



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

**Nuevos modelos de esteatosis en grandes animales, descripción y tratamiento.**

**New models of esteatosis in large animals, description and treatment**

*Autor/es*

**Inmaculada Cervera Moreno**

*Director/es*

**Antonio Güemes Sánchez**

Facultad de Medicina / Universidad de Zaragoza  
Año 2017



---

# NUEVOS MODELOS DE ESTEATOSIS EN GRANDES ANIMALES, DESCRIPCIÓN Y TRATAMIENTO.

---

## NEW MODELS OF ESTEATOSIS IN LARGE ANIMALS, DESCRIPTION AND TREATMENT.

---

TRABAJO FIN DE GRADO



**Universidad**  
Zaragoza

Autor: Inmaculada Cervera Moreno

Tutor: Dr. Antonio Güemes Sánchez

FACULTAD DE MEDICINA 2016/2017

## ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	3
2. ABSTRACT AND KEYWORDS .....	4
3. OBJETIVOS .....	4
4. INTRODUCCIÓN .....	5
4.1 HISTOPATOLOGÍA.....	5
4.2 PATOGÉNESIS DE NAFLD/NASH .....	7
4.3 ENTIDADES PRINCIPALES ASOCIADAS CON LA NAFLD .....	9
4.3.1 Diabetes Mellitus.....	9
4.3.2 Obesidad .....	10
4.3.3 Hiperlipidemia .....	10
4.3.4 Pérdida rápida de peso.....	10
4.3.5 Edad y sexo.....	10
4.4 OTRAS ENTIDADES ASOCIADAS AL NAFLD .....	10
4.4.1 NASH inducida por fármacos.....	10
4.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS .....	11
4.6 TRATAMIENTO.....	13
5. MODELOS ANIMALES DE ESTEATOSIS.....	16
5.1 MODELOS DIETÉTICOS .....	16
5.1.1 Dieta deficiente de colina y metionina (MCD):.....	17
5.1.2 Dieta deficiente en colina y L-amina (CDAA): .....	17
5.1.3 Dieta elevada en grasas (HFD): .....	17
5.1.4 Colesterol y colato:.....	19
5.1.5 Fructosa .....	20
5.1.6 Dieta combinada (Fructosa y grasa).....	20
5. 2 MODELOS GENÉTICOS.....	22
5.2.1 Ratones transgénicos SREBP-1c (ratones lipoatróficos) .....	22
5.2.2. Ratones Ob/ob .....	22
5.2.3 Ratones Db/db .....	23
5.2.4 Ratones KK-A .....	23
5.2.5 Ratones PTEN flox/flox.....	23

5.2.6 Ratones con eliminación del receptor- $\alpha$ activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- $\alpha$ ) .....	24
5.2.7 Ratones con déficit de acetil-coenzima A oxidasa (AOX-/-).....	24
5.2.8 Ratones con déficit de metionina-adenosiltransferasa-1 A (MAT1A -/-).....	25
5.2.9 Ratones NRF1 -/- .....	25
5.2.10 Ratas obesas Zucker (fa/fa) .....	25
5.2.11 Ratas transgénicas con hipertensión espontánea con sobreexpresión SREBP-1a...	26
5.2.12 Ratas obesas de Otsuka Long-Evans Tokushima (OLETF).....	26
5.3 MODELOS COMBINADOS .....	26
5.4 MODELOS EN GRANDES ANIMALES .....	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
7. RESULTADOS .....	28
7.1 GRANDES ANIMALES .....	28
8. CONCLUSIONES .....	34
9. BIBLIOGRAFÍA .....	35

## 1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) se define por el exceso de acumulación de grasa en el hígado de un paciente sin antecedentes de consumo excesivo de alcohol. Dicha patología se ha relacionado con el síndrome metabólico (obesidad, resistencia a la insulina, dislipemia e hipertensión) el cual juega un papel importante en la patogénesis de NAFLD. Ha surgido como un problema creciente de la salud pública. Con el paso del tiempo los hígados esteatósicos, que no hayan llevado un control de dieta y ejercicio pueden evolucionar hacia la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y posteriormente a cirrosis hepática, lo cual supone secuelas de hipertensión portal, enfermedad hepática terminal y mayor riesgo de hepatocarcinoma. Los modelos en grandes animales son importantes para entender todo el alcance de esta enfermedad. Faltan modelos en grandes animales, por ello se realiza una revisión bibliográfica, analizando los diferentes modelos experimentales que se han investigado para la patología de la esteatosis hepática no alcohólica, intentando encontrar el modelo ideal que simule la enfermedad hepática en humanos, mediante infiltración de grasa en animales.

**Material y métodos:** Este trabajo parte de una revisión de diferentes artículos seleccionados de las principales bases de datos biomédicas: Pubmed, Medline, The Cochrane Library, de los últimos diez años.

**Conclusiones:** Se puede concluir con respecto a los diferentes estudios referenciados que el modelo experimental de esteatosis en grandes animales basados en modificaciones de la dieta, produce cambios histológicos hepáticos similares a la Enfermedad de hígado graso no alcohólica, pero existen pocos estudios acerca de estos, debido a los elevados costes de estos modelos.

**La palabras clave:** model steatosis, animal model steatosis, nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, metabolic syndrome, pigs fatty liver, Osabaw pigs steatotic, rodent model.

## 2. ABSTRACT AND KEYWORDS

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is defined as the excess accumulation of fat in the liver of a patient with no history of excessive alcohol consumption. This pathology has been linked to the metabolic syndrome (obesity, insulin resistance, dyslipidemia and hypertension), which plays an important role in the pathogenesis of NAFLD. It has emerged as a growing problem of public health. Over time, steatotic livers, who have not been in control of diet and exercise, may progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and later to liver cirrhosis, which is a consequence of portal hypertension, terminal liver disease and increased risk of Hepatocarcinoma. Animal models are an important way to understand all the scope of the disease, we are lack of many models in big animals, a bibliographic review is carried out analyzing the different experimental models that have been investigated for the pathology of non-alcoholic hepatic steatosis, trying to find the ideal model that simulates liver disease in humans, through fat infiltration in animals.

**Material and methods:** This paper is based on a review of different articles selected from the main biomedical databases: Pubmed, Medline, The Cochrane Library, from the last ten years.

**Conclusions:** It can be concluded with respect to the different studies that the experimental model of steatosis in large animals based on dietary modifications produces liver histological changes similar to nonalcoholic fatty liver disease, but there are few studies about these, due to the high costs of models.

**The keywords:** model steatosis, animal model steatosis, nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, metabolic syndrome, pigs fatty liver, Osabaw pigs steatotic, rodent model.

## 3. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es analizar los diferentes modelos experimentales que se han descrito para investigar la patología de la esteatosis hepática no alcohólica, intentando encontrar el modelo ideal que simule la enfermedad hepática en humanos.

## 4. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) se define por el exceso de acumulación de grasa en el hígado de un paciente sin antecedentes de consumo excesivo de alcohol. Dicha patología se ha relacionado con el síndrome metabólico (obesidad, resistencia a la insulina, dislipemia e hipertensión) el cual juega un papel importante en la patogénesis de NAFLD. El contenido de grasa hepática es significativamente mayor en sujetos con resistencia a la insulina debido al aumento del flujo de ácidos grasos libres del tejido adiposo y a la absorción por el hígado, además del aumento de la lipogénesis hepática de nuevo. La acumulación hepática de triglicéridos a su vez contribuye a la alteración del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en el músculo y en el hígado.

El hígado graso no alcohólico ha surgido como un problema creciente de la salud pública. Convirtiéndose progresivamente en una enfermedad prevalente mundialmente, siendo la causa más común de enfermedad hepática crónica, aproximadamente un 10-36% de la población general y entre 70-80% en personas con diabetes tipo II. Existiendo una base genética para un desarrollo grave de la esteatosis. También afecta a niños y adolescentes convirtiéndose en el trastorno hepático más común de la población pediátrica, coincidiendo con el aumento de la incidencia de la obesidad.<sup>1, 14</sup>

Con el paso del tiempo los pacientes de hígados esteatósicos, que no hayan llevado un control de dieta y ejercicio pueden evolucionar hacia la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y posteriormente a cirrosis hepática, lo cual supone secuelas de hipertensión portal, enfermedad hepática terminal y mayor riesgo de hepatocarcinoma. Por ello requieren especial atención médica.<sup>1, 14</sup>

Los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la patogénesis de la NAFLD no han sido completamente aclarados. Con las limitaciones inherentes en la adquisición de tejido humano y en la realización de estudios experimentales en seres humanos, los modelos animales son necesarios para probar los diferentes mecanismos patógenos y objetivos terapéuticos.<sup>1</sup>

### 4.1 HISTOPATOLOGÍA

El hígado graso es la acumulación de lípidos, en forma de vacuolas, en los hepatocitos. Puede presentar características macroscópicas y microscópicas. Macroscópicamente, a medida que se va acumulando grasa, el hígado va aumentando de tamaño y adquiriendo una tonalidad amarillenta y brillante con bordes redondeados.

Microscópicamente, el hígado graso, se clasifica en macrovesicular y microvesicular.

- **La esteatosis macrovesicular** se caracteriza por una gran vacuola ocupando casi todo el citoplasma del hepatocito, que desplaza el núcleo hacia la periferia de la célula.

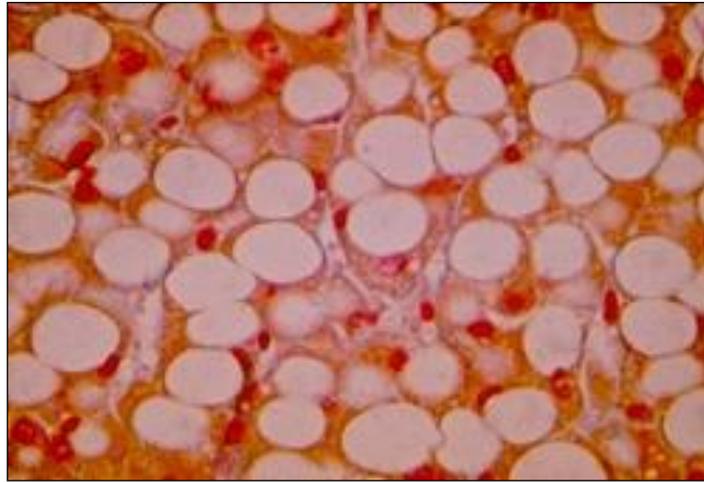


Fig.1. Corte de hígado donde se aprecian gotas de grasa que desplazan el núcleo a la periferia. Esteatosis hepática macrovesicular, tinción Rojo Sudán. *(Tesis Doctoral. Diagnóstico de la esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental)*<sup>34</sup>

- **La esteatosis microvesicular** se caracteriza por pequeñas vacuolas lipídicas en el citoplasma del hepatocito permaneciendo el núcleo en el centro de la célula.

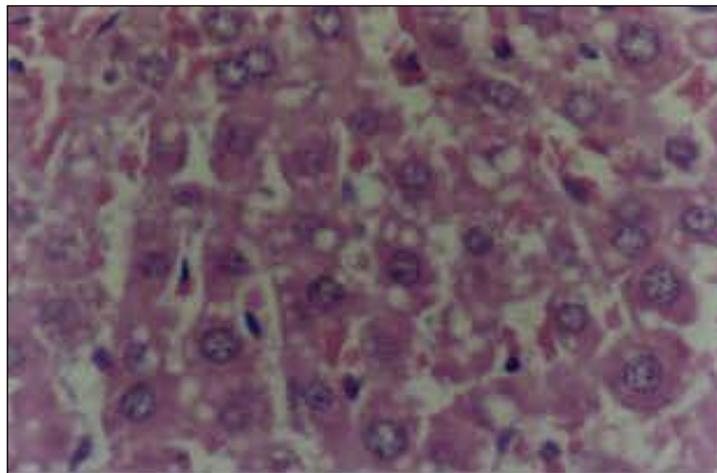


Fig.2. Corte de hígado donde se aprecian vacuolas de grasa más pequeñas que el núcleo celular. Esteatosis hepática microvesicular, tinción Hematoxilina-Eosina. *(Tesis Doctoral. Diagnóstico de la esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental)*<sup>34</sup>

Es característico que la esteatosis simple sea centrolobular y macrovesicular. Esta es la fase reversible de la enfermedad.

En los casos más avanzados, puede progresar a esteatohepatitis, que se caracteriza por la inflamación lobular, balonización hepatocelular, cuerpos de Mallory y con frecuencia asociada a fibrosis.

