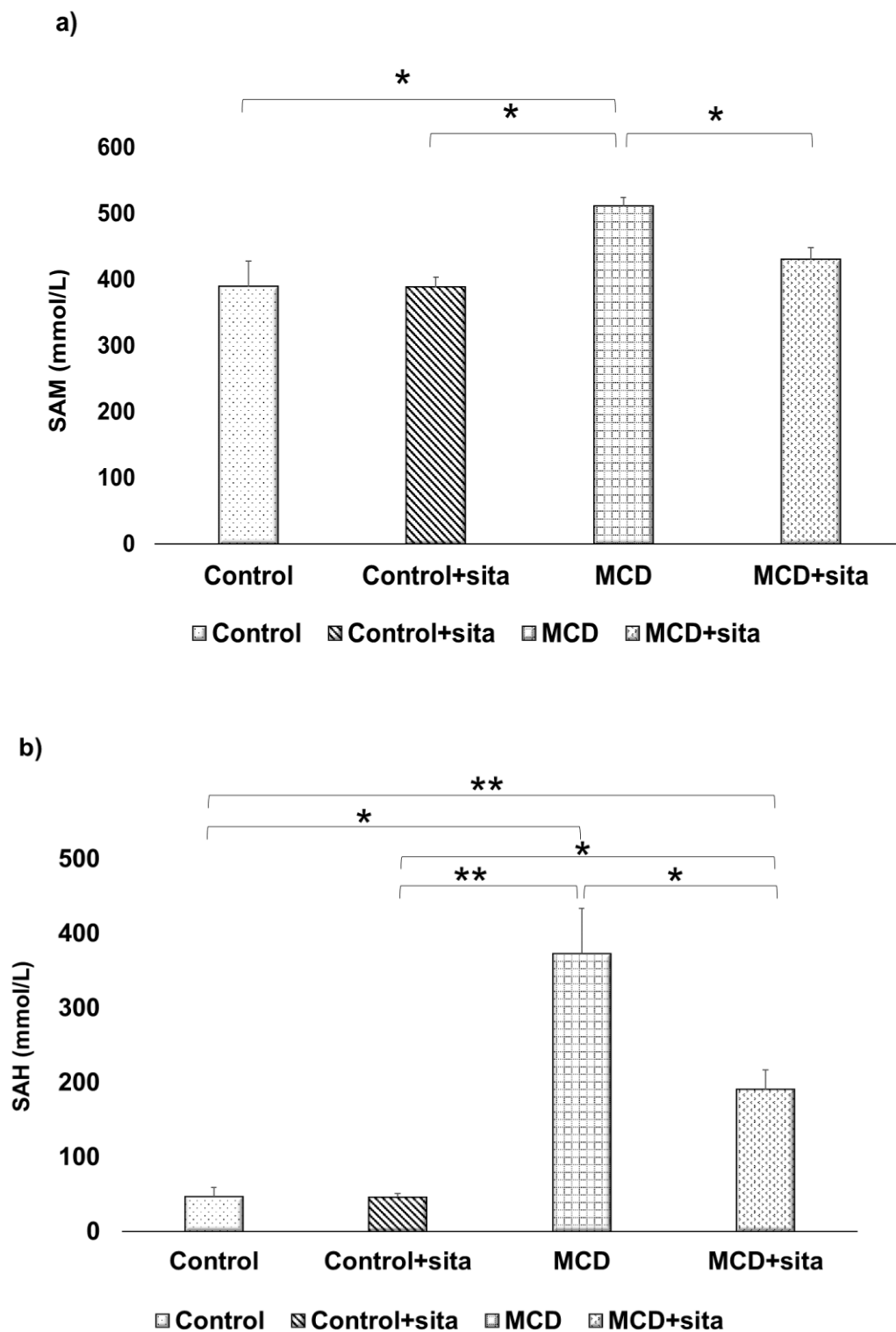


Figura 33. Al analizar **33a)** SAM y **33b)** SAH observamos un aumento en los grupos MCD. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos. ** sin diferencia significativa ($p < 0.005$) entre los grupos. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

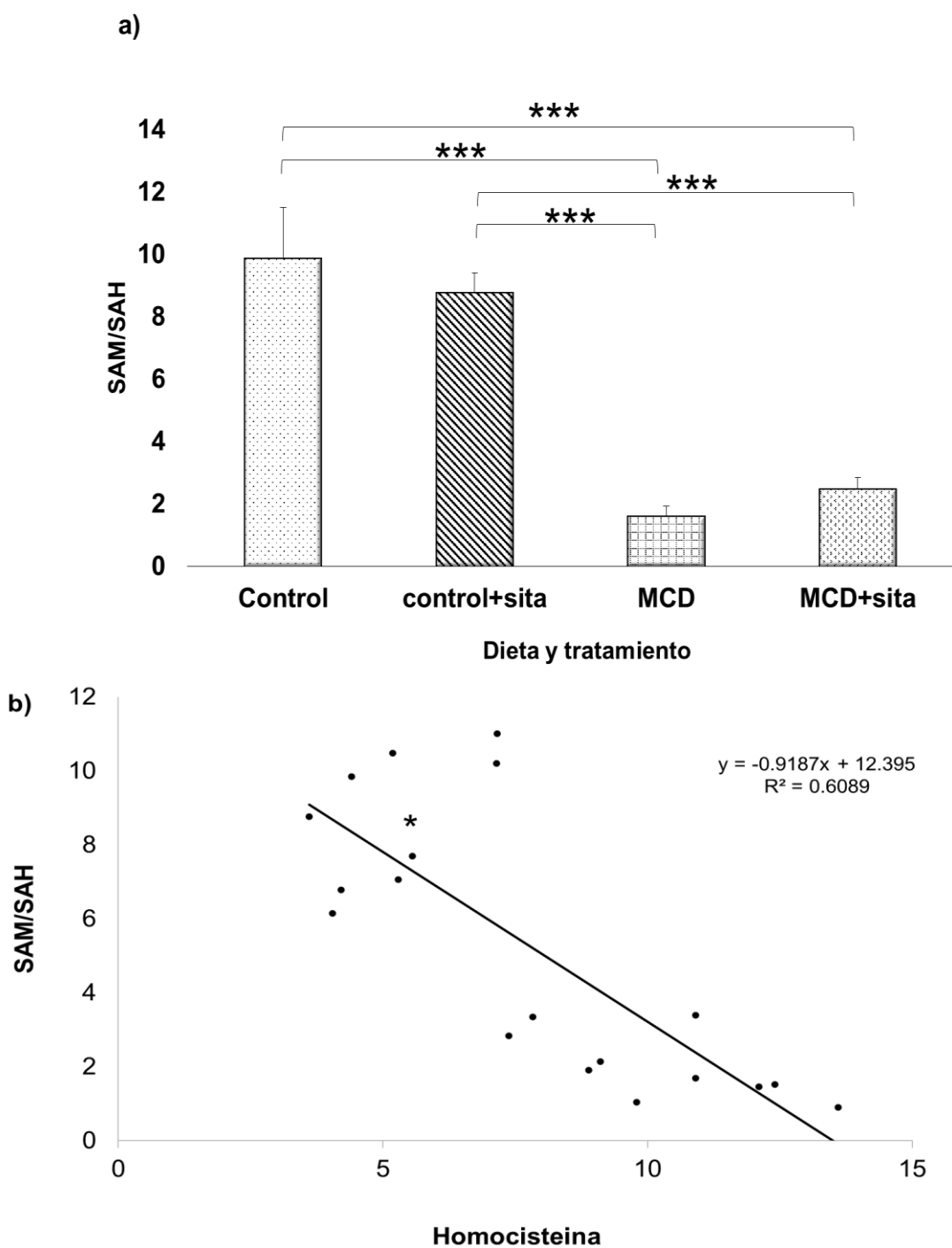


Figura 34. 34a) Altos niveles séricos en los grupos control en la Relación SAM/SAH. Correlación lineal negativa, homocisteína vs relación SAM/SAH. **34b)** Correlación lineal negativa, homocisteína vs relación SAM/SAH. **diferencia significativa ($p < 0.005$) entre los grupos control y los grupos MCD. Control $n=14$, Control+sita $n=14$, MCD $n=15$, MCD+sita $n=15$.

Tabla 3. Datos comparativos de niveles plasmáticos.

Pruebas	Control		Control+Sita		MCD		MCD+Sita	
MMA (mmol/L)	0.9	± 0.14	1.2	± 0.12 ^{a,b}	0.5	± 0.11 ^a	0.6	± 0.04 ^b
Creatinina (mg/L)	3.8	± 0.17 ^{a,b}	3.9	± 0.17 ^d	4.9	± 0.15 ^b	4.5	± 0.17 ^{a,d}
A. Úrico (mg/L)	14.6	± 4.6	11.9	± 2.8	12.8	± 2.4	11.2	± 0.8
TC (g/L)	1.6	± 0.16 ^c	1.5	± 0.17 ^e	0.7	± 0.11 ^{c,e}	0.9	± 0.25 ^{c,e}
LDL (g/L)	0.5	± 0.08 ^c	0.5	± 0.04 ^e	0.1	± 0.14 ^{c,e}	0.1	± 0.14 ^{c,e}
HDL (g/L)	0.8	± 0.09 ^c	0.8	± 0.11 ^e	0.4	± 0.08 ^{c,e}	0.6	± 0.11 ^{c,e}
TG (g/L)	0.9	± 0.28 ^c	0.8	± 0.37 ^e	0.3	± 0.07 ^{c,e}	0.4	± 0.11 ^{c,e}
FFAs (μmol/L)	706.3	± 206.6	654.5	± 228.9	687.4	± 191.11	899.3	± 425.2
ACs t(μmol/L)	61.6	± 15.6	69.4	± 24.1	34.9	± 6.9	45.9	± 5.4
ACs SC (μmol/L)	1.8	± 1.4	2.1	± 1.3 ^a	0.8	± 0.4 ^a	0.9	± 0.1 ^a
ACs MC (μmol/L)	0.5	± 0.15	0.5	± 0.12	0.5	± 0.13	0.5	± 0.06
ACs LC (μmol/L)	0.9	± 0.19 ^c	0.9	± 0.13 ^e	1.5	± 0.23 ^{a,c,e}	1.8	± 0.30 ^{a,c,e}
AST (IU/L)	154.6	± 69.6 ^a	122.6	± 25.7 ^{f,b}	236.5	± 84.8 ^{a,f}	277.5	± 122.9 ^{a,b}
ALT (IU/L)	64.5	± 19.12 ^b	53.6	± 8.92 ^a	213.8	± 65.3 ^{a,b}	187.8	± 82.1 ^{a,b}
AST/ALT	2.3	± 0.44 ^c	2.2	± 0.25 ^{b,e}	1.1	± 0.043 ^{c,e}	1.5	± 0.35 ^{c,b}
GLP-1 (pg/mL)	8063	± 1896 ^c	6221	± 2733 ^b	2270	± 1029 ^{c,b}	2440	± 568 ^{c,b}
GIP (pg/mL)	974.8	± 126.3 ^b	986.3	± 120.8 ^d	1208	± 310.4	1395	± 309.9 ^{b,d}
Leptina (pg/mL)	295.4	± 29.7 ^{a,b}	279.4	± 42.2 ^f	116.0	± 31.3 ^{b,f}	176.2	± 29.5 ^{a,f}
Glucosa (mmol/L)	6.7	± 1.6 ^a	8.2	± 2.2 ^{b,f}	4.3	± 0.9 ^{a,b}	4.7	± 1.0 ^{a,f}
Insulina (mIU/mL)	1.4	± 0.0 ^c	1.3	± 0.0 ^e	0.3	± 0.0 ^{c,e}	0.3	± 0.0 ^{c,e}
HOMA-IR	10.6	± 0.93 ^c	12.2	± 1.16 ^e	1.6	± 0.18 ^{c,e}	2.0	± 0.23 ^{c,e}
Met (mmol/L)	50.1	± 2.12	43.8	± 0.78 ^b	57.2	± 3.6 ^{b,a}	47.0	± 1.6 ^a
HCY (mmol/L)	5.2	± 0.79 ^{a,b}	4.8	± 0.35 ^{d,e}	10.7	± 1.05 ^{b,d}	9.8	± 0.81 ^{a,e}
SAM/SAH	9.8	± 1.6 ^c	8.7	± 0.63 ^e	1.5	± 0.34 ^{c,e}	2.4	± 0.38 ^{c,e}

El valor que se muestra es la media de cada prueba. HCY (homocisteína) , SAM (S-adenosilmetionina), SAH (S-adenosilhomocisteína), TC (colesterol total), LDL (lipoproteínas de baja densidad), HDL (lipoproteínas de alta densidad), TG (triglicéridos), FFAs (ácidos grasos libres), ACs (acilcarnitinas), ACs SC (acilcarnitinas de cadena corta), ACs MC (acilcarnitinas de cadena media), ACs LC (acilcarnitinas de cadena larga), HOMA-IR (índice de resistencia a la insulina), AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), MMA (ácido metilmalónico), A. Úrico (ácido úrico), Met (metionina). Diferencia significativa a y f (p<0.05), b y d (p<0.005), c y e (p<0.0005).

9.1.5 Aspecto macroscópico e Histológico

El hígado disecado se cortó de la siguiente forma: el lóbulo mayor, se dividió en tres partes, quitando previamente la periferia. Una parte se conservó en PAF, otra parte se conservó en Formol y la última parte se congeló en nitrógeno líquido en criotubos.

