



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Validación de dianas farmacológicas
para la prevención y el tratamiento de la
hipertrigliceridemia y el hígado graso inducidos
por el consumo de fructosa líquida y dieta rica
en grasa saturada**

Ana Magdalena Velázquez Chávez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universidad de Barcelona

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica

TESIS DOCTORAL

**Validación de dianas farmacológicas para la prevención
y el tratamiento de la hipertrigliceridemia y el hígado
graso inducidos por el consumo de fructosa líquida y
dieta rica en grasa saturada**

Ana Magdalena Velázquez Chávez

2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universitat de Barcelona

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica

Programa de Doctorado en Biomedicina

**Validación de dianas farmacológicas para la prevención y el
tratamiento de la hipertrigliceridemia y el hígado graso
inducidos por el consumo de fructosa líquida y dieta rica en
grasa saturada**

*Memoria presentada por Ana Magdalena Velázquez Chávez para optar por el título de
doctora por la Universitat de Barcelona*

Director/Tutor
Dr. Juan Carlos Laguna Egea

Directora
Dra. Marta Alegret

Doctoranda
Ana Magdalena Velázquez Chávez

Esta tesis doctoral se ha realizado en el Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona, dentro de grupo de Investigación de “Receptores nucleares, metabolismo energético y terapia de enfermedades metabólicas” y reconocimiento de la Generalitat de Catalunya como un grupo consolidado (2013 SGR-00066). El grupo, además, es miembro del CIBEROBN (CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III) y del IBUB (Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona).

La presente tesis ha sido financiada por:



Sociedad Española de Arteriosclerosis (beca FEA/SEA 2020 Investigación Básica en Arteriosclerosis)



Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2017-82369-R)



Gobierno autonómico de Catalunya (2017 SGR 38)



Ayuda predoctoral de formación de personal investigador (nro. 130/2019) de la cuarta convocatoria del programa de becas Don Carlos Antonio López (BECAL) del Gobierno de Paraguay (BAL04-327)

“If your dreams do not scare you, they are not big enough”

Ellen Johnson Sirleaf

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Dr. **Juan Carlos Laguna** y la Dra. **Marta Alegret** por haberme dado la oportunidad y la confianza de realizar esta Tesis en su grupo de investigación. Muchas gracias por guiarme en el maravilloso mundo del metabolismo. Me siento tan afortunada de haber trabajado con personas que aman la investigación, fue una experiencia apasionante aprender a hacer ciencia con Ustedes. Aparte de ser excelentes profesionales, son buenísimas personas, y sobre todo con una altísima calidad humana, factores que han contribuido en demasía para sobrellevar el duro camino del doctorado. Además, agradecer a los otros miembros del laboratorio, a la Dra. **Núria Roglans** y la Dra. **Rosa Sánchez**, por tener siempre muy buena predisposición para ayudarme, por el asesoramiento en el laboratorio y, sobre todo, por animarme siempre a seguir adelante. Sin duda he aprendido un montón y me llevo los más lindos recuerdos.

Es increíble como pasó el tiempo, parece que fue ayer que conocí a Gemma en el laboratorio. Mi primera compañera de poyata. Recuerdo que yo iniciaba tímidamente mis primeros pasos y tú ya te ibas. Me ensañaste todo lo que sabías en tan poco tiempo y de una manera muy efectiva. A pesar de que compartimos unas pocas semanas en el laboratorio, no perdimos el contacto y, desde lejos estuviste apoyándome siempre durante todos estos años. ¡Mil gracias Gemma! Agradecer también a todos los alumnos que pasaron por el laboratorio y que han contribuido con los experimentos del proyecto, pero sobre todo por la amistad. **Lidia, María, Gabriele, Lara, Andrea** y **Alicia**. Sin duda hemos pasado muy buenos momentos y me llevo anécdotas muy divertidas de la poyata.

Además, quiero hacer un paréntesis especial para **Eleonora** y **Emma** Torras dos personitas del team Laguna que me han sorprendido no solamente a nivel profesional, sino personal. Me ha encantado trabajar con Ustedes y aprender muchísimo de sus experiencias. Sobre todo, quiero destacar la contagiante alegría de Emma, siempre aportando un condimento extra a la poyata. Son una luz y espero que sigan brillando en su camino.

Un espacio especial para mi sucesor, **Roger** Bentanchs. El que ha sido mi compi por más tiempo. En primer lugar, muchas gracias por tu amistad, por la ayuda con los experimentos, por siempre tener tan buena predisposición, adelantarte a todo y sobre todo por el aguante. Me encantó trabajar contigo, siempre todo bajo control y en sincronía. Estoy segura de que siempre irás por el camino correcto y, sobre todo, que traerás muy buenos resultados al laboratorio.

Durante el doctorado es muy importante establecer conexiones redes, hacer contactos en otras áreas y pensar en futuras colaboraciones. Es tan gratificante cuando estas redes se convierten en amistades increíbles. **Emma** Barroso, desde el primer momento sentí una gran conexión contigo, sos excelente en todos los sentidos. Gracias por tu ayuda, tus consejos, tu sinceridad, por darme soporte en los momentos difíciles. Al final, las palabras quedan cortas para expresar lo inmensamente agradecida que estoy por tener tu amistad. Así también quiero agradecer a los demás compañeros del grupo naranja: **David**, el más sincero y directo, gracias por tu ayuda y tus consejos, fuimos los primeros del team patinete. **Cristina, Lucia, Javier** Pizarro, **Triana, Javi** Izquierdo y los nuevos, siempre muy dispuestos para ayudar con las dificultades que se presentaban en la poyata, ¡muchas gracias! También a todos los del grupo verde y amarillo: **Dolors, Julia, Aina, Fotini, Leti, Gaia, Miren, Raúl, Oriol, Marina, Maria, Nuria, Oriol, Mona** y **Adel**. La experiencia en el laboratorio no hubiese sido la misma sin vuestra ayuda y compañía.

Quiero agradecer especialmente a **Vanessa** Izquierdo, la hermana que regaló el doctorado. Que muchas emociones me vienen a la cabeza tan solo recordar algunos de los momentos que pasamos. En las buenas y en las malas, siempre estuviste ahí amiga, super comprensiva, divertida, siempre con la respuesta correcta, dándome soporte y acompañándome en los momentos más difíciles. ¡Gracias por tanto amiga!

También a la Dra. **Laura** Herrero y a sus alumnos, en especial a **Pia** Bastias, gracias por la colaboración, por ayudarme con los protocolos experimentales, por el increíble asesoramiento y soporte. Y, sobre todo, gracias **Pia** por tu amistad incondicional, juntas hemos pasado muchos momentos, gracias por siempre hacer lo imposible para darme una mano.

También quiero agradecer a **Mar** (sos una luz), **Kim** y **Silvia** que no solamente me brindaron ayuda técnico-administrativas, sino también, agradables charlas en cuanto se podían. Sin duda un ingrediente importante para sobrellevar los largos días en el laboratorio. Y como no mencionar a los queridos de estabulario: **Teresa, Marta** y **David**, gracias por enseñarme tanto, por ayudarme con los experimentos y orientarme en el cuidado animal. Me siento afortunada de haber contado con vuestra ayuda.

A mi pequeña familia farmacológica de Paraguay, quienes confiaron en mí desde el vamos, y siempre me dieron la oportunidad de crecer. **Derlis, María del Carmen, Yenny (†), Olga, Luisa, Miguel** y **Jorge**, quienes me ayudaron a dar el primer paso en la ciencia. Especialmente a mi querida **Yenny**, aún me duele su partida, pero sin duda sé que estaría muy orgullosa de este logro. Muchas gracias por el apoyo de siempre y la confianza infinita.

Además, a mi familia. Mis padres, **Ana** y **Darío**, y mis hermanos, **Alex** y **Marcos**. Gracias por creer en mí, por apoyarme incondicionalmente y dejarme luchar por mis sueños. Fueron unos años durísimos lejos de casa, pero siempre estuvimos juntos a pesar de la distancia.

Y alguien más que especial, **Luis**, mi compañero de vida. Gracias por ser mi mayor soporte, mi alegría, por no dudar jamás de mi capacidad, por cuidarme tanto y siempre ayudarme a ser mi mejor versión. Cuantas cosas hemos pasado juntos, pero sin duda estos 4 años de doctorado fueron los más desafiantes. Darnos soporte el uno al otro para sobrellevar los altibajos de nuestras tesis nos ha hecho crecer un montón. Soy tan afortunada de tener alguien que ama la ciencia y que día a día me inspira ser mejor ¡Gracias por tanto amor!

Se que es imposible no olvidarse de nadie, así que muchas gracias a todos los que me estuvieron acompañando en esta gran travesía. ¡GRATITUD INFINITA!

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease is a highly prevalent condition without specific pharmacological treatment, characterized in the initial stages by hepatic steatosis. In this thesis, we studied two potential candidates for its treatment. The first one, caffeine (CAF), was suggested to reduce the lipid infiltration in the liver through anti-inflammatory, antioxidative and autophagy-related mechanisms. The second, bempedoic acid (BemA), was recently approved for the treatment of hypercholesterolemia, and has effects on hepatic fatty acid synthesis. This thesis was divided into three studies: in study 1, we characterized an animal model of hepatic steatosis induced by the consumption for three months of a high-fat diet (HFD) supplemented with 10% liquid fructose (HFHFr) in female Sprague Dawley rats. Despite the higher caloric intake, the body weight did not change in HFD or HFHFr rats, due to the induction of thermogenesis in the brown adipose tissue. The addition of fructose to the HFD increased hepatic steatosis by the inhibition of fatty acid catabolism and the induction of DNL through ChREBP and SREBP activation, without signs of inflammation, endoplasmic reticulum stress or hepatic insulin resistance. Furthermore, in the liver of the HFHFr rats, ChREBP activation increases PNPLA3 expression, triggering hypertriglyceridemia, and increasing the fatty acid flux to the muscle. This changed the mean energy substrate in the muscle, showed by an increment of the fatty acid β -oxidation in this tissue. In study 2, we analyzed the effect of a low dose of CAF (5 mg/kg), isolated or as part of a green coffee extract (GCE), in HFHFr rats. Neither CAF nor GCE alleviated hepatic steatosis, but GCE-treated rats showed lower hepatic triglyceride levels compared to the CAF group. The differential GCE effects could be related to reductions of hepatic (a) mTOR phosphorylation, leading to higher nuclear lipin-1 levels, and limiting lipogenic gene expression; (b) diacylglycerol levels and hexosylceramide/ceramide ratios; and (c) very-low-density lipoprotein receptor expression. In study 3, we treated HFHFr rats with BemA (30 mg/kg/day). The treatment improved the lipid accumulation in the liver through novel mechanisms besides the already described inhibition of hepatic ACLY: (a) decrease of DNL through the reduction of hepatic KHK expression; (b) increase in lipolysis by induction of PNPLA3 expression, also responsible for the lack of effect of the drug on hypertriglyceridemia; and (c) increase of fatty acid β -oxidation due to a PPAR α agonist effect, also observed on PPAR γ .

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico es una patología sin tratamiento farmacológico específico que posee una alta prevalencia a nivel mundial, cuya etapa inicial se caracteriza por la esteatosis hepática simple. En esta tesis estudiamos dos fármacos candidatos para su tratamiento. El primero, la cafeína (CAF), sugerido por su efecto en la reducción de la infiltración de lípidos en el hígado a través de mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes y relacionados con la autofagia y, el segundo, el ácido bempedoico (BemA), aprobado recientemente para el tratamiento de la hipercolesterolemia, que posee efectos en el hígado sobre la síntesis de ácidos grasos. Esta tesis fue dividida en tres estudios: en el estudio 1, caracterizamos un modelo animal de esteatosis hepática inducida por el consumo de una dieta alta en grasas (HFD) suplementada con fructosa líquida al 10% (HFHFr) durante tres meses en ratas hembras Sprague Dawley. A pesar de la mayor ingesta calórica, el peso corporal no varió en ratas HFD o HFHFr, debido a la inducción de termogénesis en el tejido adiposo marrón. La adición de fructosa al HFD incrementó la esteatosis hepática debido a la inhibición del catabolismo de ácidos grasos y la inducción de la DNL a través de ChREBP y SREBP, sin signos de inflamación, estrés del retículo endoplásmico o resistencia a la insulina hepática. Además, en el hígado de las ratas HFHFr, la activación de ChREBP aumentó la expresión de PNPLA3, desencadenando hipertrigliceridemia y aumentando el flujo de ácidos grasos hacia el músculo. Este efecto cambió el principal sustrato energético en el músculo, mostrado por un incremento de la β -oxidación de ácidos grasos en este tejido. En el estudio 2, analizamos el efecto de una dosis moderada de CAF (5 mg/kg), o como parte del extracto de café verde (GCE), en ratas HFHFr. Ni la CAF ni el GCE mejoraron la esteatosis hepática, sin embargo, las ratas tratadas con GCE, mostraron niveles más bajos de triglicéridos hepáticos en comparación con el grupo CAF. Los efectos diferenciales de GCE podrían estar relacionados con reducciones en la (a) fosforilación de mTOR hepático, lo que conduce a niveles más altos de lipina-1 nuclear y limita la expresión de genes lipogénicos; (b) niveles de diacilglicerol y ratio de hexosilceramida/ceramida; y (c) expresión del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad. En el estudio 3, tratamos ratas HFHFr con BemA (30 mg/kg/día). El tratamiento mejoró la acumulación de lípidos en el hígado a través de nuevos mecanismos, además de la ya descrita inhibición de ACLY hepática: (a) disminución de DNL a través de la reducción de la expresión de la KHK hepática; b) aumento de la lipólisis por inducción de la expresión de PNPLA3, también responsable de la falta de efecto del fármaco

sobre la hipertrigliceridemia; y c) aumento de la β -oxidación de ácidos grasos debido a un efecto agonista de PPAR α , también observado sobre PPAR γ .

TRABAJOS

Artículos que derivan de esta tesis

Velázquez, A; Roglans, N; Bentanachs, R; Gené, M; Sala-Vila, A; Lázaro, I; Rodríguez-Morató, J; Sánchez, R; Laguna, JC; & Alegret, M. (2020). Effects of a Low Dose of Caffeine Alone or as Part of a Green Coffee Extract, in a Rat Dietary Model of Lean Non-Alcoholic Fatty Liver Disease without Inflammation. *Nutrients*, 12(11), 3240. <https://doi.org/10.3390/nu12113240>. Cuartil: Q1 (2020 - Nutrition and Dietetics). Impact factor: 5.7

Bentanachs, R., **Velázquez, A.**, Sánchez, R., Alegret, M., Laguna, J., Roglans, R. (2021). El ácido bempedoico como activador PPAR α : Nuevas perspectivas para el tratamiento de la esteatosis hepática en un modelo experimental en rata hembra. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* (2ª revisión)

Artículos relacionados con la tesis

Sangüesa, G., Roglans, N., Baena, M., **Velázquez, A. M.**, Laguna, J. C., & Alegret, M. (2019). mTOR is a Key Protein Involved in the Metabolic Effects of Simple Sugars. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1117. <https://doi.org/10.3390/ijms20051117>

Sangüesa, G., Roglans, N., Montañés, J. C., Baena, M., **Velázquez, A. M.**, Sánchez, R. M., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2018). Chronic Liquid Fructose, but not Glucose, Supplementation Selectively Induces Visceral Adipose Tissue Leptin Resistance and Hypertrophy in Female Sprague-Dawley Rats. *Molecular nutrition & food research*, 62(22), e1800777. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800777>

Roglans, N., Baena, M., Sangüesa, G., **Velázquez, A.M.**, Griñán-Ferré, C., Pallàs, M., Sánchez, R., Alegret, M., Laguna, J.C. (2021) Chronic liquid fructose supplementation does not cause liver tumorigenesis but elicits clear gender differences in the metabolic response in Sprague-Dawley rats. *Food & Nutrition Research*. Accepted on Jun 5, 2021.

Presentaciones en congresos

Velázquez, A; Bentanachs, R; Rodríguez-Morató, J; Roglans, R; Alegret, M; Laguna, JC. (2021). The addition of liquid fructose to a high-fat diet induces skeletal muscle insulin resistance in female Sprague-Dawley rats. *38th International Symposium on Diabetes and Nutrition*. DNSG e-poster presentation. June 21-24, Spain.

Bentanachs, R; **Velázquez, A;** Roglans, R; Sala-Vila, A; Lázaro, I; Rodríguez-Morató, J; Alegret, M; Laguna, JC. (2021). El ácido bempedoico modula los cambios en el perfil lipídico hepático inducidos por una dieta rica en grasas y fructosa líquida. XXIII Congreso Virtual de la sociedad española de Arteriosclerosis. SEA, 7-10 de Junio. España

Velázquez, A; Bentanachs, R; Gené, M; Roglans, N Laguna, JC & Alegret, M. (2020). Effects of bempedoic acid on diet-induced hepatic steatosis in female rats. Abstract Congreso publicado en: *Atherosclerosis*, 315, E12. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.049>

Velázquez, A; Roglans, R; Bentanachs, R; Sala-Vila, A; Lázaro, I; Rodríguez-Morató, J; Alegret, M; Laguna, JC. (2020). Changes in hepatic levels of individual lipid species induced by caffeine in a model of hepatic steatosis in female rats. CIBEROBN. September. Spain.