La inflamación intralobular suele ser leve e incluye un pequeño número de linfocitos, neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos tienden a infiltrar alrededor de los cuerpos de Mallory y en el área marcada de esteatosis. La inflamación portal es normalmente leve; sin embargo, puede presentarse de forma intensa en la inflamación crónica.

Los hepatocitos balonzados representan daño del hepatocito que aparece hinchado con un citoplasma enrarecido.

Los cuerpos de Mallory son eosinófilos con estructura amorfa, en el citoplasma de los hepatocitos y se observan en hepatitis alcohólica, NASH, colestasis crónica y hepatocarcinoma. En NASH los encontramos con más frecuencia en las áreas fibrosas perisinusoidales de la zona 3 y acompañarse con frecuencia de infiltración por neutrófilos. Los cuerpos de Mallory generalmente son menos diferenciados que en hepatitis alcohólica. Inmunohistoquímicamente, son positivos para citoqueratina (CK) 8, CK 18, p62 y ubiquinina.

Otras características patológicas que se observan en NASH incluyen quistes de grasa, lipidogranulomas y núcleos de los hepatocitos glucogenados en la zona 1. Además, pueden observarse megamitocondrias y depósitos de hierro.

Normalmente la fibrosis se origina en las regiones perisinusoidales de la zona 3 (fibrosis perisinusoidal) y también en el área periportal.

Para establecer el diagnóstico de certeza de esteatosis hepática, es necesario realizar una biopsia en la que más del 5% de los hepatocitos sean esteatósicos.<sup>2</sup>

### 4.2 PATOGÉNESIS DE NAFLD/NASH

Existen dos hipótesis de impacto exitosas, propuestas por *Day et al* generalmente aceptadas para la patogenia de NAFLD/NASH; el primer impacto es causado por la acumulación de grasa en el hepatocito y el segundo impacto es causado por la inflamación y la fibrosis. La acumulación de grasa en el hígado está estrechamente asociada con el desequilibrio metabólico que se presenta en obesidad central y resistencia a la insulina. Los factores de riesgo más reproducibles por NAFLD/NASH son la obesidad central, resistencia a la insulina, hiperglucemia de ayuno e hipertrigliceridemia y es vista en síndrome metabólico.

La esteatosis hepática ocurre cuando la tasa de importación o síntesis de ácidos grasos por los hepatocitos excede la tasa de secreción o catabolismo. Como consecuencia hay cuatro mecanismos posibles causantes de la acumulación lipídica en el hígado:

- Incremento de suministros y absorción en los hepatocitos de largas cadenas de ácidos grasos debido al exceso de consumo en la dieta y secreción por el tejido adiposo.
- Incremento de nuevo de las cadenas largas de ácidos grasos y de la síntesis de triglicéridos.

- Fallo de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Síntesis y secreción de triglicéridos.
- Fallo de la eliminación de los ácidos grasos de cadena larga debido a la deficiencia de las mitocondrias  $\beta$ -oxidativas de los hepatocitos.

Cuando la esteatosis se desarrolla, el hígado es sensibilizado a la respuesta inflamatoria precipitada por una variedad de estímulos: Estrés oxidativo, citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ ), alteración de la división lipídica y hepatotoxicidad producida por ácidos grasos libres, acúmulo anormal de colesterol, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia y la apoptosis. Finalmente las lesiones producidas en el hepatocito, junto con la inflamación activan las células estrelladas hepáticas (células Ito), que sintetizan la matriz extracelular, ocasionando fibrosis hepática.<sup>2</sup>

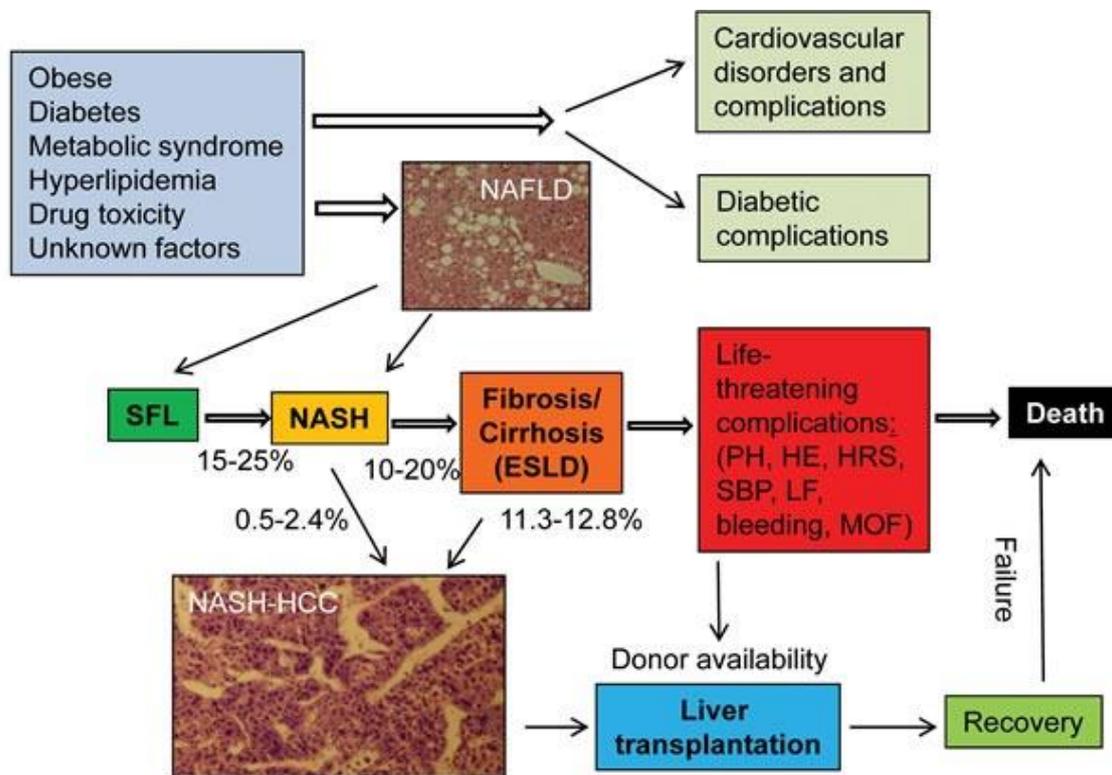


Fig 3. Desarrollo, progresión y pronóstico de la NAFLD desde hígado graso simple hasta la enfermedad hepática terminal (ESLD) en humanos. Los trastornos cardiovasculares y diabéticos y sus complicaciones pueden ser responsables de una gran proporción de morbilidad y mortalidad en pacientes con obesidad, diabetes y síndrome metabólico. El trasplante de hígado es la única terapia establecida para ESLD y HCC. Dada la escasez de hígados donantes, sólo una pequeña parte de los candidatos calificados para el trasplante hepático recibirá finalmente un trasplante antes del deterioro. Las complicaciones potencialmente mortales de la ESLD incluyen hipertensión portal (HP), insuficiencia hepática (LF), hemorragia, síndrome renal hepático (HRS), encefalopatía hepática (HE), peritonitis bacteriana espontánea y falta de órganos múltiples. Los números además de las flechas en la figura son las tasas de posible transición o transformación. NAFLD = enfermedad hepática grasa no alcohólica; NASH-HCC = carcinoma hepatocelular asociado a esteatohepatitis no alcohólica; NASH = esteatohepatitis no alcohólica; SFL = hígado graso simple. (Wu J. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma)<sup>14</sup>

### 4.3 ENTIDADES PRINCIPALES ASOCIADAS CON LA NAFLD

El factor más predisponente y reproducible respecto al hígado graso no alcohólico es la resistencia a la insulina debido a su influencia en la Diabetes Mellitus tipo II y en la obesidad. Existen múltiples factores de riesgo asociados a la esteatosis hepática no alcohólica como son:

Factores asociados a NAFLD	Factores asociados primordiales	Obesidad
		Diabetes Mellitus
		Hiperlipidemia
		Sexo femenino, edad avanzada
		Rápida pérdida de peso
		Resistencia a la insulina
		Alteración de la deposición de hierro
	Entidades etiológicamente asociados con NAFLD	- Técnicas quirúrgicas asociadas con la obesidad: Bypass yeyuno-ileal, bypass yeyuno-cólico, gastroplastia, derivación bilio-pancreática.
		- Otras técnicas quirúrgicas con rápida pérdida de peso como la resección intestinal masiva
		Trastornos alimentarios y otras anomalías de la nutrición: - Anorexia, ayuno, bulimia. - Nutrición parenteral total. - Enfermedad celiaca. - Diverticulosis yeyunal y otros sobrecrecimientos bacterianos.
		Hepatopatías inducidas por fármacos: - Amiodarona - Maleato de perhexilina - Bloqueadores de los canales del calcio - Glucocorticoides a altas dosis - Estrógenos sintéticos, tamoxifeno. - Cloroquina. - Síndrome del aceite tóxico. - Toxicidad por dimetilformamida.
		Enfermedades metabólicas: - Enfermedad de Wilson, hepatopatías de la infancia relacionadas con el cobre. - Glucogenosis tipo I - Abetalipoproteinemia.
		Síndromes de severa resistencia a la insulina: - Lipodistrofia (general, parcial) - Mutaciones de receptores de insulina

Fig.4. Factores asociados a NAFLD.<sup>4</sup>

#### 4.3.1 Diabetes Mellitus

La diabetes es un gran predictor de la NASH independientemente de la fibrosis hepática. Hasta el 33% de los pacientes presentan diabetes o hiperglucemias en ayunas en el momento del diagnóstico de NAFLD. Se presenta con más frecuencia en pacientes con diabetes tipo II aunque también, diabéticos insulino-dependientes de difícil control. El riesgo que asocia la diabetes tipo II con la NASH está incrementado por 2,6 veces.<sup>4</sup>

### 4.3.2 Obesidad

Pacientes con sobrepeso (IMC >25Kg/m<sup>2</sup>) u obesidad (IMC>30 en caucasianos y >27 en asiáticos) presentan NAFLD entre el 39 y el 100%. La NAFLD presenta una prevalencia 6 veces mayor en personas obesas en comparación con personas delgadas. Se detecta esteatosis en más del 75% de los pacientes obesos mórbidos y cirrosis entre el 3 y 11%. Independientemente de la edad y la diabetes, la obesidad es directamente proporcional a la gravedad de la fibrosis en la NASH. Presentando correlación significativa entre el grado de esteatosis y la relación cintura/cadera, siendo de gran importancia la distribución de la grasa corporal como factor de riesgo.<sup>4</sup>

### 4.3.3 Hiperlipidemia

La mayoría de los pacientes con NAFLD presentan hiperlipidemia entre un 20 y un 80%. La corrección de la anomalía lipídica se asocia con una mejoría de las pruebas funcionales hepáticas.<sup>4</sup>

### 4.3.4 Pérdida rápida de peso

Una rápida pérdida de peso tras una cirugía destinada a corregir la obesidad, la resección masiva intestinal y el ayuno severo, se han asociado con la NASH.<sup>4</sup>

### 4.3.5 Edad y sexo

La edad avanzada y pertenecer al sexo femenino, como factores independientes, se han asociado a fibrosis hepática en la NASH.<sup>4</sup>

## 4.4 OTRAS ENTIDADES ASOCIADAS AL NAFLD

Existen otras causas asociadas al hígado graso no alcohólico como el bypass yeyunoileal, la gastroplastia, el bypass gástrico y otros tipos de cirugía que conlleven una rápida pérdida de peso, los trastornos en la alimentación como la anorexia y la bulimia, la celiaquía, la diverticulosis yeyunal, otras causas de sobrecrecimiento bacteriano, la nutrición parenteral total, la abetalipoproteinemia, la lipodistrofia parcial, la enfermedad de Weber-Christian, el síndrome del aceite tóxico, entre otros.

### 4.4.1 NASH inducida por fármacos

Los fármacos con propiedades lipofílicas como la amiodarona, el maleato de perhexilina, el dietilaminoetoxihexestrol y el tamoxifeno atraviesan más fácilmente la membrana externa mitocondrial, pasando por el espacio mitocondrial hasta el interior de la mitocondria, alcanzando altas concentraciones intramitocondriales inhibiendo la beta-oxidación produciendo como consecuencia la esteatosis. Otros como los glucocorticoides a dosis altas, estrógenos sintéticos, el tamoxifeno, la cloroquina, entre otros, también pueden inducir esteatosis.