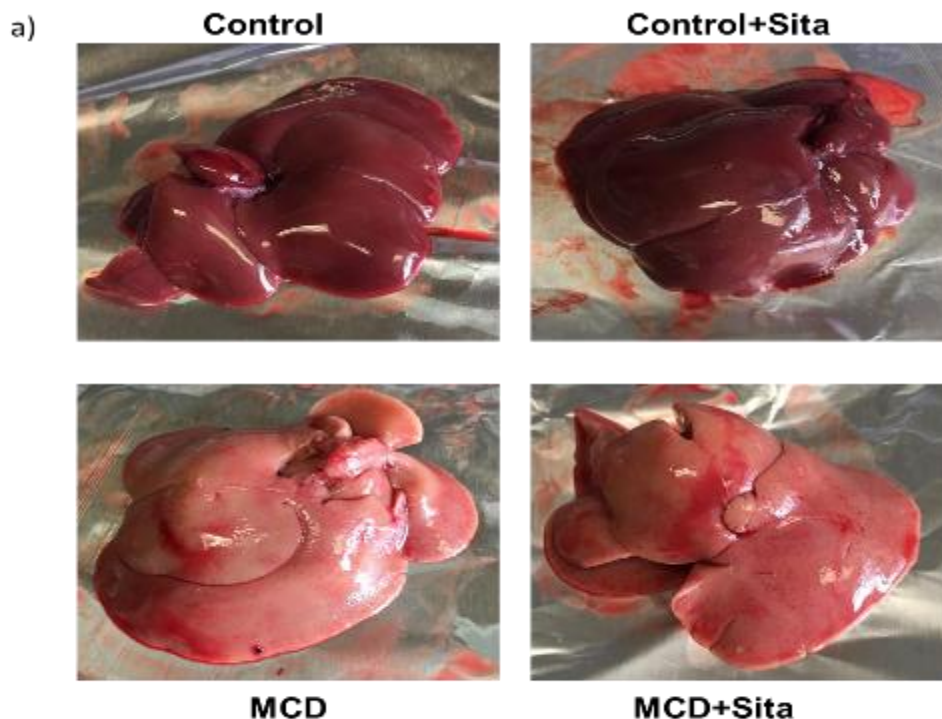
Cuando se realizó la disección del hígado, pudimos observar que en los grupos MCD parecía de mayor tamaño que el de los grupos control y control+sitagliptina, se calculó la relación entre el peso del hígado y el peso de cada una de las ratas (Figura 35).

Grupo 1 Control: El hígado fue de un color café rojizo profundo e intenso.

Grupo 2 Control+sitagliptina: El hígado un color café rojizo profundo e intenso.

Grupo 3 MCD: El hígado fue de un color café rojizo, pero más claro y era más grande, ocupaba casi todo el espacio abdominal. Al recolectar sangre se obtuvieron pocos mililitros.

Grupo 4 MCD+sitagliptina: El hígado presentó un color rojo amarillento y un gran tamaño al igual que el de las ratas del grupo 3.



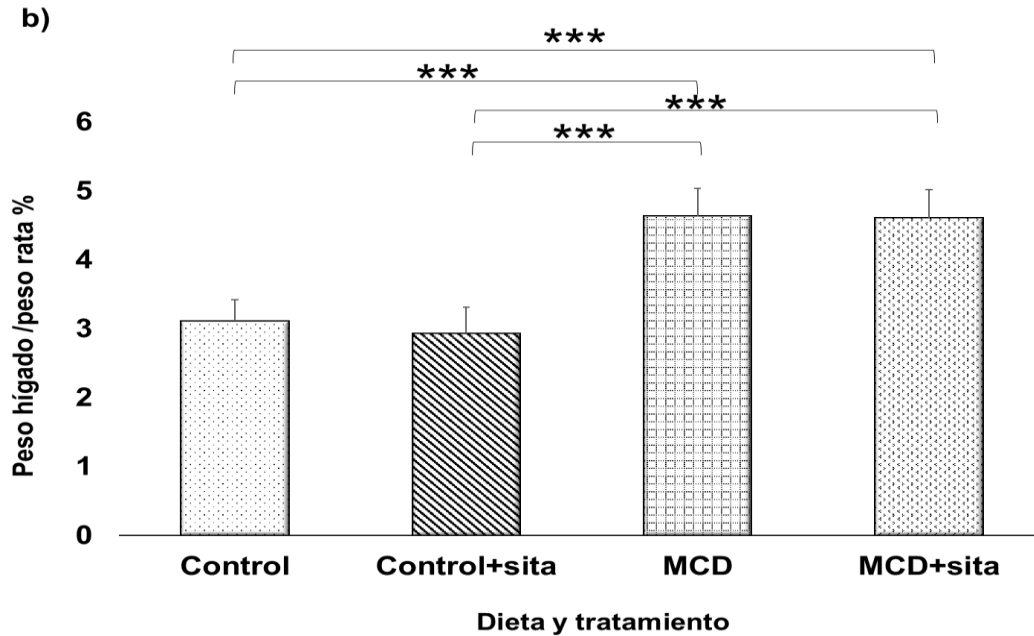


Figura 35. 35a) Diferencias de coloración y tamaño del hígado entre los grupos. **35b).** Relación entre el peso del hígado y el peso corporal, se observa que el hígado presenta un mayor porcentaje en los grupos de MCD (dieta deficiente en metionina y colina), la sitagliptina no tiene un efecto significativo. Control n=14, Control+sitagliptina n=14, MCD n=15, MCD+sitagliptina n=15.

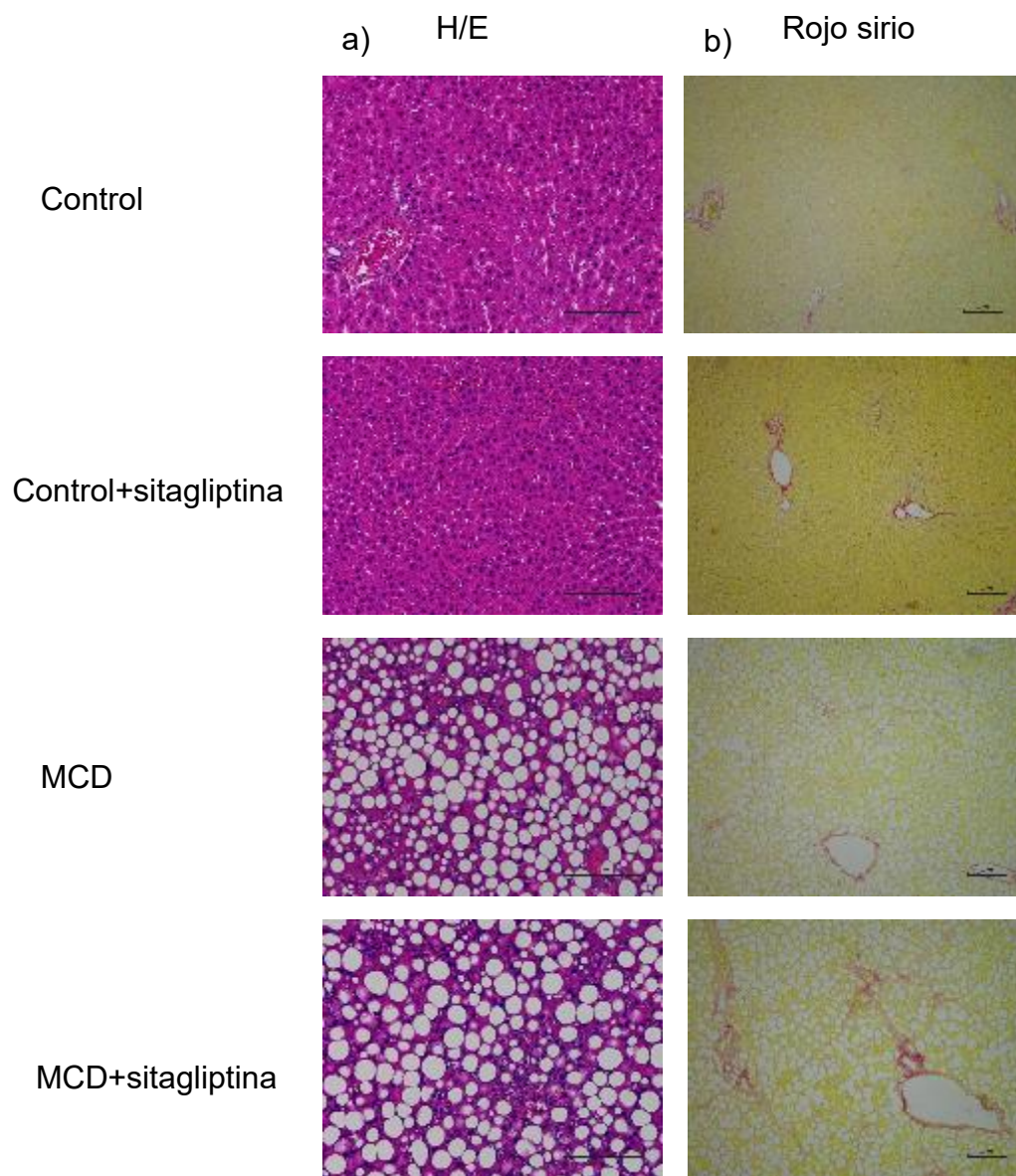
Después de realizar cortes histológicos y las tinciones correspondientes obtuvimos micrografías, con una tinción de hematoxilina-eosina, de tejido hepático. En el grupo control suplementado con sitagliptina observamos algún indicio de inflamación; en el grupo alimentado con la dieta MCD observamos esteatosis (acumulación de lípidos en el hepatocito), inflamación y balonización (Figura 36). El grupo MCD y suplementado con sitagliptina también presentó esteatosis, inflamación y balonización. El score NAS (sistema de puntuación histológico) que nos permite determinar el grado de daño en el tejido por la NAFLD. (Tabla 4). Las micrografías teñidas con rojo sirio nos muestran un aumento de fibras de colágeno, en el grupo MCD+sitagliptina (Figura 36).

Tabla 4. Resultado, diagnóstico histológico de NAFLD. Tomada de (Rovira et al., 2017)

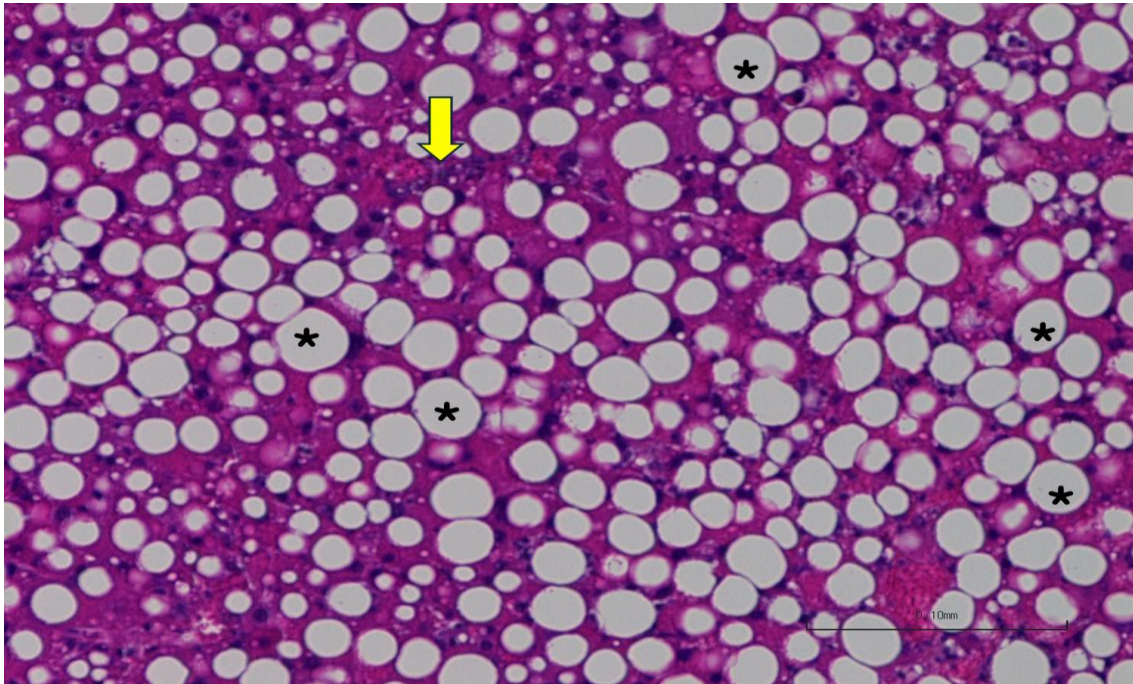
Índice de actividad		Índice de fibrosis	
Diagnostico histológico	Puntos	Tipo de fibrosis	Puntos
Esteatosis	0-3	Ninguna	0
Inflamación	0-3	Perisinusoidal zona 3	
		Leve	1A
		Moderada	1B
Balonización	0-2	Portal/perportal	1C
		Perisinusoidal + periportal	2
Puntuación máxima	8	Puentes	3
		Cirrosis	4
Puntuación ≥ 5 diagnóstico de NAFLD			
Puntuación ≤ 3 no diagnóstico de NAFLD			

