



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Modelos experimentales de esteatosis hepática no alcohólica.

Revisión bibliográfica.

Autor:

Cristina Fernández García

Director:

Dr. Antonio Güemes Sánchez

Facultad de Medicina.
2015

INDICE

RESUMEN.....	3
Palabras clave:	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Etiología	5
Histología	5
Mecanismos bioquímicos de esteatosis	7
Tratamiento de la esteatosis hepática.....	9
MODELOS EXPERIMENTALES DE ESTEATOSIS HEPÁTICA:	11
Modelos nutricionales.....	12
Modelos genéticos	18
Modelos mixtos.....	23
Modelos en grandes animales.....	23
Modelos experimentales de tratamiento de la esteatosis.....	25
CONCLUSIONES:.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA) es una patología cada vez más frecuente e importante en todo el mundo debido al aumento de prevalencia del síndrome metabólico (obesidad, diabetes tipo 2, hiperlipemia), que está fuertemente relacionado con el desarrollo de esta enfermedad. Es la enfermedad hepática crónica más frecuente en el mundo occidental y comprende diversos hallazgos histopatológicos que van desde la esteatosis simple, pasando por la esteatohepatitis, hasta la fibrosis y cirrosis. La etiopatogénesis de la EHGNA no está del todo clara y su tratamiento tampoco está del todo establecido. Como los estudios con humanos tienen muchas limitaciones, los modelos animales son cruciales, no sólo para avanzar en el conocimiento de la compleja histología y patogenia de los diferentes estadios de la enfermedad, sino también para conocer mejor la historia de la enfermedad y poder estudiar nuevas estrategias terapéuticas que puedan prevenirla o evitar su progresión. Actualmente hay numerosos modelos animales, pero ninguno de ellos llega a reflejar a la perfección todos los aspectos de la etiopatogénesis y los hallazgos histológicos típicos de la EHGNA en humanos. Por ello, en este trabajo se revisan tanto modelos nutricionales, como modelos genéticos o mixtos, y se valoran sus ventajas y desventajas.

Palabras clave:

Modelos animales; Esteatosis hepática; Enfermedad de hígado graso no alcohólico; Esteatohepatitis no alcohólica

ABSTRACT

Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an increasingly common and important disease worldwide due to the increased prevalence of metabolic syndrome (obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia), which is strongly linked to the development of this disease. It is the most common chronic liver disease in the Western world and it includes several histological findings, ranging from simple steatosis, through steatohepatitis to fibrosis and cirrhosis. The etiopathogenesis of NAFLD is not clear and its treatment is not entirely established. As human studies have many limitations, animal models are crucial, not only to improve the understanding of the complex histology and pathogenesis of the different stages of the disease, but also to better know the history of the disease and to explore new therapeutic strategies to prevent or avoid its progression. Currently there are numerous animal models, but none of them perfectly reflects all aspects of the etiopathogenesis and the typical histological

features of human NAFLD. Therefore, in this document both nutritional such as genetic or mixed models, are reviewed and their advantages and disadvantages are assessed.

Key words:

Animal model; Hepatic steatosis; Non-alcoholic fatty liver disease; Non-alcoholic steatohepatitis

INTRODUCCIÓN

La esteatosis es la acumulación anormal de grasa, mayoritariamente en forma de triglicéridos, en el citoplasma de células parenquimatosas como, por ejemplo, los hepatocitos. La esteatosis hepática, por tanto, se refiere a una enfermedad del hígado caracterizada por acumulación de ácidos grasos y triglicéridos en los hepatocitos. El alcohol es una causa frecuente de hígado graso, y es un factor que siempre debe considerarse en un paciente con hígado graso, pero también hay otras causas que producen esteatosis no alcohólica. (1) En este trabajo se estudian principalmente modelos experimentales de esteatosis de origen no alcohólico, por ello, la necesidad de una mayor explicación de esta patología.

El término enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) se utiliza para denominar a un amplio espectro de afecciones hepáticas, que van desde la esteatosis simple, la esteatohepatitis, la fibrosis y finalmente la cirrosis, que incluso puede progresar a hepatocarcinoma. (2) (3) Desde el punto de vista histológico, se asemejan a las lesiones inducidas por el alcohol, si bien por definición, la EHGNA se desarrolla en pacientes que no consumen alcohol o lo hacen en escasa cuantía. (1)

La EHGNA es considerada como una manifestación hepática del síndrome metabólico, puesto que esta se relaciona con la prevalencia de la obesidad, la diabetes tipo 2 y la hiperlipemia. (4) Por estar relacionada con el síndrome metabólico, en estos últimos años la EHGNA ha ganado importancia ya que ha aumentado su prevalencia en las sociedades occidentales como la nuestra, donde es la patología hepática crónica más común. (2) Recientemente se ha observado que la EHGNA no solo puede causar la muerte por el desarrollo de una hepatopatía crónica, sino que también puede dar lugar a frecuentes alteraciones en el metabolismo lipídico y a un incremento del riesgo cardiovascular. (1)

La EHGNA es una enfermedad asintomática, que frecuentemente no muestra alteraciones analíticas relevantes y que en la mayoría de los estudios de prevalencia se determina mediante ecografía. Esta técnica no es excesivamente sensible pues precisa

de la infiltración grasa de al menos la tercera parte del parénquima hepático para dar un resultado positivo. (1)

Con estas limitaciones, se estima que afecta al 20–30% de la población occidental. La esteatohepatitis, que precisa una biopsia hepática para su diagnóstico, afectaría solo al 2–3% de la población. (4) (2)

El predominio de la EHGNA aumenta de forma paralela a la edad: menos del 20% por debajo de los 20 años y más del 40% por encima de los 60. No obstante, también se ha descrito la EHGNA en población infantil con una prevalencia del 2,6%, pero que puede ascender hasta un 10–80% en niños obesos. La EHGNA es también más prevalente en pacientes que padecen concomitantemente Diabetes Mellitus tipo 2 (40–75%), u obesidad (33–76%), llegando hasta el 99% en individuos sometidos a cirugía bariátrica. (1)

Etiología

La esteatosis hepática se desarrolla a lo largo de años como resultado de un acúmulo de diferentes factores de riesgo así como de diferentes grados de susceptibilidad genética. Puede tener diferente etiología: hábitos nutricionales (cantidad y composición de la dieta), inactividad física, estrés crónico, estilo de vida, consumo de tóxicos (alcohol, fármacos), alteración en el metabolismo de los lípidos... son los factores no genéticos más importantes que determinan la manifestación y severidad de la enfermedad. (2) Posteriormente se muestran los mecanismos bioquímicos que explican la esteatosis debida a alteraciones del metabolismo de los lípidos y nutricionales, que se verían explicadas por el primer paso de la teoría de “*los dos golpes*” ya que se debe sobre todo a alteraciones en la resistencia a la insulina, obesidad...

Histología

Histológicamente la EHGNA se define por la presencia en el hígado de esteatosis que supera el 5% de los hepatocitos, independientemente de si es microvacuolar, macrovacuolar o mixta (en dependencia del tamaño de las vacuolas grasas). (2) Los triglicéridos son el componente principal de las vacuolas, aunque pueden acumularse varias clases de lípidos. En los adultos, la EHGNA se caracteriza predominantemente por esteatosis macrovacuolar que está generalmente distribuida en la zona 3 o panacinar. (2)

- **Esteatosis microvacuolar:** se caracteriza por la aparición de pequeñas vacuolas grasas citoplasmáticas. Las células pueden o no estar agrandadas y el núcleo se localiza en el centro de la célula. Tiene lugar en enfermedades genético-metabólicas de la mitocondria, que se caracterizan por alteraciones de la

oxidación de los lípidos, alteraciones del ciclo de la urea y defectos de la cadena respiratoria (5) (hígado graso del embarazo, síndrome de Reye, degeneración espumosa del alcoholismo, reacciones hepatotóxicas a drogas y toxinas...). (6) La esteatosis microvacuolar es menos frecuente y es una condición característicamente aguda. (7)

- **Esteatosis macrovacuolar:** es una de las anormalidades metabólicas reversibles más comunes del hígado y se trata de una condición benigna. En ella los hepatocitos comprometidos son de mayor tamaño que el resto. La acumulación de lípidos neutros en el citoplasma de los hepatocitos forma vesículas lipídicas que desplazan el núcleo a la periferia, dando lugar a *células en anillo*. (7) Este tipo de esteatosis es característica del alcoholismo crónico y se da en algunas condiciones como la desnutrición/*kwashiorkor*, la nutrición parenteral, la obesidad, la diabetes tipo 2, la hepatitis C, el *bypass* yeyunoileal, etc. (6) Es más característica de procesos crónicos. Este tipo es el más frecuente en individuos con EHGNA. (3)
- En los casos más severos de EHGNA, existe un **patrón mixto** de esteatosis (macrovacuolar y microvacuolar). (6)