#### 4.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Hoy en día, la prueba *gold standard* para diagnóstico de certeza de la esteatosis hepática es la biopsia hepática. Ninguna prueba posee la fiabilidad y especificidad que ella tiene, pero sin embargo presenta ciertos inconvenientes, como el ser una prueba de elevado coste e invasiva para el paciente, pudiéndole provocar ciertos efectos perjudiciales (dolor, hematoma, hemoperitoneo, bilioperitoneo).

Si bien es cierto, la NAFLD puede ser diagnosticada por otras pruebas de imagen como son el ultrasonido, la tomografía computarizada (TC) o la resonancia magnética (MRI). Pero el diagnóstico de NASH requiere de biopsia hepática puesto que deben de determinarse las características principales, tales como la inflamación, hinchamiento de los hepatocitos, Mallory-Denk órganos y la fibrosis temprana.<sup>30</sup>

##### PRUEBAS DE IMAGEN:

- **Ultrasonografía:** La ecografía abdominal es una de las pruebas más utilizadas en el hígado graso en la práctica clínica ya que es barata y presenta una elevada sensibilidad (93%).<sup>31</sup>



Fig. 5. Imagen ecográfica de un hígado esteatósico, con aumento de ecogenicidad. (*Tesis Doctoral. Diagnóstico de la esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental*)<sup>34</sup>

- **Tomografía computarizada:** produce diferentes radiolucencias dependiendo del órgano examinado. La TC no es superior a la ecografía en la evaluación de la esteatosis hepática, pero la TC puede sugerir valores cuantitativos y objetivos en comparación con la ecografía.<sup>31</sup>



Fig. 6. TC sin contraste, hígado con atenuación muy baja respecto al bazo y lagos de grasa. Corresponde a una paciente con esteatosis severa medicamentosa. *(Tesis Doctoral. Diagnóstico de la esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental)*<sup>34</sup>

- **Resonancia magnética:** el tipo de esteatosis no es posible distinguirlo con la RMN y en los mejores casos la precisión diagnóstica de la RMN se aproxima al 93%.<sup>31</sup>

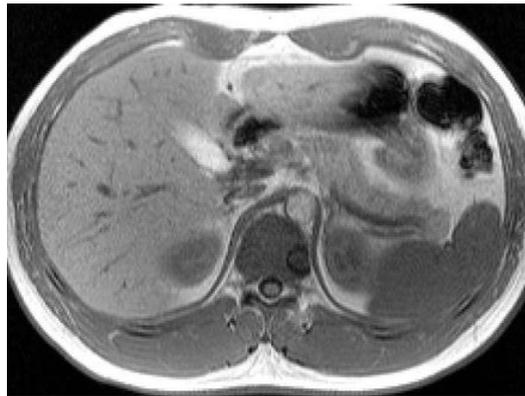


Fig. 7. Esteatosis severa (intensidad de señal del hígado más baja que músculo paravertebral y bazo). Imagen de RMN. *(Tesis Doctoral. Diagnóstico de la esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental)*<sup>34</sup>

#### PRUEBAS DE LABORATORIO:

El diagnóstico de esteatosis y esteatohepatitis se sospecha en la mayoría de los pacientes por alteración en las pruebas de funcionamiento hepático, específicamente por una elevación de ALT y de AST cuando se han excluido las enfermedades hepatocelulares que cursan con esta alteración.

A pesar de la escasa sensibilidad y especificidad, los niveles séricos de ALT y AST son los más disponibles y los más utilizados para evaluar la enfermedad hepática asintomática. La obtención de un ALT y AST al azar en pacientes con síndrome metabólico o diabetes puede ser razonable, dada la alta carga de morbilidad en esta población. Aunque el 50% de los pacientes con NAFLD tienen quimioterapia hepática

normal, hasta el 80% de los pacientes con NASH pueden ser identificados en base a niveles elevados de transaminasas.<sup>32</sup>

### CLINICA:

La mayoría de estos enfermos están asintomáticos, no tienen manifestaciones de enfermedad hepática en el momento del diagnóstico; ocasionalmente se quejan de hepatomegalia dolorosa, fatiga y malestar general. Cuando existen signos de insuficiencia hepática a la exploración y se detecta por ejemplo, trombocitopenia en la citología hemática o signos ultrasonográficos de aumento de la fibrosis hepática, la enfermedad está avanzada y el paciente puede tener ya cirrosis hepática.<sup>33</sup>

## 4.6 TRATAMIENTO

Los pacientes con esteatosis presentan características individuales en las que podemos intervenir para la mejora del hígado graso no alcohólico. No existe un tratamiento farmacológico consensuado para la esteatosis. En la actualidad, el tratamiento principal es la modificación del estilo de vida. Aunque hay fármacos que actúan para prevenir la progresión de la enfermedad.

1. **Modificación del estilo de vida.** Es de gran importancia llevar una dieta equilibrada y la práctica de actividad física.
2. **Modificación del síndrome metabólico.** Personas con Diabetes Mellitus deben mantener unas cifras de HbA1c < 7.5%, evitar la obesidad, mantener un control de la hipertensión arterial y de la dislipemia.
3. Si las medidas higiénico-dietéticas fracasan para el control de los factores predisponentes del hígado graso. Puede considerarse la utilización de fármacos como:

### - Hipolipemiantes

Existen fármacos que presentan mejoras en los ensayos clínicos realizados. Por ejemplo, el *gemfibrozilo* a dosis de 600 mg/día durante 4 semanas demostró una mejora significativa de las transaminasas. El *bezafibrato* es un fármaco que actúa como ligando del receptor  $\alpha$  del peroxisoma proliferante-activado que podría compensar la insuficiente  $\beta$ -oxidación mitocondrial en pacientes con NAFLD. El *probucol* presenta fuertes propiedades antioxidantes, en un estudio de 27 pacientes a dosis de 599 mg/día durante 6 meses consiguió reducir de forma significativa las transaminasas. La *atorvastatina* también obtuvo resultados muy prometedores que puede ser útiles para el tratamiento de la NAFLD.

### - Fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina

Fármacos como las tiazolidindionas o metformina han mejorado la resistencia a la insulina y el hígado graso en modelos de ratones con estas características.

La **metformina** es una biguanida que disminuye la hiperinsulinemia y mejora la resistencia hepática a la insulina utilizándose como antidiabético oral. Ha demostrado mejorar significativamente las enzimas hepáticas y la esteatosis probablemente al producir una menor expresión del TNF- $\alpha$ , inductor insulínico y productor de lesiones necroinflamatorias características de la NASH. Es un fármaco que puede utilizarse con total seguridad en pacientes con NASH y resistencia a la insulina y prediabetes. Aunque estaría contraindicado en pacientes que presentan acidosis láctica potencial, insuficiencia renal o insuficiencia cardiaca congestiva. Otro fármaco beneficioso en pacientes lipodistróficos con NASH sería la *leptina*.

### - Antioxidantes

La **vitamina E** es un antioxidante bien tolerado y barato que mejora las enzimas hepáticas a dosis de 400-1200 UI diarias vía oral en pacientes y ciertos modelos de animales de NASH.

La **betaína** es un metabolito de la colina que en un estudio piloto que incluyó 10 pacientes con NASH consiguió reducir las transaminasas séricas y mejorar el grado de esteatosis, necroinflamación y fibrosis.

La **silimarina** es un estimulante de la RNA polimerasa ribosómica, un quelante del hierro y un reductor de la actividad promotora tumoral. Velussi y cols comprobaron que era capaz de producir un descenso de la glucemia basal, de la insulina y del melandialdehído a los 12 meses de tratamiento.

La **N-acetilcisteína** evidenció un descenso significativo de las transaminasas y de la gamaglutamiltranspeptidasa en un estudio de 11 pacientes diagnosticados histológicamente de NASH, tratados durante tres meses con 1000 mg/día.

### - Ácidos grasos n-3 poliinsaturados (n-3 PUFAs)

El suplemento en la dieta de estos ácidos ha demostrado en diversos estudios humanos mejorar las transaminasas séricas, los triglicéridos y los niveles de glucosa en ayunas en pacientes con NAFLD. Pero otros estudios no tuvieron los mismos efectos, por tanto no está claro acerca de su recomendación.

### - Probióticos y simbióticos

Se han realizado ensayos con *Lactobacillus rhamnosus*, en los cuales se ha visto mejora de las transaminasas séricas y de la fibrosis. Pero al igual que los anteriores en otros estudios no se han obtenido dichos efectos. Por ello, no está claro su beneficio.

**- Ácido ursodesoxicólico**

Serían necesarios nuevos estudios aleatorizados y controlados con un mayor número de pacientes para llegar a conclusiones claras acerca de sus propiedades beneficiosas en pacientes NAFLD.

**- Antibióticos**

Mediante vía parenteral se administró polimixin B y metronidazol a ratas, logrando reducir el grado de esteatosis hepática y la producción de TNF- $\alpha$ .

**- Melatonina**

La melatonina es una hormona que es producida en la glándula pineal y actúa como hormona endocrina y paracrina. Existen diversos estudios que prueban la utilidad de esta hormona, como tratamiento en la NASH, por disminución del nivel de enzimas hepáticas, niveles de colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos libres. Por lo tanto, muestra su acción antihiperlipidémica.

En un estudio se incluyó 42 pacientes con NASH, diagnosticada por biopsia, durante 12 semanas con dieta adecuada, ejercicio moderado y melatonina. Los resultados que se observaron determinaron que en ambos grupos se habían reducido los niveles de las enzimas hepáticas, pero que era más notable en el grupo en el que se había administrado melatonina, en la dosis de 10 miligramos diarios.

Otro estudio elaborado en la Universidad de Annamalai, en la Facultad de Medicina, con ratas macho adultas demostró que la melatonina es un fuerte antioxidante capaz de neutralizar radicales libres, lo cual protege a las membranas celulares del daño oxidativo.<sup>36, 37</sup>

**- Flebotomías terapéuticas**

Se han llevado a cabo estudios con pacientes que presentan sobrecarga férrica asociada a resistencia insulínica, donde se logra reducir el riesgo de fibrosis hepática, cáncer o enfermedad cardiovascular. En otro estudio con pacientes intolerantes a los hidratos de carbono que presentaban además NAFLD mejoraron las concentraciones de insulina plasmática y normalizaron los niveles de transaminasas. Por ello, la depleción de hierro juega un papel importante junto con la hiperinsulinemia en la patogenia del NASH.

**- Suplementos nutricionales.**

La deficiencia de carnitina y/o colina disminuye la oxidación de los ácidos grasos libres y la secreción de VLDL contribuyendo a la aparición de esteatosis o NASH. Se suplementó con colina la alimentación de un grupo de pacientes con nutrición parenteral, mostrando una desaparición completa de la esteatosis.

**- Transplante hepático**

No es una buena solución ante pacientes con NASH, ya que existen recidivas. Se desconocen las causas aunque puede estar influenciada por múltiples factores.

**- Ácido ursodesoxicólico conjugado con lisofosfatidiletanolamida (AUDC-LPE)**

Estudio realizado en ratas con hígado graso alimentadas con una dieta deficitaria en metionina y colina en las que se aplica AUDC-LPE. La AUDC-LPE consigue disminuir el daño hepático en las diferentes etapas de la enfermedad, ya que presenta características inflamatorias, propiedades hipolipemiantes potentes, siendo capaz de inhibir la progresión de la enfermedad. Por ello, presenta un alto potencial para llegar a tratar el hígado graso no alcohólico.<sup>26</sup>

**- Manipulación epigenética**

La manipulación epigenética a través de vías metabólicas, como la del metabolismo del carbono se presenta como técnica prometedora para retardar la progresión de la enfermedad de hígado graso.