Diagnóstico histológico	Score NAS			
	Control	Control+Sita	MCD	MCD+Sita
Esteatosis	0.0	0.0	2.4	3.0
Inflamación	0.0	0.2	2.2	3.0
Balonización	0.0	0.0	1.0	1.0
Total	0.0 ^a	0.2 ^b	5.6 ^{ab}	7.0 ^{ab}
Fibrosis	0.0 ^a	0.0 ^b	2.0 ^{a,b}	3.0 ^{a,b}

Diferencia significativa a,b ($p < 0.0005$). Letras diferentes indican diferencia entre columnas.



c)



d)

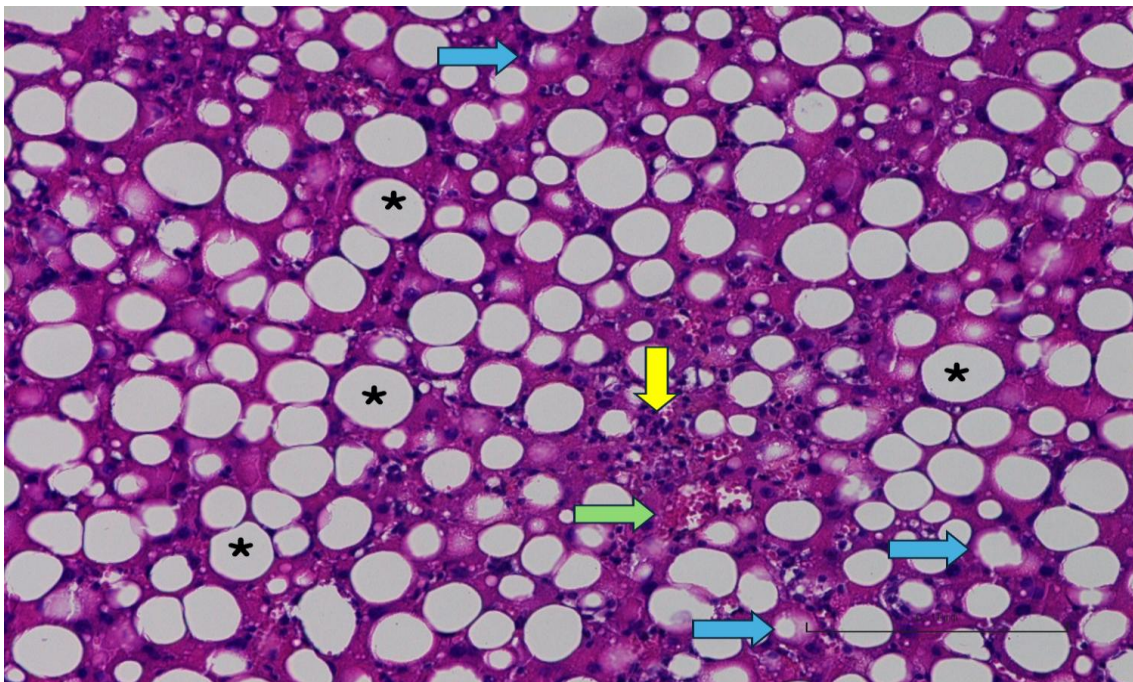


Figura 36. Micrografías, **36a)** con tinción Hematoxilina-eosina (H&E) 100X. **36b)** Micrografías con tinción Rojo sirio 100X. **36c)** prominente esteatosis de tipo macrovesicular (asteriscos), leve infiltrado inflamatorio linfocitario (flecha amarilla). **36d)** b) esteatosis macrovesicular (asteriscos), acentuado infiltrado inflamatorio neutrofílico (flecha amarilla), cuerpos de Mallory-Denk intracitoplasmáticos (flecha verde), células balonizadas (flechas azules).

9.1.6 Expresión proteica

Con el fin de corroborar el aspecto histológico, realizamos el análisis de la expresión de las proteínas MMP2, α -SMA y Col1A2 utilizadas como marcadores de fibrosis. Las bandas se cuantificaron por densitometría, se normalizaron con GAPDH y se expresaron como unidades arbitrarias (Figura 37).

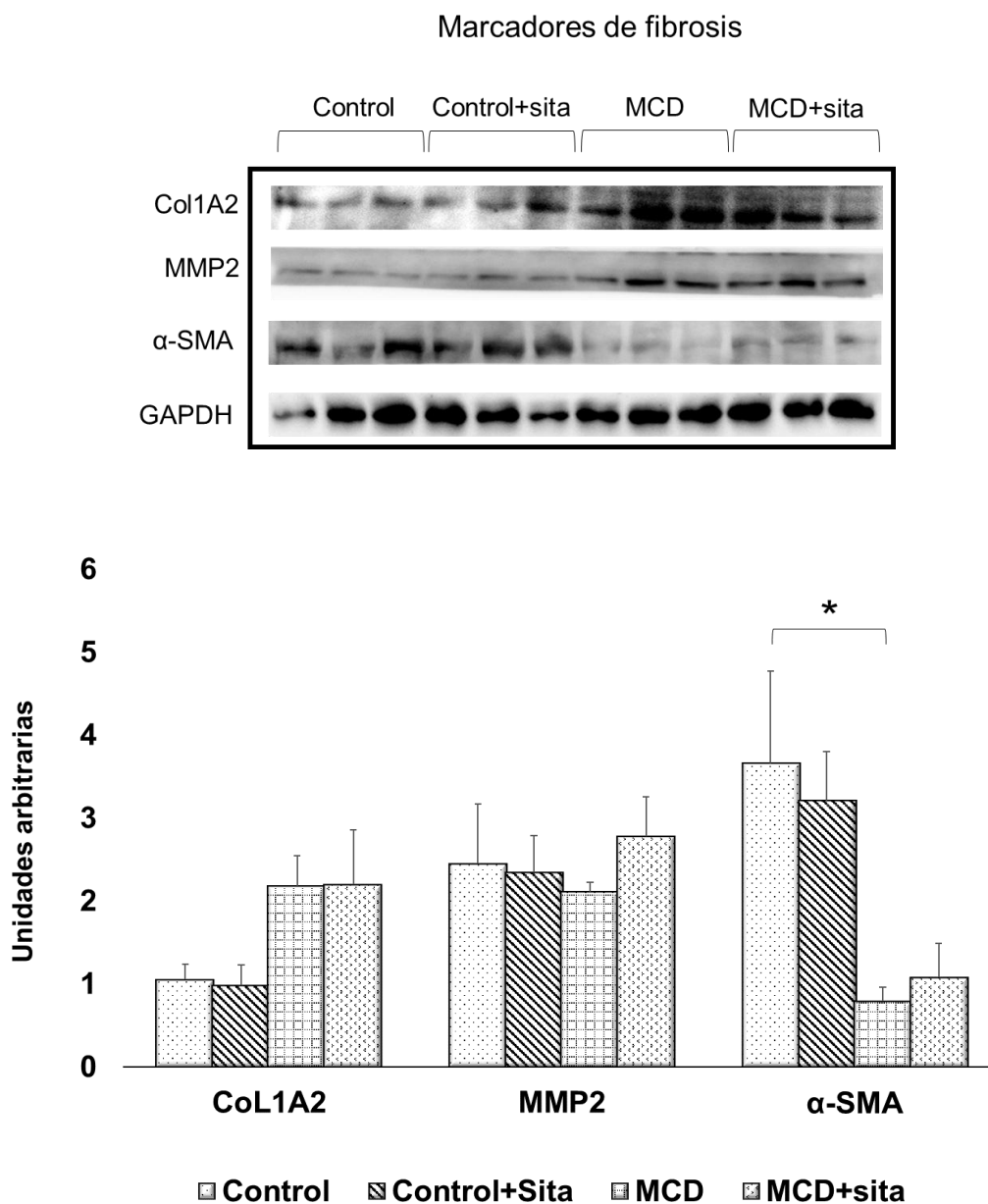


Figura 37. Análisis por Western blot de la expresión de marcadores de fibrosis.

10 Discusión

En este estudio, analizamos el efecto de la sitagliptina (inhibidor de la DPP-4) en los cambios metabólicos e histológicos del hígado de ratas macho Wistar después de una dieta deficiente en metionina y colina, la cual ha sido reportada en varios artículos como una dieta que induce NASH, es decir un modelo bien establecido (Kucera y Cervinkova, 2014).

Observamos una disminución drástica en el peso y talla de los animales pertenecientes a los grupos MCD y MCD+sita. Los resultados relacionados con el metabolismo mostraron una disminución en los niveles de glucosa, insulina, índice HOMA-IR, leptina y GLP-1 en los grupos tratados con dieta MCD y suplementados con sitagliptina, aunque los niveles de GIP aumentaron. Además, el perfil lipídico mostró niveles por debajo de lo establecido por el control. El análisis de las transaminasas y su relación sugiere la presencia de una lesión hepática en los grupos de estudio. Por otro lado, en el metabolismo de 1C, observamos un aumento en los niveles plasmáticos de metionina, homocisteína, SAM y SAH; mientras que la relación SAM/SAH disminuyó en los grupos de estudio. Los resultados histológicos revelaron daño hepático evidente en los grupos MCD y MCD+sita.

El primer estudio publicado para investigar los efectos benéficos de la sitagliptina en NASH en modelos animales, fue en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa, se demostró una reducción en NASH después de la administración de sitagliptina (Maiztegui *et al.*, 2011). Basándose en estos estudios, otros autores han probado el mismo tratamiento con diferentes modelos de NASH utilizando ratones o ratas sometidas a dietas altas en lípidos con una amplia gama de dosis de sitagliptina (Ideta *et al.*, 2015; Onoyama *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017). Por ejemplo, Kumar *et al.*, (2020) observaron que la sitagliptina, a dosis de 100 mg/kg/día, agrava la NAFLD al aumentar el estrés oxidante en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol. Por lo tanto, estudiamos una dosis más baja para evitar efectos adversos de la sitagliptina. Este estudio previo y nuestros resultados difieren de los informados por otros equipos. De manera similar, 100 y 300 mg/kg/día inhibieron eficazmente la fibrosis hepática al suprimir la proliferación de células estelares del hígado y la síntesis de colágeno (Kaji

et al., 2014). La sitagliptina también mostró efectos benéficos sobre la NAFLD en ratones. Otro estudio mostró efectos benéficos en ratones sometidos a una dosis de sitagliptina de 20 mg/kg/día durante cinco semanas, atenuando la esteatohepatitis inducida por la dieta MCD a través de efectos sobre la acumulación de lípidos, el estrés oxidante y el estrés del RE (Jung *et al.*, 2014). Otros autores han probado el mismo tratamiento con modelos diferentes de NASH tanto en ratones como en ratas sometidas, en la mayoría de los casos, a una dieta rica en grasas, con dosis de sitagliptina que oscilaron entre 10 mg/kg/día y 100 mg/kg/día (Onoyama *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017). Sin embargo, es de interés tener en cuenta que la diferencia entre los resultados podría deberse a factores como el tipo de animal utilizado, la dosis administrada o la duración del estudio.

La dieta MCD utilizada en este estudio produjo una disminución progresiva en los pesos de los animales lo que es consistente con estudios previos (Tahan *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2014). Esto puede explicarse por los efectos de la dieta MCD en el metabolismo de los lípidos debido a la deficiencia de colina y metionina, además hay que recordar que la dieta es rica en lípidos (aproximadamente 10%). También se observó una disminución de la masa de tejido adiposo blanco en las ratas MCD comparado con los controles (Tanaka *et al.*, 2014). Sorprendentemente, la administración de sitagliptina no afectó la pérdida de peso en las ratas del grupo MCD, lo que podría estar relacionado con hallazgos clínicos donde el efecto de la sitagliptina en el peso puede variar según el peso inicial del paciente. Algunos pacientes que presentaban un peso medio antes del tratamiento con sitagliptina ganaron peso al cabo de diez meses, mientras que en los pacientes obesos se produjo el efecto contrario (Chen *et al.*, 2015).

La dieta MCD también produjo niveles bajos de triglicéridos, HDL-colesterol y colesterol total en sangre, lo cual es consistente con estudios previos (Kucera y Cervinkova, 2014). Estos niveles bajos se deben al bloqueo hepático de VLDL debido a la falta de metionina y colina, lo que afecta la formación de fosfatidilcolina, esencial para la formación de VLDL y su secreción al hígado. Las ratas con esta dieta presentan acumulación de triglicéridos en el hígado, lo que lleva al desarrollo de esteatosis y fibrogénesis, así como una clara desnutrición y pérdida considerable de peso. Los

niveles séricos de glucosa de ambos grupos (MCD y MCD+sitagliptina) fueron inferiores al grupo control. Esto contrasta con los resultados previos de Jung *et al.*, (2014) que observaron que el grupo MCD+sitagliptina restauró los niveles de glucosa. La DPP-4 es una peptidasa que actúa sobre las incretinas y muchas adipocinas, quimiocinas y neuropéptidos (Ansorge *et al.*, 2011; Fadini y Avogaro, 2011) . La sitagliptina no afecta los niveles de incretina en ratas como lo hace en humanos. La sitagliptina no afecta los niveles de GLP-1 o insulina en ratones alimentados con MCD y en ratas de nuestro estudio. El efecto de la sitagliptina sobre la NAFLD (Baumeier *et al.*, 2017) puede estar mediado por la inhibición de la DPP-4 en lugar de su influencia sobre el GLP-1 y la señalización de la insulina (Jung *et al.*, 2014). La DPP4 tiene funciones adicionales independientes de la degradación de las hormonas incretinas, como la inducción de resistencia a la insulina e inflamación en varios sistemas celulares. Se sabe que la DPP4 se expresa en niveles elevados en el hígado, y tanto la expresión, como sus niveles circulantes, aumentan en NAFLD y NASH. Además, el sDPP4 (DPP4 soluble), se ha propuesto como biomarcador de NAFLD (Baumeier *et al.*, 2017).