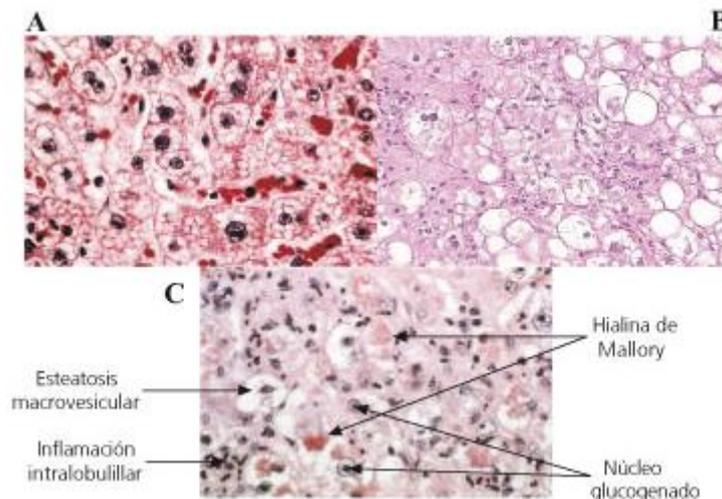


Ilustración 1. Imágenes histológicas representativas de esteatosis hepática (A) microvacuolar y (B) macrovacuolar y (C) de esteatohepatitis. En (C) se señalan las principales características histológicas. (3)

La esteatohepatitis es una complicación necroinflamatoria de una esteatosis hepática crónica cuyas principales características histológicas son la esteatosis macrovesicular y los infiltrados inflamatorios de leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, macrófagos... También se pueden encontrar cuerpos de Mallory, núcleos glucogenados, degeneración hepatocitaria balonizante y aumento de apoptosis. Esta inflamación crónica del hígado provoca el desarrollo de distintos grados de fibrosis, principalmente, en zonas perivenosas y perisinusoidales de la zona 3 del acino

hepático, distorsionando la arquitectura hepática. En las etapas finales de EHGNA la fibrosis puede degenerar en cirrosis y hepatocarcinoma. (3) El examen histológico de la biopsia hepática sigue siendo el “goldstandard” para evaluar con precisión el grado de esteatosis, los cambios necroinflamatorios y la fibrosis. (2)

Los hallazgos histológicos en la enfermedad de hígado graso no alcohólico van desde la esteatosis simple, hasta una esteatohepatitis, con una posterior aparición de fibrosis hepática, hasta llegar al desarrollo de cirrosis e incluso puede llegar a aparecer carcinoma hepatocelular.

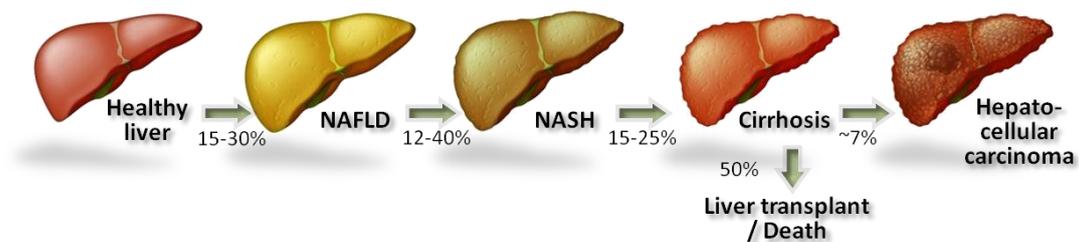


Ilustración 2. Estadios de la enfermedad de hígado graso no alcohólica. Porcentajes de progresión a la siguiente fase.

Además de la diferenciación dentro de estos diferentes grados de infiltración grasa del hígado (esteatosis simple, esteatohepatitis, fibrosis o cirrosis), cada uno de ellos puede tener un estadio según su severidad (porcentaje de hepatocitos afectados) que puede ser leve (5-29% de los hepatocitos afectados), moderada (30-59%) y severa (>60%).

La distinción entre la etiología alcohólica y la no alcohólica se establece más por criterios cuantitativos y no es del todo clara (en la forma alcohólica son más abundante los cuerpos hialinos de Mallory, hay mayor densidad del infiltrado polimorfonuclear y grados avanzados de fibrosis). Por ello se recomienda que el diagnóstico histopatológico sea el de esteatohepatitis y que su causa sea determinada por los antecedentes de alcoholismo del paciente. (6)

Mecanismos bioquímicos de esteatosis

Los mecanismos de patogénesis de la esteatosis hepática no alcohólica no están todavía completamente claros. Una de las principales hipótesis es “La teoría de los dos impactos”. (8)

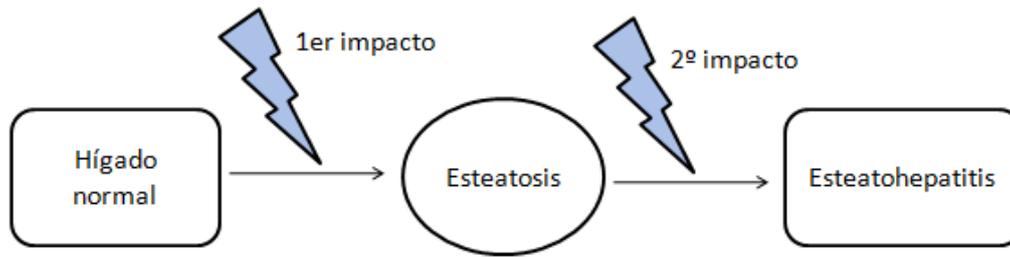


Ilustración 3. Teoría de los "dos impactos".

Según esta teoría, el "*primer golpe*" para el establecimiento de la esteatosis no alcohólica es la acumulación de lípidos en los hepatocitos, sobre todo en forma de triglicéridos. Esto es el resultado de un desequilibrio entre el metabolismo que promueve la respuesta del hepatocito y la síntesis de ácidos grasos y aquellos que promueven la oxidación, degradación, exportación y secreción de estos ácidos grasos. La resistencia a la insulina (encontrada en la obesidad y la diabetes tipo II) ha sido considerada el factor más importante en la acumulación de grasa en el hígado. La resistencia a la insulina causa lipólisis periférica, hiperinsulinemia e hiperglucemia. La lipólisis produce aumento de ácidos grasos libres y captación por parte de los hepatocitos de estos ácidos grasos. La hiperinsulinemia intensifica la síntesis hepática de ácidos grasos al inducir la glucólisis y favorece la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos al disminuir la capacidad de reesterificación y exportación de los triglicéridos. La elevación de quilomicrones es típica después de ingerir cantidades de grasa en exceso. La hiperinsulinemia inhibe la formación y secreción de VLDL en el hígado de los pacientes con esteatohepatitis. Otro efecto de la hiperinsulinemia e hiperglucemia es la inhibición de la β -oxidación de los ácidos grasos y la promoción de lipogénesis en el hígado. La insulina es el principal estimulador de la lipogénesis hepática mediante la activación del factor de transcripción de la proteína de unión al elemento regulador de esterol (SREBP-1c) (9) (2) (4)

Algunos pacientes con esteatosis simple progresan a esteatohepatitis. El "*segundo golpe*" sería el que causa la inflamación y la fibrosis una vez se ha establecido la esteatosis. El progreso de esteatosis simple a estadios más avanzados de la enfermedad es un proceso que puede llevar años en los humanos. A consecuencia de la esteatosis hepática, los hepatocitos desarrollan vulnerabilidad al estrés oxidativo (inducción del sistema microsomal citocromo P450), que en gran parte, puede ser responsable de la progresión de la esteatosis simple a la esteatosis asociada a actividad necroinflamatoria y fibrosis. Por lo tanto, este "*segundo golpe*" puede tener lugar gracias a distintos factores: el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica, la disfunción mitocondrial, el imbalance entre citoquinas/adipoquinas (factor de necrosis tumoral α , interleucina 6, adiponectina, leptina, etc), la lipotoxicidad de los ácidos grasos libres, el acúmulo hepático de colesterol, la activación de inmunidad innata, etc. El exceso de

defensa y mecanismos de auto-reparación de los hepatocitos serían los causantes de la muerte celular o apoptosis. (9) (2)