Velázquez, A; Roglans, N; Laguna, JC; Alegret, M. (2019). Hepatic triglyceride accumulation and fatty acid synthesis after treatment with caffeine or coffee extract in high-fat high-fructose-fed rats. XII Jornada de Recerca, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació. Spain

Velázquez, A; Seguí, L; Roglans, N; Laguna, JC; Alegret, M. (2019). Hepatic steatosis in female rats induced by high-fat high-fructose diet: effects of caffeine and green coffee extract. MetNET. Sociedad Catalana de Biología. March, 2019, Spain.

Velázquez, A; Roglans, N; Laguna, JC; Alegret, M. (2019). Efectos de la cafeína sobre el estrés de retículo y la autofagia en un modelo de esteatosis hepática. Jornades Doctorals en Farmacologia de la UAB i UB. Sociedad Catalana de Farmacología. Junio. Barcelona-España

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	8
1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico.....	9
1.1 Epidemiología.....	12
1.2 Comorbilidades.....	14
1.3 NAFLD en pacientes no obesos	15
1.4 Diagnóstico	16
1.5 Función metabólica del hígado y su plasticidad	17
1.5 Patogénesis del hígado graso no alcohólico.....	19
2. La insulina y su papel en la regulación del metabolismo energético.....	20
2.1 Transportadores de glucosa.....	22
2.2 Señalización de la vía de la insulina	24
3. NAFLD y la resistencia a la insulina.....	26
4. Factores que alteran la lipogénesis hepática	28
4.1 Polimorfismos y predisposición genética	30
5. Transporte y metabolismo de lípidos en la NAFLD	31
6. Catabolismo de ácidos grasos: β -oxidación.....	33
7. Regulación de metabolismo y la autofagia.....	35
8. La dieta como factor de riesgo de NAFLD	37
8.1 El consumo de fructosa predispone al desarrollo de NAFLD.....	38
9. Estrés de retículo endoplasmático	40
11.1 Caféina	49
11.2 Ácido bempedoico.....	50
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	54
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. Animales.....	58
2. Dietas empleadas	58
3. Fármacos administrados	60
4. Diseño experimental	61
5. Test de actividad locomotora.....	64
6. Test de tolerancia oral a la glucosa.....	65
7. Determinación de parámetros bioquímicos	65

7.1	Niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre.....	65
7.2	Determinación de parámetros bioquímicos por el método colorimétrico.....	66
7.3	Ensayos inmunoenzimáticos: ELISA.....	66
8.	Valoración histopatológica del hígado.....	67
9.	Análisis de contenido de lípidos hepáticos.....	68
9.1	Medición de ésteres metílicos de ácidos grasos en TG hepáticos.....	68
9.2	Análisis lipídómico en homogenados de hígado de rata.....	70
10.	Actividad de β -oxidación de los ácidos grasos en el hígado.....	70
11.	Determinación de los niveles de expresión de mRNA.....	72
11.1	Obtención de RNA total a partir de tejido hepático.....	72
11.2	Obtención de RNA total a partir de tejido adiposo.....	73
11.3	Obtención de RNA total a partir de músculo.....	73
11.4	Cuantificación y valoración de la integridad del RNA.....	74
11.5	Síntesis de cDNA.....	74
11.6	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).....	75
12.	Ensayo de micro-arrays para PPAR.....	80
13.	Extracción de proteínas.....	85
13.1	Obtención de extracto de proteína total de hígado.....	85
13.2	Obtención de extracto de proteína nuclear de hígado.....	86
13.3	Obtención de extracto de proteína total de músculo.....	86
13.4	Extracto de proteína total a partir de tejido adiposo.....	86
14.	Determinación de la concentración de proteína.....	87
15.	Ensayo de Western blot.....	88
15.1	Electroforesis.....	88
15.2	Transferencia de proteínas.....	89
15.3	Inmunodetección de proteínas.....	90
16.	Ensayo de actividad funcional del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR).....	93
17.	Análisis estadístico de los resultados.....	94
4.	RESULTADOS.....	95
	Estudio 1: Caracterización del modelo HFHF_r en ratas hembra Sprague-Dawley.....	96
1.1	La dieta HFHF _r incrementa la ingesta calórica, sin modificar la ganancia de peso corporal.....	96
1.2	La adición de fructosa a la dieta HFD incrementa la termogénesis en el tejido adiposo marrón.....	99

1.3	La adición de fructosa líquida a la dieta de ratas mantenidas con HFD potencia la esteatosis hepática sin producir inflamación.....	102
1.4	La adición de fructosa es responsable de la inducción de la lipogénesis de <i>novo</i> en el grupo HFHFr	103
1.5	Efectos sobre el catabolismo de los ácidos grasos en el hígado	108
1.6	Efecto de las intervenciones dietéticas en el transporte de lípidos	110
1.7	Efecto de las dietas sobre el metabolismo de los ácidos biliares	112
1.8	La esteatosis hepática en el grupo HFHFr se desarrolla en ausencia de inflamación	114
1.9	La adición de fructosa a la dieta HFD activa selectivamente IRE1 α en el hígado.....	115
1.10	Efectos de las dietas HFD y HFHFr sobre la sensibilidad periférica a la insulina	118
Estudio 2: Efectos de la cafeína y del extracto de café verde en el modelo HFHFr en ratas hembra Sprague-Dawley		126
2.1	Los tratamientos con CAF y GCE no alteran los parámetros zoométricos en el modelo de rata HFHFr.....	126
2.2	Los tratamientos con CAF o GCE no revierten las alteraciones sobre el metabolismo periférico de la glucosa inducidas por la dieta HFHFr.....	130
2.3	El GCE ejerce efectos diferenciales de sobre la composición de TG hepáticos en comparación al tratamiento con CAF en el modelo HFHFr.....	134
2.4	A diferencia del tratamiento con CAF, el GCE podría reducir la DNL hepática vía inactivación de mTOR	139
2.5	Efectos de la CAF y GCE sobre el catabolismo de ácidos grasos en el hígado.....	142
2.6	Efectos de los tratamientos con CAF y GCE sobre los marcadores de estrés de retículo endoplásmico, inflamación y estrés oxidativo	144
Estudio 3: Efectos del ácido bempedoico en el modelo HFHFr en ratas hembra Sprague-Dawley		147
3.1	BemA disminuye la ingesta calórica de fructosa paralelamente al peso corporal.....	147
3.2	El tratamiento con BemA reduce la expresión de la fructoquinasa hepática en las ratas HFHFr	149
3.3	El tratamiento con BemA reduce la esteatosis hepática e induce hipertrofia en los hepatocitos	151
3.4	Efectos de BemA sobre la DNL en el hígado de las ratas HFHFr.....	154
3.5	BemA no modifica la termogénesis del BAT de las ratas HFHFr	156
3.7	Efecto del BemA sobre la síntesis de BA en el modelo HFHFr.....	160
3.8	El tratamiento con BemA no modifica la sensibilidad periférica de la insulina en las ratas HFHFr	161
3.9	Efectos de BemA sobre ACLY y AMPK en el hígado	164
3.10	BemA posee actividad agonista sobre PPAR α y PPAR γ	166
5.	DISCUSIÓN.....	172
6.	CONCLUSIONES	199
	Anexos.....	245

ABREVIATURAS

Acaa2	<i>Acetil-CoA aciltransferasa 2</i>
ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
ACLY	<i>ATP citrato liasa</i>
ACO	<i>Acyl-CoA oxidase1</i>
ACS	<i>Acyl-CoA synthase</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
AKT	<i>Protein kinase B (PKB)</i>
ALT	<i>Alanina aminotransferasa</i>
AMPKα	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANGPTL3	<i>Angiopoyetina 3</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
AST	<i>Aspartato aminotransferasa</i>
AS160	<i>Akt substrate of 160 kDa</i>
ATF6α	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	<i>Adenosín trifosfato</i>
AUC	<i>Area under curve</i>
BemA	<i>Bempeoic Acid</i>
BiP (GPR78)	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
Bloc1s1	<i>Biogenesis Of Lysosomal Organelles Complex 1 Subunit 1</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAF	<i>Caffeine</i>
CHOP	<i>C/EBPα-homologous protein</i>
ChoRE	<i>Carbohydrate responsive element</i>

ChREBP	<i>Carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CT	<i>Control</i>
Col6a1	<i>Collagen VI, Alpha-1 Polypeptide</i>
CPT1	<i>Carnitine palmitoyltransferase 1</i>
Cyp7a1	<i>Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1</i>
Cyp27a1	<i>Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1</i>
c.s.	<i>Cantidad suficiente</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DGAT	<i>Diacylglycerol acyltransferase</i>
DEPC	<i>Diethylpirocarbonato</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Dnajb9	<i>DnaJ homolog subfamily B member 9</i>
DNL	<i>De novo lipogenesis</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
Ehhadh	<i>Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase</i>
Edem1	<i>Endoplasmic reticulum degradation-enhancer α-mannosidase-1 like protein 1</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ER	<i>Endoplasmic Reticulum</i>
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
F4/80	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor E1</i>
FA	<i>Fatty acids</i>

FFA	<i>Free fatty acids</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF19	<i>Fibroblast growth factor 19</i>
FGF21	<i>Fibroblast growth factor 21</i>
FoxO1	<i>Forkhead box protein 01</i>
FXR	<i>Receptor X farnesoide</i>
G6Pasa	<i>Glucose-6-phosphatase</i>
GADD34	<i>Growth arrest and DNA damage inducible 34</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GCE	<i>Green Coffee extract</i>
GcK	<i>Glucokinase</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GRP78	<i>G-protein-coupled receptor 78</i>
GPAT	<i>Glicerol-3-fosfato aciltransferasa</i>
GPX1	<i>Glutatione peroxidase 1</i>
GS	<i>Glycogen synthase</i>
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase-3β</i>
HCC	<i>Carcinoma hepatoceular</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HFCS	<i>High fructose corn syrup</i>
HMGCS	<i>3-hidroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase</i>
HMGCR	<i>3-hidroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase</i>
HNF4α	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 a</i>
HFD	<i>High-fat diet</i>
HFHFr	<i>High-fat / high-fructose</i>
IL	<i>Interlenkin</i>

IR	<i>Insulin receptor</i>
IRE1	<i>Inositol requiring protein 1</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
ISI	<i>Insulin sensitivity index</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LCAT	<i>Lecitina-colesterol aciltransferasa</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i>
LDH	<i>Lactate deshidrogenase</i>
LDL	<i>Lipoproteína de baja densidad</i>
LPK	<i>Liver-piruvate kinase</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>Mammalian target of Rapamycin</i>
mTORC	<i>mTOR complex</i>
MTT	<i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids</i>
Nappi	<i>Sodium pyrophosphate</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NAPDH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NEFA	<i>Non esterified fatty acids</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ORO	<i>Oil Red O</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK	<i>Fosfatidilinositol trifosfato</i>

PDH	<i>Pyruvate dehydrogenase</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PERK	<i>Protein Kinase RNA-like ER kinase</i>
PIP3	<i>Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato</i>
PI3K	<i>Fosfatidilinositol-3-cinasa</i>
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1</i>
PKA	<i>Proteína cinasa A</i>
PKC	<i>Proteína cinasa C</i>
PNPLA3	<i>Patatin like phospholipase domain-containing protein 3</i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
QM	<i>Quilomicrones</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
SCD1	<i>Sterol-CoA desaturase 1</i>
SD	<i>Standard desviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFA	<i>Saturated fatty acid</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase 28</i>
SREBP-1	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
sWAT	<i>Subcutaneous white adipose tissue</i>
TBC1D4	<i>RabGAP TBC1 domain family member 4</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TG	<i>Triglicéridos</i>
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>

TSA	<i>Trichostatin A</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis 2</i>
TBP	<i>TATA Box-binding protein</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
ULK1	<i>Uncoordinated 51-like kinase 1</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
XBP1	<i>X-box Binding Protein 1</i>

1. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico

Durante el siglo pasado se produjo un cambio importante a nivel global en el estilo de vida de las personas que condujo al incremento de la prevalencia de varias enfermedades metabólicas. Este cambio se encuentra estrechamente relacionado al aumento del consumo de dietas con mayor contenido calórico, como la dieta occidental o tipo *Western*, y con el estilo de vida más sedentario adoptado por la población. Estos hábitos producen un desequilibrio importante en la homeostasis energética que afecta a varios órganos, en particular al hígado debido a su papel clave como regulador del metabolismo energético (Takahara & Shimomura, 2014; Howell *et al*, 2021). En las últimas décadas, se observó un incremento en la incidencia de la diabetes y la obesidad paralela a la aparición de una nueva epidemia denominada “Enfermedad del hígado graso no alcohólico” (NAFLD, *Non-alcoholic fatty liver disease*) (Younossi *et al.*, 2018).

La NAFLD fue definida por primera vez en 1980 por Ludwig y colaboradores, como una patología con características histológicas similares a las observadas en pacientes con enfermedad hepática alcohólica (acumulación de lípidos en el hígado) pero sin antecedentes de consumo significativo de alcohol (<20 g/día en mujeres; <30 g/día en hombres). En la mayoría de los pacientes se presenta de forma asintomática, lo que permite que la enfermedad progrese a estados más complejos como cirrosis o cáncer hepático. En la actualidad la NAFLD afecta a prácticamente un tercio de la población adulta en el mundo y a un número creciente de niños en países desarrollados (Dyson *et al.*, 2014; Cohen *et al.*, 2011; Younossi *et al.*, 2016).

El hígado graso no solamente se produce a partir de una interacción compleja de factores como la predisposición genética, el consumo de dietas hipercalóricas y la falta de actividad física, sino que también se ha citado que el desarrollo y la progresión de esta patología pueden estar modulados por factores epigenéticos que regulan el transcriptoma hepático, como la metilación específica del ADN y los microARNs (Dongiovanni *et al.*, 2013; Than & Newsome, 2015).

La NAFLD engloba un amplio espectro de desórdenes hepáticos estrechamente relacionados entre sí que pueden evolucionar paulatinamente a través de varios estados de la enfermedad (**Figura I-1**). La primera etapa de la enfermedad es reversible, consiste en una esteatosis hepática simple que se caracteriza por la acumulación de lípidos en el hígado. Aproximadamente un 24% de estos pacientes pueden progresar a un segundo estado también reversible denominado esteato-hepatitis (NASH, *Non-alcoholic steatohepatitis*) en el cual se desarrolla inflamación junto a la esteatosis. Algunos de estos pacientes pueden progresar a etapas irreversibles de la enfermedad como fibrosis hepática, que finalmente puede conducir a cirrosis y/o carcinoma hepatocelular (Younossi *et al.*, 2018). Estudios clínicos y de meta-análisis han evidenciado que tanto el hígado graso simple como NASH poseen potencial similar de evolucionar hacia fibrosis (Anstee *et al.*, 2019; Mazzolini *et al.*, 2020).

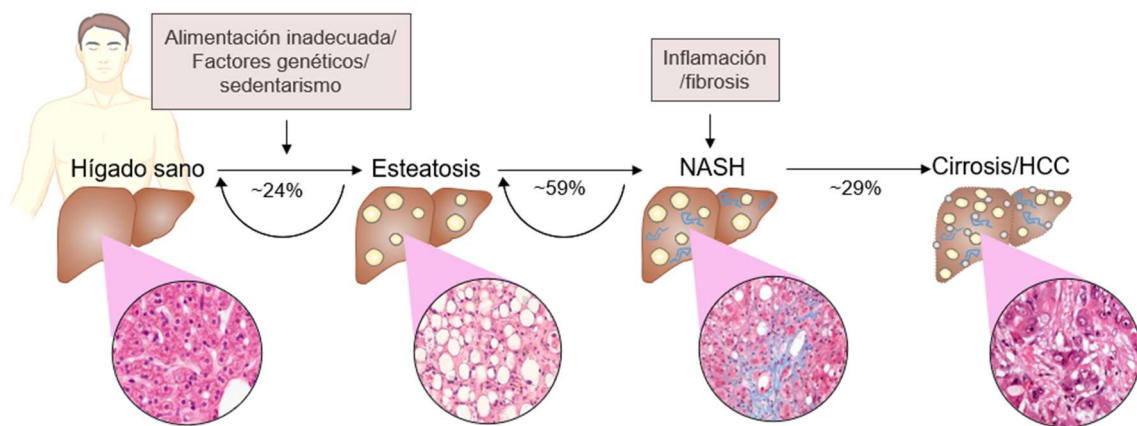


Figura I-1. Progresión esquemática de NAFLD e histología distintiva del hígado en cada estado. La predisposición genética, el sedentarismo y la alimentación inadecuada conducen a la acumulación de lípidos que derivan en esteatosis hepática, hasta un 59% de los pacientes derivan a NASH y un 29% desarrolla muerte celular y fibrosis, que puede progresar a cirrosis y/o cáncer hepático. Adaptado de Cohen *et al.*, 2011)

Cada etapa del espectro de la enfermedad posee características histopatológicas distintivas: La primera etapa se presenta como una esteatosis hepática simple, que se caracteriza por la deposición de grasa en forma de *lipid droplets* (gotas de lípidos) en el citoplasma de más del 5% de los hepatocitos, aunque también puede afectar a otros tipos de células hepáticas (Leroux *et al.*, 2012). Entre los subtipos de lípidos responsables de la esteatosis hepática se encuentran los triglicéridos (TG), que son los más abundantes y menos hepatotóxicos comparados con otros lípidos como los ácidos grasos, los diacilgliceroles, los oxi-esteroles, el colesterol libre, las ceramidas y los fosfolípidos (Yamaguchi *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2007).