La acumulación de lípidos en el hígado provoca el reclutamiento de macrófagos/células Kupffer, así como la polarización de macrófagos tipo 1 proinflamatorios (M1). Esta acumulación, desencadena la producción de citocinas proinflamatorias que agravan la NAFLD al provocar disminución de la sensibilidad a la insulina hepática, aumento de la inflamación y fibrosis, eventos relacionados con la activación de las HSC (Sakai *et al.*, 2020).

Se ha observado que los inhibidores de la DPP4 provocan la disminución de los macrófagos M1, pero un aumento de macrófagos tipo 2 (M2) antiinflamatorios en el tejido adiposo blanco y hepático de ratones obesos inducidos por dieta. Estudios han demostrado que la eliminación de los macrófagos M1 aumenta la sensibilidad a la insulina en ratones obesos, mientras que la reducción de los M2 puede generar resistencia a la insulina en ratones delgados. Por lo tanto, los inhibidores de la DPP4 pueden proteger contra la exacerbación de la inflamación, evitando la progresión de NAFLD a HCC. (Nishina y Hino, 2022). Por otro lado un estudio del 2012 mostró que, GLP-1 regula negativamente la lipogénesis *de novo* a través de la inhibición de

SREBP-1c mediada por AMPK en ratones alimentados con dieta de tipo occidental, pero no en ratones alimentados con MCD (Patankar *et al.*, 2012). La linagliptina, otro inhibidor de la DPP-4, reduce la inflamación y demuestra un modesto efecto antifibrótico en ratones alimentados con MCD (Wang *et al.*, 2017). Esto indica que los mecanismos que regulan la respuesta a la sitagliptina pueden ser diferentes entre modelos y especies.

En relación con la función renal, se incrementan los niveles de creatinina en el grupo MCD y una mínima restitución en el grupo MCD+sitagliptina. Aunque los niveles de creatinina no indican una alteración grave en la función renal causada por la NAFLD, es importante tener en cuenta que la relación entre la insuficiencia renal y la NAFLD puede variar en pacientes diabéticos y no diabéticos (Li *et al.*, 2012). Por otro lado, la presencia y gravedad de la NAFLD están asociadas con un riesgo y gravedad mayores de la enfermedad renal crónica (Musso *et al.*, 2014). La hiperuricemia, también está fuertemente asociada con la NAFLD y el síndrome metabólico (Lombardi *et al.*, 2016). Es importante mencionar que los estudios antes mencionados fueron realizados en humanos.

Nuestros resultados muestran niveles disminuidos de baja de insulina, aunque no determinamos los niveles de péptido C, que es un marcador de secreción de insulina, y que son más bajos en pacientes con NALFD, los niveles de péptido C serían una buena variable por determinar en trabajos futuros en el modelo de la rata (Keymeulen *et al.*, 2021).

Rinella y Green, (2004) mencionaron que la dieta MCD no parece producir resistencia a la insulina, lo que sugiere que este parámetro podría no jugar un papel relevante en el desarrollo de NAFLD en este modelo, aunque podría tener importancia en humanos. Ellos encontraron en ratones macho FVB/NJ de dos meses de edad, administrando por 28 días, dieta MCD, que los niveles séricos de insulina disminuyen en los grupos con dieta MCD. Sus resultados mostraron un aumento en la sensibilidad a la insulina en los grupos con dieta MCD a pesar de un mayor contenido de sacarosa en esa dieta; concluyendo que la resistencia a la insulina podría no tener un papel importante en el desarrollo de la esteatohepatitis en ratones alimentados con la dieta deficiente en metionina y colina. Por otro lado, Jung *et al.*, (2014) demostraron, en ratones macho,

que la dieta MCD adicionada con sitagliptina no afectó los niveles de GLP-1 ni de insulina, indicando que tal vez el efecto de la sitagliptina en NASH puede estar mediado por la inhibición de DPP4 en lugar de hacerlo por GLP-1 o por la vía de señalización de la insulina. La ventaja de la dieta MCD se centra en que puede inducir una forma más grave de esteatohepatitis en comparación con otros modelos alimenticios, aunque presenta limitaciones considerables, como la falta los principales factores de riesgo para el desarrollo de NAFLD en humanos, como son la obesidad, la diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina, algunos estudios mostraron que los ratones alimentados con la dieta MCD pierden peso progresivamente hasta en un 40% en 8 semanas (Soret *et al.*, 2020).

Lo anterior fue demostrado en una revisión realizada en el 2018, se menciona que la dieta MCD replica el fenotipo histológico de la enfermedad, pero no las características metabólicas, ya que este modelo presenta pérdida de peso y ausencia de resistencia a la insulina. Estas características hacen que este modelo de NAFLD sea muy diferente a la que se presenta en humanos (Santhekadur *et al.*, 2018). Es importante destacar que la IR está asociada con la NAFLD aún en pacientes delgados con niveles normales de glucosa. En un estudio se analizaron los efectos de la dieta MCD en la expresión de CYP2E1, observando que un aumento en su expresión se relaciona con resistencia a la insulina, aunque podrían existir otros factores que influyan (Schattenberg *et al.*, 2005).

Nagasawa *et al.*, (2006) reportaron niveles bajos de triglicéridos plasmáticos y HDL-colesterol, en ratones macho alimentados con dieta MCD, lo que indica que niveles bajos de lípidos plasmáticos son característicos en esta dieta. En nuestro estudio, todas las mediciones plasmáticas se realizaron después de 6 semanas de tratamiento, mostrando niveles inferiores que los controles; sin embargo, (Stanković *et al.*, 2014) reportaron que, en ratones macho, los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total y HDL disminuyeron aunque el LDL aumentó con el transcurso de las semanas, lo que sugiere que esta dieta parece no tener efecto protector porque la relación LDL/HDL es aterogénica en la NAFLD inducida por MCD. Esto podría ser una ventaja de este modelo ya que en la NAFLD también se asocia con un perfil lipídico aterogénico en humanos obesos. (Jha *et al.*, 2014) también encontraron una reducción

de los ácidos grasos séricos totales en ratones ob/ob, con dieta MCD. De manera similar, Marcolin *et al.*, (2011) encontraron en ratones con MCD, pérdida de peso y aumento significativo de las enzimas de daño hepático, así como disminución de los niveles sistémicos de glucemia, triglicéridos, colesterol total, HDL y VLDL, mientras se incrementaron los niveles de creatinina, solo hubo una mínima restitución del nivel de creatinina en sangre de las ratas tratadas con sitagliptina. El ácido úrico disminuyó en el grupo con MCD; lo que podrían indicarnos que no hay alteración en la función renal grave causada por la NAFLD desarrollada por esta dieta.

Cequera y de León Méndez, (2014), definieron los biomarcadores en suero de la fibrosis. Los directos, que indican depósito o eliminación de matriz extracelular en el hígado; y los indirectos, moléculas liberadas a la sangre como producto del deterioro de la función hepática, como son la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) (Barba, 2008; Cequera y de León Méndez, 2014). Jung *et al.*, (2014) encontraron que los ratones con dieta MCD tienen niveles séricos de AST y ALT significativamente más altos que el control, y la suplementación con sitagliptina disminuyó ambas transaminasas (Itagaki *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2014). En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de ALT fueron mayores en el grupo de MCD y en el grupo de MCD suplementado con sitagliptina. MCD aumentó el nivel plasmático de AST sin recuperación con el tratamiento con sitagliptina. (Ferrer *et al.*, 2008), indican que, a pesar de que AST y ALT son los indicadores más utilizados de necrosis hepática, no pueden distinguir entre NAFLD simple (con inflamación mínima o sin ella) y NASH (con fibrosis) desde el punto de vista clínico, siendo la biopsia y el estudio histológico necesarios para establecer la severidad del daño. Por otro lado, aunque son sensibles, son poco específicas, ya que la AST no solo se encuentra en el hígado, sino también en el músculo esquelético y cardíaco, riñón y eritrocitos. Por otro lado, (Neuman *et al.*, 2014) indicaron que los pacientes con NAFLD que tienen niveles de ALT altos son más propensos a tener inflamación que puede conducir a la NASH.

La relación $AST/ALT > 1$ puede indicar con precisión la gravedad de la lesión hepática (Abbas y Sheikh, 2016). La relación AST/ALT se correlacionó negativamente con la metilación hepática en ambos grupos de estudio que recibieron la dieta MCD. Nuestros hallazgos apoyan que los niveles de transaminasas pueden estar relacionados con la

presencia de esteatohepatitis y fibrosis hepática. En nuestro estudio la relación AST/ALT fue ≥ 1 en ambos grupos con dieta MCD y suplementados con sitagliptina. Esto indica que existe una lesión hepática crónica o fibrosis. En el análisis histológico observamos daño hepático crónico o fibrosis en las ratas con dieta MCD. El tratamiento con sitagliptina produjo una la relación AST/ALT que acerca levemente a los valores del control.

Los niveles de vitamina B12 y de metabolitos relacionados se alteran en presencia de NAFLD y NASH, aunque su asociación aún se encuentra en debate. Li *et al.* reportan el uso de ácido metilmalónico como un biomarcador sensible para la deficiencia de vitamina B12, lo que sugiere su uso predictivo en fibrosis (Abdelhamid *et al.*, 2022). Los niveles de metionina en sangre se observan elevados en el grupo MCD. Esto podría deberse a una disminución de la remetilación de la homocisteína en metionina, ya que la dieta deficiente en colina impide que la homocisteína siga la vía de la transulfuración y, en cambio, sea remetilada para formar metionina. Este hallazgo es consistente con estudios previos en ratones alimentados con dietas deficientes en metionina (Aissa *et al.*, 2014). Tanto la deficiencia de metionina en la dieta como la suplementación con metionina inducen anomalías en el hígado, incluida la desregulación de las vías metabólicas de lípidos y de un carbono y la inducción de estrés oxidante y del RE (Aissa *et al.*, 2014). Como se esperaba, la disminución del índice de metilación redujo los lípidos plasmáticos debido a la deficiencia de colina. La colina participa en el metabolismo de los grupos metilo, particularmente en el hígado, porque es una fuente dietética primaria de grupos metilo a través de su oxidación irreversible a betaína y la posterior síntesis de S-adenosilmetionina. La deficiencia de colina perjudica la exportación de lípidos porque es necesaria para sintetizar fosfatidilcolina, un componente de las partículas de VLDL, que transportan la grasa desde el hígado a los tejidos periféricos. Cuando el suministro de colina es inadecuado, las VLDL no se pueden sintetizar, lo que lleva a una reducción en la exportación de ácidos grasos desde el hígado y, por tanto, a la acumulación de grasa en el hígado (Kucera y Cervinkova, 2014). El modelo de inducción de NAFLD mediante la dieta MCD no reproduce las características metabólicas de la enfermedad, como la obesidad, la resistencia a la insulina y la dislipidemia (Nakano *et al.*, 1997).

Para intentar explicar el nivel elevado de metionina en el grupo MCD, *postulamos la hipótesis de que la homocisteína es metabolizada a través de 2 vías, la remetilación y la transulfuración. La remetilación permite la recuperación de metionina, es catalizada por la homocisteína metiltransferasa (también denominada metionina sintasa), se relaciona con el ciclo del folato, y es dependiente de la vitamina B12, captura un grupo metilo de la reserva de un-carbono dependiente de folato (5-metiltetrahidrofolato). La transulfuración es la vía alternativa en el caso de que la metionina esté en exceso relativo y no se requiera su recuperación. Permite la síntesis de la cisteína a través de dos enzimas dependientes de la vitamina B12, la cistationina β sintasa (que tiene como grupo prostético al fosfato de piridoxal PLP), que cataliza la condensación de la homocisteína con la serina para formar cistationina y entonces convertirse en cisteína. Cuando disminuyen los niveles de metionina en la célula, se genera un aumento de homocisteína ya que esta solamente va a ser metabolizada por la vía de la remetilación, es decir se cierra el paso para que la homocisteína siga la vía de la transulfuración y, por esto tenemos niveles suficientes de homocisteína que se siguen metabolizando en metionina.

En nuestro estudio, las ratas MCD presentaron niveles elevados de homocisteína en plasma; del mismo modo que ratones hembras adultas alimentadas con la misma dieta (Henkel *et al.*, 2009). Este incremento probablemente está mediado por la disminución de la metilación de la homocisteína en metionina dependiente de betaína. Otra hipótesis es que, en ausencia de colina, la actividad de la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT) aumenta (Li y Vance, 2008). Además, los ratones con una dieta que carecía de colina y metionina tenían niveles aumentados de SAM y una relación SAM/SAH disminuida en comparación con los ratones *Mthfr/p* y *Mtr/p*. Este hallazgo es similar a los resultados observados en ratones macho C57BL/6 de 12 semanas de edad sometidos a una dieta MCD (Gyamfi *et al.*, 2008). Podría estar relacionado con los mecanismos adaptativos del ciclo de la metionina, con un aumento en la síntesis de metionina para compensar la disminución de la fuente de metionina en la dieta. Asimismo, los niveles de SAM son más altos en ambos grupos de estudio MCD que el control; resultado similar se presentó con la SAH. Además, la relación S-

Adenosil metionina (SAM) / S-Adenosil L-homocisteína (SAH) disminuyó en los grupos MCD, lo que sugiere una disminución en la capacidad de metilación.