La principal diferencia entre la esteatosis simple y la esteatohepatitis está en el grado de daño de los hepatocitos y la apoptosis. El aumento de apoptosis es considerado por algunos autores como el “*tercer golpe*” que conduce a una fibrosis avanzada y cirrosis. (2)

Más recientemente se ha desarrollado la “*teoría de los múltiples golpes*” para acomodar los nuevos conocimientos sobre el fondo genético que se piensa que tiene esta enfermedad junto con los cambios inflamatorios que se sabe que inducen la esteatosis y la progresión de la enfermedad. Un estudio de asociación del genoma completo ha informado de que un polimorfismo del gen PNPLA3 se asocia con susceptibilidad a EHGNA. Aunque los mecanismos moleculares de esta enfermedad y su relación con un componente genético son complejos y están todavía pendientes de una mayor investigación. (10)

Tratamiento de la esteatosis hepática

El manejo de los pacientes con esteatosis hepática depende en gran medida del estadio de la enfermedad. En la actualidad, el tratamiento principal es la modificación del estilo de vida con dieta y ejercicio. Sin embargo, la terapia farmacológica es indispensable ya que los pacientes a menudo tienen dificultades para mantener la mejora de los estilos de vida. (11) (12) Hasta el momento no hay un tratamiento farmacológico consensuado para esta enfermedad. Hay cuatro áreas principales sobre las que se puede actuar:

- **Modificación del estilo de vida:** Sobre todo dirigida a la pérdida de peso y el aumento de la actividad física. Hay que recomendar evitar el sedentarismo, la realización de ejercicio físico regular y una dieta sana. (11)
- **Manejo de los componentes del síndrome metabólico:** es importante el manejo de la Diabetes Mellitus (manteniendo cifras de HbA1c < 7.5%), el correcto tratamiento de la hipertensión arterial y de la dislipemia. (11) La eficacia de las estatinas para la EHGNA no ha sido validada por completo, ya que hay varios estudios que muestran resultados diferentes. Sin embargo se están realizando ensayos clínicos con *ezetimiba* que es un agente nuevo que reduce los niveles de lípidos en suero mediante la inhibición de absorción de colesterol. Estos ensayos muestran una mejora de la fibrosis hepática, pero hay un aumento de los niveles de ácidos grasos de cadena larga y hemoglobina A1c hepática. (12)
- **Farmacoterapia que actúe sobre el hígado:** Para los pacientes con esteatohepatitis confirmada por biopsia, en los que la intervención sobre el

estilo de vida ha fracasado, puede ser considerada la farmacoterapia dirigida al hígado con:

- Sensibilizadores de la insulina: Las tiazolidindionas (TZDs) aumentan la sensibilidad a la insulina. La rosiglitazona y pioglitazona son TZD representativas. La rosiglitazona demostró mejorar la esteatosis y los niveles de transaminasas en pacientes con EHGNA en un ensayo controlado aleatorizado, pero no está comercializada en Europa. La pioglitazona en algunos ensayos controlados aleatorizados indujo mejoras significativas en los niveles séricos de transaminasas y la histología hepática en comparación con placebo en pacientes con EHGNA. Sin embargo, la mejora en el grado de fibrosis no fue significativa. Hay algunos problemas sobre su seguridad a largo plazo (aumento de peso, aumento del riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva, cáncer de vejiga y reducción de la densidad del hueso). Sin embargo, no se recomienda el uso de metformina ya que en diversos ensayos clínicos se ha mostrado que no fue superior a placebo. (12) (11)
- Antioxidantes: La Vitamina E es un antioxidante que ha demostrado recientemente en varios ensayos clínicos tener efectos beneficiosos en pacientes no diabéticos con biopsia probada de esteatohepatitis. Se ha visto mejora tanto de los niveles de transaminasas, como de la esteatosis, la fibrosis y el balonamiento hepatocelular. Por el contrario, se ha informado de que puede haber un mayor riesgo de infarto hemorrágico y cáncer de próstata con el tratamiento a dosis altas. (11) (12)
- Pentoxifilina: es un derivado de metilxantina y un inhibidor no selectivo de la fosfodiesterasa que inhibe la síntesis de TNF- α . Los ensayos controlados aleatorizados dieron lugar a resultados mixtos. En algunos de ellos sí se mostraba mejora en la histología de la EHGNA pero, en otros, los resultados no eran superiores a placebo. (12)
- Ácido ursodesoxicólico: es un ácido biliar hidrofílico con propiedades antiapoptóticas y citoprotectoras. Todavía no está recomendado para tratamiento ya que hay diversos ensayos clínicos que muestran resultados dispares. (12)
- Ácidos grasos n-3 poliinsaturados (n-3 PUFAs): El suplemento con estos ácidos grasos ha mostrado en diversos estudios humanos mejora en las transaminasas séricas, los triglicéridos y los niveles de glucosa en ayunas en pacientes con EHGNA. También disminuyó la fibrosis, el balonamiento hepatocelular y la esteatosis en la mayoría de los pacientes. En otros ensayos no se obtuvieron efectos significativos. Es difícil establecer la recomendación de los PUFAs porque no están claras las cantidades y proporciones necesarias. (12)

- Probióticos y simbióticos: En algunos ensayos con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* se ha visto mejora de los niveles séricos de AST y ALT y disminución de la fibrosis. Pero en otros estudios no se han visto efectos beneficiosos. Aunque los resultados son prometedores, los efectos de los probióticos y simbióticos en EHGNA deben ser confirmados en ensayos controlados aleatorizados más grandes. Además, necesitan establecerse las dosis efectivas. (12)

En conclusión: actualmente, los sensibilizadores de la insulina (TZDs) y la vitamina E parecen ser los más prometedores pero se necesita un mejor estudio sobre la seguridad a largo plazo y la eficacia de estos fármacos antes de que puedan incorporarse plenamente a la práctica clínica. La pentoxifilina, los hipolipemiantes y los n-3 PUFAs tienen bastante interés, pero sus efectos deben ser validados por ensayos clínicos bien diseñados y de mayor tamaño. (12)

MODELOS EXPERIMENTALES DE ESTEATOSIS HEPÁTICA:

La EHGNA es una patología cada vez más importante en todo el mundo debido al aumento de prevalencia de la obesidad, la diabetes tipo 2 y la hiperlipemia. La patogénesis de la esteatosis no es del todo conocida y el tratamiento, además de los cambios en el estilo de vida, tampoco está del todo establecido. Los estudios con humanos tienen muchas limitaciones ya que se necesitan largos periodos de tiempo para la progresión de la esteatosis hepática a esteatohepatitis y a cirrosis. Y además hay limitaciones éticas en cuanto al uso de fármacos o la recogida de biopsias hepáticas de pacientes. Por tanto, los modelos animales son cruciales, no sólo para avanzar en el conocimiento de la compleja histología y patogenia de esta patología y para conocer mejor la historia de la enfermedad, sino también para descubrir estrategias terapéuticas apropiadas que puedan prevenirla o evitar su progresión. (13)

Se han realizado numerosas investigaciones con distintos modelos animales que asemejen la esteatosis hepática humana. Un modelo ideal sería aquel que refleje tanto la histología como la fisiopatología de la EHGNA en sus diferentes estadios. El hígado del animal deberá mostrar por tanto esteatosis, cierto grado de inflamación intralobular, balonamiento hepatocelular, fibrosis perisinusoidal y susceptibilidad a padecer tumores hepáticos. Además, estos animales deben mostrar anormalidades metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina, dislipemia, alteración del perfil adiposo... Estos modelos deben ser reproductibles, fiables, sencillos y económicos. Los ratones y las ratas son los que se han utilizado principalmente como animales de experimentación para esta enfermedad. (4) (2)

De todos modos, todavía no hay ningún modelo animal que refleje completamente la histología y fisiopatología humana de la esteatosis hepática. Es

importante saber que no puede haber un modelo ideal debido a la compleja y larga historia natural y la patogénesis de la EHGNA en los humanos. En algunos modelos genéticos la esteatosis ocurre primero y posteriormente se desarrolla la esteatohepatitis. En otros, el progreso a esteatohepatitis no es espontáneo. Y por otro lado, en algunos modelos nutricionales la esteatohepatitis ocurre muy rápido, lo cual no refleja la historia natural de la enfermedad en humanos. Desde este punto de vista, los modelos de sobrenutrición crónica y progresión espontánea de esteatosis a esteatohepatitis son los más válidos. Además, estos modelos muestran una mayor correlación entre las anormalidades metabólicas y el daño hepático. (4)

Hay que tener en cuenta que los datos obtenidos de los experimentos con animales son muy homogéneos debido a que estos estudios están formados por grupos muy definidos (especie, sexo, peso, edad, condiciones del laboratorio...). Por el contrario en la población humana hay una gran heterogeneidad, incluso está distribuido en poblaciones similares, ya que hay una gran variabilidad en la comorbilidad, actividad física, medicación, dieta y estilo de vida de los distintos pacientes. Por tanto, la interpretación de datos obtenidos en estudios con animales es mucho más simple.