La esteatosis hepática simple se puede definir también como los niveles de TG hepáticos que exceden el percentil 95 de los individuos sanos y delgados de la población (TG > 55 mg por gramo de hígado). Para el diagnóstico debe asegurarse la ausencia de otras enfermedades hepáticas como la hepatitis crónica viral, el uso de medicamentos que inducen esteatosis como esteroides, amiodarona o tamoxifeno, y otras enfermedades crónicas del hígado, como la hepatitis autoinmune, hemocromatosis, enfermedad de Wilson o consumo significativo de alcohol (Dyson, *et al.*, 2014).

La esteatosis hepática simple es muy frecuente y al mismo tiempo autolimitada, sin embargo, estudios afirman que hasta en el 59% de los pacientes pueden progresar a NASH (Younossi *et al.*, 2018). Esta segunda etapa, caracterizada histológicamente por producirse esteatosis con inflamación y se diferencia de una simple esteatosis por la presencia de más del 5% de *ballooning* hepatocelular en las muestras histológicas (Chalasanani *et al.*, 2018). El *ballooning* consiste en hepatocitos con citoplasma claro y con tamaño incrementado entre 2-3 veces mayor al normal. Además, se aprecia infiltrado inflamatorio, con o sin deposición de colágeno (fibrosis) y muerte celular (necrosis). El infiltrado inflamatorio, también conocido como inflamación lobular, se presenta en la cercanía de los hepatocitos con *ballooning* y se caracteriza por la presencia de pequeños grupos de células inflamatorias, que incluyen linfocitos, eosinófilos y neutrófilos (Tiniakos *et al.*, 2010).

La característica histológica más relevante asociada con la mortalidad en pacientes con NASH es la presencia significativa de fibrosis (Ekstedt *et al.*, 2015). La NASH con fibrosis ocurre cuando los hepatocitos son reemplazados por tejido cicatricial y se produce un exceso de actividad fibrótica. El tejido cicatricial está compuesto principalmente por colágeno del tipo I, que es producido por las células estrelladas activadas previamente por la lesión hepática. Los pacientes con NASH que tengan algún grado de fibrosis, tienen un riesgo alto de desarrollar cirrosis (Chalasanani *et al.*, 2018) Por último, en un promedio de 10 años, hasta casi un 29% de los individuos con cirrosis inducida por NASH pueden desarrollar carcinoma hepatocelular (HCC), convirtiendo a la NAFLD como una de las principales causas de HCC a nivel mundial (Younossi *et al.*, 2018).

En la actualidad, la NAFLD se considera un problema importante para el sistema sanitario, debido a que no solamente los pacientes que la padecen tienen un mayor riesgo de muerte por patologías cardiovasculares y metabólicas asociadas, sino que también la gran cantidad de pacientes con NAFLD y potencial de progresión crea grandes desafíos para el cribado de la enfermedad, lo que genera una carga económica importante para los países afectados (Ma *et al.*, 2017; Younossi *et al.*, 2018).

El tratamiento de la NAFLD consiste en estrategias basadas en el cambio del estilo de vida, como el aumento de la actividad física, la pérdida de peso y la implementación de dietas rigurosas. Estos tratamientos no solamente no están bien definidos, sino que son poco efectivos y generalmente presentan muchas recidivas en los pacientes (Kwak & Kim, 2018). Hasta el momento, a pesar de que la prevalencia de la NAFLD sigue en aumento, no se cuenta con una terapia farmacológica aprobada para su tratamiento, lo que claramente lo posiciona como una prioridad para este campo de la medicina.

1.1 Epidemiología

En los últimos años, la NAFLD ha sido posicionada como la causa más común de enfermedad hepática en adultos, adolescentes y niños en países desarrollados, debido al aumento acelerado de su incidencia junto con la de la obesidad y la diabetes (Younossi *et al.*, 2018). En relación a su prevalencia, existe una gran variabilidad entre los estudios debido a una serie de factores, como los diferentes criterios de selección de la muestra, los métodos utilizados para diagnosticar, el diseño del estudio, el sesgo de verificación y las diferencias de una región a otra.

Aproximadamente un cuarto de la población adulta en el mundo padece NAFLD y, en algún momento, una gran parte de estos pacientes deberán someterse a una biopsia por tener algún indicio clínico de NASH. Un meta-análisis llevado a cabo por Younossi y colaboradores (2016), realizado en base a publicaciones sobre NAFLD de los últimos 30 años, reveló que la prevalencia global es del 25% (**Figura I-2**), con una mayor tasa en Medio Oriente (31,8%) y Sudamérica (30,4%), seguida por Asia (27,4%), América del Norte (24,1%) y Europa (23,7%), y finalmente, con tasas menores en África (13,5%).

Se ha visto que la prevalencia global es afectada por el factor étnico. Los hispanos representan al grupo étnico con mayor vulnerabilidad, en contraste con la raza negra que poseen un menor riesgo de desarrollar la enfermedad (Younossi *et al.*, 2016). Adicionalmente, en otro estudio denominado “*Dallas Heart Study*”, se menciona que el hígado graso se presenta en el 45% de los hispanos, 33% en los de ascendencia europea, y 24% de los americanos africanos (Browning *et al.*, 2004). La mayor prevalencia de hígado graso presentada en hispanos podría estar relacionada en parte con la alta prevalencia de obesidad y resistencia a la insulina que desarrolla esta población.

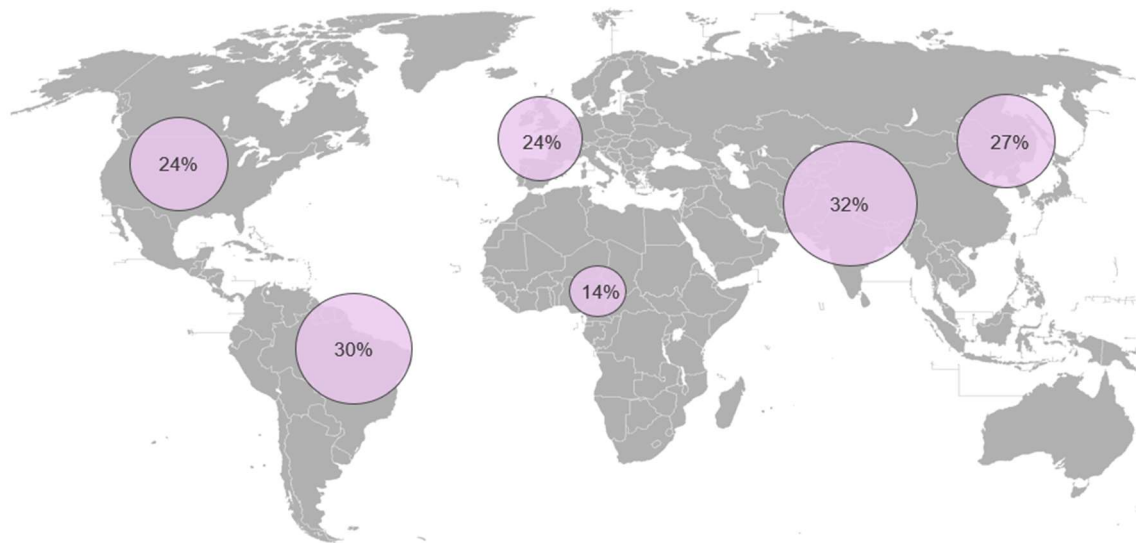


Figura I-2. Prevalencia (%) global estimada de NAFLD en los últimos 30 años estratificada por regiones. Adaptado de (Younossi *et al.*, 2016).

Se ha observado que el riesgo de desarrollar NAFLD depende estrechamente de la edad y el sexo. La prevalencia en adultos entre 30 y 70 años se incrementa con la edad. Antes de los 60 años, los hombres son significativamente más propensos a desarrollar esteatosis que las mujeres, pero a edades superiores las mujeres son más propensas (Younossi *et al.*, 2016). La prevalencia de NAFLD en hombres en general es el doble que el de mujeres, sin embargo, las mujeres con hígado graso poseen un mayor riesgo de progresar a etapas de fibrosis avanzada (Chalasani *et al.*, 2018). En niños, la NAFLD representa la causa más común de enfermedad hepática crónica. Su prevalencia media varía desde un 7% en la población pediátrica general hasta 34% en niños obesos (Anderson *et al.*, 2015). En contraste con la población general pediátrica, en poblaciones obesas, la prevalencia difiere según la región geográfica; las estimaciones de prevalencia son más bajas en América del Sur y más altas en Asia que en Europa, Medio Oriente/África del Norte y América del Norte. Se ha observado que el sobrepeso durante la niñez y la adolescencia conlleva a un mayor riesgo de NAFLD que el aumento de peso en la edad adulta (Anderson *et al.*, 2015).

1.2 Comorbilidades

A menudo muchos pacientes con NAFLD pueden cursar la enfermedad sin comorbilidades, sin embargo, muchas patologías metabólicas han sido asociadas con la esteatosis hepática. Entre las más frecuentes se encuentran la obesidad (51%), la diabetes tipo 2 (22%), la hiperlipidemia (69%), la hipertensión (39%) y el síndrome metabólico (42%) (Dyson *et al.*, 2014). La resistencia a la insulina ha sido considerada como uno de los factores claves vinculantes de la NAFLD con el síndrome metabólico y la obesidad. Entre el 70-90% de los pacientes con síndrome metabólico desarrollan NAFLD y por este motivo, el hígado graso ha sido considerado como la manifestación hepática del síndrome metabólico (Argo & Caldwell, 2009; Saltiel, 2015).

El síndrome metabólico por su naturaleza consta de tres o más de las siguientes características: obesidad abdominal, alteración de la glucosa en ayunas, hipertrigliceridemia, bajo colesterol HDL e hipertensión (Younossi *et al.*, 2018). Hasta aproximadamente un tercio de los pacientes con NAFLD tienen el síndrome metabólico completo y más del 90% tienen al menos una de las características mencionadas. Adicionalmente, la progresión hacia NASH y fibrosis es más frecuente en pacientes con más factores de riesgo metabólicos; esto permite que el síndrome metabólico sea considerado como un predictor independiente de fibrosis en el desarrollo de la NAFLD (Dyson *et al.*, 2014).

La obesidad también ha sido relacionada tanto con la patogénesis de la esteatosis simple, así como con su progresión hacia NASH. Se ha sugerido que el riesgo de desarrollo de NASH es menor en personas delgadas que en personas con obesidad (Sookoian & Pirola, 2018). Algunos estudios señalan que hasta un 80% de pacientes obesos, en contraste con un 16% de personas sanas con peso normal, pueden desarrollar NAFLD (Williams *et al.*, 2000). Igualmente, los pacientes que sufren de fibrosis hepática tienden a ser más obesos que no obesos, un 86% frente a un 27%, respectivamente (Fassio *et al.*, 2004).

La NAFLD también se relaciona con enfermedades cardiovasculares. Recientemente, observaciones clínicas indicaron que NASH aumenta el riesgo de aterosclerosis y otras patologías cardiovasculares por la sobreexpresión local de mediadores inflamatorios, daño endotelial y reguladores de la presión arterial (Targher *et al.*, 2010).

Además, otros estudios demostraron que los pacientes con NAFLD muestran alteraciones en la capacidad de vasodilatación, aumento del grosor de la capa íntima-media de la arteria carótida y una mayor prevalencia de placas ateroscleróticas carótidas en comparación con sujetos sanos, independientemente de que presenten obesidad y otros factores de riesgo establecidos (Ding *et al.*, 2020).

1.3 NAFLD en pacientes no obesos

Pese a que normalmente la esteatosis hepática se encuentra asociada con la obesidad, algunos estudios afirman que hasta un 45% de los pacientes pueden cursar la enfermedad sin sobrepeso. Esta condición en particular es conocida como NAFLD tipo “no obeso”, y se da en personas que poseen un índice de masa corporal normal, pero con características similares a los de un paciente con obesidad. El aumento del porcentaje de grasa visceral (a diferencia de la obesidad general), el alto consumo de fructosa y grasa y los factores de riesgo genéticos, incluidos los defectos congénitos del metabolismo, podrían estar asociados con la NAFLD en pacientes no obesos (Younossi *et al.*, 2018).

Estudios han planteado la hipótesis de que los distintos perfiles metabólicos e histológicos, y en consecuencia la patogenia de la NAFLD con o sin obesidad se debe a algo más que diferencias en el peso corporal y el índice de masa corporal (IMC). Según Chen y colaboradores (2020), el fenotipo clínico de la NAFLD sin obesidad podría reflejar alteraciones en la integración de señales de la dieta y del medio metabólico sistémico, así como del eje enterohepático, que involucra a la acción de los ácidos biliares, así como la microbiota intestinal. Se ha descrito que la esteatosis hepática en los pacientes sin sobrepeso es principalmente una consecuencia del aumento de la lipogénesis de *novo* (DNL, *De novo* lipogenesis) en el hígado, de la disminución de la capacidad para almacenar grasas y de la reducción de la función mitocondrial en el tejido adiposo (Ruderman *et al.*, 1988).

El NAFLD sin obesidad fue inicialmente descrita en la población asiática, encontrándose una prevalencia de hasta el 23% en individuos sin sobrepeso (Chen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). Actualmente se presenta hasta en el 20% de la población americana y europea (Younossi *et al.*, 2017). En contraste con la NAFLD del tipo obeso, la del tipo no obeso se presenta con mayor frecuencia en personas jóvenes, sedentarias, con niveles altos de triglicéridos en plasma y generalmente con mayor resistencia a la insulina. A pesar de que estos pacientes tengan una menor incidencia de síndrome metabólico, presentan un mayor riesgo cardiovascular y niveles más elevados de lípidos en el hígado (Younossi *et al.*, 2012).

Cabe destacar que el NAFLD en pacientes no obesos se presenta mayoritariamente en mujeres, que además evidencian una menor prevalencia de resistencia a la insulina (Ye *et al.*, 2020). Sin embargo, otros estudios han demostrado que tanto el sexo como la edad no parecen afectar la predisposición a hígado graso sin obesidad. Según, Nishioji y colaboradores (2015), en la población no obesa de Asia oriental, el polimorfismo *PNPLA3 rs738409* junto a los cambios en el estilo de vida pueden afectar de manera contundente a la patogenia de NAFLD independientemente de sexo o de la edad.

Como este tipo de NAFLD se presenta con menos comorbilidades relacionadas, se cree erróneamente que este subgrupo seguiría un curso clínico relativamente benigno. Sin embargo, esta manifestación presenta el mismo pronóstico de fibrosis que la del tipo obeso, y, por lo tanto, merece una atención clínica más especializada, ya que muchos diagnósticos pasan desapercibidos por su naturaleza asintomática (Conus *et al.*, 2007).

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad en sus inicios no siempre es posible, debido a que la mayoría de los pacientes generalmente son asintomáticos y cursan la enfermedad de forma desapercibida, lo que permite que ésta evolucione de forma insospechada a estadios prácticamente irreversibles. Hasta el 11% de los pacientes que cursan la enfermedad sin sintomatología tienen un alto riesgo de progresar a fibrosis hepática avanzada (Chalasani *et al.*, 2018). En su mayoría, estos pacientes solo serán diagnosticados cuando se sometan a chequeos rutinarios de sangre y/o de imágenes abdominales por otros motivos distintos al del hígado graso.

Al evaluar a un paciente con sospecha de NAFLD es esencial excluir la existencia de enfermedad hepática crónica común coexistente y otras etiologías competidoras. En las últimas décadas ha habido un gran interés en desarrollar reglas de predicción clínica y biomarcadores no invasivos para identificar esteatosis hepática en los pacientes. El contenido de triglicéridos hepáticos puede ser cuantificado por métodos de imagen no invasivo, sin embargo, la biopsia hepática seguida por análisis histológico es determinante para confirmar el estado y la progresión de la enfermedad (Cohen *et al.*, 2011; Tandra *et al.*, 2011). Otras pruebas como la determinación de los niveles séricos de aminotransferasas, la ecografía, la tomografía computarizada y la resonancia magnética, también son utilizadas en el diagnóstico, sin embargo, no reflejan de forma fidedigna el estado de la enfermedad. Aunque la biopsia está limitada por el costo, el error de muestreo y la mortalidad relacionada al procedimiento, actualmente sigue siendo el enfoque más fiable para confirmar la presencia de esteatohepatitis y fibrosis en los pacientes (Chalasanani *et al.*, 2018).

La amplitud de la esteatosis se clasifica según el porcentaje de hepatocitos esteatósicos: leve entre 5–33%, moderado entre 33–66%, grave > 66%, y severo cuando la esteatosis ocupa completamente el acino (Brunt *et al.*, 1999). Por otra parte, según el tamaño de las vacuolas lipídicas, los pacientes pueden presentar dos tipos de esteatosis. La esteatosis macrovesicular que se caracteriza por vacuolas grandes que ocupan todo el citoplasma y típicamente empujan el núcleo hacia un lado de la célula. Este patrón es predominante en la NAFLD, sin embargo, en algunos casos, el citoplasma contiene múltiples vacuolas lipídicas pequeñas con el núcleo centrado; a este tipo se la conoce como esteatosis microvesicular (Lefkowitz, 2005).