En estudios sobre la regulación de la expresión de la metionina adenosil transferasa (MAT), codificada por los genes MAT1A, específicos del hígado y MAT2A, en otros sitios, Gyamfi et al., (2008) encontraron, en ratones con dieta MCD, y MCD+etanol que hay un cambio en la expresión en el hígado, de MAT1A a MAT2A, lo que se pueden correlacionar con la disminución de niveles de SAM. MAT2A tiene mayor afinidad por la metionina, un sustrato clave para la síntesis de SAM, sin embargo, la actividad de MAT2A se inhibe por SAM por lo que los niveles SAM no pueden aumentar cuando ambas isoenzimas se expresan completamente.

Aissa *et al.*, (2014) realizó un estudio en que se varió la cantidad de DL-metionina en la dieta, 0% de DL-metionina (MDD) y 2% de DL-metionina (MSD) durante 10 semanas. El nivel de homocisteína en MSD fue 2.5 veces mayor, SAM 3 veces mayor y SAH 2.5 veces mayor, mientras que la metionina disminuyó 3 veces comparado con el control. En el grupo MDD, el nivel de homocisteína, SAM y SAH aumentó ligera pero significativamente, pero la metionina disminuyó 3.5 veces. Concluyeron que el aumento de SAH y homocisteína puede deberse a una disminución en la expresión de S-Adenosil-L-homocisteína hidrolasa (AHCY), ya que esta cataliza la hidrólisis reversible de SAH a homocisteína y de cistationina- β -sintasa (CBS), que es responsable de controlar la entrada de homocisteína en la vía de transulfuración, donde se elimina. En nuestro estudio, la homocisteína se correlacionó negativamente con la relación SAM/SAH. Ésta juega un papel importante en la regulación de las funciones hepáticas, como la proliferación, la regeneración, la diferenciación y la sensibilidad al daño; por otro lado, también regula la metilación general *in vivo*, por lo que la capacidad de metilación también se reduce. Henkel *et al.*, (2009), encontraron que el agotamiento de SAM después de la administración de la dieta MCD se asocia con un aumento en la lesión hepática.

SAM es el sustrato universal de mecanismos epigenéticos y epigenómicos. La falta de metilación es muy perjudicial. Un modelo nutricional que indujo una deficiencia gestacional en donantes de metilo (folatos y B12) produjo, en el hígado de las crías, disminución en la metilación, lo que perjudicó la oxidación de los ácidos grasos

mitocondriales a través de la disminución de la interacción de PGC1- α hipometilado con los receptores de hormonas nucleares, PPAR- α , ERR- α y HNF-4A, y produjo esteatosis hepática (Pooya *et al.*, 2012). La esteatosis se revirtió cuando los sujetos de estudio recibieron una dieta normal durante las primeras etapas de la vida postnatal. Sin embargo, cuando los animales fueron alimentados con una dieta rica en lípidos, pero en ausencia de donantes de metilo, la esteatosis hepática fue más grave que en los controles (Bison *et al.*, 2016).

En nuestro estudio encontramos niveles bajos de leptina en el nivel MCD, así como en el grupo MCD+sitagliptina. En el 2002 (Leclercq *et al.*, 2002), observaron que los niveles plasmáticos de leptina fueron bajos en los ratones ob/ob, en comparación con los magros y los ob/ob+leptina; los ratones ob/ob+leptina al ser alimentados con dieta MCD mostraron fibrosis hepática significativa y lesiones necroinflamatorias hepáticas como los ratones deficientes en leptina. Lo que es consistente con la hipótesis de que la leptina es esencial para desencadenar la fibrosis hepática y para la regulación transcripcional de colágeno-I durante la lesión hepática necroinflamatoria crónica.

Sahai *et al.*, (2004), en su estudio en que utilizaron ratones hembra db/db (diabético), ob/ob (obeso) y db/m (no diabético) alimentados con dieta MCD, encontraron que los niveles séricos de leptina se elevaron significativamente en db/db, mientras que fue indetectable en los ob/ob. La dieta MCD incrementó los niveles de leptina en ratones db/m y db/db. Esto es consistente con los niveles de leptina reportados en la mayoría de los pacientes con NASH; aunque en otros estudios no se han visto cambios en los niveles séricos de leptina entre los pacientes con NASH y esteatosis simple.

Con el modelo de dieta MCD, se ha observado que los animales presentan caquexia, disminuyendo hasta en un 50% su peso corporal, así como los niveles de TG (Anstee y Goldin, 2006). En nuestro estudio, al observar una disminución en el peso y la grasa corporal en los animales de estudio, notamos valores circulantes de leptina bajos. Dado que la secreción de la leptina ocurre principalmente en tejido adiposo, los niveles plasmáticos son directamente proporcionales a la cantidad de grasa en el cuerpo (Perakakis *et al.*, 2021). Además, los niveles circulantes de leptina reflejan las reservas de energía del cuerpo y los cambios sutiles en la ingesta calórica (Polyzos *et al.*, 2015). (Ilcol *et al.*, 2003) encontraron que la colina aumenta los niveles de insulina a través

de la liberación del neurotransmisor acetilcolina y no mediante la activación de receptores muscarínicos o nicotínicos, esto, en ratas macho de 350g, con inyección intraperitoneal de cloruro de colina.

En el estudio histológico se observó las ratas que recibieron una dieta MCD acumularon lípidos en el hígado, principalmente macrovesículas, acompañados de esteatosis, inflamación, fibrosis y balonamiento, Tandra et al., (2011) mencionan que ambas gotas de lípidos a menudo pueden estar presentes en la esteatosis macrovesicular y pueden simular la unión, por lo que aparecen como gotas grandes. Finalmente, las proteínas α -SMA, Col1A2 y MMP2 se consideran marcadores indicativos de fibrosis, (Bison *et al.*, 2016), mencionan que un aumento en la expresión de estos marcadores es una característica distintiva de presencia de esteatohepatitis. La MMP-2 es un componente del espacio de Disse y se encarga de degradar el colágeno tipo IV, la fibronectina y la elastina. Algunos estudios han demostrado que es un marcador de fibrosis en humanos y también se utiliza como marcador sérico de enfermedad hepática alcohólica (Tsomidis *et al.*, 2022). Las células HSC proliferan durante el desarrollo de la fibrosis hepática. Además, su activación provoca un aumento en la expresión de α -SMA en presencia de hepatitis crónica; algunos estudios determinaron que α -SMA es un buen marcador de fibrosis producida por la hepatitis tipo B (Akpola *et al.*, 2005). Por otro lado, Col1A1 y Col1A2 forman al colágeno tipo 1. La agregación excesiva de Col1A2 se ha relacionado con la aparición de neoplasias malignas, fibrosis e inflamación en algunas investigaciones clínicas (Pan *et al.*, 2022).

El modelo utilizado en este trabajo, dieta MCD se centra principalmente en provocar una alteración del metabolismo de los lípidos para generar daño hepático (NAFLD). La deficiencia de metionina y colina provoca que el hígado no pueda exportar eficientemente los triglicéridos, resultando en una acumulación de grasa en los hepatocitos. La falta de metionina reduce la producción de glutatión, lo que incrementa el estrés oxidante en el hígado, contribuyendo aún más a la inflamación y al daño celular. Mientras la sitagliptina tiene como objetivo aumentar los niveles de incretinas como GLP-1 (glucagon-like peptide-1) y el GIP (polipéptido insulínotropo dependiente de glucosa) al inhibir a la DPP-4, lo que prolonga su acción en el cuerpo.

Permitiendo un control más efectivo de la glucemia en personas con diabetes tipo 2. Por lo que podemos decir que la sitagliptina no mejoro los parámetros que se midieron para corroborar NAFLD provocada por la dieta MCD, ya que este fármaco no actúa sobre los mecanismos metabólicos esenciales alterados por estas deficiencias, como la síntesis de fosfolípidos y la exportación de triglicéridos, procesos clave para la salud del hígado. La sitagliptina, se centra en la mejora del control glucémico.

11 Conclusiones

En conclusión, nuestro estudio proporciona una mayor comprensión de los efectos metabólicos e histológicos de la dieta MCD y la suplementación con sitagliptina en ratas macho Wistar como modelo de esteatohepatitis no alcohólica. Los resultados sugieren que la resistencia a la insulina podría no ser un factor clave en este modelo y que la fibrosis hepática puede estar influenciada por la suplementación con sitagliptina. Particularmente, se encontró que:

- ✚ El modelo que utilizamos, de dieta deficiente en metionina y colina (MCD), indujo NASH en ratas Wistar macho, modificando el perfil lipídico, disminuyó la salud hepática sin variar la glucosa en suero.
- ✚ La suplementación con sitagliptina con dosis de 50 mg/kg/día durante 6 semanas no revirtió los efectos fisiopatológicos de la enfermedad (NASH), pero amplificó significativamente la esteatosis en ratas sometidas a la dieta MCD.
- ✚ La suplementación con sitagliptina amplificó significativamente los parámetros histológicos y sanguíneos de esteatosis e inflamación, que estuvieron acompañados por un aumento en la expresión de la proteína inflamatoria y de fibrosis, Col1A2.
- ✚ El modelo MCD es interesante para estudiar NASH, sobre todo desde un punto de vista histológico, aunque, al no reproducir todas las características metabólicas representativas de la enfermedad, no es el modelo adecuado para probar los efectos beneficiosos de sitagliptina en la esteatohepatitis no alcohólica. Por lo que no fue posible caracterizar los mecanismos de acción.
- ✚ Nuestro resultado desafía los informes de datos anteriores sobre los efectos benéficos de la sitagliptina y es consistente con los resultados negativos de algunos ensayos clínicos.

12 Perspectivas

Se necesita más investigación para comprender completamente los mecanismos detrás de estos efectos y desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas para la esteatohepatitis no alcohólica. Aunque nuestros hallazgos contribuyen a la base de conocimiento en esta área y pueden ser relevantes para futuras investigaciones y terapias dirigidas a la NAFLD y la NASH; una dosis de 50mg/kg/día de sitagliptina, no produjo efectos benéficos en la reducción de esteatosis en la rata alimentada con la dieta MCD. Es importante seguir profundizando en esta área para abordar el creciente problema de salud pública que representa la enfermedad hepática asociada con la obesidad y el síndrome metabólico, utilizando nuevos fármacos que pudieran revertir el efecto de la esteatosis y esteatohepatitis.

Los puntos importantes para dar seguimiento a esta investigación son:

- ✚ Proponer un modelo dietético que logre reproducir, en animales, los parámetros metabólicos característicos de la enfermedad en humanos.
- ✚ Probar con nuevos fármacos que muestren algún tipo de efecto para revertir la NAFLD y NASH, como lo es el Resmetirom (fármaco de reciente aprobación por la FDA en el tratamiento contra hígado graso).
- ✚ Determinar los niveles circulantes y en tejido de DPP4.
- ✚ Determinar la captación de ácidos grasos.
- ✚ Explorar las vías involucradas en la inflamación

13 Referencias bibliográficas

1. **Abbas, A.S.y Sheikh, N.** (2016). "Counter effects of *N. Sativa* L. and *P. ovata* L. on indicative markers of non alcoholic fatty liver disease." *Pak J Pharm Sci* 29(1).
2. **Abdel-Misih, S.R.y Bloomston, M.** (2010). "Liver anatomy." *Surg Clin* 90(4): 643-653.
3. **Abdelhamid, A.M., Youssef, M.E.y Saber, S.** (2022). "The Role of incretin-based therapies in maintaining glucose homeostasis and management of diabetes mellitus." *Delta University Scientific Journal* 5(2).
4. **Aguilera-Méndez, A.** (2019). "Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 56(6): 544-549.
5. **Aissa, A.F., Tryndyak, V., De Conti, A., Melnyk, S., Gomes, T.D.U.H., Bianchi, M.L.P., James, S.J., Beland, F.A., Antunes, L.M.G.y Pogribny, I.P.** (2014). "Effect of methionine-deficient and methionine-supplemented diets on the hepatic one-carbon and lipid metabolism in mice." *Mol Nutr Food Res* 58(7): 1502-1512.
6. **Akcali, M.y Akçali, K.** (2018). "Liver fibrosis." *Turk J Gastroenterol* 29(1): 14-21.
7. **Akpolat, N., Yahsi, S., Godekmerdan, A., Yalniz, M.y Demirbag, K.** (2005). "The value of α -SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study." *Histopathology* 47(3): 276-280.
8. **Ansorge, S., Nordhoff, K., Bank, U., Heimbürg, A., Julius, H., Breyer, D., Thielitz, A., Reinhold, D.y Täger, M.** (2011). "Novel aspects of cellular action of dipeptidyl peptidase IV/CD26."
9. **Anstee, Q.M.y Goldin, R.D.** (2006). "Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research." *International journal of experimental pathology* 87(1): 1-16.
10. **Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O.y Heikenwalder, M.** (2019). "From NASH to HCC: current concepts and future challenges." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16(7): 411-428.
11. **Antwi, S.O., Petrick, J.L., Campbell, P.T., Norez, D.A., Stevens, V.L., Liao, L.M., Roberts, L.R., Patel, T.y McGlynn, K.A.** (2020). "One-carbon metabolism-related micronutrients intake and risk for hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study." *Int J Cancer* 147(8): 2075-2090.
12. **Asrani, S.K., Devarbhavi, H., Eaton, J.y Kamath, P.S.** (2019). "Burden of liver diseases in the world." *J Hepatol* 70(1): 151-171.
13. **Ayala, I., Cámara, P.y Fernández-Pardo, J.** (2008). Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. *Anales de veterinaria de Murcia*.
14. **Bar-Or, D., Rael, L.T., Madayag, R.M., Banton, K.L., Tanner, A., Acuna, D.L., Lieser, M.J., Marshall, G.T., Mains, C.W.y Brody, E.** (2019). "Stress hyperglycemia in critically ill patients: insight into possible molecular pathways." *Front Med* 6: 54.
15. **Barba, E.J.** (2008). "Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática." *Rev Mex Patol Clin* 55(4): 216-232.
16. **Baumeier, C., Schlüter, L., Saussenthaler, S., Laeger, T., Rödiger, M., Alaze, S.A., Fritsche, L., Häring, H.-U., Stefan, N.y Fritsche, A.** (2017). "Elevated hepatic

DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease." *Molecular metabolism* 6(10): 1254-1263.