Los modelos experimentales de EHGNA que se revisan en este trabajo, son principalmente realizados con ratas y ratones y están divididos en tres grupos según el mecanismo de producción de la esteatosis: modelos genéticos, modelos nutricionales y modelos mixtos. No se incluyen los modelos farmacológicos o tóxicos, que son distintos de la etiopatogenia natural de la EHGNA.

Modelos nutricionales

Los modelos nutricionales se diferencian en cuanto al mecanismo por el que la esteatosis u otros cambios se producen. Estos modelos incluyen tanto modelos que incrementan la aportación de lípidos o la síntesis de estos en el hígado, como modelos que reducen la exportación y el catabolismo de los lípidos. Como pocos pacientes muestran defectos genéticos evidentes, el uso de modelos dietéticos es más relevante que los modelos genéticos. Actualmente, el modelo más utilizado es el de dieta alta en grasa. (4)

Dieta alta en grasas:

Una dieta alta en grasa para las ratas sería aquella que contiene entre un 30-50% de grasa en la dieta y una dieta muy alta en grasa más del 50%. Ya que una dieta estándar para ratas contiene menos del 10% de grasa. (4)

El uso de dietas altas en grasa es muy popular, pero hay muchas variaciones en estas dietas, con diferentes composiciones y diseños experimentales por tanto, los resultados obtenidos de estos estudios son muy variables. En algunos estudios se

indujo esteatosis hepática en diversos grados y patrones mientras que otros no condujeron al desarrollo de esteatosis. Los estudios también difieren en lo que respecta al desarrollo de resistencia a la insulina, obesidad y dislipemia, y otros factores patógenos conocidos de la esteatosis en humanos. (4)

Estos estudios varían en el momento de la alimentación, la cepa de rata, el sexo y edad de las ratas, la cantidad de energía procedente de las grasas, el origen de las grasas, la proporción de ácidos grasos saturados, monoinsaturados (MUFA) y (PUFA) ácidos grasos poliinsaturados, y la proporción de ω -3 y ω -6 PUFA. En cuanto a la composición de grasas, los ácidos grasos influyen considerablemente en la expresión de muchos genes, particularmente en el hígado. Las dietas también varían en la composición de nutrientes no grasos (el porcentaje de proteínas y sacáridos, la proporción de mono-, oligo- y polisacáridos). En la mayoría de los estudios los animales son alimentados ad libitum, pero en algunos documentos, se utilizó la alimentación controlada mediante una cánula intragástrica. (4) (14)

La dieta alta en grasas no sólo se utiliza para la inducción de cambios en la EHGNA sino que también se emplea como modelo de síndrome metabólico, dislipidemia, obesidad y resistencia a la insulina. Debido a que la resistencia a la insulina es uno de los factores patogénicos más importantes de la enfermedad del hígado graso, la alimentación de ratas con una dieta alta en grasas es legítima y se asemeja más a la patogénesis de la EHGNA humana que los modelos genéticos y dietas con déficit de nutrientes. (2)

En los diversos estudios de dietas altas en grasa comparados se observan diferentes resultados en ratas. En todos ellos se desarrollaba una esteatosis que afectaba a más del 66% de las células hepáticas, pero los patrones histológicos eran diferentes. En algunos de ellos se encontró esteatosis microvesicular, mientras que otros desarrollaban esteatosis macrovesicular acompañada de una fibrosis pronunciada. Estos estudios demostraban una mayor susceptibilidad de las ratas macho a desarrollar esteatosis, que se corresponde a lo observado en humanos, donde la enfermedad de hígado graso es más frecuente en hombres y mujeres postmenopáusicas. (15) (2)

Un estudio comparativo de 4 dietas altas en grasas compuestas por diferentes grasas (manteca de cerdo, aceite de oliva, grasa de coco y aceite de pescado) concluyó que histopatológicamente tanto la manteca, como el aceite de oliva y el coco producían una esteatosis microvesicular sin inflamación ni fibrosis. Las dietas basadas en la manteca y el aceite de oliva producían una mayor obesidad y resistencia a la insulina así como un mayor acúmulo graso en el hígado. Sin embargo, el aceite de pescado mostró efectos beneficiosos ya que reducía la severidad histológica de la esteatosis y había un aumento de los factores reguladores de la oxidación de los ácidos grasos. (2)

Otro modelo distinto sería la dieta alta en grasas utilizada en el modelo de Lieber et al (compuesta por un 71% de grasas, un 11% de hidratos de carbono y un 18% de proteínas). Las ratas tomaban esta dieta durante 3 semanas y mostraban una elevación de los niveles de insulina plasmática reflejando resistencia a la insulina. Las ratas que tomaron la dieta alta en grasas desarrollaron una marcada esteatosis panlobular, y las concentraciones hepáticas de lípidos fueron el doble que las de las ratas control que siguieron la dieta estándar de Lieber-De Carli (35% de grasa, 47% de hidratos de carbono y 18% de proteínas). Como en los humanos, las ratas que consumieron esta dieta desarrollaron daño oxidativo en el hígado. Pero no se observaron variaciones en el peso. Cuando se restringía esta dieta, disminuía la esteatosis, la inflamación hepática, el estrés oxidativo y los niveles plasmáticos de insulina. Otros autores probaron llevar a cabo estas mismas dietas en ratas y no se consiguió producir los cambios histológicos de la esteatohepatitis, incluso manteniendo la dieta durante 5 o 6 semanas. (4) (16) (2)

En otro estudio se probó a sobrealimentar a los ratones de manera intragástrica con una dieta alta en grasas durante 9 semanas. De este modo se replicaron los cambios histopatológicos y patogénicos de la esteatohepatitis. Estos ratones mostraban obesidad, aumento de la grasa visceral, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Casi la mitad de los animales desarrollaron esteatohepatitis y sus niveles de ALT se veían 9-10 veces aumentados. Se observaba una infiltración neutrofílica y una fibrosis perisinusoidal que recuerda a la de la esteatohepatitis humana. Pero incluye algunas limitaciones como la sobrealimentación, el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y los requisitos técnicos y habilidades para realizarlo. (17)

Como conclusión se obtiene que en los últimos años los modelos de dieta alta en grasas están siendo ampliamente utilizados para causar esteatosis hepática y esteatohepatitis en animales experimentales. Sin embargo, parece que este modelo de dieta produce resultados variables en cuanto al grado de esteatosis, inflamación y fibrosis, además de tratarse de dietas cuya composición no corresponde del todo a la dieta alta en grasas seguida por los humanos. Los resultados dependen de la especie, la cepa y el sexo de los roedores, el contenido de grasa de la dieta, la composición de esa grasa, la duración del tratamiento. Una de las limitaciones podría ser la baja reproductibilidad de estos modelos basados en dietas altas en grasa. (2) (4) (14)

En comparación con el modelo de dieta deficiente en colina-metionina, el grado de daño hepático es menos severo en la dieta alta en grasas. Dentro de los modelos de dietas altas en grasa, la histopatología y fisiopatología del método de sobrealimentación intragástrico es el que más se asemeja a la esteatohepatitis en humanos. (4) (14)

Dieta deficiente en colina-metionina (MCD):

Esta es una dieta deficitaria en antioxidantes hepáticos. Contiene altas cantidades de sacarosa (40%) y de grasa (10%) y no contiene metionina ni colina, que son esenciales para la β -oxidación hepática y la producción de VLDL. Como resultado, los lípidos se depositan en el hígado. Además, ante un estrés oxidativo se induce la producción de α -TNF y citoquinas inflamatorias que finalmente llevan a la esteatohepatitis. (4) (14)

En los estudios realizados con este tipo de dieta se observa durante los primeros días el desarrollo de esteatosis microvesicular con un componente macrovesicular en la zona 3. En torno a la tercera semana el patrón de esteatosis cambia a macrovesicular y aparecen focos de células inflamatorias. Más adelante comienza a aparecer alguna zona de necrosis. En torno a la semana 7 hay una esteatosis macrovesicular extensa y numerosos grupos de células inflamatorias. (2)

Aunque el modelo de dieta con déficit de metionina y colina causa mayor inflamación, estrés oxidativo y fibrogénesis que otros modelos animales nutricionales, la severidad de la esteatohepatitis en los roedores depende de la especie, el género y la tensión del animal. Se ha estudiado la diferencia de género en diversos estudios y en ellos el resultado es que hay una mayor inflamación y necrosis en los machos. Comparando estudios de ratones y ratas con este tipo de dieta, se ha visto que las ratas desarrollan esteatohepatitis más lentamente (4) (2) (14).