Mundialmente no existe una terapia efectiva, es necesario un mejor conocimiento de la enfermedad y ensayos terapéuticos prospectivos para una correcta toma de decisiones. Existen evidencias de mejoras en la enfermedad pero se necesitan ensayos clínicos aleatorios, control-placebo y doble-ciego, con un mayor número de pacientes por periodos más prolongados, valorando el grado de lesión esteatótica antes y después del tratamiento para conseguir así una terapia efectiva para pacientes con NAFLD.<sup>27, 28</sup>

## 5. MODELOS ANIMALES DE ESTEATOSIS

### 5.1 MODELOS DIETÉTICOS

Durante la última década ha habido un aumento del número de modelos de esteatohepatitis no alcohólica, con una variedad de perfiles metabólicos y de patrones histológicos observados en la esteatosis humana. Los modelos basados en la dieta han demostrado una similitud metabólica sustancial con los seres humanos con esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica reproduciendo características histológicas y la progresión a fibrosis hepática. La severidad de la dieta para reproducir esteatosis hepática no alcohólica depende de la especie (en ratas aparece con más sensibilidad que en los ratones), género (en machos parece ser más sensible que en las hembras que están protegidas por los estrógenos frente a la esteatosis) y la tensión del animal (Los ratones C57BL/6J parecen ser más susceptibles)<sup>1</sup>. Como pocos pacientes muestran defectos genéticos evidentes, el uso de modelos dietéticos es más relevante que los

modelos genéticos. Actualmente, el modelo de la dieta alta en grasa es el más utilizado<sup>2</sup>.

### 5.1.1 Dieta deficiente de colina y metionina (MCD):

La dieta deficiente de metionina y colina, antioxidantes esenciales para la beta-oxidación hepática y producción de VLDL, tiene un alto contenido de sacarosa y grasa (40% sacarosa y 10% grasa). Como resultado, los lípidos se depositan en el hígado y ante semejante estrés oxidativo se activa la producción de citoquinas y adipocitoquinas inflamatorias contribuyendo al daño hepático. Si antagonizamos el estrés oxidativo incrementando los antioxidantes se atenúa el grado de esteatohepatitis<sup>2</sup>.

En los ratones alimentados con la dieta deficiente de metionina y colina, los niveles de alanina transaminasa en suero están sistemáticamente aumentados. La esteatosis aparece al décimo día y la fibrosis perisinusoidal es observada entre la octava y décima semana en los ratones. Después de diez semanas alimentándolos con MCD, se observa una amplia esteatosis macrovesicular en todas las áreas excepto en la región periportal y focos necroinflamatorios con linfocitos y neutrófilos, más acusada en machos. Las ratas desarrollan más lentamente la esteatosis<sup>1,2</sup>.

### 5.1.2 Dieta deficiente en colina y L-amina (CDAA):

Este tipo de dieta tiene la misma composición que la dieta deficiente en colina y metionina. La única diferencia es el reemplazo de proteínas por otras equivalentes, mezcla de ácidos L-amina. Al igual que la MCD, existe un aumento del estrés oxidativo, de síntesis lipídica e inflamación, resultando un hígado fibroso. Es necesario un largo periodo de tiempo con esta dieta para que se desarrollen cambios histológicos. Los ratones no ganan peso ni presentan cambios de sensibilidad periférica a la insulina. Al ser un marco diferente de lo que puede ser la enfermedad en humanos, no deberíamos usarla como modelo en investigación<sup>1</sup>.

### 5.1.3 Dieta elevada en grasas (HFD):

Muchos autores han llevado a cabo diferentes diseños experimentales con las dietas elevadas en grasa para la reproducción de esteatosis y esteatohepatitis en animales experimentales, con gran variedad en la composición de la dieta, en la forma de administración del alimento (ad libitum o mediante cánulaintragástrica), además de diferentes cepas, edades y sexo de las ratas. La composición de grasas y ácidos grasos influyen en la expresión de muchos genes, particularmente en el hígado<sup>2</sup>.

La resistencia a la insulina es uno de los factores patogénicos más importantes de la esteatosis. Debido a esto, la dieta elevada en grasas, en ratas se asemejan más los resultados, a la patogénesis de la enfermedad de hígado graso no alcohólico humana que los modelos genéticos y dietas con déficit de nutrientes. Ya que esta dieta, se

emplea como modelo del síndrome metabólico, dislipemia, obesidad, además de la resistencia a la insulina<sup>4</sup>.

En las ratas alimentadas con la dieta elevada en grasas, se observa esteatosis en el 66% de los hepatocitos con patrones histológicos diferentes. En algunos estudios se desarrolló esteatosis micovesicular mientras que en otros se desarrolló una fibrosis muy marcada con esteatosis macrovesicular. La enfermedad de hígado graso es más frecuente en hombres que en mujeres, estos estudios demuestran la misma evidencia con las ratas macho, presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar la esteatosis<sup>4,9</sup>.

Lieber et al realizó un modelo con dieta alta en grasas (compuesta por un 71% de grasas, un 11% de hidratos de carbono y un 18% de proteínas). Las ratas estuvieron alimentándose con esta dieta durante 3 semanas, mostrando elevación de los niveles de insulina plasmática. Desarrollaron una marcada esteatosis panlobular, y las concentraciones hepáticas de lípidos fueron el doble que las de ratas control que siguieron la dieta estándar de Lieber-D Carli (35% de grasa, 47% de hidratos de carbono, y 18% de proteínas). Al igual que ocurre en los humanos, presentaron daño oxidativo hepático y cuando esta dieta se restringía, disminuía la esteatosis, la inflamación hepática, el estrés oxidativo y los niveles plasmáticos de insulina.<sup>4</sup>

Otro modelo realizado, comparan cuatro dietas elevadas en grasas: manteca de cerdo, aceite de oliva, grasa de coco y aceite de pescado. Histológicamente se concluyó que tanto la manteca de cerdo como el aceite de oliva y el coco producían una esteatosis microvesicular sin inflamación ni fibrosis. Las dietas basadas en el aceite de oliva y la manteca de cerdo producían una mayor obesidad y resistencia a la insulina, además de un mayor acúmulo de grasa en el hígado. Sin embargo, la dieta basada en el aceite de pescado mostró efectos beneficiosos debido a que reducía la severidad de la esteatosis y producía un aumento de los factores reguladores de la oxidación de los ácidos grasos.<sup>4</sup>

En otro estudio, se sobrealimentó de forma intragástrica a los ratones durante 9 semanas con dieta elevada en grasas. Estos ratones mostraron obesidad, aumento de grasa visceral, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Replicando los cambios histopatológicos y patogénicos de la esteatohepatitis, casi la mitad de los animales desarrollaron esteatohepatitis y sus niveles de ALT se veían 9-10 veces aumentados. Se apreciaron infiltraciones de neutrófilos y fibrosis perisinusoidal como la esteatohepatitis humana. Este estudio presenta limitaciones como la sobrealimentación, el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y los requisitos técnicos y habilidades necesarias para realizarlo.<sup>12</sup>

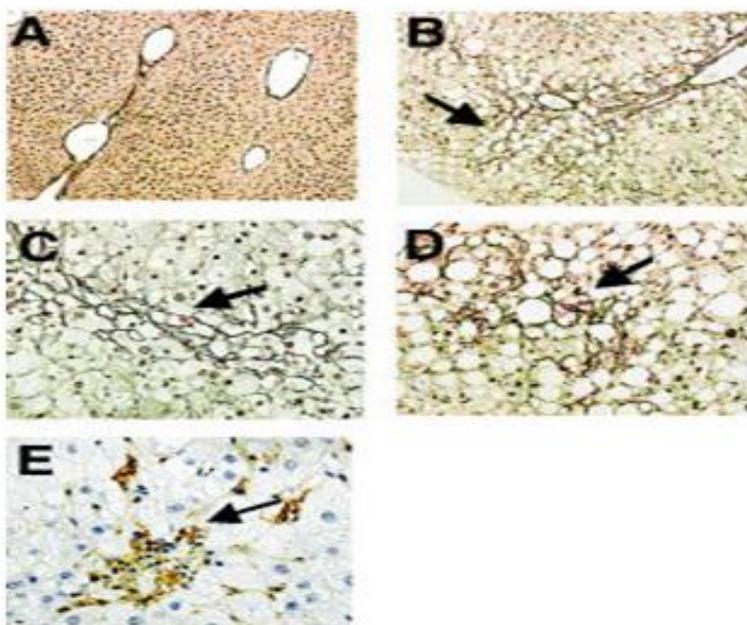


Fig. 8. Fibrosis hepática inducida por sobrealimentación. (A) Tinción normal de reticulina del hígado de un ratón alimentado de forma regular. (B) Aumento de la tinción de reticulina del hígado de un ratón sobrealimentado. (C) Mayor aumento del hígado del ratón sobrealimentado mostrando fibrosis sinusoidal (flecha). (D) Aumento mayor del panel B que representa la fibrosis pericelular (flecha). (E) Aumento de la tinción de las células positivas a la actina del músculo liso, indicando la activación de las células estrelladas hepáticas (flecha). (Deng QG, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S, Tsukamoto H. *Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice*)<sup>12</sup>

Si comparamos el daño hepático entre la dieta elevada en grasas y la dieta deficiente de colina-metionina, el grado de daño es menos severo en la dieta elevada en grasas. El método de sobrealimentación intragástrico es el que más se asemeja a la esteatohepatitis en humanos.<sup>2, 13</sup>

#### 5.1.4 Colesterol y colato:

Un gran factor de riesgo para la progresión a la inflamación hepática es llevar una dieta alta en colesterol. Los ratones C57BL/6J alimentados con una dieta constituida por colesterol al 1.25%, 7.5% de mantequilla de coco y 0.5% de colato más de tres semanas, muestra una gran inflamación debido a los componentes de colesterol en la dieta y un aumento de la fibrogénesis por el colato. Entre la semana 6 y 24 se induce la progresión a la esteatosis, inflamación y fibrosis por esta dieta aterogénica y a partir de la semana 24 se observaron hepatocitos balonzados. La adición de grasa al 60% (mantequilla de coco) acelera el desarrollo de Esteatohepatitis no alcohólica y hepatocitos balonzados a las 12 semanas. Los ratones con dieta aterogénica son notablemente sensibles a la insulina en comparación con el grupo control.

Un modelo que combine una dieta alta en grasa, colesterol y colato en animales es un factor importante para que se produzca esteatosis hepática y progrese hacia la esteatohepatitis no alcohólica. La dieta aterogénica replica la patogenia de la enfermedad en humanos.<sup>1, 4</sup>

### 5.1.5 Fructosa

Las ratas alimentadas con una dieta enriquecida en fructosa presentaron una mayor esteatosis tanto macrovesicular como microvesicular, inflamación intralobular, mayor peso corporal y mayores concentraciones de triglicéridos hepáticos que en las ratas control. La zona principalmente afectada es la zona 1, a diferencia de la esteatosis hepática en el adulto que la zona 3 es la predominante en esteatosis. Además, mostraron mayores expresiones de interleuquina (IL)-6 y TNF- $\alpha$  en el hígado en comparación con las ratas control. La inflamación causada por toxinas endógenas de metabolitos de la fructosa se piensa que es uno de los mecanismos de la patogenia de la esteatohepatitis.<sup>2, 11</sup>

La dieta elevada en fructosa es un buen modelo para reproducir el síndrome metabólico que se observa en la esteatosis y esteatohepatitis. Reproduce la resistencia a la insulina, la dislipemia, elevación de las citoquinas y marcadores de peroxidación de lípidos propios del síndrome metabólico.<sup>2</sup>

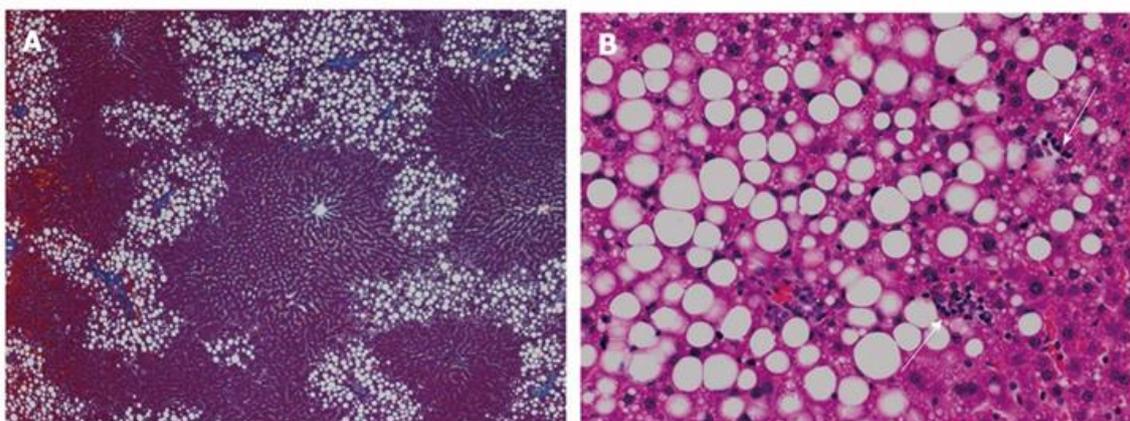


Fig 9. Histología hepática de ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa durante 5 semanas. A: Se observa esteatosis hepática, principalmente distribuida en la zona 1, (azan stain,  $\times 40$ ); B: Tanto la esteatosis macrovesicular como la microvesicular son evidentes, así como focos necroinflamatorios dispersos (flechas) (hematoxilina y coloración de eosina,  $\times 200$ ). (Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato Y. *Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis.*)<sup>2</sup>

### 5.1.6 Dieta combinada (Fructosa y grasa)

Un consumo elevado de fructosa en una dieta alta en grasas saturadas y colesterol reproduce todas las características de la esteatosis, incluyendo los hepatocitos balonizados, en grandes animales. Cuando los ratones C57BL/6 fueron alimentados con una dieta elevada en grasa [45% calorías de grasa y un 30% de aceite vegetal hidrogenado (ácidos grasos 28% saturados, 57% monoinsaturados, 13% poliinsaturados)], dieta elevada en fructosa (55% fructosa, 45% glucosa consumida con agua) y un estatus sedentario durante 16 semanas desarrollaron obesidad con resistencia a la insulina y esteatosis hepática severa asociada a necrosis e inflamación.