17. **Bayón, C., Barriga, M.A.y Litwak, L.** (2010). "Incretinas, Incretinomiméticos, Inhibidores de DPP IV: 1er parte." *Revista argentina de endocrinología y metabolismo* 47(1): 36-51.

18. **Ben-Moshe, S.y Itzkovitz, S.** (2019). "Spatial heterogeneity in the mammalian liver." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16(7): 395-410.

19. **Berardo, C., Di Pasqua, L.G., Cagna, M., Richelmi, P., Vairetti, M.y Ferrigno, A.** (2020). "Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: current issues and future perspectives in preclinical and clinical research." *Int J Mol Sci* 21(24): 9646.

20. **Berkan-Kawińska, A.y Piekarska, A.** (2019). "Hepatocellular carcinoma in non-alcohol fatty liver disease—changing trends and specific challenges." *Curr Med Res Opin(just-accepted)*: 1-1.

21. **Bernal-Reyes, R.** (2012). "Hígado graso, esteatohepatitis alcohólica y esteatohepatitis no alcohólica." *RGMX* 77(Supl 1): 84-86.

22. **Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I.y Ballesteros-Amozurrutia, M.** (2019). "Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico." *RGMX* 84(1): 69-99.

23. **Bernal-Reyes, R., Icaza-Chávez, M., Chi-Cervera, L., Remes-Troche, J., Amieva-Balmori, M., Priego-Parra, B., Martínez-Vázquez, S., Méndez-Guerrero, I., Martínez-Rodríguez, L.y Barranca-Enríquez, A.** (2022). "Prevalencia y características clínico-epidemiológicas de una población mexicana con enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica: un estudio en población abierta." *RGMX*.

24. **Bhatt, P., Bhatt, K., Huang, Y., Lin, Z.y Chen, S.** (2020). "Esterase is a powerful tool for the biodegradation of pyrethroid insecticides." *Chemosphere* 244: 125507.

25. **Bison, A., Marchal-Bressenot, A., Li, Z., Elamouri, I., Feigerlova, E., Peng, L., Houlgatte, R., Beck, B., Pourié, G.y Alberto, J.-M.** (2016). "Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet." *Sci Rep* 6: 37207.

26. **Blaise, S.A., Alberto, J.M., Audonnet-Blaise, S., Gueant, J.L.y Daval, J.L.** (2007). "Influence of preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(6): E1492-1502.

27. **Blumenfeld, S.** (2009). "Incretinas: Un nuevo paradigma en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2." *Rev Endocrinol Nutr* 17: 84-90.

28. **Caballería, R.L., Torán, M.P., Auladell, L.M.y Pera, B.G.** (2008). "Esteatosis hepática no alcohólica. Puesta al día." *Aten Primaria* 40(8): 419-424.

29. **Carretero, C.M.** (2008). "Sitagliptina. Antidiabético oral." *OFFARM* 27(8): 118-119.

30. **Cequera, A.y de León Méndez, M.G.** (2014). "Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas." *RGMX* 79(3): 187-199.

31. **Chen, X.W., He, Z.X., Zhou, Z.W., Yang, T., Zhang, X., Yang, Y.X., Duan, W.y Zhou, S.F.** (2015). "Clinical pharmacology of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors indicated

for the treatment of type 2 diabetes mellitus." *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 42(10): 999-1024.

32. **Chen, Y.-Y.y Yeh, M.M.** (2021). "Non-alcoholic fatty liver disease: A review with clinical and pathological correlation." *J Formos Med Assoc* 120(1): 68-77.

33. **Choi, J., Joe, H., Oh, J.-E., Cho, Y.-J., Shin, H.-S.y Heo, N.H.** (2023). "The correlation between NAFLD and serum uric acid to serum creatinine ratio." *PLoS One* 18(7): e0288666.

34. **Chua, D., Low, Z.S., Cheam, G.X., Ng, A.S.y Tan, N.S.** (2022). "Utility of human relevant preclinical animal models in navigating NAFLD to MAFLD paradigm." *Int J Mol Sci* 23(23): 14762.

35. **Clare, C.E., Brassington, A.H., Kwong, W.Y.y Sinclair, K.D.** (2019). "One-carbon metabolism: linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development." *Annual review of animal biosciences* 7: 263-287.

36. **Colak, Y., Ozturk, O., Senates, E., Tuncer, I., Yorulmaz, E., Adali, G., Doganay, L.y Enc, F.Y.** (2011). "SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease." *Med Sci Monit* 17(5): HY5-9.

37. **Costa, D.S., Guahnon, M.P., Seganfredo, F.B., Pinto, L.P., Tovo, C.V.y Fernandes, S.A.** (2021). "Vitamin B12 and homocysteine levels in patients with NAFLD: a systematic review and metanalysis." *Arquivos de Gastroenterologia* 58: 234-239.

38. **Cubero, F.y Nieto, N.** (2006). "Células de Kupffer y hepatopatía alcohólica." *REED* 98(6): 460-472.

39. **Cunningham, R.P.y Porat-Shliom, N.** (2021). "Liver zonation—revisiting old questions with new technologies." *Front Physiol* 12: 732929.

40. **Deng, X.Q., Chen, L.L.y Li, N.X.** (2007). "The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats." *Liver Int* 27(5): 708-715.

41. **Drucker, D.J.** (2006). "The biology of incretin hormones." *Cell metabolism* 3(3): 153-165.

42. **Enz, N., Vliegen, G., De Meester, I.y Jungraithmayr, W.** (2019). "CD26/DPP4—a potential biomarker and target for cancer therapy." *Pharmacol Ther* 198: 135-159.

43. **Fadini, G.P.y Avogaro, A.** (2011). "Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1." *Vasc Pharmacol* 55(1-3): 10-16.

44. **Fang, J., Celton-Morizur, S.y Desdouets, C.** (2023). "NAFLD-related HCC: focus on the latest relevant preclinical models." *Cancers* 15(14): 3723.

45. **Ferrer, M.M., Rico, M.M., Carvia, P.C., Gálvez, M.A., Casado, M.M., Velasco, A.J.y Ferrer, A.M.** (2008). "Prevalencia y factores asociados a la esteatohepatitis no alcohólica en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica." *Cir Esp* 84(6): 313-317.

46. **Francque, S.M., Marchesini, G., Kautz, A., Walmsley, M., Dorner, R., Lazarus, J.V., Zelber-Sagi, S., Hallsworth, K., Busetto, L.y Frühbeck, G.** (2021). "Non-alcoholic fatty liver disease: A patient guideline." *JHEP Reports* 3(5): 100322.

47. **Fu, Y., Hua, Y., Alam, N.y Liu, E.** (2024). "Progress in the Study of Animal Models of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease." *Nutrients* 16(18).

48. **Gal, B., López, M., Martín, A., I.y Prieto, J.** (2007). *Bases de la fisiología. España.*

49. **Galef, B.G., Jr.** (1981). "Preference for natural odors in rat pups: implications of a failure to replicate." *Physiol Behav* 26(5): 783-786.

50. **Gaona, V.G.** (2011). Estudio del efecto en el perfil lipídico y adipocitocinas, tras el consumo sostenido de aceite de aguacate, de semilla de uva y de soya, en ratas. Licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro.
51. **Garcia, M.M., Gueant-Rodriguez, R.M., Pooya, S., Brachet, P., Alberto, J.M., Jeannesson, E., Maskali, F., Gueguen, N., Marie, P.Y., Lacolley, P., Herrmann, M., Juilliere, Y., Malthiery, Y.y Gueant, J.L.** (2011). "Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1." *J Pathol* 225(3): 324-335.
52. **Geier, A., Tiniakos, D., Denk, H.y Trauner, M.** (2021). "From the origin of NASH to the future of metabolic fatty liver disease." *Gut* 70(8): 1570-1579.
53. **Godoy-Matos, A.F., Silva Júnior, W.S.y Valerio, C.M.** (2020). "NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes." *Diabetol metab syndr* 12(1): 1-20.
54. **Graffigna, M., Catoira, N., Soutelo, J., Azpelicueta, A., Berg, G., Perel, C., Migliano, M.E., Aranguren, M., Musso, C.y Farias, J.** (2017). "Diagnóstico de esteatosis hepática por métodos clínicos, bioquímicos y por imágenes." *Rev Argent Endocrinol Metab* 54(1): 37-46.
55. **Gyamfi, M.A., Damjanov, I., French, S.y Wan, Y.-J.Y.** (2008). "The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury." *Biochem Pharmacol* 75(4): 981-995.
56. **Henkel, A.S., Elias, M.S.y Green, R.M.** (2009). "Homocysteine supplementation attenuates the unfolded protein response in a murine nutritional model of steatohepatitis." *J Biol Chem* 284(46): 31807-31816.
57. **Huang, J., Liu, X., Wei, Y., Li, X., Gao, S., Dong, L., Rao, X.y Zhong, J.** (2022). "Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 in autoimmune disease." *Front immunol* 13: 830863.
58. **Ideta, T., Shirakami, Y., Miyazaki, T., Kochi, T., Sakai, H., Moriwaki, H.y Shimizu, M.** (2015). "The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin attenuates hepatic lipogenesis via AMPK activation in non-alcoholic fatty liver disease model mice." *Int J Mol Sci* 16(12): 29207-29218.
59. **Ilcol, Y.O., Gurun, M.S., Taga, Y.y Ulus, I.H.** (2003). "Choline increases serum insulin in rat when injected intraperitoneally and augments basal and stimulated acetylcholine release from the rat minced pancreas in vitro." *European journal of biochemistry* 270(5): 991-999.
60. **Itagaki, H., Shimizu, K., Morikawa, S., Ogawa, K.y Ezaki, T.** (2013). "Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice." *Int J Clin Exp Pathol* 6(12): 2683-2696.
61. **Itou, M., Kawaguchi, T., Taniguchi, E., Oriishi, T.y Sata, M.** (2012). "Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Improves Insulin Resistance and Steatosis in a Refractory Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patient: A Case Report." *Case Rep Gastroenterol* 6(2): 538-544.
62. **Iwai, M., Kojima, T.y Suriawinata, A.A.** (2019). *Anatomy and Function*.
63. **Iwasaki, T., Yoneda, M., Inamori, M., Shirakawa, J., Higurashi, T., Maeda, S., Terauchi, Y.y Nakajima, A.** (2011). "Sitagliptin as a novel treatment agent for non-alcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus." *Hepato-gastroenterology* 58(112): 2103-2105.