Este modelo imita algunos cambios histopatológicos que se producen en la enfermedad de hígado graso, pero la distribución de la esteatosis puede variar. Además, la mayor desventaja de este modelo es que el perfil metabólico es opuesto al de la esteatohepatitis en humanos. Por ejemplo, los ratones muestran una significativa pérdida de peso (generalmente más del 20% después de 3 semanas), disminuye la glucemia en ayunas, disminuyen los niveles de insulina y leptina en sangre, disminuyen los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre y los niveles de adiponectina en sangre no varían o aumentan. Para mejorar estos problemas, se pueden utilizar ratones genéticamente obesos (*ob/ob* y *db/db*) en estas dietas. La principal ventaja de esta dieta es que es muy fácil de obtener y utilizar. (4) (2) (14)

Dieta con déficit de colina:

Este tipo de dieta induce esteatosis hepática cuyo grado depende del tiempo de alimentación. En contraste con la dieta con déficit de metionina-colina, en este modelo las ratas no desarrollan fibrosis severa y la inflamación es de menor extensión. No hay un aumento significativo de las transaminasas séricas. En este modelo se desarrolla obesidad, dislipemia y resistencia a la insulina. (2)

Por tanto, la dieta con déficit de metionina-colina y la de déficit de colina se diferencian no solo en los hallazgos histopatológicos, sino también en las

características metabólicas de las ratas (resistencia a la insulina, respuesta inflamatoria, estrés oxidativo). (2)

Colesterol y colato:

Las dietas con suplementos de colesterol fueron utilizadas inicialmente para el estudio de la aterosclerosis. Matsuzawa et al (18) alimentaron a ratones con una dieta aterogénica que contenía 1.25% de colesterol y 0.5% de colato y observaron una progresiva formación de esteatosis, inflamación y fibrosis de una manera dependiente del tiempo durante 6-24 semanas. Cuando se añadía un 60% de grasa a la dieta, el desarrollo de los cambios histopatológicos se aceleraba y se observaba balonamiento hepatocelular en 12 semanas. Además, la dieta aterogénica inducía el estrés oxidativo.

Por lo tanto, parece que un modelo que combine una dieta alta en grasa, colesterol y colato en animales es un importante factor para la producción de esteatosis hepática y para la progresión de esteatosis simple a esteatohepatitis. El uso de dietas aterogénicas puede acompañarse de obesidad, dislipemia, resistencia a la insulina y elevación de aminotransferasas. (2) (4)

Dieta alta en fructosa/sacarosa:

Un cambio en los hábitos alimenticios de los países occidentales en las últimas décadas se ha caracterizado por un aumento de los monosacáridos y disacáridos, principalmente sacarosa y fructosa. Estos sacáridos son conocidos para promover la lipogénesis *de novo*. En los seres humanos, una mayor cantidad de fructosa en la dieta está asociada con el síndrome metabólico, la obesidad y el hígado graso no alcohólico. (2)

Los animales experimentales alimentados con una dieta enriquecida con fructosa son buenos modelos de síndrome metabólico (resistencia a la insulina, dislipemia, elevación de citoquinas y marcadores de peroxidación de lípidos). En los diferentes estudios realizados con ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa se ha encontrado una mayor esteatosis tanto macro como microvesicular e inflamación intralobular, mayor peso corporal y mayores concentraciones de triglicéridos hepáticos que en las ratas control. Este patrón, en el que la zona principalmente afectada es la zona 1, difiere de la esteatosis hepática del humano adulto, en el que la esteatosis es generalmente predominante en la zona 3. (4) (2)

Las ratas alimentadas con un alto contenido de fructosa mostraron significativamente mayores expresiones de interleuquina (IL) -6 y TNF- α en el hígado en comparación con las ratas control. La inflamación causada por toxinas endógenas de metabolitos de la fructosa se sugiere como uno de los mecanismos del segundo golpe en la patogenia de la esteatohepatitis (19) (4).

Dieta combinada (alta en grasas y alta en fructosa):

Las dietas similares a la "comida rápida" que contienen cantidades más altas de grasa y fructosa también se usan para inducir enfermedad de hígado graso en ratas. Estas dietas pueden complementarse con colesterol o ácidos grasos. En un estudio en el que se alimentó a ratas macho con una dieta con un alto contenido en fructosa, alta en grasas, junto con fructosa en el agua durante 16 semanas se vio una marcada obesidad, tolerancia alterada a la glucosa, dislipemia, hiperinsulinemia, aumento de la leptina plasmática y esteatosis hepática, inflamación y fibrosis. El sistema cardiovascular (aumento de la presión arterial sistólica, disfunción endotelial, inflamación, fibrosis y la hipertrofia del ventrículo izquierdo), los riñones (inflamación y fibrosis) y el páncreas también se vieron afectados. (2)

Dieta de cafetería:

Ratas macho alimentadas al mismo tiempo con pienso estándar y con comida que generalmente ofrecen las cafeterías durante 15 semanas desarrollaron hiperfagia, lo que resulta en una obesidad severa y prediabetes. Esta dieta induce esteatosis microvesicular panlobular, esteatohepatitis e inflamación crónica en el tejido adiposo blanco y pardo. Tanto la histopatología hepática como las alteraciones metabólicas fueron más pronunciadas con la dieta de cafetería que con la dieta alta en grasas basada en manteca. Por tanto, esta dieta "de cafetería" refleja de manera muy similar la etiopatogenia de la esteatohepatitis humana y el síndrome metabólico. (2)

Tabla 1. Modelos nutricionales de EHGNA más frecuentes.

Modelos nutricionales	Obesidad	Resistencia a la insulina	Citoquinas /adipoquinas en plasma	Dislipemia	Elevación de transaminasas	Histología hepática			
						Esteatosis	Inflamación	Balonamiento hepatocelular	Fibrosis
Dieta alta en grasas	Si/no/no descrita	Si/ no descrita	↑TNFα ↓adiponectina	Si/no/no descrita	Si/no	Si/no	Si/no	Si/no descrito	Si/no/ no descrita
Dieta con déficit de metionina y colina	¡PÉRDIDA DE PESO!	No	↑IL-1β, IL-6, TNFα	↓Triglicéridos ↓colesterol	Si	Si	Si	No descrito	Si
Dieta con déficit de colina	Si	Si	No descrito	Si	No/ leve	Si	Si	No descrito	Leve (>90d)
Dieta aterogénica (colesterol y colato)	Si	Si	↑TNFα	Si	Si	Si	Si	Si (al añadir grasa)	Si
Dieta alta en fructosa/sacarosa	No	Si	↑IL-1β, IL-2, IL-6	Si	No	Si	Si/no	No descrito	Si/no descrita
Dieta combinada (alta en fructosa y alta en grasa)	Si	Si	↑leptina	Si	Si	Si	Si	No descrito	Si
Dieta de cafetería	Si	Si	No descrito	No descrito	No descrito	Si	Si	No descrito	No descrita

Modelos genéticos

Hay diferentes modelos genéticos según sean de origen natural o modelos con mutaciones genéticas inducidas. Los modelos de esteatosis hepática en ratones monogénicos no replican del todo la etiopatogénesis de la esteatosis humana, pero pueden proporcionar resultados valiosos sobre sucesos particulares en la patogenia de esta enfermedad. Los ratones modificados genéticamente están menos disponibles y son más caros. Hay gran variedad de modelos genéticos en ratones, sin embargo, se utilizan menos las ratas genéticamente modificadas. (4)

Ratones *ob/ob*:

Estos ratones tienen mutado el gen *ob*, que codifica la leptina. La leptina es una adipocina producida por el tejido adiposo y actúa en los núcleos hipotalámicos ventrales regulando el apetito y el gasto de energía. En ausencia de leptina los ratones se vuelven obesos ya que padecen hiperfagia e inactividad. También desarrollan resistencia a la insulina, que lleva a una hiperglucemia e hiperlipemia. Finalmente los ratones *ob/ob* desarrollan hígado graso, pero no progresa espontáneamente a esteatohepatitis. (4) (14)

Para que estos ratones desarrollen esteatohepatitis es necesario añadirles una dieta con déficit de metionina y colina, o una dieta alta en grasas. Otro hallazgo en los ratones *ob/ob* es que están protegidos frente a la fibrosis. Esto indica que la leptina puede ser un mediador esencial para la fibrogenesis hepática. (4) (14)