1.5 Función metabólica del hígado y su plasticidad

El hígado es un órgano que no solamente cumple un papel central en la homeostasis del metabolismo energético, sino que también, cumple funciones especializadas únicas, como la desintoxicación de compuestos endógenos o xenobióticos y la producción de muchas proteínas plasmáticas y ácidos biliares (Piccinin *et al.*, 2019). Un hígado sano tiene una notable plasticidad metabólica. En el transcurso de un día, los hepatocitos cambian fácilmente entre las tareas metabólicas dispares de almacenamiento y suministro de energía a través de transiciones perfectas. Factores múltiples, como los nutrientes, las hormonas pancreáticas y entéricas, controlan con precisión la disponibilidad de sustrato energético para todo el cuerpo (Samuel & Shulman, 2018).

El hígado funciona como un mediador entre las fuentes de energía (endógena y provenientes de la dieta) y los órganos extrahepáticos que presentan altas demandas de energía. De esta manera, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, el hígado contribuye a las respuestas adaptativas que proporcionan la energía necesaria para el sustento de las diferentes funciones de los órganos. La privación de alimentos y la actividad física activan inmediatamente la degradación de glucógeno en las células hepáticas para controlar los niveles de glucosa en sangre (Miller *et al.*, 1951). Además, durante el ayuno, el hígado cambia su programa metabólico hacia la gluconeogénesis, una vía hepática que conduce a la síntesis de glucosa a partir de lactato y otros compuestos no carbohidratos. Este proceso es la primera fuente de producción de glucosa endógena para satisfacer las necesidades metabólicas de otros órganos (Piccinin *et al.*, 2019). Durante el ayuno prolongado, se activa la lipólisis en el tejido adiposo blanco, lo que permite que se liberen ácidos grasos libres (FFA, *free fatty acids*) en el torrente sanguíneo y sean rápidamente absorbidos y metabolizados por el hígado. Esto conduce a la producción de cuerpos cetónicos que pueden usarse como combustible de diferentes órganos, el cerebro especialmente, retrasando así la degradación de las proteínas endógenas para proporcionar energía adicional (Saponaro *et al.*, 2015).

El hígado también es esencial para la homeostasis del colesterol, visto que desempeña un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas y la producción de bilis. Además, el balance de nitrógeno está estrechamente relacionado con la función hepática, debido a que el amoníaco producido por el catabolismo de aminoácidos, es principalmente desintoxicado a través del ciclo de la urea que se lleva a cabo exclusivamente en el hígado (Haüssinger, 1990).

Si el hígado es fundamental para el equilibrio energético a nivel del cuerpo, las mitocondrias son los principales centros metabólicos a nivel celular. Se ha visto que las disfunciones mitocondriales están implicadas en varias enfermedades, principalmente a las relacionadas con el metabolismo como es el caso de la NAFLD (Piccinin *et al.*, 2019). La mayoría de las vías involucradas en el metabolismo energético están compartimentadas completa o al menos parcialmente dentro de estos orgánulos. Además de su papel bioenergético único en la producción de ATP aeróbico por fosforilación oxidativa, las mitocondrias están involucradas en la homeostasis del calcio y el hierro, la apoptosis y el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Andreyev *et al.*, 2005).

1.5 Patogénesis del hígado graso no alcohólico

Desde el punto de vista metabólico, el hígado graso se produce como consecuencia de un desequilibrio energético. Es decir, cuando el flujo de ácidos grasos que ingresan (aporte exógeno) y la velocidad de la DNL en el hígado excede la velocidad de exportación y la capacidad de oxidarlos (catabolismo). Entre los mecanismos que conducen al desarrollo del hígado graso se destacan los siguientes (**Figura I-3**):

- 1) Incremento del aporte exógeno de lípidos al hígado provenientes de la dieta (Kakimoto *et al.*, 2016).
- 2) Aumento de la actividad lipolítica del tejido adiposo visceral blanco, y con menor tasa, la del tejido adiposo subcutáneo, causada principalmente por la resistencia a la insulina (Tilg & Moschen, 2010).
- 3) Resistencia a la insulina en el músculo esquelético, generada por el transporte deficiente de glucosa y déficit en la síntesis de glucógeno muscular, lo que hace que la glucosa ingerida se utilice mayoritariamente para la DNL hepática (Petersen *et al.*, 2007; Jornayvaz *et al.*, 2010)
- 4) Inducción de la DNL a través de factores lipogénicos estimulados principalmente por el consumo crónico de azúcares simples como la fructosa (Softic *et al.*, 2016; Baena *et al.*, 2016).
- 5) Reducción del catabolismo lipídico en el hígado causado principalmente por: **(a)** disminución de la oxidación de los ácidos grasos y de la lipofagia; **(b)** disfunción mitocondrial hepática, **(c)** disminución de la secreción de triglicéridos en forma de VLDL (*lipoproteínas de muy baja densidad*) desde el hígado y **(d)** el aumento del estrés de retículo endoplásmico (Fuchs *et al.*, 2014; Tilg & Moschen, 2010).

Los factores que promueven la deposición de triglicéridos, así como sus roles relativos en las transiciones de esteatosis a esteatohepatitis y cirrosis aún no han sido claramente definidos en humanos (Cohen *et al.*, 2011). La transición progresiva de la esteatosis a NASH fue presentada hace una década por Day y colaboradores (1998). Esta fue descrita como una hipótesis de “doble impacto”, que indica que, además del primer impacto (esteatosis hepática) se necesita un segundo impacto (por ejemplo, la presencia de endotoxinas intestinales) a fin de que se produzca NASH en los pacientes. Por otra parte, Tilg y Moschen (2010) han propuesto un modelo de "múltiple impacto", donde varios “impactos” deben actuar en paralelo para que finalmente se genere la inflamación hepática, que deriva principalmente de factores (citoquinas, estrés de retículo, etc.) provenientes del intestino y del tejido adiposo.

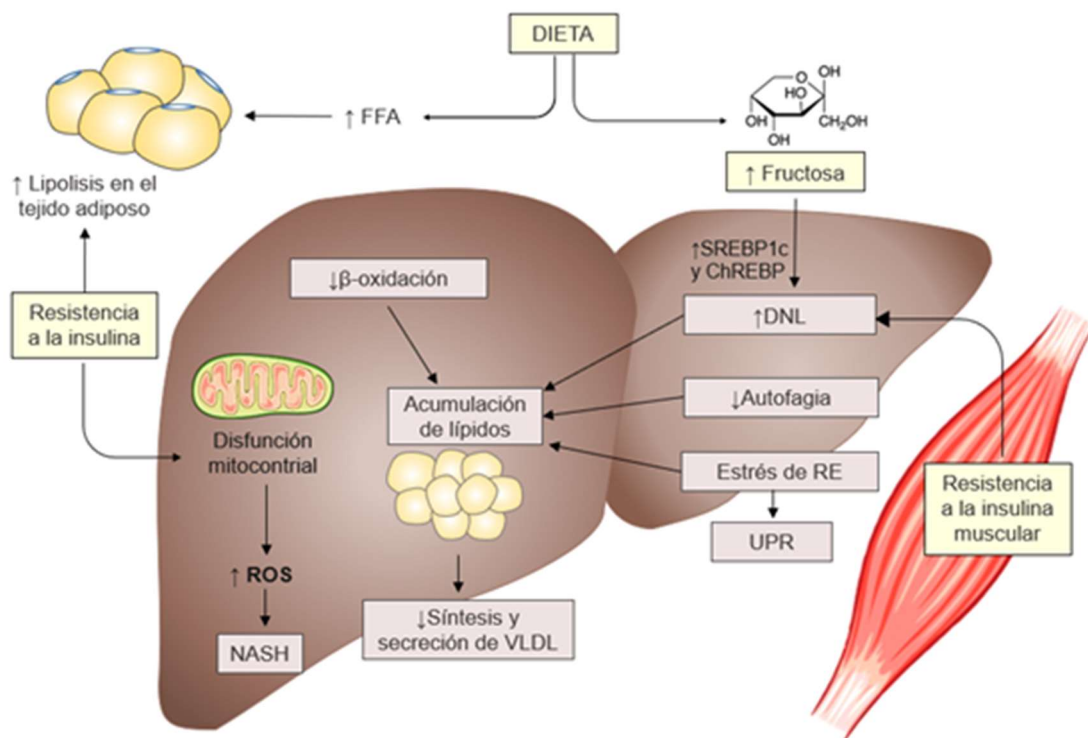


Figura I-3. Factores metabólicos envueltos en la patogénesis del hígado graso. NASH: *Non-Alcoholic SteatoHepatitis*; ROS: *Reactive oxygen species*; UPR: *Unfolded protein response*. DNL: *De novo lipogenesis*; FFA: *Free fatty acids*. RE: *Rough endoplasmic reticulum*. Adaptado de Smith y Adams (2011).

En individuos obesos, la esteatosis hepática es promovida en gran medida por el aporte de FFA provenientes de la dieta, de la DNL en el hígado y de la lipólisis en el tejido adiposo. Estudios que combinan enfoques de isótopos estables y análisis de muestras de biopsia hepática de individuos obesos, sugieren que el flujo elevado de ácidos grasos periféricos hacia el hígado y el aumento de la DNL son los proveedores directos más importantes de ácidos grasos en estos pacientes, con una contribución respectiva del 59% y 26 % en la síntesis de triglicéridos hepática (Donnelly *et al.*, 2005).

2. La insulina y su papel en la regulación del metabolismo energético

La insulina es una hormona anabólica cuya acción es esencial para regular la homeostasis energética. Consiste en una proteína formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro que se produce en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina actúa como el principal regulador de la glucosa plasmática.

A pesar de los periodos largos entre ayuno y alimentación, los niveles de glicemia permanecen en un rango estrecho entre 4 y 7 mM en individuos normales gracias a la insulina. Este estricto control se rige por el equilibrio entre la absorción de glucosa del intestino, la producción por el hígado y la captación y metabolismo de los tejidos periféricos (Saltiel & Kahn, 2001).

La insulina secretada en la sangre cumple varias funciones que se complementan entre sí con la finalidad de mantener el equilibrio de los sustratos energéticos proveídos a los diversos órganos y tejidos. Entre sus funciones principales se encuentra la de promover el almacenamiento de sustratos en el músculo, hígado y tejido adiposo, al estimular la lipogénesis y la síntesis de glucógeno. Adicionalmente, inhibe la lipólisis, la liberación de lípidos almacenados y la glucogenólisis (Saltiel & Kahn, 2001). Además, la insulina también estimula el crecimiento y la diferenciación celular, estimula la síntesis proteica y suprime la degradación de proteínas (Sesti, 2006; Muoio & Newgard, 2008).

La insulina cumple funciones diferenciales según las necesidades energéticas de cada tejido. En el músculo esquelético, esta hormona estimula la captación y metabolismo de más de un 75% de la glucosa plasmática. Este hecho sitúa al músculo como un tejido clave para la regulación de la homeostasis energética (Klip & Pâquet, 1990). La captación de glucosa en las células musculares es dependiente de la insulina, una vez que entra en las células es utilizada para la producción de glucógeno y TG. Además, inhibe la glucogenólisis y la degradación de proteínas musculares y favorece el almacenamiento de aminoácidos en forma de proteína muscular (Saltiel & Kahn, 2001).

En el hígado, a pesar de que la captación de glucosa no es estimulada por la insulina en este órgano, esta hormona es capaz de estimular la síntesis de glucógeno y bloquear la producción de glucosa hepática (gluconeogénesis) a través de la supresión de la expresión de las enzimas gluconeogénicas. Además, inhibe la glucogenólisis, disminuyendo la liberación de glucosa en sangre y regulando así sus niveles en ayunas, y promueve la síntesis de ácidos grasos incrementando la lipogénesis por mecanismos directos e indirectos (Michael *et al.*, 2000; Zhang & Liu, 2015).

En cuanto al tejido adiposo, la glucosa se almacena principalmente como lípidos. La captación de glucosa es estimulada por la insulina, aunque en una fracción menor (<10%) en relación a lo captado por el tejido muscular. La principal función de la insulina en el tejido adiposo es la activación de las enzimas de síntesis lipídicas estimulando la lipogénesis, y al mismo tiempo, inhibe la lipasa sensible a hormona que resulta en la disminución de la lipólisis (Anthonsen *et al.*, 1998; Saltiel & Kahn, 2001). De este modo, se produce un incremento de las reservas energéticas en forma de grasas y se disminuye la liberación de NEFA, del tejido adiposo hacia el plasma (Dimitriadis *et al.*, 2011).

En el cerebro, la glucosa representa la principal fuente energética y, por lo tanto, requiere de una regulación metabólica estricta a fin de mantener el funcionamiento correcto de este órgano. La insulina además regula la secreción de diversas hormonas como la leptina y la grelina que, junto con la señalización de otras moléculas, permiten controlar el balance energético de todo el organismo. En este contexto, la señalización de la insulina es esencial en la regulación de diversas actividades neuronales como la ingestión de comida, el gasto energético, el metabolismo periférico y también el aprendizaje y la memoria (Mergenthaler *et al.*, 2013; Gray *et al.*, 2014).

En los vasos sanguíneos, la insulina estimula la vasodilatación de las células endoteliales y aumenta el flujo sanguíneo a través de la activación de la producción de óxido nítrico. Esto conduce al aumento de la eliminación de glucosa en los tejidos diana de la insulina, como por ejemplo el músculo esquelético (Muniyappa *et al.*, 2007).

2.1 Transportadores de glucosa

La captación de glucosa al interior de las células se realiza por transportadores especiales pertenecientes a un subtipo de la familia de proteínas GLUT (*Glucose transporter*). Éstos se localizan en diferentes órganos y tejidos, y su función varía discretamente en función del subtipo GLUT al que pertenecen (Mueckler & Thorens, 2013). Los transportadores GLUT 1-4, que pertenecen a la familia de GLUT de la clase I, facilitan el movimiento pasivo de glucosa de acuerdo a su gradiente de concentración y se encuentran en órganos y tejidos que exigen una gran demanda de glucosa. Estos gradientes suelen ser del sistema sanguíneo al interior de la célula, pero en el caso del hígado, estos gradientes pueden ser de la célula al torrente sanguíneo sistémico (Holman, 2020).

El transportador GLUT1 está presente en grandes cantidades en los eritrocitos, el cerebro y en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La GLUT1 no es sensible a la insulina, tiene una gran afinidad por la glucosa y muy poca por la fructosa. Por otra parte, la GLUT 2 está presente en grandes cantidades en el hígado, las células β pancreáticas, el intestino y en el riñón (Wood & Trayhurn, 2003). Este transportador es insensible a la insulina y tiene una afinidad relativamente alta tanto por la glucosa como por la fructosa. En el hígado, GLUT2 se expresa en la membrana sinusoidal de los hepatocitos, permite el transporte bidireccional de glucosa bajo control hormonal y capta con avidez la fructosa de la vena porta, de modo que los niveles de fructosa se mantienen bajos en la circulación sistémica (Holman, 2020).

GLUT3 es también insensible a la insulina, tiene una alta afinidad por la glucosa, por lo tanto, se expresa en tejidos donde la demanda de glucosa como combustible es alta, en particular en las neuronas del cerebro (Wood & Trayhurn, 2003).

El transportador de glucosa tipo GLUT de la clase I que responde a la insulina es el GLUT4, que se encuentra en el corazón, en el músculo esquelético y en los tejidos adiposos marrón y blanco. Debido a que este transportador es sensible a la insulina, es responsable de la reducción del aumento posprandial de los niveles de glucosa plasmática (Rayner *et al.*, 1994). La insulina actúa estimulando la translocación de vesículas específicas que contienen GLUT4 desde los depósitos intracelulares a la membrana plasmática, lo que resulta en un aumento inmediato de 10 a 20 veces en el transporte de glucosa (Shepherd & Kahn, 1999; Bryant *et al.*, 2002).

La GLUT5 en cambio, pertenece a la familia de la clase II de proteínas GLUT, es prácticamente exclusivo para el transporte de fructosa e insensible a la insulina. Se localiza en la membrana apical de los enterocitos del intestino delgado, testículo y riñones y, en menor medida, en el músculo esquelético y tejido adiposo (Mueckler & Thorens, 2013).

2.2 Señalización de la vía de la insulina

Después de la unión de la insulina a su receptor localizado en la membrana celular (**Figura I-4**), se activa la tirosina cinasa del receptor de insulina (IR, *insulin receptor*), lo que provoca la fosforilación de residuos de tirosina del IR y de las proteínas sustrato del IR (IRS), iniciándose el proceso de señalización intracelular de la insulina. Los sitios de fosfotirosina en IRS permiten la unión de la cinasa lipídica PI3K (fosfatidilinositol-3-cinasa), que sintetiza fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática. Esto recluta a la cinasa dependiente de fosfatidilinositol trifosfato (PDK), que fosforila directamente el residuo Thr³⁰⁸ de la AKT (*protein kinase B*) (Samuel & Shulman, 2019; Arneth *et al.*, 2019). Una segunda fosforilación de AKT, en el residuo Ser⁴⁷³, se lleva a cabo mediante mTORC2 (*mammalian target of Rapamycin complex 2*) (Haeusler *et al.*, 2018).