64. **Jahn, D., Kircher, S., Hermanns, H.M.y Geier, A.** (2019). "Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1865(5): 943-953.
65. **Jha, P., Knopf, A., Koefeler, H., Mueller, M., Lackner, C., Hoefler, G., Claudel, T.y Trauner, M.** (2014). "Role of adipose tissue in methionine–choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)." *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis BBA-Mol Basis Dis* 1842(7): 959-970.
66. **Jung, Y.A., Choi, Y.K., Jung, G.S., Seo, H.Y., Kim, H.S., Jang, B.K., Kim, J.G., Lee, I.K., Kim, M.K.y Park, K.G.** (2014). "Sitagliptin attenuates methionine/choline-deficient diet-induced steatohepatitis." *Diabetes Res Clin Pract* 105(1): 47-57.
67. **Kaji, K., Yoshiji, H., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Aihara, Y., Douhara, A., Moriya, K., Kawaratani, H., Shirai, Y.y Yoshii, J.** (2014). "Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor attenuates hepatic fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cell in rats." *J Gastroenterol* 49(3): 481-491.
68. **Kanuri, G.y Bergheim, I.** (2013). "In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)." *Int J Mol Sci* 14(6): 11963-11980.
69. **Kazakos, K.** (2011). "Incretin effect: Glp-1, Gip, Dpp4." *Diabetes Res Clin Pract* 93: S32-S36.
70. **Keymeulen, B., van Maurik, A., Inman, D., Oliveira, J., McLaughlin, R., Gittelman, R.M., Roep, B.O., Gillard, P., Hilbrands, R., Gorus, F., Mathieu, C., Van de Velde, U., Wisniacki, N.y Napolitano, A.** (2021). "A randomised, single-blind, placebo-controlled, dose-finding safety and tolerability study of the anti-CD3 monoclonal antibody oteelixumab in new-onset type 1 diabetes." *Diabetologia* 64(2): 313-324.
71. **Klemann, C., Wagner, L., Stephan, M.y von Hörsten, S.** (2016). "Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system." *Clin Exp Immunol* 185(1): 1-21.
72. **Kořínková, L., Pražienková, V., Černá, L., Karnošová, A., Železná, B., Kuneš, J.y Maletínská, L.** (2020). "Pathophysiology of NAFLD and NASH in experimental models: the role of food intake regulating peptides." *Front Endocrinol* 11: 597583.
73. **Kosgei, V.J., Coelho, D., Guéant-Rodriguez, R.-M.y Guéant, J.-L.** (2020). "Sirt1-PPARS cross-talk in complex metabolic diseases and inherited disorders of the one carbon metabolism." *Cells* 9(8): 1882.
74. **Krishna, M.** (2013). "Anatomía microscópica del hígado." *Clin Liver Dis* 2(Suppl 5): 109.
75. **Kucera, O.y Cervinkova, Z.** (2014). "Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats." *World J Gastroenterol* 20(26): 8364-8376.
76. **Kumar, A., Pathak, R., Palfrey, H.A., Stone, K.P., Gettys, T.W.y Murthy, S.N.** (2020). "High levels of dietary methionine improves sitagliptin-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress in hypercholesterolemic rats." *Nutrition & metabolism* 17: 1-14.
77. **La Corte, A., Ángel, J., Villegas, E., Bendezu, H., Ortegano, M.y Vásquez-Ricciardi, L.** (2008). "Índices de Sensibilidad Insulínica (Homa Y Quicki) en Escolares y Adolescentes Sanos en Valera, Estado Trujillo. Venezuela." *Arch Venez Puer Ped* 71(3).

78. **Laemmli, U.K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
79. **Lambis, L., Solana, J.B., Gastelbondo, B., Romero, D., Garrido, D., Puello, W., García, M.C.y Suarez, A.** (2016). "Factores de riesgo asociados a hígado graso de origen no alcohólico en una población del Caribe Colombiano." *Rev colomb Gastroenterol* 31(2): 89-95.
80. **Lazo Roblejo, Y.y Lores Delgado, D.** (2012). "Las incretinas: nueva alternativa terapéutica para el control glucometabólico de la diabetes mellitus de tipo 2." *Medisan* 16(3): 445-451.
81. **Leclercq, I.A., Farrell, G.C., Schriemer, R.y Robertson, G.R.** (2002). "Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury." *J Hepatol* 37(2): 206-213.
82. **Leiva, A., Varas, P., Amigo, L., Contreras, S., Maiz, A.y Rigotti, A.** (2010). "Sitagliptina, un inhibidor de la enzima DPP-IV, aumenta el colesterol plasmático total, altera el perfil de colesterol lipoproteico y disminuye el transporte reverso de colesterol en ratones." *Rev Chil Cardiol* 29(3): 342-350.
83. **Li, G., Shi, W., Hu, H., Chan, Y., Liu, L.y Yin, D.** (2012). "Nonalcoholic fatty liver associated with impairment of kidney function in nondiabetes population." *Biochem Med* 22(1): 92-99.
84. **Li, H., Toth, E.y Cherrington, N.J.** (2018). "Asking the right questions with animal models: methionine-and choline-deficient model in predicting adverse drug reactions in human NASH." *Toxicological Sciences* 161(1): 23-33.
85. **Li, L., Huang, Q., Yang, L., Zhang, R., Gao, L., Han, X., Ji, L.y Zou, X.** (2022). "The association between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced fibrosis with serological vitamin B12 markers: results from the NHANES 1999–2004." *Nutrients* 14(6): 1224.
86. **Li, Z.y Vance, D.E.** (2008). "Thematic review series: glycerolipids. Phosphatidylcholine and choline homeostasis." *J Lipid Res* 49(6): 1187-1194.
87. **Liu, Z., Que, S., Xu, J.y Peng, T.** (2014). "Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review." *Int J Med Sci* 11(9): 925.
88. **Lombardi, R., Pisano, G.y Fargion, S.** (2016). "Role of serum uric acid and Ferritin in the development and progression of NAFLD." *Int J Mol Sci* 17(4): 548.
89. **Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B.y Oh, B.J.** (1980). "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." *Mayo Clin Proc* 55(7): 434-438.
90. **Ma, R., Martínez-Ramírez, A.S., Borders, T.L., Gao, F.y Sosa-Pineda, B.** (2020). "Metabolic and non-metabolic liver zonation is established non-synchronously and requires sinusoidal Wnts." *eLife* 9: e46206.
91. **Mahadevan, V.** (2014). "Anatomy of the liver." *Surgery* (Oxford).
92. **Maiztegui, B., Borelli, M.I., Madrid, V.G., Del Zotto, H., Raschia, M.A., Francini, F., Massa, M.L., Flores, L.E., Rebolledo, O.R.y Gagliardino, J.J.** (2011). "Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased β -cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats." *Clin Sci* 120(2): 73-80.
93. **Martín-Domínguez, V., González-Casas, R., Mendoza-Jiménez-Ridruejo, J., García-Buey, L.y Moreno-Otero, R.** (2013). "Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica." *REED* 105(7): 409-420.

94. **Martínez-Bohorquez, M.C., Carnalla, M., Chávez-Tapia, N.y Barrientos-Gutiérrez, T.** (2023). "Hepatitis C mortality trends in Mexico from 2001 to 2017." *Annals of Hepatology* 28(3): 101083.
95. **Martinou, E., Pericleous, M., Stefanova, I., Kaur, V.y Angelidi, A.M.** (2022). "Diagnostic modalities of non-alcoholic fatty liver disease: from biochemical biomarkers to multi-omics non-invasive approaches." *Diagnostics* 12(2): 407.
96. **Matteucci, E.y Giampietro, O.** (2009). "Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme." *Curr Med Chem* 16(23): 2943-2951.
97. **May, T., Klatt, K.C., Smith, J., Castro, E., Manary, M., Caudill, M.A., Jahoor, F.y Fiorotto, M.L.** (2018). "Choline supplementation prevents a hallmark disturbance of Kwashiorkor in weanling mice fed a maize vegetable diet: hepatic steatosis of undernutrition." *Nutrients* 10(5): 653.
98. **McGill, M.R.** (2016). "The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers." *EXCLI J* 15: 817.
99. **Méndez, S.N., Gutiérrez, G.Y., Chávez, T.N., Kobasi, M.R.y Uribe, M.** (2010). "Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales." *Rev Gastroenterol Mex* 75(2): 173-148.
100. **Michałowska, J., Miller-Kasprzak, E.y Bogdański, P.** (2021). "Incretin hormones in obesity and related cardiometabolic disorders: the clinical perspective." *Nutrients* 13(2): 351.
101. **Montoro, A.y García, J., C.** (2012). Enfermedad metabólicas del hígado. *Gastroenterología y hepatología. problemas comunes en la práctica clínica.* Aeg. España: 815-824.
102. **Moral, J.A.R.** (2006). "Homocisteína, vitaminas y masa ósea." *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Oseas* 15(4): 85-87.
103. **Mulaikal, T.A.y Emond, J.C.** (2012). "Physiology and Anatomy of the Liver." *Liver anesthesiology and critical care medicine*: 3-20.
104. **Mulvihill, E.E.y Drucker, D.J.** (2014). "Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors." *Endocr Rev* 35(6): 992-1019.
105. **Musso, G., Gambino, R., Tabibian, J.H., Ekstedt, M., Kechagias, S., Hamaguchi, M., Hultcrantz, R., Hagström, H., Yoon, S.K.y Charatcharoenwitthaya, P.** (2014). "Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis." *PLoS Med* 11(7): e1001680.
106. **Nagasawa, T., Inada, Y., Nakano, S., Tamura, T., Takahashi, T., Maruyama, K., Yamazaki, Y., Kuroda, J.y Shibata, N.** (2006). "Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPAR δ agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine-and choline-deficient diet." *Eur J Pharmacol* 536(1): 182-191.
107. **Nakano, H., Nagasaki, H., Barama, A., Boudjema, K., Jaeck, D., Kumada, K., Tatsuno, M., Baek, Y., Kitamura, N.y Suzuki, T.** (1997). "The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet." *J Hepatol* 26(3): 670-678.
108. **Nargis, T.y Chakrabarti, P.** (2018). "Significance of circulatory DPP4 activity in metabolic diseases." *IUBMB life* 70(2): 112-119.

109. **Neuman, M.G., Cohen, L.B.y Nanau, R.M.** (2014). "Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease." *Can J Gastroenterol Hepatol* 28(11): 607-618.
110. **Nianan, L., Jiangbin, L., Yu, W., Jianguo, L.y Rui, D.** (2021). "Hepatic stellate cell: a double-edged sword in the liver." *Physiol Res* 70(6): 821.
111. **Nishina, S.y Hino, K.** (2022). "CD26/DPP4 as a therapeutic target in nonalcoholic steatohepatitis associated hepatocellular carcinoma." *Cancers* 14(2): 454.
112. **North-Lewis, P.** (2008). *Drugs and the Liver: A Guide to Drug Handling in Liver Dysfunction*, Pharmaceutical Press.
113. **Obeid, R.** (2013). "The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway." *Nutrients* 5(9): 3481-3495.
114. **Olaywi, M., Bhatia, T., Anand, S.y Singhal, S.** (2013). "Novel anti-diabetic agents in non-alcoholic fatty liver disease: a mini-review." *HBPD INT* 12(6): 584-588.
115. **Onoyama, T., Koda, M., Okamoto, T., Kishina, M., Matono, T., Sugihara, T.y Murawaki, Y.** (2015). "Therapeutic effects of the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, sitagliptin, on non-alcoholic steatohepatitis in FLS-ob/ob male mice." *Mol Med Rep* 12(5): 6895-6902.
116. **Otero, W.y Sierra, F.** (2003). "El hígado en cirugía." *Rev. Colomb. Gastroenterol* 18(4): 230-238.
117. **Pan, X., Chen, X., Ren, Q., Yue, L., Niu, S., Li, Z., Zhu, R., Chen, X., Jia, Z.y Zhen, R.** (2022). "Single-cell transcriptomics identifies Col1a1 and Col1a2 as hub genes in obesity-induced cardiac fibrosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 618: 30-37.
118. **Parameswaran, M., Hasan, H.A., Sadeque, J., Jhaveri, S., Avanthika, C., Arisoyin, A.E., Dhanani, M.B., Rath, S.M.y Hasan Jr, H.A.** (2021). "Factors that predict the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)." *Cureus* 13(12).
119. **Patankar, J.V., Obrowsky, S., Doddapattar, P., Hoefler, G., Battle, M., Levak-Frank, S.y Kratky, D.** (2012). "Intestinal GATA4 deficiency protects from diet-induced hepatic steatosis." *Journal of hepatology* 57(5): 1061-1068.
120. **Patel, V.B.y Preedy, V.R.** (2017). *Biomarkers in Liver Disease*, Springer.
121. **Perakakis, N., Farr, O.M.y Mantzoros, C.S.** (2021). "Leptin in leanness and obesity: JACC state-of-the-art review." *Journal of the American College of Cardiology* 77(6): 745-760.
122. **Pogribny, I.P., James, S.J.y Beland, F.A.** (2012). "Molecular alterations in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency." *Mol Nutr Food Res* 56(1): 116-125.
123. **Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D.y Rautou, P.-E.** (2017). "Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases." *J Hepatol* 66(1): 212-227.
124. **Polyzos, S.A., Kountouras, J.y Mantzoros, C.S.** (2015). "Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review." *Metabolism* 64(1): 60-78.
125. **Polyzos, S.A., Kountouras, J.y Mantzoros, C.S.** (2019). "Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics." *Metabolism* 92: 82-97.
126. **Pooya, S., Blaise, S., Moreno Garcia, M., Giudicelli, J., Alberto, J.M., Gueant-Rodriguez, R.M., Jeannesson, E., Gueguen, N., Bressenot, A., Nicolas, B., Malthiery, Y., Daval, J.L., Peyrin-Biroulet, L., Bronowicki, J.P.y Gueant, J.L.** (2012). "Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha

hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver." *J Hepatol* 57(2): 344-351.

127. **Potter, B.** (2007). *Liver-Structure*. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Enna, S.J. y Bylund, D.B. New York, Elsevier: 1-8.

128. **Powell, E.E., Wong, V.W.-S.y Rinella, M.** (2021). "Non-alcoholic fatty liver disease." *Lancet* 397(10290): 2212-2224.

129. **Puche, J.E., Saiman, Y.y Friedman, S.L.** (2013). "Hepatic stellate cells and liver fibrosis." *Compr Physiol* 3(4): 1473-1492.

130. **Quintanilla-García, C.y Zúñiga-Guajardo, S.** (2010). "El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 48(5): 509-520.

131. **Ramadori, P., Weiskirchen, R., Trebicka, J.y Streetz, K.** (2015). "Mouse models of metabolic liver injury." *Laboratory animals* 49(1_suppl): 47-58.

132. **Reyes, R.B.y Carrocera, L.F.** (2015). "Programación metabólica fetal." *Perinatología y reproducción humana* 29(3): 99-105.

133. **Rinella, M.E.y Green, R.M.** (2004). "The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance." *J Hepatol* 40(1): 47-51.