En humanos, las mutaciones del gen *ob* no son frecuentes en los pacientes con esteatosis hepática, y los niveles de leptina se correlacionan poco con el desarrollo de la esteatosis. (4)

Ratones *Db/db*:

Tienen mutado el gen del receptor de la leptina. Sí pueden sintetizar leptina, y tienen niveles normales o elevados de la misma, pero se comportan de manera similar a los ratones *ob/ob*: son ratones obesos, con resistencia a la insulina, diabéticos y desarrollan esteatosis hepática macrovesicular. Desarrollan esteatohepatitis al introducir una dieta especial (como la de déficit de metionina y colina) y también desarrollan cierto grado de fibrosis hepática al introducir esta dieta, al contrario que los ratones *ob/ob*. (4) (14)

Las ventajas tanto de los ratones *ob/ob* como los *db/db* es que tienen un fenotipo que simula en muchos aspectos la condición del síndrome metabólico. La desventaja es que no desarrollan espontáneamente esteatohepatitis ni fibrosis. (4)

Ratas obesas de Zucker:

Es uno de los modelos genéticos en ratas más utilizados. Estas ratas tienen una mutación natural del receptor de la leptina. Es un modelo similar a los ratones *ob/ob* y *db/db* ya que estas ratas se vuelven obesas, desarrollan hiperleptinemia, hiperlipemia, hiperfagia, inactividad y resistencia a la insulina. Desarrollan esteatosis macro y microvesicular sin signos de progresión a esteatohepatitis. Al igual que los ratones *ob/ob* y *db/db* no desarrollan esteatohepatitis espontáneamente, sino que requieren de un “segundo golpe” para la progresión. Este “segundo golpe” puede producirse mediante la alimentación con una dieta rica en disacáridos, una dieta alta en grasa o la combinación de una dieta con déficit de metionina-colina y una alta en grasa. (2)

Aunque las ratas obesas Zucker simulan el síndrome metabólico, tienen varias desventajas: no reflejan la etiopatogenia multifactorial de la esteatosis en humanos, no desarrollan esteatohepatitis espontáneamente y son resistentes a la fibrosis hepática. (2)

Ratones lipoatróficos (ratones transgénicos *SREBP-1c*):

Se obtienen modificando la expresión de la toxina de la difteria o la expresión de *PEPCK-nSREBP-1 α* (fosfoenol piruvatocinasa que se une al elemento regulador de colesterol adjunto a la proteína I). El *SREBP* es un factor de transcripción lipogénico que está sobreexpresado. Ambas modificaciones generan lipoatrofia. La ausencia de tejido graso impide la síntesis de leptina, y por tanto se comportan de manera similar a los ratones *ob/ob*: presentan resistencia a la insulina y desarrollan diabetes.

En estos ratones, se observa acúmulo de lípidos en el tejido hepático y se aprecia una marcada esteatosis hepática en unos 8 días. Cerca de la semana 20 se aprecia inflamación lobular, fibrosis pericelular e incluso balonamiento de hepatocitos y cuerpos hialinos de Mallory. (4)

Ratas transgénicas con hipertensión espontánea con sobreexpresión de *SREBP-1 α* :

Recientemente, un nuevo modelo transgénico de sobreexpresión de *SREBP-1 α* se ha introducido en ratas espontáneamente hipertensivas. Al igual que en los ratones lipoatróficos, polimorfismos de genes *SREBP-1* están asociados con la obesidad, resistencia grave a la insulina y la diabetes tipo 2 en los seres humanos.

Estas ratas por tanto, no son obesas, pero desarrollan espontáneamente hipertensión, hígado graso e importantes características del síndrome metabólico (hiperinsulinemia, hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia). Se confirmó en ellas el acúmulo de triglicéridos en el hígado y se encontraron niveles hepáticos de colesterol elevados. (2)

Además, estas ratas al ser alimentadas con una dieta alta en fructosa muestran un aumento significativo del estrés oxidativo en el hígado, que es más pronunciado cuanto más edad tienen las ratas. (2)

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

Estos ratones no tienen expresión de acetil-coenzima A oxidasa. Esta enzima es la principal limitante de la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos de cadena larga. Por tanto, estos ratones tienen un déficit en la oxidación peroxisomal de los ácidos grasos, que se acumulan en el hígado y conducen hacia una esteatohepatitis. Comienza apareciendo cambios microvesiculares en los hepatocitos a los 7 días de vida de los ratones. A los 30 días ya aparece una esteatosis severa en las células parenquimatosas a la vez que hay un infiltrado focal de células inflamatorias. A los 2 meses, se observan grupos de hepatocitos con citoplasma granular eosinófilo ricos en peroxisomas en las zonas periportales. A los 4-5 meses de edad, hay un aumento de la expresión del PPAR- α , del citocromo P450, y se observa un incremento de los niveles de H₂O₂. Por el contrario, a los 6-7 meses se observa un aumento compensatorio de la oxidación de los ácidos grasos, y la esteatosis se recupera mediante la regeneración de los hepatocitos. Los ratones AOX-/- desarrollan adenomas hepatocelulares y hepatocarcinoma en torno a los 15 meses. (4) (14)

Ratones KK-A:

Tienen una mutación heterocigótica del *gen Agouti*, que produce una pérdida de melanocortina y un fenotipo obeso debido a hiperfagia por supresión hipotalámica del control del apetito. Estos ratones desarrollan esteatosis hepática en presencia de obesidad y resistencia a la insulina. Pero la esteatohepatitis y la fibrosis no ocurren de manera espontánea, sino al añadir una dieta con déficit de metionina y colina. (4)

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

La metionina-adenosiltransferasa-1A es una enzima restrictiva del hígado del metabolismo de la metionina y cataliza la formación de S-adenosilmetionina. Los ratones MAT1A-/- tienen los niveles de antioxidantes disminuidos, incluyendo el glutatión, y también tienen disminuida la expresión de genes envueltos en la oxidación lipídica. Estos ratones desarrollan espontáneamente esteatohepatitis después de 8 meses de edad, y se produce una proliferación de hepatocitos aumentados de tamaño que lleva al desarrollo de tumores. Los ratones son susceptibles a la dieta con déficit de colina, que les produce hígado graso a los 3 meses de edad. Aunque estos ratones son hiperglucémicos, sus niveles de insulina son normales y no suelen aparecer en ellos otros hallazgos de síndrome metabólico. (4) (14)

Ratones *NRF1*^{-/-}:

Son ratones a los que se les elimina el gen del Factor Respiratorio Nuclear en el hígado. La delección total de este gen es letal. Este gen codifica un factor de transcripción esencial contra el estrés oxidativo mediante la respuesta de elementos antioxidantes. Los ratones en los que se anula el NRF1 muestran esteatohepatitis con niveles elevados de trigliceridemia a las 4 semanas. (14) Aparece fibrosis pericentral y pericelular a los 4 meses y a los 10 meses pueden desarrollar adenomas hepáticos y carcinomas. Los hepatocitos pueden mostrar niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y elevadas cantidades de lípidos y oxidación del DNA. (14)

Ratones *PTEN flox/flox*:

A estos ratones se les elimina la fosfatasa y un homólogo de la tensina en el cromosoma 10. El PTEN es un gen supresor de tumores que codifica una fosfatasa lipídica. El PTEN es un regulador negativo de algunas vías de señalización que regulan la apoptosis, la proliferación celular y la formación de tumores. (4) (14) Estos ratones muestran hepatomegalia extensa y esteatohepatitis con fibrosis en unas 35- 40 semanas con una histología muy similar a la humana. (14) También aparecen en ellos adenomas hepatocelulares (en torno a las 44 semanas) y un gran porcentaje puede desarrollar carcinomas hepatocelulares. (4) (14)

La ventaja de este modelo es que su histología es muy semejante a la esteatohepatitis en humanos. La desventaja es que este modelo es hipersensible a la insulina. (4)

En casi la mitad de los pacientes con cáncer hepático está reducida la expresión de PTEN. (14)

Ratones con eliminación del receptor- α activador de proliferación de peroxisomas (*PPAR- α*):

El *PPAR- α* es un regulador de los genes envueltos en el sistema de oxidación peroxisomal, mitocondrial y microsomal de los ácidos grasos en el hígado. Se observa una disminución de *PPAR- α* en los modelos con dietas altas en grasas. La grasa no se acumula en el hígado de los ratones con mutación homocigótica del gen *PPAR- α* en condiciones normales, pero en estado de hambre, se produce esteatosis hepática debido a que se inhibe la oxidación de ácidos grasos. (4)