La AKT activada fosforila varios sustratos en residuos de Ser/Thr. Éstos incluyen: el factor de transcripción FoxO (*Forkhead family box O*); la proteína TSC2 (*tuberous sclerosis 2*), que permite la activación de mTORC1 y las proteínas que se encuentran por debajo de su cascada de activación: S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) y la proteína SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*); la GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) y la TBC1D4 (*RabGAP TBC1 domain family member 4*) (Howell *et al.*, 2011). Estas proteínas efectoras median los efectos de la insulina en la producción, utilización y absorción de glucosa, así como en la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos. En el músculo en particular, la AKT fosforilada desencadena la translocación de los transportadores GLUT4 que permite el ingreso de la glucosa al interior de la célula (Haeusler *et al.*, 2018; Carmichael *et al.*, 2019).

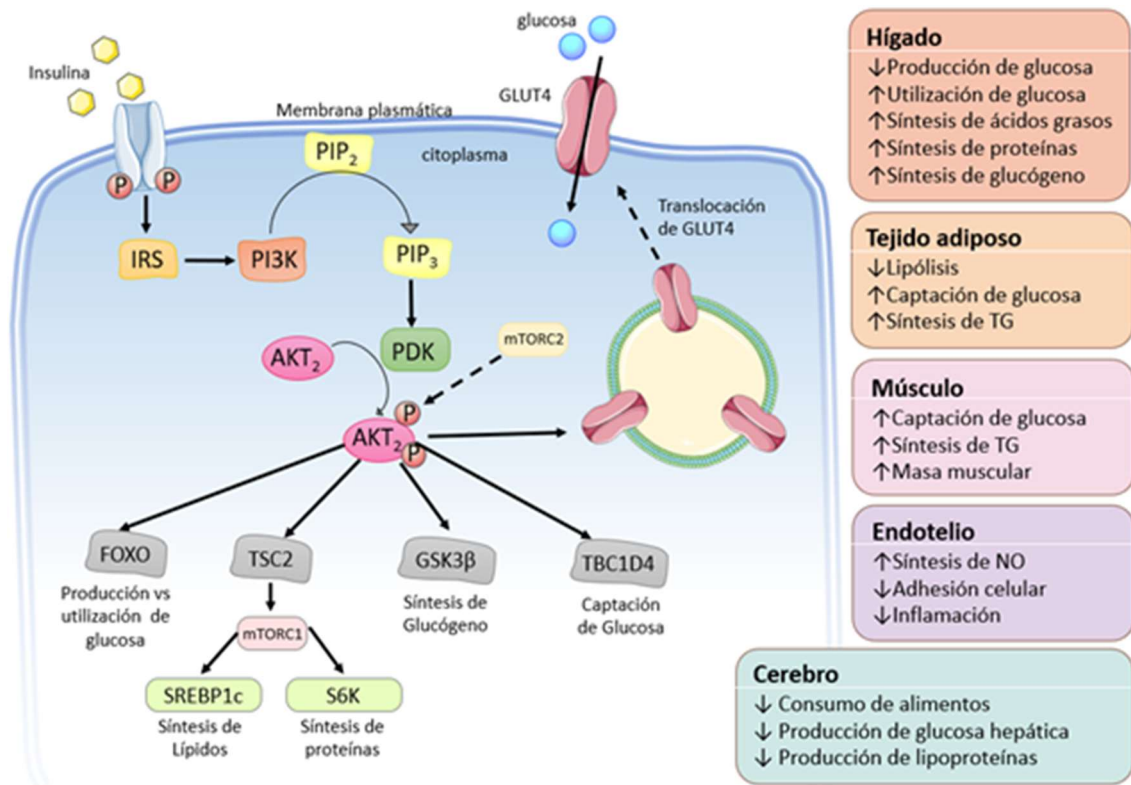


Figura I-4. Vía de señalización de la insulina y sus efectos en diferentes tejidos. La insulina se une a su receptor tirosina quinasa, lo que activa una cascada de señalización que produce diferentes efectos dependiendo de los factores que active. IRS: *Insulin receptor substrate 1*; PIP₂: fosfatidilinositol bisfosfato; PI3K: *fosfatidilinositol-3 cinasa*; AKT: proteína quinasa B. mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*. Imagen adaptada de Haeusler *et al.*, 2018.

3. NAFLD y la resistencia a la insulina

Una de las primeras manifestaciones entre las enfermedades metabólicas en el ser humano es la resistencia a la insulina. Está definida como un déficit en el control del metabolismo de la glucosa mediado por la insulina en el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado (James *et al.*, 2021). Una gran pregunta sin resolver es si la NAFLD es una causa o una consecuencia de la resistencia a la insulina en el hígado. A pesar de que muchos autores manifiesten que la resistencia a la insulina en el hígado no necesariamente está ligada a la génesis de la esteatosis, algunos estudios demuestran una fuerte correlación entre la resistencia a la insulina y la esteatosis, más aún, se ha evidenciado que las intervenciones clínicas que mejoran la resistencia a la insulina, reducen el contenido de grasa en el hígado (Semple *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido claramente el papel de la resistencia a la insulina en la génesis de la NAFLD.

Diversos estudios sugieren que el mecanismo de la resistencia a la insulina se encuentra asociado con la obesidad y que, por lo tanto, es una consecuencia directa de la exposición de los tejidos a una gran cantidad de nutrientes dietéticos y de la acumulación de subproductos metabólicos tóxicos. Sin embargo, otros factores también pueden ser importantes, incluidas las redes de comunicación entre órganos que están mediadas por hormonas peptídicas y moléculas inflamatorias (citocinas), y la activación de las vías de respuesta al estrés intracelular (Muoio & Newgard, 2008).

La secreción y funcionamiento defectuosos de la insulina conducen a múltiples anomalías metabólicas, incluida la hiperglucemia, debido a la captación deficiente de glucosa estimulada por la insulina y la producción de glucosa hepática descontrolada, y la dislipidemia, que incluye la homeostasis alterada de ácidos grasos, triglicéridos y lipoproteínas. Además, en la obesidad, los metabolitos derivados de lípidos comienzan a acumularse fuera de los depósitos adiposos (incluidos el músculo esquelético, el corazón y el hígado). Los aumentos crónicos en los niveles circulantes de glucosa y lípidos pueden afectar aún más la secreción y la acción de la insulina y causar otras formas de daño tisular (Muoio & Newgard, 2008).

Se han sugerido varios mecanismos por los cuales la resistencia a la insulina podría estar implicada en la patogénesis de la esteatosis hepática, incluida la resistencia a la insulina periférica que conduce a la lipólisis del tejido adiposo y el consiguiente aumento del flujo circulante de ácidos grasos, así como la resistencia a la insulina hepática que favorece la esteatosis y su progresión. El principal determinante de esta estrecha conexión entre la resistencia a la insulina y la esteatosis podría ser la presencia irregular de lípidos circulantes e intracelulares (Nagle *et al.*, 2009; Baiceanu *et al.*, 2016).

Se han propuesto tres mecanismos que podrían explicar cómo la resistencia a la insulina conduce a la acumulación de triglicéridos hepáticos. Con el desarrollo de la resistencia a la insulina hepática, el efecto inhibitorio de la insulina sobre la producción de glucosa disminuye, mientras que el efecto estimulante de la insulina sobre la lipogénesis se mantiene. Primero, la insulina no puede suprimir la lipólisis del tejido adiposo a través de la lipasa sensible a hormonas, lo que resulta en un aumento del flujo de salida de FFA a la circulación y, por consiguiente, la absorción por el hígado (Czech *et al.*, 2013). En segundo lugar, la hiperinsulinemia y la hiperglucemia asociadas a resistencia a la insulina promueven la DNL a través de los factores de transcripción SREBP1c y de ChREBP (*carbohydrate responsive element-binding protein*) (Dentin *et al.*, 2005). En tercer lugar, la hiperinsulinemia inhibe directamente la β -oxidación de los FFA (Hamel *et al.*, 2001). De esta manera, el efecto en conjunto de estos tres mecanismos podría promover la acumulación hepática de FFA y, a través de la esterificación, la acumulación de triglicéridos hepáticos y la esteatosis.

Se ha sugerido también que la acumulación de los triglicéridos almacenados en el hígado no está directamente afectada por la acción de la insulina. Se han propuestos dos tipos de lípidos que podrían mediar la resistencia a la insulina hepática inducida por lípidos, estas son las ceramidas y los diacilgliceroles (DAG). Las ceramidas y diacilgliceroles actúan sobre la familia de proteína cinasas C (PKC), la PKC ζ en el caso de las ceramidas y la PKC ϵ en el caso de los diacilgliceroles, que fosforilan e inhiben las proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina (Turban, 2011; Reali *et al.*, 2017). PKC ϵ fosforila el IR en la posición Thr¹¹⁶⁰, lo que da como resultado la inhibición de la actividad tirosina quinasa del IR. Así, toda la cascada de la señalización de insulina hepatocelular, incluida la estimulación de la síntesis de glucógeno, la regulación positiva transcripcional de genes lipogénicos y la regulación negativa transcripcional de genes gluconeogénicos, estarán suprimidos (Petersen *et al.*, 2013; Petersen *et al.*, 2017).

Los estudios de cultivo celular han identificado dos mecanismos probables por los cuales la resistencia a la insulina podría ser directamente inducida por las ceramidas. El primero, la activación de la PKC ζ por la ceramida altera la translocación de AKT a la membrana plasmática, lo que impide que AKT participe en la cascada de señalización de la insulina. El segundo mecanismo implica la activación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que conduce a la desfosforilación e inactivación de AKT (Stratford *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2017).

4. Factores que alteran la lipogénesis hepática

El desequilibrio energético en la dieta es un contribuyente importante en la patogénesis del hígado graso tanto en humanos como en animales. En humanos, el consumo de dietas con alto contenido en colesterol, grasas saturadas y carbohidratos, así como el consumo de bebidas con alto contenido en fructosa, han sido asociados con una mayor prevalencia del hígado graso. Los pacientes que desarrollan NAFLD tienden a tener un patrón dietético caracterizado por un mayor consumo de ácidos grasos saturados (SFA, *saturated fatty acid*), colesterol y fructosa, y una menor ingesta de ácidos grasos polinsaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acid*) y antioxidantes (vitamina C y E). Así mismo, estudios en animales han revelado que la suplementación con fructosa líquida en ratones que consumen una dieta occidental potencia la deposición de colesterol y triglicéridos en el hígado (Musso *et al.*, 2003; Vartanian *et al.*, 2007; Baena *et al.*, 2016).

La alteración en la composición de macronutrientes de la dieta desencadena cambios en vías moleculares específicas en el hígado que modifican la expresión de genes y proteínas. La composición de la dieta y la naturaleza de los ácidos grasos, específicamente los SFA y carbohidratos, pueden inducir DNL hepática al estimular la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos. La DNL está estrechamente controlada por varios factores, tanto nutricionales como hormonales que regulan enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Wong & Sook, 2010). Estos factores modulan la actividad de los factores de transcripción SREBP y ChREBP.

SREBP-1 y, concretamente la isoforma SREBP-1c, es un factor de transcripción que ejerce un importante control sobre la lipogénesis. En condiciones de ayuno, este factor de transcripción se expresa a bajas concentraciones, pero aumenta exponencialmente tras la ingesta debido a su estimulación mediada por la insulina. Así mismo, la insulina activa la función de SREBP1c a nivel postraducciona. El precursor de SREBP-1c se encuentra en la membrana del retículo endoplasmático (ER, *endoplasmic reticulum*). La acción de la insulina promueve la realización de un corte proteolítico que permite a la forma madura de SREBP-1c entrar en el núcleo, donde reconoce las secuencias SRE (*SREBP response element*) de los genes diana y promueve su transcripción (Wong & Sook, 2010) (**Figura I-5**).

SREBP1c es capaz de inducir la expresión de enzimas involucradas tanto en la glucólisis, como la glucocinasa (GcK), como enzimas que catalizan varios pasos en la vía de síntesis de ácidos grasos y TG, tales como ATP-citrato liasa (ACLY), acetil-CoA sintetasa (ACS), la ácido graso sintasa (FAS), la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1), y en la de triglicéridos como la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) (Xu *et al.*, 2013; Abdul-Wahed *et al.*, 2017).

Por otra parte, ChREBP es un factor de transcripción independiente de insulina que se activa en respuesta a los carbohidratos y sus metabolitos, y juega un papel importante en la glicólisis y la lipogénesis. Así, los carbohidratos facilitan la unión de ChREBP a la región ChoRE (*carbohydrate response element*) de los promotores de diversos genes, lo que induce la expresión de enzimas glucolíticas como LPK (*liver-pyruvate kinase*) y lipogénicas como ACC, FAS, SCD1 y GPAT (Xu *et al.*, 2013).

Existen dos isoformas de la proteína ChREBP: la ChREBP β que presenta una longitud de 687 aa y la ChREBP α con 864 aa. *Chrebp β* presenta una expresión más baja que *Chrebp α* en el hígado, tejido adiposo blanco y células β del páncreas (Zhang *et al.*, 2015). Los metabolitos de la glucosa activan primeramente a ChREBP α que, una vez activado, se transloca al núcleo y se une a la región ChoRE presente en el promotor de sus genes diana. Además, ChREBP α estimula la expresión del gen *Chrebp β* , amplificando la respuesta de la glucosa (Abdul-Wahed *et al.*, 2017). Se ha demostrado que ChREBP β regula negativamente la expresión de *Chrebp α* en células β del páncreas, lo que revela la existencia de un bucle de retroalimentación negativa entre estas dos isoformas (Jing *et al.*, 2016).

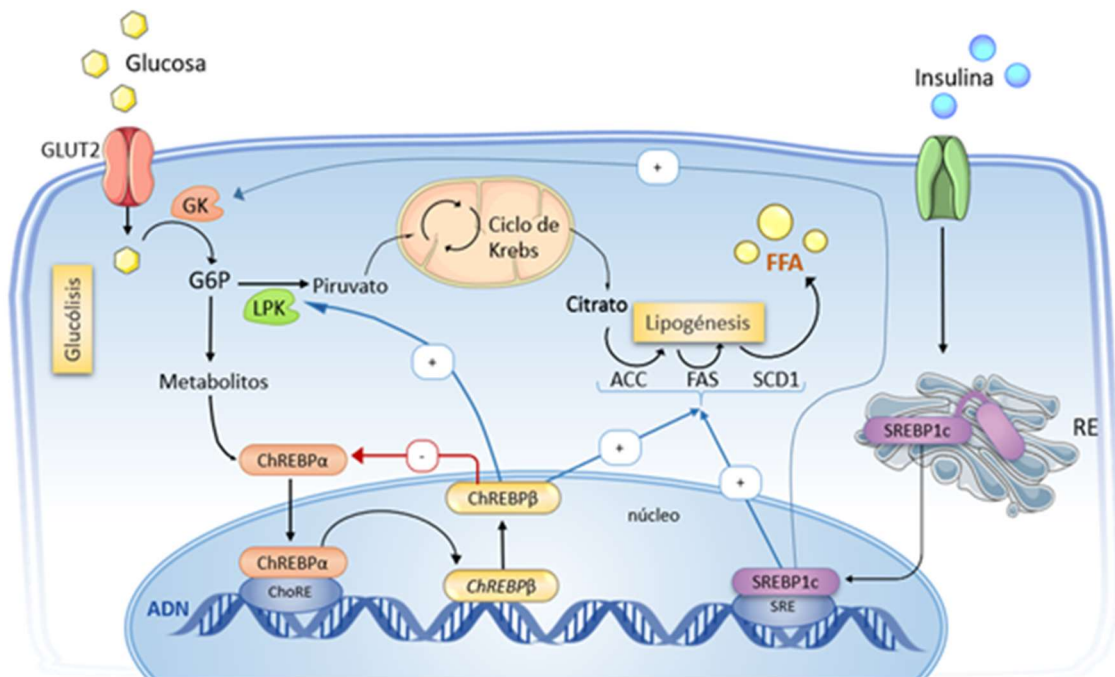


Figura I-5. Activación de la DNL en el hígado en respuesta al consumo de carbohidratos. La insulina induce la expresión de genes lipogénicos vía SREBP1c, mientras que LPK es exclusivamente inducida por ChREBPβ. Adaptado de Abdul-Wahed *et al.*, 2017.

4.1 Polimorfismos y predisposición genética

En el ser humano ocurren mutaciones naturales que se encuentran altamente correlacionadas con procesos metabólicos y nos proporcionan una poderosa herramienta para revelar los posibles mecanismos que los desencadenan. Recientemente se han identificado secuencias variantes en el genoma asociadas con la NAFLD que podrían contribuir en la identificación de nuevas moléculas claves involucradas en la patogénesis.