Aunque los ratones muestran marcas moleculares de fibrogénesis, la fibrosis visible no fue muy llamativa histológicamente. Por ello se mantuvo la sobrenutrición durante 6 meses, ya que la fibrosis en los pacientes con esteatosis se desarrolla en un largo periodo de tiempo.

La dieta elevada en grasa, fructosa y colesterol fue comparada con la dieta alta en grasa; ambas dietas mostraron características del síndrome metabólico con obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis. Sin embargo la dieta elevada en grasa presentó una mínima inflamación y no aumento de la fibrosis, mientras que la dieta contenida en grasa, fructosa y colesterol demostró una esteatosis pronunciada con hepatocitos balonzados y una fibrosis progresiva, con una alta fidelidad a las características histológicas de hígado graso no alcohólico en humanos. Esto quiere decir que la adición de fructosa y colesterol a la dieta rica en grasa refleja un desarrollo de esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica.<sup>1</sup>

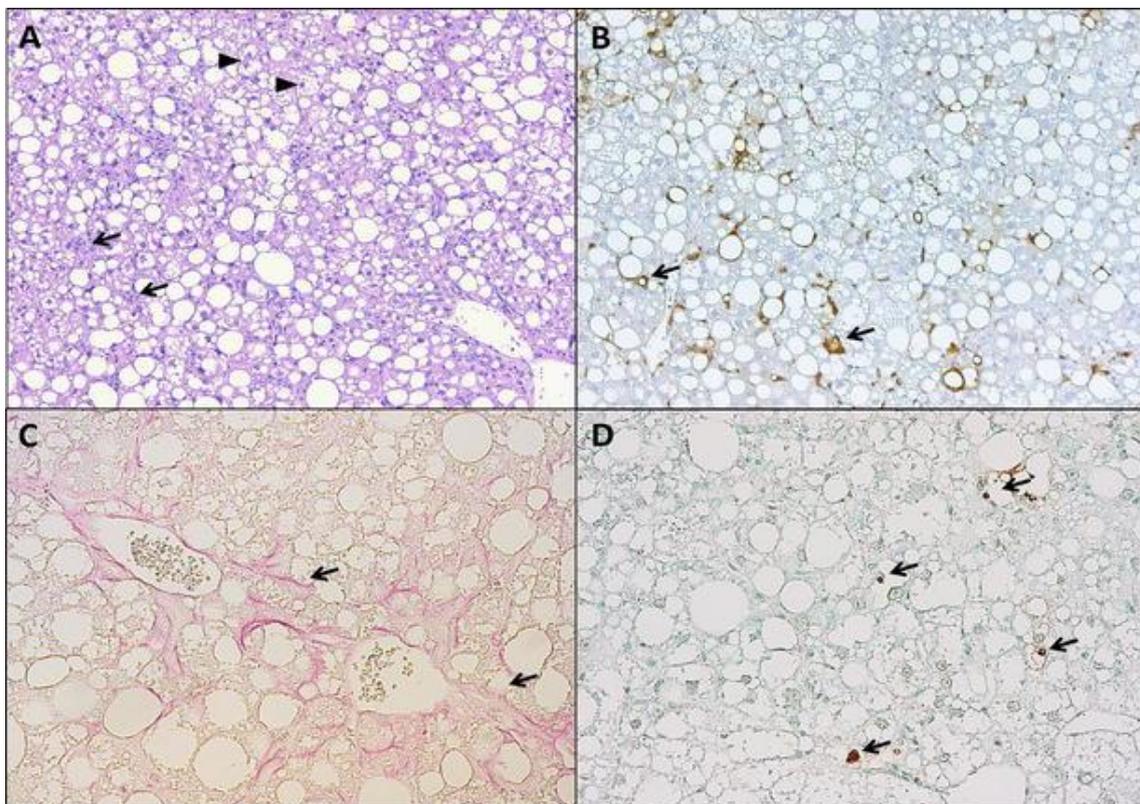


Fig. 10. Secciones histológicas de un hígado de ratón alimentado con una dieta alta en grasas, fructosa y colesterol (FFC) durante 6 meses. (A) Esteatosis con infiltración de células inflamatorias (flechas) y hepatocitos balonzados (flechas). (B) inmunohistoquímica macrófaga específica de galactosa, muestra infiltración de macrófagos (flechas). (C) Tinción roja, muestra fibrosis pericelular y puentes de fibrosis (flechas). (D) Desoxiuridina trifosfato mediado por desoxinucleotidil transferasa (TUNEL), muestra roturas de cadena de ADN marcadas en núcleos apoptóticos (flechas). (Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. *Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation*)<sup>1</sup>

### 5. 2 MODELOS GENÉTICOS

Debido a la gran variedad de modificaciones genéticas que se realizan en los ratones, podemos entender mejor como se produce el hígado graso no alcohólico. Todos estos modelos tienen en común que el resultado de las alteraciones genéticas es un hígado con acumulación de lípidos en ausencia de una inflamación marcada y fibrosis. Por ello, un estímulo adicional como es la modificación de la dieta, se requiere con frecuencia para inducir las características del hígado graso no alcohólico. Una limitación importante de estos modelos es que la manipulación genética para reproducir la esteatosis, presenta una etiología diferente a la de los humanos asociada al síndrome metabólico. Sin embargo, los modelos genéticos NAFLD/NASH han facilitado la comprensión del mecanismo por el cual el metabolismo lipídico produce enfermedad de hígado graso.<sup>1</sup>

#### 5.2.1 Ratones transgénicos SREBP-1c (ratones lipoatróficos)

En el tejido graso de estos ratones, el SREBP-1c que es un factor de transcripción lipogénico, está sobreexpresado. Esto crea un tipo de lipodistrofia congénita en la cual se desarrolla una alteración en la diferenciación adiposa secundaria provocando resistencia a la insulina y diabetes. En estos ratones, se observa una disminución del tejido graso con acumulación de lípidos en el hígado, y una marcada esteatosis hepática que se produce a los 8 días de edad. Estos ratones parecen ser apropiados para el tipo de esteatohepatitis asociada a lipodistrofia. Sin embargo, es cuestionable si ellos pueden ser el modelo típico de NAFLD/NASH, porque la grasa visceral característica aumenta en humanos con NAFLD/NASH.<sup>1,2</sup>

#### 5.2.2. Ratones Ob/ob

Los ratones Ob/ob poseen una mutación espontánea en el gen de la leptina. La leptina es una adipoquina producida por el tejido adiposo, actúa en el núcleo hipotalámico medio ventral regulando el gasto de energía y el apetito. Los ratones Ob/ob en ausencia de esta adipoquina presentan hiperfagia, se vuelven inactivos y extremadamente obesos, muestran hiperglucemia, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Desarrollan una esteatosis hepática de forma espontánea pero no progresan a esteatohepatitis espontáneamente. Sería necesario una dieta deficiente de metionina y colina o una dieta elevada en grasa, o dosis bajas de lipopolisacáridos (endotoxina) para desencadenar una esteatohepatitis en los ratones ob/ob.<sup>1,2,3</sup>

Otra característica de estos ratones es que están protegidos de fibrosis, un fenómeno dirigido por la leptina, mediador esencial de la fibrogenesis en el hígado. Las mutaciones en el gen ob no son prevalentes en sujetos obesos o pacientes NASH, pero los niveles de leptina escasos se correlacionan con el desarrollo de NASH.<sup>1,2,3</sup>

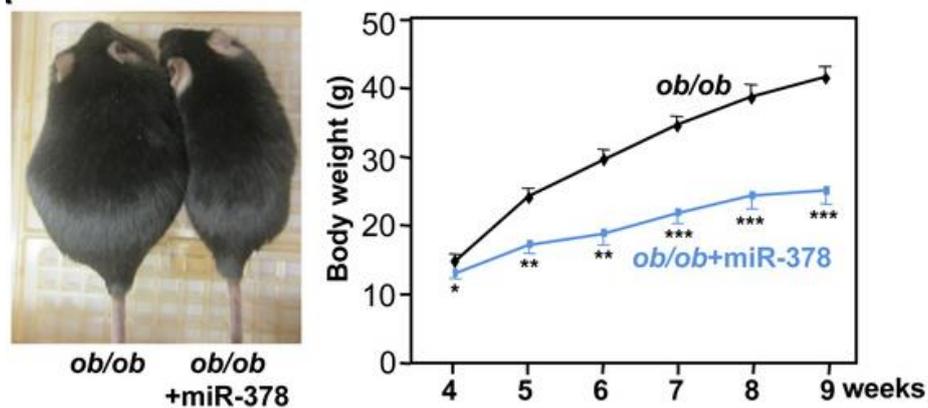


Fig. 11. A la izquierda, la imagen muestra ratones *ob/ob* y ratones *ob/ob* portando el transgén *miR-378* con nueve semanas de edad; A la derecha, pesos corporales de ratones *ob/ob* y ratones *ob/ob* con el transgén *miR-378* alimentado con una dieta normal. Los ratones *ob/ob* en ausencia de leptina presentan hiperfagia, inactividad y obesos. El transgén *miR-378* se muestra como componente regulador de la expansión y la resistencia a la obesidad. (Pan D, Mao C, Quattrochi B, Friedline HR, Zhu JL, Jung DY, et al. *MicroRNA-378 controls classical brown fat expansion to counteract obesity*)<sup>29</sup>

### 5.2.3 Ratones *Db/db*

Los ratones *Db/db* poseen una mutación en el gen de los receptores de leptina por lo que muestran niveles elevados o normales de leptina pero resistentes a sus efectos. Estos ratones son obesos, resistentes a la insulina, diabéticos y desarrollan una esteatosis hepática macrovesicular. Desarrollan NASH cuando se introduce una dieta deficiente de metionina y colina, donde se observa fibrosis significativa en el hígado a diferencia de los ratones *ob/ob*. La ventaja de los ratones *ob/ob* y *db/db* es que su fenotipo simula el síndrome metabólico de los humanos en muchos aspectos. Sin embargo, estos ratones tienen como desventaja que ellos no desarrollan espontáneamente esteatohepatitis ni fibrosis en el hígado.<sup>1, 2, 3</sup>

### 5.2.4 Ratones *KK-A*

Presentan una mutación heterocigota del gen *agouti* (*KK-Ay/a*) que produce una pérdida de melanocortina y un fenotipo obeso, debido a la hiperfagia por supresión hipotalámica del control del apetito. Estos ratones desarrollan esteatosis hepática en presencia de obesidad y resistencia a la insulina, pero tampoco producen esteatohepatitis significativa espontáneamente. Los ratones *KK-A* mostraron una gran susceptibilidad a la producción de esteatohepatitis con la introducción de la dieta deficiente de metionina y colina, donde la hipoadiponectinemia jugaba un papel muy probable en la exacerbación de la respuesta inflamatoria y profibrogénica.<sup>1, 2</sup>