134. **Rinella, M.E., Lazarus, J.V., Ratziu, V., Francque, S.M., Sanyal, A.J., Kanwal, F., Romero, D., Abdelmalek, M.F., Anstee, Q.M.y Arab, J.P.** (2023). "A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature." *Annals of Hepatology*: 101133.

135. **Rojas Lemus, M., Milán Chávez, R., Delgado Medina, A., Bizarro Nevares, P., Cano Gutiérrez, G., Cafaggi Padilla, D., Cervantes Yépez, S.y Fortoul van der Goes, T.I.** (2017). "El hepatocito como un ejemplo de interacción entre la biología celular y las rutas metabólicas." *Revista de la Facultad de Medicina (México)* 60(2): 52-58.

136. **Roldán, V.A., Ojeda, C.G.y Roldán, V.E.** (2011). "Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2." *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 54(1): 28-40.

137. **Rovira, L.C., Majeed, I., Escudé, A.M., Pillasagua, I.A.y Monserrat, P.T.** (2017). "Esteatosis hepática: diagnóstico y seguimiento." *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria* 24(7): 378-389.

138. **Sahai, A., Malladi, P., Pan, X., Paul, R., Melin-Aldana, H., Green, R.M.y Whittington, P.F.** (2004). "Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin." *Am J Physio - Gastrointest* 287(5): G1035-G1043.

139. **Sakai, Y., Chen, G., Ni, Y., Zhuge, F., Xu, L., Nagata, N., Kaneko, S., Ota, T.y Nagashimada, M.** (2020). "DPP-4 inhibition with anagliptin reduces lipotoxicity-induced insulin resistance and steatohepatitis in male mice." *Endocrinology* 161(10): bqaa139.

140. **Santhekadur, P.K., Kumar, D.P.y Sanyal, A.J.** (2018). "Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease." *J Hepatol* 68(2): 230-237.

141. **Santos, L., Hernández, G., Varón, P.A., Beltrán, O.y Claudino, B.R.** (2010). "Enfermedad hepática por infiltración grasa no alcohólica. La nueva pandemia del milenio." *Rev Col Gastroenterol* 25(4): 380-398.

142. **Sarem, M., Znaidak, R., Macías, M.y Rey, R.** (2006). "Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas." *Gastroenterol Hepatol* 29(2): 93-101.

143. **Schattenberg, J.r.M., Wang, Y., Singh, R., Rigoli, R.M.y Czaja, M.J.** (2005). "Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling." *J Biol Chem* 280(11): 9887-9894.
144. **Schwabe, R.F., Tabas, I.y Pajvani, U.B.** (2020). "Mechanisms of fibrosis development in nonalcoholic steatohepatitis." *Gastroenterology* 158(7): 1913-1928.
145. **Seghieri, M., Christensen, A.S., Andersen, A., Solini, A., Knop, F.K.y Vilsbøll, T.** (2018). "Future perspectives on GLP-1 receptor agonists and GLP-1/glucagon receptor co-agonists in the treatment of NAFLD." *Front Endocrinol* 9: 649.
146. **Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P.y Duncan, S.A.** (2010). "Organogenesis and development of the liver." *Dev Cell* 18(2): 175-189.
147. **Sibal, A.y Gopalan, S.** (2015). *Textbook of pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition*, JP Medical Ltd.
148. **Singh, R., Chandel, S., Dey, D., Ghosh, A., Roy, S., Ravichandiran, V.y Ghosh, D.** (2020). "Epigenetic modification and therapeutic targets of diabetes mellitus." *Biosci Rep* 40(9): BSR20202160.
149. **Soret, P.-A., Magusto, J., Housset, C.y Gautheron, J.** (2020). "In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease: a critical appraisal." *Journal of clinical medicine* 10(1): 36.
150. **Stanković, M.N., Mladenović, D.R., Đuričić, I., Šobajić, S.S., Timić, J., Jorgačević, B., Aleksić, V., Vučević, D.B., Ješić-Vukićević, R.y Radosavljević, T.S.** (2014). "Time-dependent changes and association between liver free fatty acids, serum lipid profile and histological features in mice model of nonalcoholic fatty liver disease." *Arch Med Res* 45(2): 116-124.
151. **Suckow, M.A., Stevens, K.A.y Wilson, R.P.** (2012). *Clinical Biochemistry and Hematology. The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*, Academic Press.
152. **Sun, D.-Q., Jin, Y., Wang, T.-Y., Zheng, K.I., Rios, R.S., Zhang, H.-Y., Targher, G., Byrne, C.D., Yuan, W.-J.y Zheng, M.-H.** (2021). "MAFLD and risk of CKD." *Metabolism* 115: 154433.
153. **Tahan, V., Yavuz, D., Imeryuz, N., Avsar, E.y Tozun, N.** (2004). "Oral glucose tolerance deteriorates in rats fed with methionine choline deficient diet." *J Hepatol* 41(2): 352.
154. **Takahashi, Y.y Fukusato, T.** (2014). "Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis." *World J Gastroenterol* 20(42): 15539-15548.
155. **Takahashi, Y., Soejima, Y.y Fukusato, T.** (2012). "Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis." *World journal of gastroenterology: WJG* 18(19): 2300.
156. **Tanaka, N., Takahashi, S., Fang, Z.-Z., Matsubara, T., Krausz, K.W., Qu, A.y Gonzalez, F.J.** (2014). "Role of white adipose lipolysis in the development of NASH induced by methionine-and choline-deficient diet." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids BBA-Mol Cell Biol L* 1841(11): 1596-1607.
157. **Tandra, S., Yeh, M.M., Brunt, E.M., Vuppalanchi, R., Cummings, O.W., Ünalp-Arida, A., Wilson, L.A.y Chalasani, N.** (2011). "Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease." *Journal of hepatology* 55(3): 654-659.
158. **Timmons, T.M.y Dunbar, B.S.** (1990). "Protein blotting and immunodetection." *Meth Enzymol* 182: 679-688.

159. **Trefts, E., Gannon, M.y Wasserman, D.H.** (2017). "The liver." *Curr Biol* 27(21): R1147-R1151.
160. **Tsomidis, I., Notas, G., Xidakis, C., Voumvouraki, A., Samonakis, D.N., Koulentaki, M.y Kouroumalis, E.** (2022). "Enzymes of fibrosis in chronic liver disease." *Biomedicines* 10(12): 3179.
161. **Urzúa, G.Z.** (2011). Efectos crónicos de la cafeína sobre el nivel y tolerancia a la glucosa en ratas sanas y con diabetes mellitus experimental. Maestría, Universidad de Colima.
162. **Veteläinen, R., Van Vliet, A.y Van Gulik, T.M.** (2007). "Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model." *Journal of gastroenterology and hepatology* 22(9): 1526-1533.
163. **Wang, H., Liang, X., Gravot, G., Thorling, C.A., Crawford, D.H., Xu, Z.P., Liu, X.y Roberts, M.S.** (2017). "Visualizing liver anatomy, physiology and pharmacology using multiphoton microscopy." *J Biophotonics* 10(1): 46-60.
164. **Washabau, R.J.y Day, M.J.** (2012). *Canine and feline gastroenterology*, Elsevier Health Sciences.
165. **Xu, B., Shen, T., Chen, L., Xia, J., Zhang, C., Wang, H., Yu, M.y Lei, T.** (2017). "The effect of sitagliptin on lipid metabolism of fatty liver mice and related mechanisms." *Med Sci Monit* 23: 1363.
166. **Ye, Q., Zou, B., Yeo, Y.H., Li, J., Huang, D.Q., Wu, Y., Yang, H., Liu, C., Kam, L.Y.y Tan, X.X.E.** (2020). "Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5(8): 739-752.
167. **Yin, R., Xu, Y., Wang, X., Yang, L.y Zhao, D.** (2022). "Role of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in antidiabetic treatment." *Molecules* 27(10): 3055.
168. **Younossi, Z.M., Marchesini, G., Pinto-Cortez, H.y Petta, S.** (2019). "Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: implications for liver transplantation." *Transplantation* 103(1): 22-27.
169. **Zarghamravanbakhsh, P., Frenkel, M.y Poretsky, L.** (2021). "Metabolic causes and consequences of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)." *Metabolism Open* 12: 100149.
170. **Zazueta, A.R.** (2007). "Polipéptido insulínico dependiente de glucosa y péptido semejante al glucagón tipo 1: acciones fisiológicas e implicaciones en la diabetes tipo 2 y la obesidad." *Revista de endocrinología y nutrición* 15(3): 156-164.

14 Productos derivados del trabajo de tesis doctoral

Biochimie 181 (2021) 240–248



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Beneficial and deleterious effects of sitagliptin on a methionine/choline-deficient diet-induced steatohepatitis in rats

Leslye Sámano-Hernández^{a,*}, Reyna Fierro^b, Aude Marchal^c, Jean-Louis Guéant^d, Humberto González-Márquez^e, Rosa-María Guéant-Rodríguez^d

^a Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

^b Laboratorio de Andrología, Depto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City, Mexico

^c Laboratoire de Biopathologie, Hôpital Robert-Debré, Avenue du Général-Koenig, 51092, Reims CEDEX, France

^d Laboratoire INSERM UMR_S 1256, Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure (NGERE), Nancy, France

^e Laboratorio de Expresión Génica, Depto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City, Mexico



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2020

Received in revised form

5 November 2020

Accepted 10 December 2020

Available online 14 December 2020

Keywords:

MCD

Methyl donors

NAFLD

NASH

Sitagliptin

Wistar rats

ABSTRACT

Non-alcoholic fat liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease in the world. NAFLD is a spectrum of diseases ranging from simple steatosis to hepatic carcinoma. The complexity of pathomechanisms makes treatment difficult. The oral antidiabetic agents, dipeptidyl peptidase four inhibitors (DPP-4i) have been proposed as possible therapeutic agents. This study was performed using a well-established NAFLD model in rats to elucidate whether sitagliptin could prevent steatohepatitis. Rats were fed a methionine/choline-deficient (MCD) diet with or without sitagliptin treatment for six weeks. Liver tissue was examined to estimate sitagliptin's effect on the development of NASH. The MCD diet decreased the SAM/SAH ratio, and increased plasma levels of homocysteine, free fatty acids, and long-chain acylcarnitines in the MCD rats. MMP2 and Col1A2 expression also increased under the MCD diet. Sitagliptin treatment did not reverse these effects and increased steatosis and long-chain acylcarnitines. In conclusion, sitagliptin was ineffective to prevent from NAFLD in the MCD rat model. This result challenges previous data reporting beneficial effects and is consistent with the clinical trials' negative results.

© 2021 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Non-alcoholic fat liver disease (NAFLD) is a spectrum of progressive liver manifestations ranging from simple steatosis, steatosis with inflammation (steatohepatitis or NASH), cirrhosis, and hepatic carcinoma as outcomes. NAFLD is closely related to diabetes, obesity and metabolic syndrome. It is more frequent in Latin America and the Middle East than in Europe. NAFLD prevalence varies from 20 to 30% among world regions, while for NASH, the estimate is 3–16%. Prevalence has been correlated with obesity and diabetes. The pathological mechanisms of NAFLD are complex. They usually result from overnutrition, but malnutrition can also lead to

steatosis. Insulin resistance and proinflammatory components related to obesity play a prominent role in the pathogenesis of the disease. However, the mechanism by which simple steatosis progresses to NASH is not yet fully elucidated and may involve the dysregulation of lipid metabolism and genetic predisposition [1].

To date, only limited treatment options exist for NASH. Management is based on lifestyle changes—diet and exercise—and drugs that target bile acid metabolism and reduce components of Metabolic Syndrome such as insulin sensors and antioxidants. In severe cases, a liver transplant may be required. Sitagliptin is an oral antidiabetic agent that inhibits dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), a member of the insulin sensor family. It produces an increase in plasma concentration of intact incretin hormones, glucagon-like peptide 1 (GLP-1), and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) while also reducing hyperglycemia and decreasing glycosylated hemoglobin levels [2,3]. Early animal and clinical studies suggested that sitagliptin is effective in treating NASH. However, more recent clinical work has shown contradictory findings on its efficacy [4]. In light of these recent contradictory

* Corresponding author.

E-mail addresses: lessamhe@gmail.com, lesamher@xanum.uam.mx (L. Sámano-Hernández), reyna@xanum.uam.mx (R. Fierro), amarchal@chu-reims.fr (A. Marchal), jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr (J.-L. Guéant), hgm@xanum.uam.mx (H. González-Márquez), rosa-maria.gueant-rodriguez@univ-lorraine.fr (R.-M. Guéant-Rodríguez).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.12.004>

0300-9084/© 2021 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00153

Matrícula: 2161800971

Caracterización de
mecanismos de acción de la
sitagliptina en la reducción
de la esteatosis y
esteatohepatitis.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:30 horas
del día 8 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ
DR. NORBERTO CARLOS CHAVEZ TAPIA
DR. TARIK ISSAD
DRA. ROSA MARIA GUEANT RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de
Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la
Disertación Pública cuya denominación aparece al margen,
para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: LESLYE SAMANO HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento
de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma
Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la
interesada el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.



LESLYE SAMANO HERNANDEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

VOCAL

DR. NORBERTO CARLOS CHAVEZ TAPIA

VOCAL

DR. TARIK ISSAD

SECRETARIA

DRA. ROSA MARIA GUEANT RODRIGUEZ