Ratas obesas de Otsuka Long-Evans Tokushima (OLETF):

Las Ratas OLETF tienen una delección en la región promotora del gen que codifica la (CCK-1) receptor de colecistoquinina-1, resultando en la expresión baja o ausente de CCK-1 del receptor de ARNm. CCK-1 participa en el control de la saciedad en el

hipotálamo. Por lo tanto, las ratas OLETF muestran hiperfagia, y son levemente obesas, con hiperlipemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus. Estas ratas desarrollan espontáneamente esteatosis hepática cuando son alimentadas con una dieta estándar. En las semanas 22-38 se desarrolla esteatosis micro y macrovesicular y balonamiento de hepatocitos sin depósito de colágeno ni fibrosis. Pero la esteatosis desaparecía después de la semana 42. Se producía un aumento de la expresión de genes lipogénicos como el *SREBP* antes de la producción de la esteatosis y posteriormente iba descendiendo gradualmente. (2)

Para la inducción de esteatohepatitis en las ratas OLETF se puede utilizar una dieta con déficit de metionina-colina o una combinada con alto contenido en grasa. La ventaja de la combinación de ambas (metionina-colina y alta en grasa) es que las ratas desarrollan esteatohepatitis con una mayor resistencia a la insulina, inflamación más pronunciada y fibrosis (pre-cirrosis), y el aumento de la expresión de ARNm de genes lipogénicos. Además algunos estudios muestran balonamiento de hepatocitos sólo mediante la alimentación de las ratas OLETF con esta dieta combinada. Por tanto, al igual que las ratas obesas Zucker, las ratas OLETF no reflejan la etiopatogenia de la enfermedad de hígado graso humana. Se recomienda utilizarlas como modelo de esteatosis hepática a la edad de 22-38 semanas, pero no son un modelo adecuado sin añadir una dieta adicional. (2)

Tabla 2. Modelos genéticos de EHGNA más utilizados.

Modelos nutricionales	Obesidad	Resistencia a la insulina	Dislipemia	Histología hepática			
				Esteatosis	Esteatohepatitis	Balonamiento hepatocelular	Fibrosis
Ratones ob/ob	Si	Si	Si	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No (resistentes)
Ratones db/db	Si	Si	No descrita	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No espontáneamente (sí con dieta)
Ratas obesas de Zucker	Si	Si	Si	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No (resistentes)
Ratones lipoatróficos (SREBP-1c)	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Ratas con sobreexpresión de SREBP-1a	No	Si	Si	Si	Si (con dieta)	No descrito	No descrita
Ratones AOX-/-	No	No	No descrita	Si	Si	No descrito	No
Ratones KK-A	Si	Si	No descrita	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No espontáneamente (sí con dieta)
Ratones MAT1A -/-	No	No	No	Si	Si	No descrito	Si
Ratones NRF 1 -/-	No descrita	No descrito	Si	Si	Si	No descrito	Si
Ratones PTEN flox/flox	No descrita	Hipersensible	No descrita	Si	Si	No descrito	Si
Ratones PPAR-α	No	No	No descrita	No (sí en estado de hambre)	No	No descrito	No
Ratas obesas de OLETF	Sí (leve)	Si	Si	Si	Si (con dieta)	Si (con dieta con dieta combinada)	Si (con dieta)

Conclusión de los modelos genéticos:

Algunos de estos ratones tienen predisposición al desarrollo de adenoma y carcinoma hepático (especialmente los PTEN-/-, AOX-/-, MAT1A-/- Y NRF-/-) pero estos modelos no muestran claramente una fase de esteatosis antes de producirse la

esteatohepatitis. Por tanto estos modelos podrían ser útiles para el estudio del progreso de la esteatohepatitis al hepatocarcinoma.

Por otro lado hay modelos que simulan muy bien la patogenia e histología de la esteatosis en humanos (obesidad, insulinoresistencia, hiperglucemia...) pero no desarrollan espontáneamente fibrosis y esteatohepatitis.

El uso de estos modelos está limitado por la falta de disponibilidad y el alto coste para su mantenimiento.

Modelos mixtos

Como ninguno de los modelos genéticos ni dietéticos refleja fielmente la enfermedad de hígado graso en humanos también se utilizan modelos mixtos. Muchos modelos animales combinan mutaciones genéticas de origen natural o modificaciones de genes específicos con cambios dietéticos o químicos tratando de conseguir que la histopatología y la fisiopatología de los modelos se parezca más a las enfermedades del hígado graso del humano. (14)

Sahai et al (20) alimentó a ratones *ob/ob* y *db/db* con una dieta deficitaria en metionina-colina y observó que los ratones *db/db* tenían niveles de ALT en suero significativamente más altos y la inflamación hepática y la fibrosis más grave que los ratones *ob/ob* y de tipo salvaje.

Los ratones con eliminación de PPAR- α alimentados con una dieta con déficit de metionina-colina tenían una esteatohepatitis más severa que la de los ratones salvajes alimentados con la misma dieta (21).

Se han reportado muchos otros modelos que combinan anomalías genéticas con cambios nutricionales. En general, estos modelos combinados inducen diversos grados de fibrosis, insulinoresistencia, obesidad, esteatosis y esteatohepatitis.

Modelos en grandes animales

Se han descrito muy pocos modelos de esteatosis con grandes animales. La mayoría de ellos mediante un mecanismo tóxico por alcohol.

Mets realizó un estudio con cerdos, que desarrollaron esteatosis mediante la administración de 1g/kg de alcohol con agua (1:3) a través de sonda nasogástrica durante 16 días. (22)

Spannbauer consiguió esteatosis en cerdos: macrovesicular con una dieta deficiente en proteínas y microvesicular con ingesta enólica aislada y con la suma de dieta deficiente en proteínas junto con alcohol. (23)

En un estudio con cerdos de Ossabaw se vio que los cerdos alimentados con una dieta aterogénica compuesta en su mayoría por aceite de soja, sin fructosa añadida, mostraban al final de el estudio síndrome metabólico (obesidad, insulinoresistencia, intolerancia a la glucosa, dislipemia...) pero no mostraban daño hepático. Por eso posteriormente se desarrollaron diferentes estudios con varias dietas distintas con el fin de objetivar un daño hepático similar al producido en la esteatohepatitis humana. (24)

Estos estudios con cerdos de Ossabaw concluyeron que los cerdos que fueron alimentados con dieta alta en fructosa fueron los que más peso ganaron y además mostraron insulinoresistencia e hipertensión pero en la biopsia hepática no mostraron alteraciones hepáticas. Los de la dieta aterogénica desarrollaron síndrome metabólico y además mostraban una esteatosis microvesicular y aparición de células de Kupffer, pero no balonamiento ni fibrosis. En el grupo alimentado con una dieta aterogénica modificada (con baja concentración de colina), los cerdos mostraron un síndrome metabólico severo con evidencia de daño hepático (esteatosis macro y microvesicular, células de Kupffer, balonamiento difuso y una importante fibrosis perivenular y perisinusoidal. (24)

Una de las conclusiones importantes de este estudio, es que ninguno de los modelos con cerdos mostró esteatosis macrovesicular. En comparación con las analíticas, estos animales no mostraban niveles de triglicéridos muy elevados, por tanto se sospecha que la esteatosis macrovesicular puede estar relacionada con la exportación de triglicéridos desde los hepatocitos en forma de VLDL. Otro hallazgo es la aparición de células de Kupffer que no es típico de la esteatosis en humanos. (24)

Otro modelo experimental con cerdos es el que está siendo utilizado en Zaragoza para varios fines, entre ellos el estudio de un nuevo método diagnóstico y de cuantificación de la esteatosis, como es la bioimpedancia. Estos cerdos son alimentados con una dieta combinada diseñada en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (con alto contenido en grasa, déficit de metionina-colina y suplementada con colesterol y colato) que es capaz de provocar esteatosis hepática a más del 60% de los individuos a los 3 meses de su inicio, sin necesidad de utilizar elementos tóxicos extraños (como el alcohol). (25)

Los modelos de grandes animales son más caros y sólo pueden ser utilizados en centros con recursos especiales, pero estos modelos pueden mostrar la anatomía humana y la fisiología mucho más semejante a la de los humanos que los roedores.