La heredabilidad de NAFLD ha sido estimada en aproximadamente un 39% (Schwimmer *et al.*, 2009), y junto a ella, existe un número creciente de defectos genéticos Mendelianos que han sido asociados con esteatosis hepática y resistencia a la insulina. Una variante genética que está consistentemente asociada con NAFLD es la mutación sin sentido [Ile148 → Met148 (I148M)] en el gen *PNPLA3* que contiene el dominio de fosfolipasa tipo patatina (PNPLA) 3, también llamado adiponutrina, que está implicada en la hidrólisis de triglicéridos (Romeo *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2011).

Pacientes con este polimorfismo exhiben un alto grado de esteatosis hepática sin resistencia a la insulina. Este hallazgo enfatiza que la naturaleza de las especies lipídicas acumuladas es más importante que la acumulación de lípidos *per se* en la alteración de la señalización de la insulina. La frecuencia de la variante de susceptibilidad (PNPLA3-148M) en grupos étnicos refleja la prevalencia de NAFLD y representa aproximadamente 70% de las diferencias en la frecuencia de esteatosis hepática entre hispanos, afroamericanos e individuos de ascendencia europea (Romeo *et al.*, 2008; Hooper *et al.*, 2011). Los homocigotos para el alelo de riesgo en PNPLA3 tienen un contenido de TG hepáticos dos veces mayor, aunque la magnitud del efecto está fuertemente influenciada por la adiposidad y la sensibilidad a la insulina (Cohen *et al.*, 2011)

5. Transporte y metabolismo de lípidos en la NAFLD

El transporte y metabolismo de lípidos en la sangre es producto del equilibrio dinámico de macromoléculas transportadoras llamadas lipoproteínas, que están formadas por un núcleo apolar, donde se ubican los lípidos transportados, básicamente triglicéridos y ésteres de colesterol, rodeado por una capa de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas. La alteración en la producción de estas lipoproteínas puede producirse como consecuencia del desequilibrio del metabolismo lipídico que lleva al desarrollo del hígado graso y otras patologías asociadas al síndrome metabólico (Fon Tacer & Rozman, 2011).

En personas sanas, el transporte de lípidos en la sangre se realiza a través de cuatro tipos de lipoproteínas plasmáticas: **(1)** los quilomicrones (QM), provenientes de la absorción intestinal de TG y otros lípidos; **(2)** las VLDL que derivan del hígado para la exportación de TG; **(3)** las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que representan la última etapa del catabolismo de las VLDL; y **(4)** lipoproteínas de alta densidad (HDL), involucradas en el transporte de colesterol, así como en el metabolismo de las VLDL y de los QM (Eisenberg, 1983; Ramasamy, 2014). Las lipoproteínas ricas en TG y sus remanentes son aterogénicas y están asociadas con otros factores de riesgo lipídicos, al contrario de la HDL que es una lipoproteína anti-aterogénica.

Las grasas provenientes de la dieta se absorben desde el intestino hacia la linfa, donde son empaquetadas en QM y transportadas en la sangre hasta los tejidos vitales como el corazón, musculo esquelético y tejido adiposo. Estas lipoproteínas poseen un gran tamaño y están formados principalmente por TG y la apolipoproteína Apo B-48. Los QM que viajan por la circulación sanguínea sufren una extensa lipólisis cuando alcanzan el endotelio de los tejidos periféricos, por acción de la lipoprotein lipasa (LPL), a fin de depositar los TG en los tejidos periféricos. De esta manera los ácidos grasos son liberados, incorporados a los tejidos, re-esterificados y almacenados como TG (Tamura & Shimomura, 2005). En ratas, el 80% de los QM son hidrolizados por la LPL y el 20% remanente, es entregado al hígado. (Cohen *et al.*, 2011).

Por otra parte, los FFA se pueden liberar en el plasma por dos mecanismos diferentes: la degradación de los TG del tejido adiposo o como resultado de la acción de la LPL sobre los TG plasmáticos. Los FFA viajan en la sangre ligados a la albúmina y pueden ser eliminados rápidamente de la circulación según las necesidades energéticas de los tejidos, es decir, son oxidados con fines energéticos o re-esterificados para almacenar energía en forma de TG en los tejidos (Van der Vusse, 2009).

Las VLDL transportan los TG endógenos del hígado junto a la Apo B100 en su superficie. Las VLDL pasan por un proceso de lipólisis para generar lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y, a partir de éstas, las LDL. Las LDL, también son ricas en ApoB100 y su principal función es transportar colesterol al resto de las células (Eisenberg, 1983). Por otra parte, las HDL son ricas en fosfolípidos y Apo A-I, y se producen en el hígado (30%) y en el intestino (70%). ApoA-I activa la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), que esterifica el colesterol libre plasmático. La función principal de la HDL es el transporte reverso de colesterol, facilitando la extracción del exceso de colesterol de las células y transportándolo al hígado, para su posterior eliminación en las heces en forma de ácidos biliares y colesterol. (Fielding *et al.*, 1972; Pownall *et al.*, 2021).

El desequilibrio del metabolismo de las grasas en el hígado graso se acompaña de una sobreproducción de VLDL muy enriquecidas en triglicéridos; éstas, a su vez, originan por metabolismo en sangre un tipo específico de LDL, de pequeño tamaño y elevada densidad, que se encuentra elevado en la NAFLD y en el síndrome metabólico. Además, la redistribución de triglicéridos y ésteres de colesterol producida por la actividad CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) en sangre, favorece la formación de partículas HDL que son eliminadas activamente en el riñón, lo que conduce a una reducción en la concentración circulante de HDL (Fon Tacer & Rozman, 2011).

6. Catabolismo de ácidos grasos: β -oxidación

En las células eucariotas, los ácidos grasos se catabolizan por β -oxidación mayoritariamente en las mitocondrias, aunque también se lleva a cabo en menor medida y de forma similar en otros compartimentos celulares como los peroxisomas (**Figura I-6**). La β -oxidación proporciona sustratos al ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarbóxico y al sistema de fosforilación oxidativa que, conjuntamente, permiten la producción de ATP.

En primer lugar, para que se lleve a cabo la β -oxidación, es necesaria la entrada de ácidos grasos del plasma en el interior de la célula. Este transporte se produce gracias a la proteína FABP (*fatty acid binding protein*) y los transportadores de ácidos grasos FAT/CD36 (*fatty acid translocase/CD36*) y FATP 1/6 (*fatty acid transport protein*) (Holloway *et al.*, 2008; Lopaschuk *et al.*, 2010). Una vez dentro de la célula, la enzima ACS añade un grupo CoA a los ácidos grasos, permitiendo su activación y obteniendo sus derivados acil-CoA. A continuación, la enzima CPT-1 (carnitina palmitoil transferasa-1) promueve la translocación de los derivados de acil-CoA en la mitocondria para que se pueda llevar a cabo la β -oxidación (Lopaschuk *et al.*, 2010).

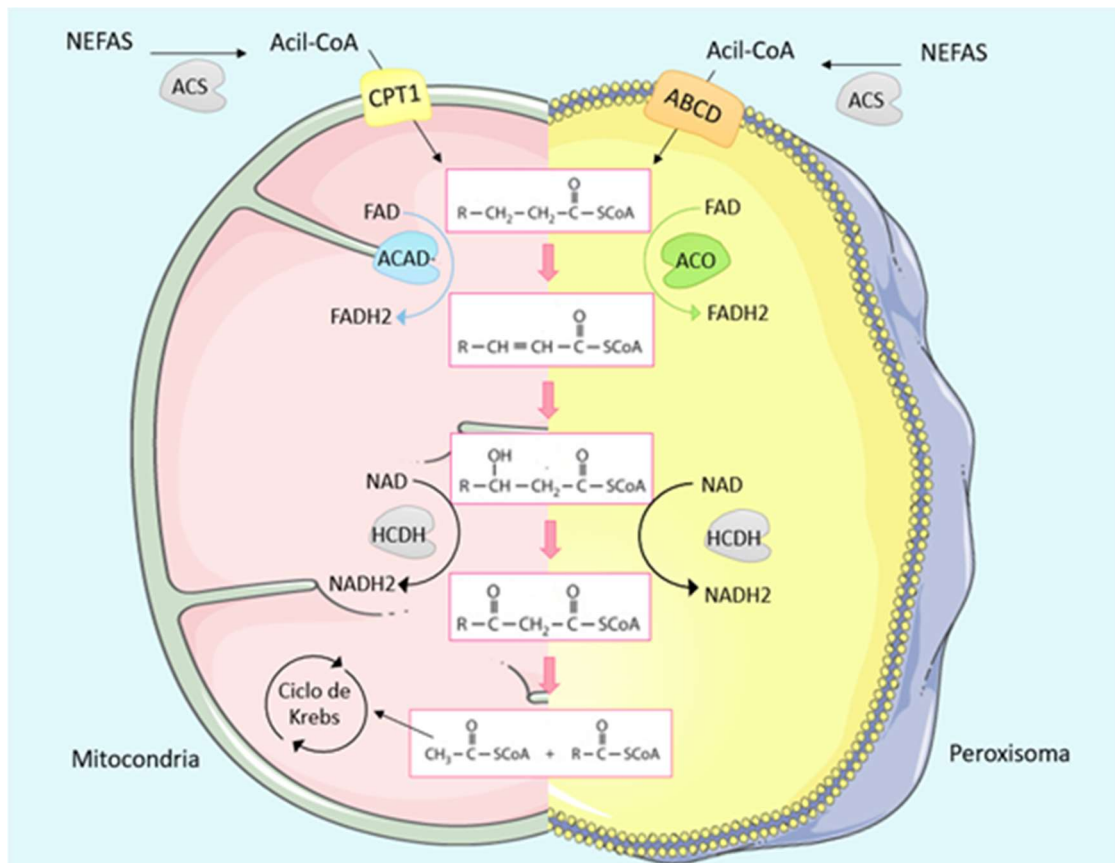


Figura I-6. Diferencia entre β -oxidación mitocondrial y peroxisómica de los ácidos grasos dentro de la célula.

En la β -oxidación mitocondrial, los ácidos grasos experimentan la eliminación oxidativa de unidades sucesivas de dos átomos de carbono, proporcionando así moléculas de acetil-CoA. Destaca el papel de las acil-CoA deshidrogenasas (ACAD), que catalizan el primer paso de este proceso, así como de la enzima HCDH (hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa) que produce moléculas de NADH (nicotamida adenina dinucleótico) (Bastin, 2014). Estos acetil-CoA pueden condensarse en cuerpos cetónicos para utilizarse como fuente de energía en tejidos extrahepáticos, o bien oxidarse a CO_2 a través del ciclo de Krebs dando lugar a los transportadores electrónicos reducidos NADH y FADH_2 , y finalmente a ATP a través de la cadena de transporte de electrones. La β -oxidación peroxisómica es importante para la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga y ramificados, que posteriormente serán oxidados completamente en la mitocondria (Nakamura *et al.*, 2014). Destaca, la enzima conocida como ACO (acil-CoA oxidasa), que cataliza la etapa limitante del proceso de β -oxidación peroxisómica. La DNL inhibe la β -oxidación de los ácidos grasos debido al efecto de modulación alostérica negativa del intermediario malonil-CoA sobre la actividad de la CPT1, reduciendo la entrada de ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias para su posterior oxidación (Morris *et al.* 2011).

Otros factores que regulan la β -oxidación de ácidos grasos son los factores de transcripción activados por ligando PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*). Específicamente PPAR α , el isotipo más abundante en el hígado, regula la expresión de enzimas necesarias para la β -oxidación de los ácidos grasos en los hepatocitos, lo que proporciona una gran flexibilidad metabólica al hígado. PPAR α es particularmente activo durante la lactancia y el ayuno, dos condiciones en la que los ácidos grasos son la principal fuente de energía del organismo (Régnier et al, 2020). Se ha descrito la delección específica de PPAR α en los hepatocitos de ratones, induce esteatosis y reduce la cetogénesis inducida por el ayuno (Montagner *et al.*, 2016).

7. Regulación de metabolismo y la autofagia

La autofagia es un proceso por el cual el material celular es degradado por lisosomas o vacuolas y posteriormente reciclado. Está inducido generalmente por la inanición, se produce con la finalidad de mantener los niveles de energía óptimos y garantizar el control de calidad de las proteínas (Senft & Ronai, 2015). En la mayoría de las células coexisten tres tipos de autofagia: la autofagia mediada por chaperonas, la macroautofagia y la microautofagia, siendo las dos primeras relevantes en los hepatocitos (Madrigal-Matute & Cuervo, 2016).

La macroautofagia se inicia por la formación de la membrana limitante del autofagosoma, que se forma por lípidos y proteínas provenientes de varios orgánulos (RE, aparato de Golgi, mitocondrias o membranas plasmáticas) y secuestra el material citosólico a ser degradado. La membrana limitante consiste en una vesícula con doble membrana que entrega el material a ser degradado a los lisosomas, a través de la participación de proteínas clave relacionadas con la autofagia (Stolz *et al.*, 2014).

La macroautofagia se puede activar en respuesta a estímulos, vía receptores autofágicos como P62/SQSTM1, que llevan a la formación de un pre-autofagosoma alrededor del material a ser degradado. La vesícula formada es transportada por los microtúbulos para fusionarse con los lisosomas, donde su contenido es hidrolizado y las moléculas resultantes (aminoácidos, lípidos y carbohidratos) pueden ser transportados al citosol para ser reciclados (Shen *et al.*, 2014).

El segundo tipo de autofagia relevante para los hepatocitos, la autofagia mediada por chaperona, degrada un subconjunto de proteínas que contienen un motivo específico de pentapéptido (KFERQ) en su secuencia. Estas proteínas son reconocidas por la proteína citosólica HSC70 (*heat shock cognate protein* de 70 kDa) y forman un complejo que se asocia con el receptor del lisosoma LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein type 2A) y les permite fusionarse con la membrana lisosómica para su posterior degradación (Madrigal-Matute & Cuervo, 2016).

Se ha descrito una vía alternativa de metabolismo lipídico a través de la degradación autofágica de lípidos mediante la participación de lisosomas (Liu & Czaja, 2013). En esta vía, conocida como lipofagia, los triglicéridos y el colesterol presentes en los *lipid droplets* son captados por autofagosomas y liberados al interior de los lisosomas, donde serán degradados mediante la acción de las hidrolasas. Los ácidos grasos generados por la lipofagia a partir de estos triglicéridos almacenados, estimulan la β -oxidación mitocondrial (Singh *et al.*, 2009). De esta manera, la lipofagia regula los niveles de lípidos intracelulares y se activa en función de estímulos extracelulares, como el aporte energético que le llega a la célula.

La inanición es uno de los principales desencadenantes de la macroautofagia y la autofagia moderada por chaperonas. Después de 4-6 horas de escases de nutrientes se produce la inactivación de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), un inhibidor endógeno de la autofagia, que conduce a la activación de la macroautofagia (Kanazawa *et al.*, 2004). Los aminoácidos resultantes de la degradación lisosomal son utilizados en la síntesis proteica o redirigidos al ciclo de Krebs, algunos de ellos pueden inhibir la autofagia, creando una retroalimentación autoinhibidora. Si la escasez de nutrientes persiste, el glicógeno y los *lipids droplets* pasan a ser degradados por el mismo mecanismo (Madrigal-Matute & Cuervo, 2016).

Por otra parte, la autofagia es promovida por la proteína AMPK (*AMP activated protein kinase*), un sensor de energía clave que regula el metabolismo celular para mantener la homeostasis energética y además inhibe vías de señalización pro-inflamatorias (Salminen *et al.*, 2011). En situaciones de privación de glucosa, AMPK promueve la autofagia activando directamente ULK1 (*Unc-51 like autophagy activating kinase 1*), una cinasa esencial para la formación del autofagosoma, a través de la fosforilación en la posición Ser³¹⁷ y Ser⁷⁷⁷ de ULK1 (Egan *et al.*, 2011).

Bajo condiciones suficientes de nutrientes, la alta actividad de mTOR reprime la autofagia al fosforilar directamente ULK1 en la posición de la Ser⁷⁵⁷ e interrumpir la interacción entre Ulk1 y AMPK. Esta fosforilación coordinada es importante para Ulk1 en la inducción de autofagia (Kim *et al.*, 2011).

8. La dieta como factor de riesgo de NAFLD

Estudios de perfiles genéticos sugieren que los seres humanos hemos evolucionado durante miles de años con un patrón nutricional muy diferente al actual. Nuestros antepasados consumían una dieta mucho más rica en fibra, azúcares complejos y cuya relación de PUFA ω -6/ ω -3 era aproximadamente 1. En las últimas décadas, la dieta del tipo occidental, rica en grasas saturadas, azúcares simples y pobre en fibras, ha sido adoptada por una gran parte de la población, produciendo un cambio drástico a nivel nutricional. Entre ellos, la composición de esta dieta posee una relación de ω -6/ ω -3 de aproximadamente 15/1. El incremento de ω -6 en la alimentación ha promovido muchas enfermedades crónicas, incluidas las enfermedades metabólicas, mientras que los niveles elevados ω -3 en las dietas ejercen efectos supresores (Simopoulos, 2002).