### 5.2.5 Ratones *PTEN flox/flox*

*PTEN* es un gen supresor tumoral que codifica la fosfatasa lipídica cuyo sustrato más importante es el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (*PIP3*). Además, es un regulador

negativo de varias vías de señalización tales como fosfatidilinositol 3-kinasa y serine-treonina protein kinasa B (PKB, o Akt). Esta vía regula la apoptosis, la proliferación celular y la formación tumoral. El gen PTEN es específico del hígado de estos ratones, muestran hepatomegalia y esteatohepatitis, siendo similar la histopatología a la de los humanos con NASH. La esteatosis es observada a las 10 semanas de edad, y la esteatohepatitis con fibrosis se observa a las 40 semanas. Presentan una incidencia del 47% a las 44 semanas de adenomas y a las 74-78 semanas todos los hígados los presentan, siendo un 66% el desarrollo de Hepatocarcinoma. Este gen hace que los ratones sean hipersensibles a la insulina e invalida los hepatocitos que tienen una alta actividad proliferativa in vitro. La ventaja de este modelo es que el fenotipo histológico se asemeja al de los humanos con NASH. La desventaja de este modelo es que es hipersensible a la insulina.<sup>2</sup>

### 5.2.6 Ratones con eliminación del receptor- $\alpha$ activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- $\alpha$ )

El PPAR- $\alpha$  es la llave reguladora de los genes implicados en el sistema de oxidación peroxisomal, mitocondrial y microsomal de los ácidos grasos en el hígado. La deficiencia de PPAR- $\alpha$  previene la regulación positiva de los ácidos grasos en respuesta al aumento de ácidos grasos del tejido adiposo al hígado, inducido ya sea por privación de alimentos o por una dieta con alto contenido en grasas. Por ello, en la dieta elevada en grasas y en el ayuno se produce una esteatosis severa porque la oxidación de los ácidos grasos está inhibida. Mientras que la grasa no se acumula en el hígado de los ratones con una mutación homocigota del gen PPAR- $\alpha$  bajo condiciones de alimentación normal. Los ratones con deficiencia de PPAR- $\alpha$  desarrollan espontáneamente un patrón dismórfico de obesidad (más pronunciado en ratones hembra) y esteatosis hepática, sin embargo, no progresa a Hígado graso no alcohólico<sup>1,2</sup>.

### 5.2.7 Ratones con déficit de acetil-coenzima A oxidasa (AOX-/-)

La acetil-coenzima A oxidasa (AOX) es la enzima que limita la beta oxidación peroxisomal de los ácidos grasos de cadena larga (LCFA). Los ratones AOX -/- tienen una deficiente beta-oxidación peroxisomal de LCFA, la cual se acumula en el hígado y conduce a la esteatohepatitis. Empiezan a mostrar cambios con microvesículas de grasa en los hepatocitos en las zonas 2 y 3 de los lóbulos hepáticos a los 7 días de edad. A los 30 días de edad, muestran un incremento grave de esteatosis hepática en las células parenquimatosas y simultáneamente infiltración focal de células inflamatorias. A los 2 meses de edad, se observa en áreas periportales, un conglomerado de hepatocitos con eosinófilos de citoplasma granulado ricos en peroxisomas. A los 4-5 meses de edad, aumenta la expresión de la PPAR- $\alpha$ , del citocromo P450 y niveles de agua aumentados. Sin embargo, el aumento de la oxidación de los ácidos grasos se observa en los meses 6-7 de edad como compensación y la esteatosis hepática se recupera por la regeneración de los

hepatocitos. Estos ratones desarrollan adenomas hepatocelulares y Hepatocarcinomas por los 15 meses de edad.<sup>1,2</sup>

### 5.2.8 Ratones con déficit de metionina-adenosiltransferasa-1 A (MAT1A -/-)

La metionina-adenosiltransferasa-1 A (MAT1A) es la enzima limitante, específica del hígado, del metabolismo de la metionina y cataliza la formación de S-adenosilmetionina. Los ratones MAT1A -/- tienen disminuidos los niveles de antioxidantes, incluyendo el glutatión y la disminución de la expresión de los genes involucrados en la oxidación lipídica. Los ratones MAT1A -/- desarrollan espontáneamente esteatohepatitis después de los 8 meses de edad y se produce una proliferación de hepatocitos aumentados de tamaño que llevan al desarrollo de tumores. Los ratones son susceptibles al desarrollo de hígado graso a los 3 meses de edad, inducidos por la dieta deficitaria de colina. Aunque los ratones MAT1A son hiperglucémicos, sus niveles de insulina son normales y ellos no parecen desarrollar otras características del síndrome metabólico.<sup>1,2,3</sup>

### 5.2.9 Ratones NRF1 -/-

El gen del Factor Respiratorio Nuclear es eliminado en estos ratones, cuya delección total de este gen es letal. Los ratones con anulación del NRF1 muestran esteatohepatitis con niveles elevados de trigliceridemia a las 4 semanas. Presentan fibrosis pericelular y pericentral a los 4 meses y pueden desarrollarse adenomas hepáticos y carcinomas a los 10 meses. En los hepatocitos se pueden ver niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y elevadas cantidades de lípidos además de la oxidación del DNA.<sup>13</sup>

### 5.2.10 Ratas obesas Zucker (fa/fa)

Se ha demostrado que el gen de la rata obesa (fa) es homólogo al gen db del ratón. Por ello es un modelo similar tanto a los ratones db/db como a los ratones ob/ob, ya que estas ratas se vuelven obesas, inactivas, desarrollan hiperleptinemia, hiperlipemia, hiperfagia y resistencia a la insulina. Produciéndose una esteatosis macrovesicular y microvesicular sin signos de progresión a esteatohepatitis, localizándose el acúmulo de grasa en el área periportal. Al igual que los ratones db/db y ob/ob no desarrollan esteatohepatitis espontáneamente, sino que requieren una alimentación rica en disacáridos, dieta alta en grasa o combinación de una dieta con déficit de metionina y colina con una dieta elevada en grasa.<sup>3,4</sup>

Es uno de los modelos genéticos más utilizados en ratas. Aunque las ratas obesas Zucker simulan el síndrome metabólico, tienen varias desventajas, no reflejan la etiopatogenia multifactorial de la esteatosis en humanos, la esteatohepatitis no la desarrollan de forma espontánea y son resistentes a la fibrosis hepática.<sup>4</sup>

### 5.2.11 Ratas transgénicas con hipertensión espontánea con sobreexpresión SREBP-1a

Es un nuevo modelo transgénico de sobreexpresión SREBP-1a en ratas que son espontáneamente hipertensivas. Como en los ratones lipoatróficos, los polimorfismos SREBP-1 se asocian con obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo II en los humanos. Pero estas ratas no son obesas, desarrollan hipertensión espontáneamente, hígado graso y características del síndrome metabólico como la hiperinsulinemia, hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Además si se les alimenta con una diete elevada en fructosa presentan un aumento significativo del estrés oxidativo en el hígado y sobre todo es más pronunciado si las ratas presentan más edad.<sup>4</sup>

### 5.2.12 Ratas obesas de Otsuka Long-Evans Tokushima (OLEFT)

Las ratas OLEFT presentan una delección en la región promotora del gen que codifica la CCK-1 receptor de colecistoquinina -1, que participa en el control de la saciedad en el hipotálamo. Por tanto, estas ratas presentan hiperfagia, una ligera obesidad con hiperlipemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus. Cuando son alimentadas con una dieta estándar desarrollan esteatosis espontáneamente. Pero para la inducción de esteatohepatitis se les sometía a una dieta con déficit de metionina y colina o una combinada con alto contenido en grasa. La ventaja de la combinación de ambas dietas es que las ratas desarrollan esteatohepatitis con resistencia a la insulina, inflamación más pronunciada y fibrosis, además de un aumento de la expresión de ARNm de genes lipogénicos. Al igual que las ratas obesas de Zucker, las ratas OLEFT no reflejan la etiopatogenia de hígado graso en humanos. No son por ello, un modelo adecuado sin una dieta adicional.<sup>4</sup>

## 5.3 MODELOS COMBINADOS

Con la finalidad de conseguir reproducir histológica y fisiopatológicamente la enfermedad de hígado graso, de la forma que más se asemeje a la de los humanos, muchos de los modelos animales se combinan, mutaciones genéticas con cambios dietéticos o químicos.<sup>13</sup> Así, Saha et al realizó un estudio con ratones ob/ob y db/db alimentándolos con una dieta deficitaria en metionina y colina. Donde observó que los ratones db/db tenían niveles de ALT en suero más elevados y una inflamación y fibrosis hepática más grave que los ratones ob/ob y de tipo salvaje. (20) Por otro lado, los ratones con eliminación de PPAR- $\alpha$  con una dieta deficiente de metionina y colina presentaron una esteatohepatitis más severa que la de los ratones salvajes llevados con la misma alimentación.<sup>21</sup> Estos dos entre otras muchas más combinaciones.

## 5.4 MODELOS EN GRANDES ANIMALES

Los modelos en grandes animales son costosos y sólo pueden ser desarrollados y utilizados por centros con recursos especiales. Se han descrito muy pocos modelos de esteatosis en grandes animales, aunque ofrecen una oportunidad única para el examen en serie del mismo conjunto de animales. Además, los grandes animales como los cerdos se asemejan a la anatomía y a la fisiología humana mucho más cerca que los roedores. La mayoría de estos modelos utilizan cerdos y se lleva a cabo la reproducción de la esteatosis mediante mecanismos tóxicos y dietas similares a las utilizadas en roedores, como dietas aterogénicas, fructosa, deficiente de colina y metionina entre otras. Son una oportunidad para investigar la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica de forma longitudinal y también para probar la eficacia de nuevos agentes terapéuticos.<sup>23, 24</sup>

Los cerdos a estudio, expresan un genotipo ahorrador, que les permite almacenar grandes cantidades de grasa y sobrevivir largos periodos de hambruna. Son los cerdos de la isla de Ossabaw, cerca de la costa de Georgia, una raza salvaje de cerdos que tienen un gran valor científico como excelente modelo para investigar el síndrome metabólico, la progresión a la diabetes tipo 2 y las complicaciones a largo plazo incluyendo la enfermedad de arterias coronarias.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

“Se ha realizado una revisión sistemática acerca de los nuevos modelos de esteatosis en grandes animales, descripción y tratamiento”. Consultando revisiones sistemáticas y estudios científicos sobre el tema a tratar.

### Fuentes de información

Este trabajo parte de una revisión de diferentes artículos seleccionados de los últimos cinco años. Dichos artículos se han seleccionado de las principales bases de datos biomédicas: Pubmed, Medline, The Cochrane Library.

La palabra clave a utilizar ha sido *model steatosis* con la que aparecen 946 artículos.

Más palabras clave que he utilizado para realizar la búsqueda han sido: animal model steatosis, nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, metabolic syndrome, pigs fatty liver, Osabaw pigs steatotic, rodent model.

Los artículos que se han utilizado son: metaanálisis, revistas clínicas, ensayos clínicos, estudios piloto, tesis doctorales. Todos los artículos encontrados son textos en lengua inglesa, de los que utilice finalmente 37.

## Metodología

Durante la búsqueda, he utilizado palabras como, *model steatosis* o *nonalcoholic steatohepatitis* para buscar artículos acerca de los modelos esteatósicos existentes, aparecieron muchos estudios relacionados con roedores y únicamente un artículo relacionado con primates. También debía descartar los artículos que trataban de la esteatosis hepática alcohólica, tema que existen muchas publicaciones, además de los estudios que no se centraban en aumento de esteatosis sino en la influencia sobre la proliferación de células tumorales o microambientes para células metastásicas. Para centrar mi búsqueda en los modelos de grandes animales debía hacer una búsqueda más específica, utilizando términos como: *Ossabaw pigs steatotic* o *pigs fatty liver*. De esta manera obtuve dos artículos con modelos porcinos, a destacar *Nutritional Model of Steatohepatitis and Metabolic Syndrome in the Ossabaw Miniature Swine*. Además he utilizado los datos de dos estudios experimentales realizados en Zaragoza en el Hospital Clínico Universitario y la facultad de veterinaria que me han proporcionado datos de 52 animales porcinos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 GRANDES ANIMALES

En el estudio realizado por Spannbauer, los cerdos desarrollaron esteatosis macrovesicular mediante una dieta deficiente en proteínas y esteatosis microvesicular con la ingesta enólica aislada.<sup>6</sup>

Group	Day	Steatosis (% of hepatocytes)	Morphology	INFLAMMATION	Hepatocyte-swelling	Hepatocellular-necrosis
1	24	10,0 ± 2	microvesicular	mild	none	none
2	48	30,0 ± 2	microvesicular	moderate	none	single cell necrosis
3	72	45,0 ± 8	microvesicular	moderate	none	single cell necrosis
4	72	67,5 ± 3	microvesicular	moderate	severe	focal necrosis
5	72	71,7 ± 2	macrovesicular	mild	severe	focal necrosis

Fig. 12. En la tabla se muestran cinco grupos de cerdos Landrace compuestos de 6 animales, con un peso corporal inicial de  $15,9 \pm 0,6$  kg. Recibieron diariamente cantidades constantes de etanol y/o una dieta deficiente en proteínas. El grupo 1 recibió etanol oral y los grupos 2-4 se le administró por medio de un catéter intragástrico percutáneo. En el grupo 5 se administró una dieta deficiente en proteínas. (Spannbauer MM, Oleszczuk A, Tannapfel A, Blüher M, Pietsch UC, Hengstler J, Donaubaue B, Madaj-Sterba P, Fürll M, Schuhmacher A, Thiery J, Hauss JP, Schön MR. Micro- and Macrovesicular steatotic liver model for transplantation induced by ethanol and protein-deficient diet)<sup>6</sup>

Otro de los estudios, realizado por Mets, se administró 1g/Kg de alcohol con agua (1:3) mediante una sonda nasogástrica durante 16 días y los cerdos desarrollaron esteatosis.<sup>5</sup>

Otros estudios llevados a cabo con cerdos de Ossabaw, se realizaron cuatro grupos a los que se les alimentó a cada uno con una dieta: dieta estándar, dieta elevada en fructosa, dieta aterogénica y dieta aterogénica modificada.