Modelos experimentales de tratamiento de la esteatosis

En algunos estudios se ha demostrado que la restricción en la dieta puede atenuar significativamente las alteraciones que se producen en la esteatohepatitis por una dieta alta en grasas, pero la patología no se recupera totalmente. Los enfoques dietéticos para tratar y prevenir la esteatohepatitis y la obesidad siguen siendo objeto de debate. (16)

Ácido ursodesoxicólico conjugado con lisofosfatidiletanolamida (AUDC-LPE):

Se ha realizado algún estudio experimental para el tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólica, como el diseñado por *Phatil et al* donde se utiliza el AUDC-LPE. En este estudio se aplica este compuesto a ratas con enfermedad de hígado graso inducida por dieta alta en grasa y otras por déficit de metionina-colina. Los resultados del estudio proporcionan pruebas de que el AUDC-LPE aminora lesión hepática en diferentes etapas de la enfermedad de hígado graso (esteatosis y esteatohepatitis avanzada). El conjugado tiene excelentes características anti-inflamatorias, propiedades hipolipemiantes potentes, y puede ser capaz de inhibir la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, el UDCA-LPE representa un compuesto prometedor para el tratamiento de hígado graso no alcohólico, y los estudios para definir su perfil farmacocinético con el fin de hacer que el conjugado adaptable al uso humano están actualmente en curso. (26)

Plantas medicinales:

Varias plantas medicinales y productos naturales son conocidas por poseer propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes, y por lo tanto se cree que tienen efectos sobre la EHGNA. Medicamentos a base de plantas japonesas son medicamentos tradicionales japoneses que se integran en la práctica clínica moderna.

Se investigaron los efectos de los cuatro tipos de plantas japonesas [shosaikoto (TJ-9), inchinkoto (TJ-135), juzentaihoto (TJ-48), y keishibukuryogan (TJ-25)] en un modelo de ratón de EHGNA (ratones *db/db* alimentados con dieta deficiente en metionina y colina), y se mostró que TJ-9 y TJ-48 inhibían la necroinflamación y la fibrosis en el hígado. Los informes sobre los efectos positivos de las plantas medicinales y productos naturales en modelos animales de EHGNA han ido en aumento, y se necesitan futuros estudios en seres humanos. (12)

Melatonina:

Hay numerosos estudios en ratas con esteatosis inducida por dietas ricas en grasa que demuestran que la melatonina ejerce un efecto protector, probablemente a través de

su acción antioxidante e hipolipemiante. No existen apenas modelos en grandes animales del efecto de la melatonina sobre la esteatosis y casi todos ellos se basan en la producción de esteatosis por medio de tóxicos (con daño directo celular hepático), así pues un modelo de esteatosis en grandes animales inducido por dietas especiales sería el modelo ideal donde probar el efecto de la melatonina como antioxidante en la reversión de la esteatosis hepática. Este estudio se está desarrollando en Zaragoza donde se están utilizando modelos experimentales de cerdos con esteatosis inducida por una dieta combinada y se está comprobando si la melatonina es capaz de revertir dicha esteatosis, gracias a su efecto antioxidante a nivel citoplasmático y mitocondrial.

Manipulación epigenética:

El campo emergente de la epigenética ofrece una nueva perspectiva sobre la patogenia de la EHGNA. La epigenética es un fenómeno heredable pero reversible que afecta a la expresión de genes sin alterar la secuencia de ADN y se refiere a la metilación del ADN, modificaciones de las histonas y microRNAs. La manipulación epigenética a través de las vías metabólicas tales como el metabolismo del carbono ha sido propuesta como un enfoque prometedor para retardar la progresión de la enfermedad de hígado graso. La investigación de los modificadores epigenéticos en EHGNA también puede llevar al desarrollo de estrategias preventivas o terapéuticas para las complicaciones asociadas a la EHNA. (27) (28)

CONCLUSIONES:

Como se muestra en esta revisión se han estudiado muchos modelos animales de EHGNA diferentes. Pero todavía no hay un modelo ideal que replique del todo el espectro de la enfermedad en humanos (clínica, histología, etiología y patogenia). Por tanto se necesita seguir buscando modelos animales mejores.

Eligiendo un modelo adecuado para el estudio de un evento particular de la enfermedad de hígado graso no alcohólico se ha contribuido en gran medida a la comprensión de esta enfermedad, su progresión y tratamiento. A pesar de todas sus limitaciones, los modelos animales son muy útiles para entender la relación entre el metabolismo de los lípidos, los factores ambientales, la variabilidad genética, etc, que tienen que ver en el desarrollo de esta patología.

Algunos de los modelos animales que han sido revisados a lo largo de este trabajo ya están siendo utilizados tanto para estudiar posibles tratamientos útiles en la EHGNA, como para desarrollar nuevos métodos diagnósticos y de estadificación de la enfermedad que sean menos invasivos que los actuales.

En cuanto a los modelos que se han revisado se puede concluir que la mayoría de los modelos en los que se produce insulinoresistencia no desarrollan esteatohepatitis espontáneamente. Mientras que los modelos en los que se produce esteatohepatitis generalmente no muestran insulinoresistencia periférica y algunos muestran otras limitaciones como la pérdida de peso.

Los modelos animales que mejor reflejan las características de la EHGNA en humanos son los modelos mixtos en los que se utilizan animales modificados genéticamente (como los ratones ob/ob o las Ratas Zucker) y son alimentados con una dieta alta en grasa o con déficit de metionina-colina o combinada (alta en grasa y con déficit de metionina-colina).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Brea A, Puzo J.** Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl.* 2010. 22(6). 259-271.
2. **Kucera O, Cervinkova Z.** Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol.* 2014. 20(26). 8364-8376.
3. **Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B.** Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008. 100. 565-578.
4. **Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T.** Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012. 18(19). 2300-2308.
5. **Ene, Ribalta J.** Pathophysiological mechanisms of microvesicular steatosis (acute fatty liver of pregnancy). *Medwave.* 2003. 3. 1.
6. **Herrera A, Nasiff A, Arus E, Cand C, León N.** Hígado graso. Enfoque diagnóstico y terapéutico. *Rev Cubana Med.* 2007. 46(1).
7. **JR, Barba.** Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. *Rev Mex Patol Clin.* 2008. 4. 216-232.
8. **Day CP, James OF.** Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998. 114. 842-845.
9. **L. Sanches SC, Z. Ramalho LN, Josiele Augusto M, da Silva DM, Silva Ramalho F.** Nonalcoholic steatohepatitis: A search for factual animal models. *BioMed Research International.* Article ID 574832.
10. **Takaki A, Kawai D, Yamamoto K.** Molecular Mechanisms and New Treatment Strategies for Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci.* 2014. 15(5). 7352-7379.
11. **Dyson JK, Anstee QM, McPherson S.** Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Postgrad Med J.* 2015. 91. 92-101.
12. **Takahashi Y, Sugimoto K, Inui H, Fukusato T.** Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2015. 21(13). 3777-3785.
13. **Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, Masuoko H, Gores G.** Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011. 301. G825-G834.

14. **Fan JG, Qiao L.** Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009. 8. 233-240.
15. **Stöppeler S, Palmes D, Fehr M, Hölzen JP, Zibert A, Siaj 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.
16. **Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli Lm.** Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004 y 1100-1107, 79:.. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004. 79. 1100-1107.
17. **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.
18. **Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S.** Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* 2007. 46. 1392-1403.
19. **Nomura K, Yamanouchi T.** The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem.* 2012. 23. 203-208.
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. **Mets B, Kamban JR, Janicki PK, Franks J, Neveling U, Hickman R.** Alcohol pretreatment does not affect bupivacaine pharmacokinetics in the pig. *Pharmacol Res.* 1996. 33(4-5). 291-5.
23. **Spannbauer MM, Oleszczuk A, Tannapfel A, Blüher M, Pietsch UC, Hengstler J, Donaubaue 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..
24. **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 Miniatura Swine. *Hepatology.* 2009. 50(1). 56-67.
25. **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.

26. **Pathil A, Mueller J, Warth A, Chamulitrat W, Stremmel W.** Ursodeoxycholy Lyso phosphatidylethanolamide 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.** Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic Fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2015. 16(3). 5161-5179.
29. **Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M, Rosenthal T, Pappo O, Link G, Sela BA.** Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension.* 2005. 45. 1012–1018.
30. **Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Kanter M, Can M, Ucar F, Unalacak M.** Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem.* 2005. 38. 540–547.
31. http://www.uv.es/jcastell/5_Regulacion_hepatica_del_metabolismo.pdf. [En línea]
32. **Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, Tang PH, Miles L, Miles MV, Balistreri WF, et al.** High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010. 52. 934-944.
33. **Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I.** Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology.* 2009. 50. 1094-1104.
34. **Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T, Yamanouchi T.** Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr.* 2009. 139. 2067–2071.
35. **Lieber C, Leo M, Mak K, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli L.** Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004. 79. 502-509.