Se ha observado que los PUFA de cadena larga del tipo ω -3, reducen la acumulación de TG y mejoran la esteatosis hepática a través de la activación de los PPAR. Estos PUFA actúan como ligandos de PPAR α , activando dicho receptor que regula transcripcionalmente una amplia gama de genes que codifican proteínas asociadas con la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de las lipoproteínas (Masterton *et al.*, 2010). Adicionalmente, los PUFA ω -3 de cadena larga regulan negativamente la expresión de SREBP-1c (Tamura & Shimomura, 2005).

Por otra parte, los SFA pueden estimular la expresión de SREBP-1c (Jump, 2002). Se cree que la acción de los SFA sobre el metabolismo de los lípidos hepáticos está influenciada por la isoforma 1 β del coactivador de PPAR- γ (PGC-1 β). Cuando los SFA estimulan la expresión hepática de PGC-1 β , éste coactiva SREBP-1c y aumenta su actividad transcripcional sobre los genes lipogénicos descritos anteriormente en la **Figura I-5** (Lottenberg *et al.*, 2012). Por otra parte, la ingestión de MUFA reduce el riesgo cardiovascular y mejora el perfil lipídico.

La sustitución de SFA por MUFA mejora los niveles de glucosa en suero y la presión arterial, inhiben la oxidación del colesterol LDL y disminuye los niveles séricos de TG mediante la activación del receptor PPAR α . (Zivkovic *et al.*, 2007).

8.1 El consumo de fructosa predispone al desarrollo de NAFLD

La fructosa es un azúcar simple que está presente de forma natural en la fruta y la miel, así como en grandes cantidades en bebidas azucaradas y alimentos procesados de la industria alimentaria. Se presenta como un componente importante de los dos edulcorantes más utilizados, la sacarosa (azúcar de mesa, un disacárido de fructosa y glucosa) y el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (HFCS, *high-fructose corn syrup*), que contiene una mezcla de fructosa y glucosa monosacáridos (Jensen *et al.*, 2018).

En la década de los 70, el HFCS se introdujo en la industria alimentaria de los EE.UU. convirtiéndose en uno de los edulcorantes más utilizados en la actualidad. El HFCS presenta un alto poder edulcorante con buenas propiedades organolépticas, gran estabilidad y bajo coste, características que contribuyeron a un rápido incremento de su uso en los EE.UU., desplazando a otros edulcorantes como la sacarosa (Bantle, 2009).

El HFCS se elabora hidrolizando el almidón de maíz en glucosa y, posteriormente, una porción de la glucosa es convertida en fructosa mediante una reacción de isomerización enzimática. El HFCS puede producirse en diversas proporciones de fructosa y glucosa, siendo las más comunes el HFCS-55 y el HFCS-42 que contienen 55% y 42% de fructosa respectivamente (White *et al.*, 2015).

El consumo de fructosa en su forma líquida podría ser más perjudicial que la sólida, debido a que el exceso de energía no se compensa por una disminución de la ingesta calórica de sólidos, y este excesivo consumo de fructosa líquida contribuye a un importante aporte calórico a la dieta (Vartanian *et al.*, 2007). Los refrescos y las bebidas de frutas industrializadas han aumentado del 3,9% de la ingesta total de energía en 1977 al 9,2% de la ingesta total de energía en 2001 (Nielsen & Popkin 2004). Actualmente, la ingesta de azúcares agregados se acerca al 15% de la ingesta energética total en la dieta occidental promedio, con una mayor ingesta entre los individuos más jóvenes (Jensen *et al.*, 2018).

Evidencias clínicas y experimentales sugieren que el mecanismo por el que el HFCS induce acumulación de lípidos en el hígado se debe principalmente a su contenido en fructosa (Ouyang *et al.*, 2008). En la década de 1960, numerosos trabajos científicos informaron que la fructosa era distinta de la glucosa en su capacidad única de aumentar tanto los triglicéridos plasmáticos como la grasa hepática (Macdonald, 1966; Laube *et al.*, 1973). Además, estudios de perfusión esplácnica demuestran que la fructosa produce mayores tasas de secreción de triglicéridos del hígado que cantidades equimolares de glucosa (Wolfe *et al.*, 1975). La administración a largo plazo de fructosa en ratas produce esteatosis hepática macro y microvesicular con aumento de los triglicéridos y colesterol hepático (Ackerman *et al.*, 2005).

En nuestro grupo se ha demostrado previamente que la suplementación con fructosa líquida al 10% a ratas hembras durante 2 semanas produce esteatosis hepática a través del aumento de la lipogénesis, la reducción de la actividad PPAR α y del catabolismo de ácidos grasos, junto con un aumento de la expresión de la forma *spliced* de la proteína XBP1 (*X-box-binding protein 1*) (Rebollo *et al.*, 2014). Al comparar la glucosa y la fructosa en condiciones de ingesta calórica equivalentes, a diferencia de la glucosa, la suplementación de fructosa induce esteatosis hepática y alteraciones en la vía de señalización de la insulina (Baena *et al.*, 2016). Además, en comparación con glucosa, las ratas suplementadas con fructosa desarrollan hiperleptinemia y aumento de peso corporal debido a una hipertrofia del tejido adiposo visceral blanco, sin signos de lipólisis mediada por leptina (Sangüesa *et al.*, 2018).

El hecho de que la fructosa sea mucho más lipogénica que la glucosa, se debe a que, una vez ingerida, es casi completamente absorbida y metabolizada por el hígado, activando vías lipogénicas que exacerban aún más la NAFLD (Mayes, 1993; Tappy & Lê, 2010; Samuel *et al.*, 2018). Antes de que la glucosa y la fructosa converjan con la vía glucolítica, el metabolismo inicial de la fructosa implica la fosforilación de fructosa a fructosa-1-fosfato por la fructocinasa (KHK, cetohecoxinasa) usando el sustrato ATP. La alta actividad de la fructocinasa en la fosforilación de fructosa a fructosa-1-fosfato en el hígado, podría provocar este agotamiento del ATP hepático (Ouyang *et al.*, 2008). En humanos, diversos estudios revelan que la recuperación del agotamiento de ATP inducido por fructosa se encuentra disminuida en la NAFLD (Oberhaensli *et al.*, 1986).

A diferencia del metabolismo de la glucosa dietética, que se metaboliza prácticamente en todo el cuerpo, la fructosa de la dieta es casi exclusivamente metabolizada en el hígado. El metabolismo de la glucosa en el hígado se inicia por fosforilación catalizada por la glucocinasa que es regulada alostéricamente por sus metabolitos, así como el balance entre varias hormonas, entre ellas la insulina (Petersen *et al.*, 2017). Sin embargo, el metabolismo hepático de la fructosa no está limitado, cuando la fructosa entra al hepatocito se fosforila por acción de la fructocinasa, una enzima específica de la fructosa y que no está sometida a regulación alostérica. Además, la fructosa se fosforila en el carbono 1 en lugar del carbono 6, por lo que no se puede ser utilizada para sintetizar glucógeno, sino que se convierte en gliceraldehído-3-fosfato, proporcionando sustrato ilimitado para la DNL (Havel, 2005).

9. Estrés de retículo endoplasmático

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo membranoso de las células eucariotas, que presenta una envoltura nuclear plana de apariencia rugosa (RE rugoso) y una red tubular periférica lisa (RE liso) (Shibata *et al.*, 2006). El RE rugoso, caracterizado por la presencia de ribosomas unidos a la membrana, está implicado principalmente en la síntesis de proteínas secretoras y, por lo tanto, es muy importante en células con una alta capacidad secretora. El RE liso no posee ribosomas y está involucrado principalmente en la síntesis de lípidos (Baiceanu *et al.*, 2016).

En los hepatocitos, tanto el RE rugoso como el liso, cumplen funciones importantes como la maduración de proteínas, síntesis de lípidos y formación de VLDL, detoxificación xenobiótica (incluyendo enzimas del Citocromo P450) y almacenaje de Ca^{+2} . Las enzimas claves que catalizan la síntesis de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos se encuentran en la membrana del RE liso. El RE proporciona un entorno hidrofóbico para los lípidos sintetizados, que se entregan a las membranas celulares u orgánulos, ya sea por transporte no vesicular en los sitios de contacto con la membrana del RE o por transporte vesicular a través del aparato de Golgi (Gorelick *et al.*, 2001; Lev, 2012).

En ciertas condiciones fisiológicas, las proteínas sintetizadas que fueron plegadas incorrectamente pueden acumularse en la luz del RE, una condición conocida como estrés de RE (Senft & Ronai, 2015). El estrés de RE puede surgir como resultado de un rápido aumento en la demanda de proteínas, así como a una variedad de perturbaciones en la homeostasis celular, como el desequilibrio redox y la alteración de la glucosilación de proteínas, entre otros (Baiceanu *et al.*, 2016).

El RE tiene mecanismos de control de calidad que tienen como objetivo evitar que las proteínas dañadas, mal ensambladas o sin ensamblar, ejerzan efectos dañinos fuera del RE (Christianson *et al.*, 2012). El estrés de RE activa varios procesos celulares bien orquestados (**Figura I-7**), cuyo objetivo es restaurar la homeostasis celular o iniciar la muerte celular. La primera línea de defensa contra la acumulación de proteínas mal plegadas es la degradación asociada al RE (ERAD, *endoplasmic reticulum-associated degradation*), caracterizada por una secuencia definida de eventos. La maquinaria ERAD es un sistema organizado alrededor de un complejo central de ligasa E3 que facilita el reconocimiento de sustratos dañados (**Figura I-7**), su extracción a través de la bicapa lipídica del RE (también conocida como retrotranslocación), posterior ubiquitilación en el lado citosólico de la membrana del RE y finalmente su degradación por el proteosoma (Christianson *et al.*, 2012; Baiceanu *et al.*, 2016).

El RE, como orgánulo especializado en el metabolismo de los lípidos, representa en una pieza clave en el desarrollo de la esteatosis. El ERAD no solo está involucrado en la degradación de proteínas mal plegadas, sino que también regula la estabilidad de las proteínas claves del hígado, independientemente de cualquier deterioro del plegamiento. Esta característica de ERAD podría tener consecuencias importantes para el desarrollo de esteatosis (Baiceanu *et al.*, 2016).

Cuando ERAD no es suficiente para eliminar las proteínas mal plegadas que se han acumulado, el RE inicia la siguiente línea de defensa, denominada “respuesta de proteína mal plegada” (UPR, *unfolded protein response*). Las funciones principales de la UPR son disminuir la carga de proteínas mal plegadas mediante la inhibición de la traducción e inducción de la expresión de enzimas involucradas en ERAD, así como aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas, principalmente mediante la inducción de la expresión de chaperonas.

La UPR se lleva a cabo principalmente por tres proteínas transmembrana del RE (**Figura I-7**): PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum (ER) kinase*); IRE1 α (*inositol-requiring enzyme 1 α*); y ATF6 (*activating transcription factor 6*). En condiciones basales, estos transductores están unidos a la chaperona BiP (*immunoglobulin heavy chain-binding protein*), y por lo tanto se mantienen en un estado inactivo. Cuando se produce estrés del RE, BiP es secuestrada por proteínas luminales mal plegadas y desplazada de su unión con PERK, IRE1 y ATF6, lo que conduce a la activación de estos transductores (Bertolotti *et al.*, 2000; Malhi *et al.*, 2011).

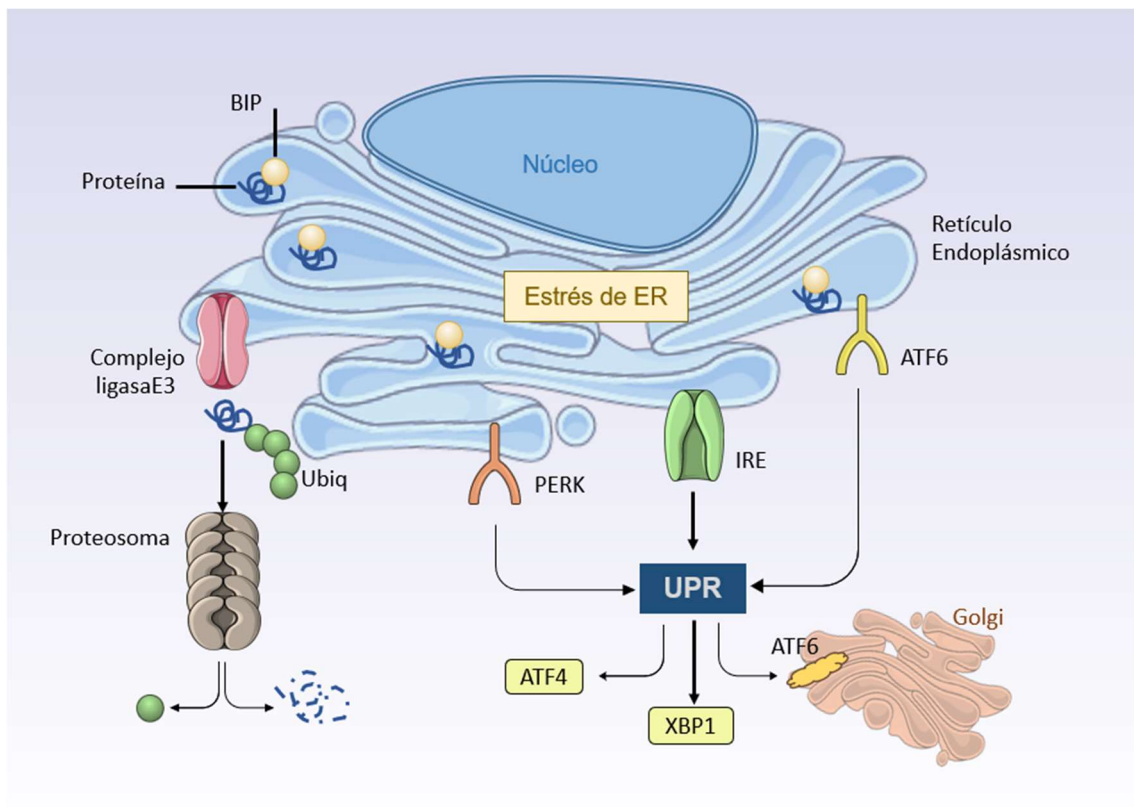


Figura I-7. Estrés de RE y activación de la UPR. Bajo condiciones de estrés de RE se activan el mecanismo ERAD contra las proteínas mal plegadas a fin de reestablecer la homeostasis celular. Las proteínas mal plegadas son translocadas al citosol, ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma. Cuando la carga de proteínas mal plegadas sobrepasa la capacidad de ERAD, se desencadena la UPR, iniciado cuando la chaperona BIP anclada a proteínas efectoras de la UPR, se disocia de la membrana de RE y se dirige a lumen del RE para unirse a las proteínas defectuosas. Así, se activan las proteínas efectoras de la UPR (PERK, IRE1 y ATEF6) que activan mecanismos para reestablecer el equilibrio en el RE. Adaptado de Baiceanu *et al.*, 2016.

Después de la liberación de BiP, PERK forma homodímeros y experimenta una reacción de autofosforilación que activa su dominio de cinasa y conduce a la fosforilación del factor eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2a*). La fosforilación de eIF2 α previene el ensamblaje del ribosoma 80S y, por lo tanto, la traducción, lo que conduce a una caída en la afluencia de nuevas proteínas al ER (Harding *et al.*, 1999; Donnelly *et al.*, 2013).

A pesar de su efecto general sobre el ensamblaje del ribosoma 80S, la fosforilación de eIF2 α mediada por PERK paradójicamente permite la traducción del gen *Atf4*, que codifica el factor de transcripción ATF4 (*activating transcription factor 4*). El incremento de actividad ATF4 en condiciones de estrés de RE conduce a la expresión de genes implicados en el metabolismo, transporte de aminoácidos o apoptosis, como CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Harding *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2002).

Otra diana controlada por ATF4 es GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*). La inducción de la expresión de GADD34 permite un mecanismo de retroalimentación que conduce a la desfosforilación de eIF2 α y la reiniciación de la traducción, que es esencial para la supervivencia celular (Harding *et al.*, 2009). Además de eIF2 α , PERK también puede fosforilar NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), que promueve la transcripción de genes antioxidantes (Cullinan *et al.*, 2004). PERK, por lo tanto, coordina la convergencia del estrés RE con la señalización del estrés oxidativo mediante la activación de factores de transcripción NRF2 y ATF4.

La segunda rama de la UPR involucra IRE1, una proteína con actividades de cinasa y endoribonucleasa. En respuesta al estrés de RE, se induce la actividad endoribonucleasa de IRE1, lo que conduce a un *splicing* alternativo del ARNm de *XBP1* (*X-box binding protein 1*). La traducción del ARNm *XBP1s* genera una forma muy potente del factor de transcripción XBP1, que a su vez regula la expresión de componentes ERAD, chaperonas del RE y enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos (Tirasophon *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2001). Adicionalmente, la actividad proteína cinasa y endoribonucleasa de IRE1 α son necesarios para mantener la homeostasis de los lípidos hepáticos en condiciones de estrés del RE, mediante la represión de la acumulación de lípidos hepáticos y el mantenimiento de la secreción de lipoproteínas (Zhang *et al.*, 2011).