Los cerdos alimentados con una *dieta elevada en fructosa* presentaron un marcado aumento de peso, una resistencia a la insulina e hipertensión, es decir presentaron síndrome metabólico pero sin dislipemia. En comparación con el grupo control no fueron diferentes los niveles de insulina, glucosa, evaluación del modelo de homeostasis, colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos en ayunas. Estos tenían en ayuno, niveles más altos de ácidos grasos libres y leptina sérica. Los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina y bilirrubina total no fueron diferentes al control. Niveles significativamente más bajos de alanina aminotransferasa (ALT). La histología hepática de los cerdos en el grupo de la fructosa era indistinguible de la de los cerdos de control, es decir sin alteraciones hepáticas en la biopsia. Ni el grupo control ni los alimentados con dieta elevada en fructosa mostraron esteatosis, hepatocitos balonizados o fibrosis.

Los cerdos alimentados con *dieta aterogénica compuesta por aceite de soja, sin fructosa añadida*, aumentaron su peso pero no más que el grupo de fructosa. En ayunas, los niveles séricos de insulina eran más altos que el grupo control, pero no los de glucosa. Por otro lado, Los niveles de colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos fueron más altos que en el grupo control y fructosa. Sin embargo, Los ácidos grasos libres y la leptina fueron más altos en el grupo control, pero no diferentes al grupo de fructosa. Las AST, ALT y bilirrubina total en el grupo de dieta aterogénica no fueron superiores a los de los grupos control y fructosa, pero el nivel de fosfatasa alcalina fue significativamente mayor. Estos cerdos desarrollaron síndrome metabólico y presentaron histología hepática anormal consistente en esteatosis microvesicular difusa y células Kupffer espumosas y esteatóticas, pero sin hepatocitos balonizados ni fibrosis. Únicamente un cerdo mostró esteatosis macrovesicular.<sup>23</sup>

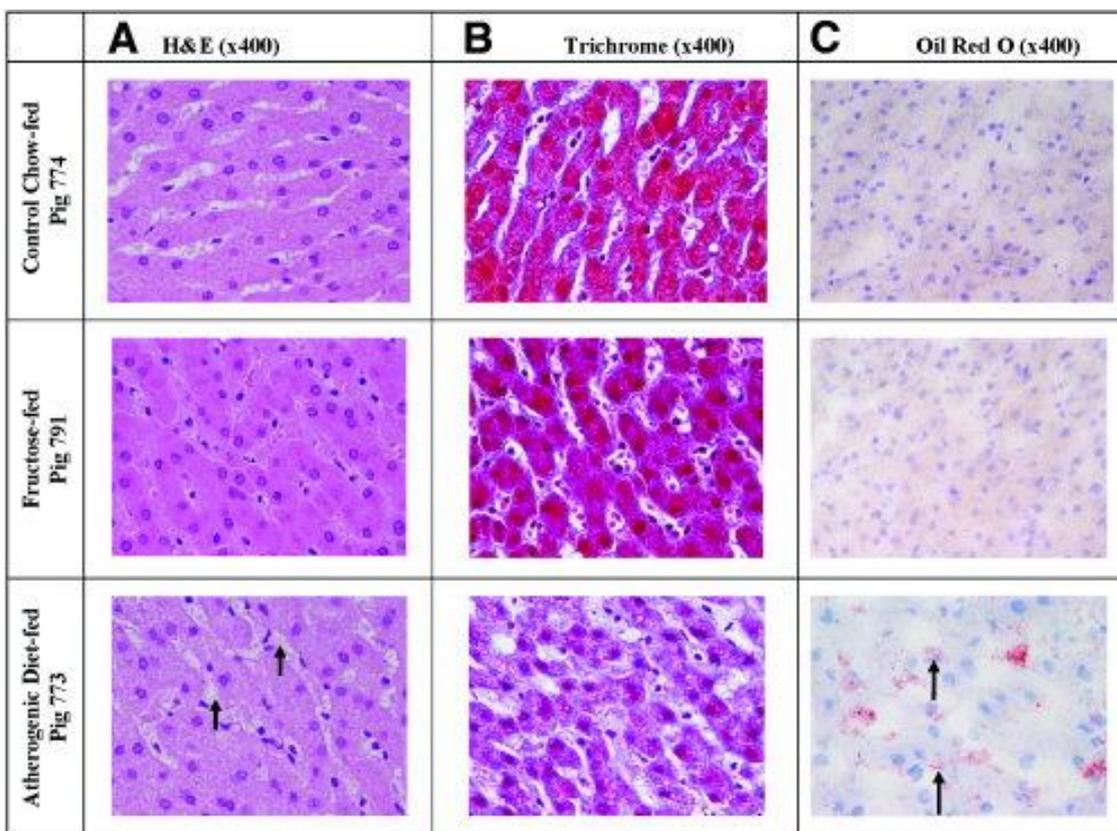


Fig. 13. Controles de comida estándar: no se observa acumulación de grasa en H & E (A) o tricrómico (B), y en Oil Red O(C) no muestran hallazgos anormales. Grupo de fructosa: No se observa acumulación de grasa en H & E (A) o tricrómico (B) ni en Oil Red O (C). Grupo de dieta aterogénica: (A y B) En H & E y tricromo muestran un cambio espumoso que implica células de Kupffer (flechas cortas). (C) El Oil Red O muestra grasa en las células de Kupffer (flechas largas) y en los hepatocitos, pero no muestra fibrosis. (Lee L, Alloosh M, Saxena R, Alstine WV, Watkins BA, Klaunig JE, Sturek M, chalasani N. *Nutritional Model of Steatohepatitis and Metabolic Syndrome in the Ossabaw Miniature Swine.*)<sup>23</sup>

Finalmente, Los cerdos alimentados con la dieta M-Ath (dieta aterogénica modificada con diferente fuente de grasa y proteína, más alta pero menor contenido de colina) aumentaron de peso, pero no más que el grupo de dieta aterogénica. Los valores de insulina, leptina, TNF- $\alpha$ , colesterol, ácidos grasos libres, LDL, HDL, triglicéridos, AST, fosfatasa alcalina y bilirrubina total fueron mayores que en el grupo control, menos la adiponectina que tuvo niveles más bajos. Los cerdos del grupo M-Ath tuvieron un colesterol total, LDL y triglicéridos significativamente más altos que los del grupo de dieta aterogénica, pero los niveles de HDL o de ácidos grasos libres no fueron diferentes. En comparación con el grupo de dieta aterogénica, los cerdos alimentados con dieta M-Ath presentaron AST y fosfatasa alcalina significativamente más altas pero no ALT o bilirrubina total. Acabaron desarrollando síndrome metabólico severo y evidencia notable de lesión hepática, con esteatosis macrovesicular y microvesicular, células de Kupffer espumosas y esteatóxicas, hepatocitos balonizados difusos y fibrosis perivenular y perisinusoidal importante. Ningún cerdo desarrolló cirrosis.<sup>23</sup>



Fig. 14. Los cerdos de Ossabaw alimentados con dieta aterogénica modificada (M-Ath) son significativamente obesos en comparación con los cerdos de Ossabaw (imagen superior) con una dieta estándar. (Lee L, Alloosh M, Saxena R, Alstine WV, Watkins BA, Klaunig JE, Sturek M, chalasani N. *Nutritional Model of Steatohepatitis and Metabolic Syndrome in the Ossabaw Miniature Swine.*)<sup>23</sup>

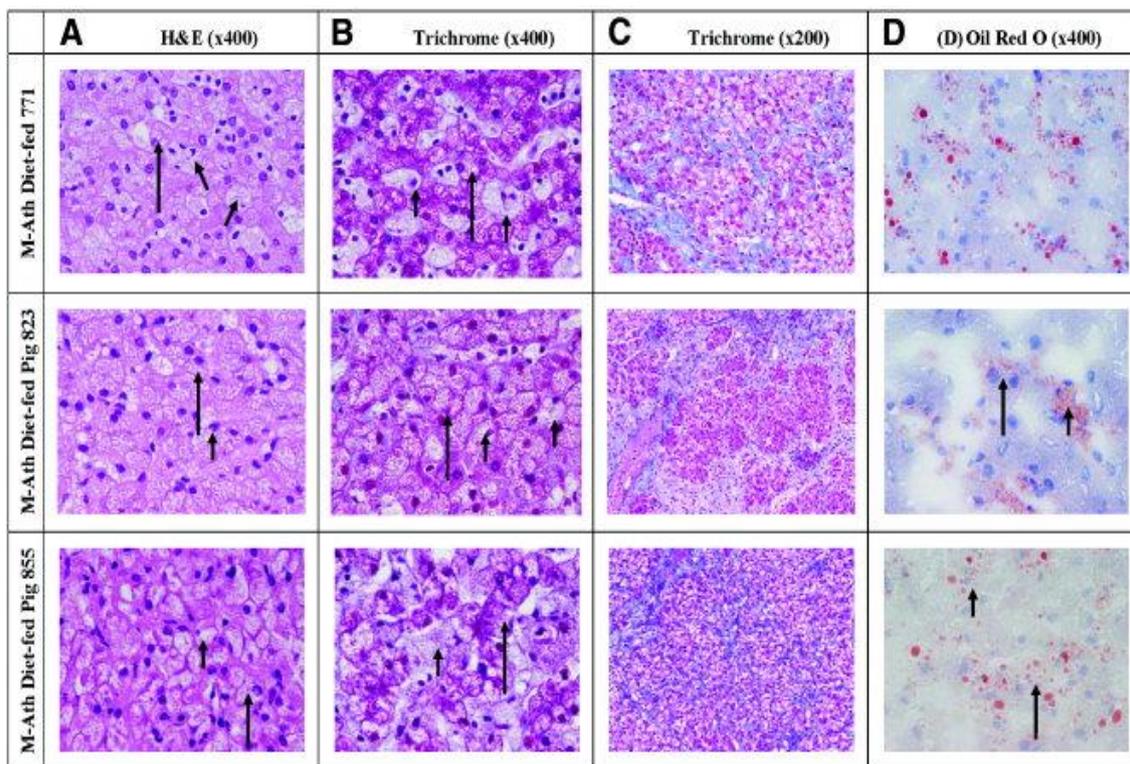


Fig. 15. Histología hepática de los cerdos Ossabaw alimentados con dieta aterogénica modificada (M-Ath). Cerdo 771: (A y B) En H & E y tricromo se muestra un cambio espumoso extenso que implica tanto hepatocitos (flechas largas) como células Kupffer (flechas cortas). (C) La tinción tricrómica muestra tejido fibroso que emana de los septos y se deposita en una distribución pericelular. (D) El Oil Red O muestra grasa macrovesicular y microvesicular, tanto en hepatocitos como en células de Kupffer. Muchas de las gotitas más grandes están probablemente en las células Ito. Cerdo 823: (A y B) en H & E y tricromo muestran un cambio espumoso extenso que implica tanto hepatocitos (flechas largas) como células Kupffer (flechas cortas). (C) La tinción tricrómica muestra tejido fibroso que emana de los septos y se deposita en una distribución pericelular. (D) El Oil Red O muestra grasa en ambos hepatocitos (flechas largas) y células de Kupffer (flechas cortas). Muchas de las gotitas más grandes están probablemente en las células Ito. Cerdo 855: (A y B) Las manchas de H & E y tricromo muestran un cambio espumoso extenso que implica tanto hepatocitos (flechas largas). (C) La tinción tricrómica muestra tejido fibroso que emana de los septos y se deposita en una distribución pericelular. (D) El Oil Red O muestra la grasa en los hepatocitos (flechas largas) y las células de Kupffer (flechas cortas). Muchas de las gotitas más grandes están probablemente en las células Ito. (Lee L, Alloosh M, Saxena R, Alstine WV, Watkins BA, Klaunig JE, Sturek M, chalasani N. *Nutritional Model of Steatohepatitis and Metabolic Syndrome in the Ossabaw Miniature Swine.*)<sup>23</sup>

La acumulación de células grasas de Kupffer no es típica de la esteatosis en humanos, pero es un hallazgo hepático común en animales alimentados con una dieta aterogénica y también en algunos modelos animales de esteatohepatitis. La acumulación de triglicéridos hepáticos no es relevante en la patogénesis general de la esteatohepatitis.<sup>7, 23</sup>

En Zaragoza se ha realizado un modelo experimental en cerdos, con la intención de conseguir un nuevo método diagnóstico y de cuantificación de la esteatosis, mediante la bioimpedancia. Para ello, los cerdos son alimentados con una dieta compuesta por alto contenido en grasa, deficiente en metionina y colina y con un suplemento de colesterol y colato. Consiguiendo producir esteatosis hepática a los pocos meses del

inicio, sin la utilización de elementos tóxicos como el alcohol a diferencia de otros estudios llevados a cabo.<sup>8</sup>



Fig 16. Izda. Cerdos alimentados con pienso común, controles. Presentan aspecto saludable. Fig. 17. Dcha. cerdos alimentados con pienso dieta deficiente de metionina que contiene colato pertenecientes al grupo de estudio, escasa ganancia de peso y alteraciones dermatológicas. *(Martínez Soriano B. Tesis doctoral efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática. Modelo experimental)*<sup>34</sup>

Otro de los estudios llevados a cabo en Zaragoza, realizado para demostrar un efecto beneficioso de la melatonina, se estimuló con dieta un modelo animal porcino. Reproduciendo animales esteatóticos a los tres meses del estudio.

Si juntamos los animales porcinos que han llevado dieta esteatótica en Zaragoza, se puede observar que a los tres meses del estudio en la mayoría de los animales se consigue un porcentaje superior a 60% de esteatosis. Los cerdos que continuaron con la dieta un mes más, siguieron aumentando el grado de esteatosis.

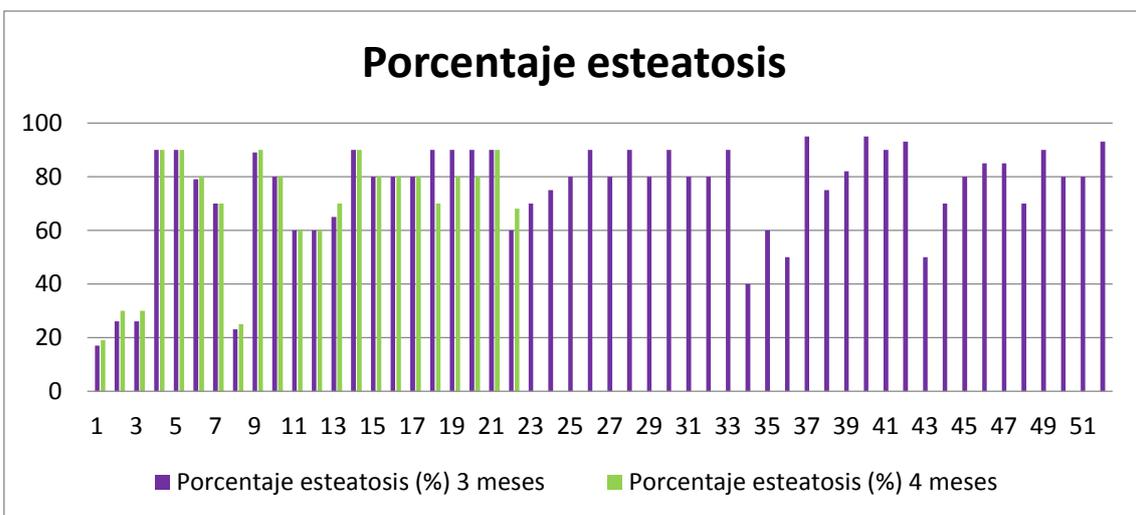


Fig. 18. En esta tabla se recoge el porcentaje de esteatosis alcanzado. A los tres meses se realiza biopsia intermedia de 22 cerdos para comprobar que efectivamente se está consiguiendo esteatosis con la infiltración de grasa. A los cuatro meses se realiza biopsia final de los 52 animales. Confirmando aumento del porcentaje de esteatosis. *(Martínez Soriano B. Tesis doctoral efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática. Modelo experimental y Gonzalo Rodríguez M.A. Tesis Doctoral. Diagnóstico de la esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental)*<sup>34, 35</sup>

Para finalizar con los modelos en grandes animales, se ha realizado un estudio en hembras de primate *Macaca fascicularis*. Se alimentó un grupo con dieta control y a otro con dieta elevada en fructosa observándose un aumento de gotitas lipídicas, contenido de colágeno hepático y aumento de peso, en el grupo alimentado con una dieta elevada en fructosa más que en el que llevaron una dieta estándar. Demostrando que una dieta alta en carbohidratos, como la fructosa, no aumentada con grasa o colesterol, induce hígado graso y también promueve procesos de fibrosis. Características similares a las observadas en la NAFLD humana. Sólo otro modelo de primates, *Macaca radiata*, describió la fibrosis que acompaña a la esteatosis. Aunque es posible que la dextrosa pueda producir resultados similares, en otros estudios se ha demostrado que la fructosa es más potente en la inducción de hígado graso.<sup>22</sup>

## 8. CONCLUSIONES

- Según los trabajos revisados hemos encontrado que los diferentes modelos de esteatosis en grandes animales basados en modificaciones de la dieta, producen cambios histológicos hepáticos similares a la Enfermedad de hígado graso no alcohólica en humanos.
- El mejor modelo para estudiar la NAFLD en grandes animales fué el de los cerdos con dieta aterogénica modificada (grupo M-Ath). Queda por determinar si los estudios de mayor duración en el modelo de cerdo de Ossabaw no M-Ath, revelarían la esteatosis macrovesicular, que es uno de sus componentes determinantes del síndrome de NAFLD humano.
- Es necesario la elaboración de más modelos experimentales en grandes animales. Pero debido a los altos costes que estos suponen, es la causa de que la mayoría de los estudios experimentales se realicen en roedores.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci*. 2016. 61(5). 1325-1336.
2. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012. 18(19). 2300-2308.
3. Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, et al. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 21833-21857. DOI: 10.3390/ijms141121833.
4. Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*. 2014. 20(26). 8364-8376.
5. Mets B, Kamban JR, Janicki PK, Franks J, Neveling U, Hickman R. Alcohol pretreatment does not affect bupivacaine pharmacokinetics in the pig. *Pharmacol Res*. 2004. 30. 104-110.
6. Spannauer MM, Oleszczuk A, Tannapfel A, Blüher M, Pietsch UC, Hengstler J, Donaubaier B, Madaj-Sterba P, Füll M, Schuhmacher A, Thiery J, Hauss JP, Schön MR. Micro- and Macrovesicular steatotic liver model for transplantation induced by ethanol and protein-deficient diet. *Transplant Proc*. 2005. 37(1). 210-1..
7. Lee L, Alloosh M, Saxena R, Van Alstine W, Watkins BA, Klauning JE, Sturek M, Chalasani N. Nutritional Model of Steatohepatitis and Metabolic Syndrome in the Ossabaw Miniature Swine. *Hepatology*. 2009. 50 (1). 56-67.
8. Gonzalo MA, Martínez-Beamonte R, Palacios P, Marín J, Castiella T, Surra J, Burdío F, Sousa R, Güemes A, Osada J, García-Gil A. Analysis of tissue bioimpedance as a measurement of liver steatosis: experimental model in large animals. *Transplant Proc*. 2012. 44(6). 1579-1583.
9. Stöppeler S, Palmes D, Fehr M, Hölzen JP, Zibert A, Sjaaj R, Schmidt HH-J, Spiegel HU, Bahde R. Gender and strain-specific differences in the development of steatosis in rats. *Laboratory Animals*. 2013. 47. 43-52.
10. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli Lm. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*. 2014. 79. 1100-1107.
11. Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanism of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2012. 23. 203-208
12. Deng QG, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S, Tsukamoto H. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology*. 2005. 42. 905-914.
13. Fan JG, Qiao L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009. 8. 233-240.

14. Wu J. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016. 7(27).
15. Dowman JK, Hopkins LJ, Reynolds GM, et al. Development of hepatocellular carcinoma in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis induced by use of high-fat/fructose diet and sedentary lifestyle. *Am J Pathol*, 2014, 184(5):1550-1561.
16. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am H Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(5):G987-995.
17. VanSaun MN, Lee IK, Gorden DL. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *Am J Pathol*, 2009, 175(1):355-364.
18. Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011. 8(1):35-44.
19. Willebrords J, Pereira IV, Maes M, et al. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog Lipid Res*. 2015. 59:106-125.
20. Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. 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 Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004. 287. G1035-G1043.
21. Kashireddy PV, Rao MS. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2004. 30. 104-110.
22. Cydylo MA, Davis AT, Kavanagh K. Fatty Liver Promotes fibrosis in Monkeys Consuming High Fructose. *Obesity J*. 2017. 25(2).
23. Lee L, Alloosh M, Saxena R, Alstine WV, Watkins BA, Klaunig JE, Sturek M, Chalasani N. Nutritional Model of Steatohepatitis and Metabolic Syndrome in the Ossabaw Miniature Swine. *Hepatology* 2009. 50(1). 56-67.
24. Liang T, Alloosh M, Bell LN, Fullenkamp A, Saxena R, Alstine WV, Bybee P, Werling K, Sturek M, Chalasani N, Masuoka HC. Liver Injury and Fibrosis Induced by Dietary Challenge in the Ossabaw Miniature Swine.
26. Pathil A, Mueller J, Warth A, Chamulitrat W, Stremmel W. Ursodeoxycholy Lysophosphatidylethanolamide Improves Steatosis and Inflammation in Murine Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2012. Vol 55, 5.
27. Lee JH, Friso S, Choi S-W. Epigenetic Mechanisms Underlying the Link between Non-alcoholic Fatty Liver Diseases and Nutrition. *Nutrients*. 2014. 6(8). 3303-3325.

28. Sun C, Fan JG, Qiao L. Potencial epigenetic mechanism in non-alcoholic Fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2015. 16(3). 5161-5179.
29. Pan D, Mao C, Quattrochi B, Friedline HR, Zhu JL, Jung DY, et al. MicroRNA-378 controls classical brown fat expansion to counteract obesity. *Nat Commun.* 2014. 5(4725).
30. Brent A. Neuschwander-Tetri. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med.* 2017. 15: 45.
31. Oh H, Won Jun D, Saeed WK, Nguyen MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clin Mol Hepatol.* 2016; 22(3): 327–335.
32. Spengler EK, MD, Loomba R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo clinic.* 2015. 90(9). 1233–1246
33. Emmanuel C, Martín C. Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). *Rev Gastroenterol Peru.* 2016. 36(1): 58-65.
34. Gonzalo Rodríguez M.A. Diagnóstico de la esteatosis hepática a través de la medición de la bioimpedancia tisular. Estudio experimental [Tesis Doctoral]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza. Oct 2011.
35. Martínez Soriano B. Efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática. [Tesis Doctoral]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
36. Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, Mularczyk A, Konturek P.C, Brzozowski T and Konturek S.J. The effects of long-term melatonin treatment on plasma liver enzymes levels and plasma concentrations of lipids and melatonin in patients with non alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 2012, 63, 1, 35-40.
37. Subramanian P, Mirunalini S, Pandi-Perumal S.R, Trakht I and Cardinali D.P. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *European Journal of Pharmacology.* 2007; 571: 116-119.