Independientemente de su efecto sobre XBP1, IRE1 puede promover la degradación del ARNm localizado en las proximidades del RE, por un mecanismo llamado RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*). La inducción de XBP1 y el proceso RIDD por IRE1, por lo tanto, contribuye a la reducción del estrés RE. Sin embargo, si la actividad de RIDD aumenta progresivamente con el estrés de RE, puede conducir a la apoptosis (Maurel *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2015), mientras que XBP1 induce señales de supervivencia (Lin *et al.*, 2007). De

hecho, cuando IRE1 está hiperactivada, su actividad endoribonucleasa puede reducir los niveles intracelulares de microARN específicos que normalmente reprimen señales proapoptóticas, como la proteína caspasa-2 o la TXNIP (*thioredoxin-interacting protein*), llevando a la apoptosis (Lerner *et al.*, 2012; Upton *et al.*, 2012).

Los niveles aumentados de TXNIP activa el inflammasoma NLRP3 y la producción de citosinas proinflamatorias dependiente de caspasa-1, como IL-1 β e IL-18 (Schroder *et al.*, 2010). La parte citoplásmica de IRE1 activado se une a TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), una proteína adaptadora que acopla los receptores de la membrana plasmática a la activación de JNK (*c-Jun amino-terminal kinases*), que finalmente conduce a la muerte celular (Urano *et al.*, 2000).

El tercer transductor del UPR, ATF6, se sintetiza como un precursor inactivo en el RE y posee dos señales de localización del aparato de Golgi que están enmascaradas por la unión de BiP (Shen *et al.*, 2002). Tras la disociación de BiP, ATF6 se transloca al aparato de Golgi y se activa mediante el mecanismo regulado de proteólisis intramembrana que involucra las proteasas unidas a la membrana. Una vez que ATF6 es cortado, el dominio activo se transloca al núcleo, donde induce la expresión de genes que codifican chaperonas del RE y componentes del UPR como BiP, endoplasmína, CHOP y XBP1. La activación coordinada de estas tres ramas de la UPR tiene como objetivo aliviar el estrés de RE (Baiceanu *et al.*, 2016).

10. Modelos animales para el estudio de NAFLD

Existen factores que limitan el estudio de la NAFLD, como la evolución de la patología, que puede llevar décadas en desarrollarse, y las limitaciones éticas para obtener tejido hepático humano para su estudio. Por lo tanto, los investigadores han centrado su atención en el desarrollo de modelos animales adecuados para evaluar el papel de las moléculas y las vías moleculares en la formación de hígado graso. Estos modelos ofrecen la posibilidad de adoptar un enfoque que permita evaluar el papel de un gen o un factor dietético, o una combinación de ambos, en el proceso de la enfermedad (Hebbard & George, 2011; Santhekadur *et al.*, 2018).

Las características ideales de un modelo animal de NAFLD dependen de la finalidad del estudio en concreto. Modelos en roedores que imitan ciertas características de la enfermedad en humanos han proporcionado información sobre posibles mecanismos patológicos que contribuyen a su desarrollo. Se han desarrollado varios modelos animales que reflejan tanto la histopatología como la fisiopatología de etapa específicas de la NAFLD humana (Cohen, *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2019; Ching *et al.*, 2017).

La mayoría de los modelos animales de hígado graso se centran en proporcionar una dieta que cause daño hepático. Debido a los fuertes vínculos entre la formación de hígado graso y el síndrome metabólico, se han desarrollado modelos animales que imitan las dietas altas en grasas de estilo occidental. En estos modelos, los animales alimentados con dietas ricas en grasa o HFD (*high-fat diet*) imitan tanto la histopatología como la patogénesis del NAFLD humano, incluyendo características como la obesidad y resistencia a la insulina. Sin embargo, el grado de esteatosis hepática no siempre está bien definido y parece depender de varios factores, incluida la cepa de roedores.

Un modelo utilizado en animales es la dieta deficiente en metionina y colina, que es rica en sacarosa y grasa pero que carece de metionina y colina, elementos esenciales para la β -oxidación hepática y producción de VLDL. Esta alimentación resulta en el desarrollo de esteatosis hepática, necroinflamación hepática y niveles elevados de transaminasas hepáticas, características parecidas a un estado de fibrosis en humanos (Rinella *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayor desventaja de este modelo es que su perfil metabólico es diferente al que es observado en humanos, presentando niveles de insulina, leptina y glucosa reducidos, y ausencia de resistencia periférica a la insulina (Hebbard & George, 2010).

En los modelos clásicos de HFD, los animales son alimentados *ad libitum* con la HFD, en la que la mayoría de la ingesta calórica (45-75%) proviene de grasas o combinaciones con fructosa, grasas trans o colesterol para inducir obesidad, resistencia a la insulina y/o daño hepático. En comparación con el modelo de dieta deficiente en colina y metionina, el grado de lesión hepática no es tan grave. Un modelo clásico HFD está establecido en ratas macho, que consumen una dieta que contienen 71% de grasa, 11% de carbohidratos y 18% de proteína durante 3 semanas.

En comparación con las ratas que reciben la dieta control (35% de grasa, 47% de carbohidratos, y 18% de proteínas), la histopatología resultante de las ratas HFD es similar a la observada en NASH humana, además de presentar resistencia a la insulina, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Lieber *et al.*, 2004).

Los estudios de los modelos de dietas que combinan HFD con alto contenido de fructosa (HFHF_r, *high-fat/high-fructose*), sugiere que el consumo de fructosa es necesario para el desarrollo y la progresión de hígado graso a NASH. Esto se debe a que en comparación con los ratones alimentados con HFD, los ratones alimentados con dieta HFHF presentan mayor inflamación hepática, estrés oxidativo y fibrosis. Además, el uso de una dieta que combina grasas, fructosa y colesterol (FFC), con composición: 40% de grasa, 42 g/l de concentración final de fructosa y 0.2% de colesterol, reproduce las características de resistencia a la insulina, esteatosis, inflamación con *ballooning* hepatocelular y fibrosis progresiva (Charlton *et al.*, 2011).

En los modelos en los cuales se suplementa fructosa líquida en roedores de laboratorio se ha evidenciado que la fructosa induce alteraciones metabólicas en varios tejidos, a saber, hígado, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético, por lo que estos modelos animales también pueden ser utilizados para descifrar los mecanismos moleculares implicados en el hígado graso. En estudios previos de nuestro de investigación se ha demostrado que la suplementación de fructosa al 10% en ratas machos durante 14 días, produce hipertrigliceridemia y esteatosis hepática debido a dos mecanismos: inducción de la lipogénesis y disminución de la β -oxidación hepática (Roglans *et al.*, 2007).

Resultados en ratas hembras de nuestro laboratorio, también suplementadas con fructosa durante 2 semanas, muestran el mismo resultado que en machos, con la diferencia que las hembras presentan resistencia a la insulina. Además, se observa una alteración en la vía del estrés de RE, donde a pesar de que las ramas de PERK y ATF-6 no se vieron afectadas por la fructosa, existe un aumento marcado en la fosforilación de IRE1, indicativo de activación (Baena *et al.*, 2015). En ratas suplementadas con fructosa (10%) durante 8 semanas, se observa también el aumento marcado de la fosforilación de IRE1 que se correlaciona con un aumento del mRNA y la proteína nuclear de la forma *spliced* XBP1 (Baena *et al.*, 2015). Estas ratas, además presentan hiperinsulinemia y una clara reducción de la IRS-2, responsable de la señalización de insulina en el hígado, sin modificación del ISI (índice de sensibilidad a la

insulina), lo que sugiere que en estos animales el aumento de insulina es suficiente para controlar los niveles de glucosa plasmática.

Por otra parte, ratones alimentados únicamente con HFD a una cantidad equivalente de calorías, los ratones alimentados con una dieta HFD más un 15% de fructosa líquida exhibieron hiperinsulinemia y una reducción en el ISI en comparación con los ratones alimentados con comida normal. Este efecto sobre la señalización de insulina hepática se observa en concordancia con la reducción de la fosforilación de Akt, que se observa únicamente en el grupo HFD suplementado con fructosa (Baena *et al.*, 2017).

Las alteraciones metabólicas inducidas por la fructosa experimentan cambios dinámicos que dependen de varios factores como la especie y el tiempo de suplementación. Algunos efectos son evidentes en tiempos de exposición cortos y luego son atenuados en tratamientos más prolongados (Rebollo *et al.*, 2014).

Está establecido que el consumo de fructosa está relacionado con el aumento de peso y la obesidad, pero esto no siempre es evidente en los estudios con roedores. En ratas suplementadas con fructosa líquida durante 14 días no se detectó ningún cambio en el aumento de peso (Vilà *et al.*, 2011a; Vilà *et al.*, 2011b). Sin embargo, en ratas hembras que recibieron 10% de fructosa líquida durante 8 meses mostraron no solo un aumento del peso corporal, sino también un aumento significativo en la masa de tejido adiposo visceral (Sangüesa *et al.*, 2018).

11. Estrategias farmacológicas para el tratamiento del NAFLD

Como se ha mencionado previamente, las estrategias basadas en los cambios en el estilo de vida no siempre son efectivas y se observan muchas recidivas entre los pacientes. Hasta el momento no están disponibles fármacos aprobados específicamente para el tratamiento de la NAFLD, aunque se aceptan en ciertos casos y según criterio clínico, la utilización de algunos posibles abordajes farmacológicos se focaliza en influir en las vías que contribuyen a la NAFLD, como los agonistas para PPAR, FXR (receptor X farnesoide) y análogos para GLP-1), o en inhibir las enzimas claves de la síntesis de lípidos (Samuel & Shulman, 2018).

Entre los fármacos que podrían disminuir la síntesis de lípidos indirectamente se encuentra la liraglutida, un análogo de GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*). La GLP-1 es una hormona que pertenece a la familia de las incretinas que actúa sobre el sistema nervioso central disminuyendo el apetito. Los análogos de GLP-1 pueden promover un mayor gasto energético al activar al tejido adiposo marrón, disminuir la producción de glucosa y la DNL en el hígado (Armstrong *et al.*, 2016).

Aunque todos los análogos de las incretinas disponibles promueven la pérdida de peso moderada, solo se ha demostrado que la liraglutida es eficaz en el tratamiento de NASH. En muchos ensayos clínicos que evalúan los tratamientos NASH, los pacientes mejoran la esteatosis y el *ballooning* de los hepatocitos, pero no la inflamación ni la fibrosis (Armstrong *et al.*, 2013).

Los efectos terapéuticos de los agonistas de PPAR α son en parte atribuibles a la inducción de FGF21 (*fibroblast growth factor 21*). FGF21 es un gen diana de PPAR α que se produce principalmente en el hígado y tejido adiposo blanco, y coordina el cambio metabólico de estados post-prandiales a ayuno. Además, FGF21 regula la cetogénesis hepática, la gluconeogénesis y la lipólisis (Badman *et al.*, 2007; Inagaki *et al.*, 2008).

En ensayos clínicos recientes, un agonista de FXR (*farnesoid X receptor*) ha mostrado resultados alentadores al reducir la fibrosis hepática de pacientes con NASH. Este agonista, el ácido obeticolico (OCA), es un análogo de los ácidos biliares (BA, *bile acids*) altamente selectivo para FXR. El FXR es una proteína nuclear activado por los AB que se expresa en los enterocitos e induce la expresión de hormonas, como la FGF19 (*fibroblast growth factor 19*), y es capaz de suprimir la síntesis de AB a fin de controlar su concentración. A pesar de los efectos beneficiosos del OCA sobre la inflamación hepática, hasta el 10% de los pacientes tratados presentan alteraciones sobre la lipemia y reacciones adversas que llevan a la interrupción del tratamiento (Chapman *et al.*, 2020).

11.1 Cafeína

La cafeína, principio activo del café, es el alcaloide vegetal (1,3,7-trimetilxantina) con actividad psicoestimulante más consumido en todo el mundo. Se encuentra presente en cantidades variables en más de 60 tipos plantas, principalmente en los granos de café y cacao, así como en las hojas de té y de la yerba mate. La cafeína también se encuentra en diversos productos alimenticios y farmacéuticos (chocolate, refrescos, bebidas energizantes, etc.), que también aportan cafeína en pequeñas cantidades (Nehlig & Alexander, 2018).

La ingesta de café se ha incrementado en las últimas décadas, y actualmente, es la bebida con cafeína más consumida (70%) por los adultos, seguido por las bebidas de cola (16%) y el té (12%). Investigaciones actuales sugieren que casi el 85% de la población estadounidense bebe al menos un café al día por varias razones, que incluyen mejorar el estado de alerta mental, la concentración y reducir la fatiga (Mitchell *et al.*, 2014). El consumo promedio de cafeína de todas las fuentes asciende a alrededor de 70 mg/persona por día (Frary *et al.*, 2005).

La cafeína *per se* tiene numerosos efectos farmacológicos, que incluyen efectos cardiovasculares, renales y en el músculo liso, así como efectos sobre el estado de ánimo, la memoria y el rendimiento cognitivo. Su principal mecanismo de acción es a nivel de sistema nervioso central, cuando es administrada a dosis moderadas actúa como antagonista de los receptores de adenosina tipo A₁ y A_{2A}, y este bloqueo se traduce en una reducción del efecto inhibitor de la adenosina a nivel central (Hsu *et al.*, 2010). En los EE.UU., la FDA (*Food and Drug Administration*) estableció que la concentración máxima de cafeína reconocida como segura en las bebidas es de 0.02%, siendo la dosis letal de cafeína entre 5 y 10 g/día (Alsbri *et al.*, 2018).

Cuando la cafeína se administra vía oral, se absorbe casi completamente en el intestino delgado y a los 45 minutos alcanza una biodisponibilidad del 99% con una vida media de aproximadamente 4 horas (Brachtel & Richter, 1992). El 95% del metabolismo primario de la cafeína se realiza en el hígado por CYP1A2, y el 3% o menos se excreta sin cambios en la orina. La cafeína se metaboliza a través de reacciones de oxidación de fase I, principalmente a paraxantina, teobromina y teofilina, seguidas de conjugación de fase II (Nehlig & Alexander, 2018).

Recientemente varios estudios en humanos han reportado que la ingesta de café podría tener efectos beneficiosos en pacientes con hígado graso y fibrosis hepática (Molloy *et al.*, 2012; Hayat *et al.*, 2020). El mecanismo protector podría deberse en parte, al efecto supresor de la cafeína sobre la hiperglucemia al mejorar la sensibilidad a la insulina debido a una reducción de la expresión de citocinas inflamatorias (Birerdinc *et al.*, 2012). Sin embargo, estos estudios resultan controvertidos, debido a que la relación inversa entre el café y el hígado graso no pudo ser confirmada en otros estudios similares (Shen *et al.*, 2016; Veronese *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios que describen los efectos beneficiosos de la ingesta de café utilizan café obtenido a partir de granos de café tostado; sin embargo, el perfil de los compuestos bioactivos del café es alterado durante el proceso de tostado (Priftis *et al.*, 2015). El extracto de café verde (GCE), elaborado a partir de los granos de café verde sin tostar, contiene mayor cantidad de compuestos polifenólicos, entre ellos el ácido clorogénico, un potente antioxidante que mejora la resistencia a la insulina y la autofagia en modelos murinos de NAFLD (Yan *et al.*, 2018).

Algunos estudios sugieren que el GCE presenta efectos beneficiosos, en comparación con el café tostado, sobre las enfermedades metabólicas, induciendo mejoras en el metabolismo de glucosa y lípidos y efectos contra la obesidad (Daglia *et al.*, 200; Park, 2013). Estudios en humanos sugieren que el GCE podría tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa (Roshan *et al.*, 2018; Nikpayam *et al.*, 2019), y sobre el síndrome metabólico, debido a que además mejora la presión arterial, y los niveles de glucosa y triglicéridos plasmáticos (Sarriá *et al.*, 2018). Además, podría ser capaz de inducir pérdida de peso al regular los niveles de leptina y adiponectina en ratones obesos (Choi *et al.*, 2016).

11.2 Ácido bempedoico

El ácido bempedoico (BemA) es un tipo de ω -ácido hidroxialcanodicarboxílico también conocido como ETC-1002 (Ácido 8-hidroxio-2,2,14,14-tetrametilpentadecanodioico), que recientemente ha sido introducido como fármaco para el tratamiento de la dislipidemia. Su mecanismo de acción básicamente consiste en disminuir la concentración de colesterol en sangre a través de la activación de AMPK y la inhibición de la ATP citrato liasa (ACLY) (**Figura I-8**).

ACLY es una enzima que cataliza la conversión del citrato que proviene del ciclo de Krebs a acetil-CoA y oxalacetato, un paso clave en la biosíntesis de lípidos que precede a la HMG-CoA reductasa y a la ACC (Elshourbagy *et al.*, 1990; Pinkosky *et al.*, 2013).

En el hígado, el BemA activa directamente a AMPK, que posteriormente inhibe la fosforilación de ACC reduciendo los niveles de malonil-CoA, lo que conduce al aumento de la β -oxidación de ácidos grasos, debido a que se incrementa el transporte de ácidos grasos a la mitocondria vía CPT1. Por otra parte, el BemA es convertido a un derivado CoA por acción de la ACSVL1 (*very long-chain acyl-CoA synthetase-1*). El derivado CoA del BemA (BemA-CoA) inhibe directamente a ACL, lo que lleva a la reducción de la producción de acetil-CoA en el citosol, disminuyendo la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Cramer *et al.*, 2004; Pinkosky *et al.*, 2013).

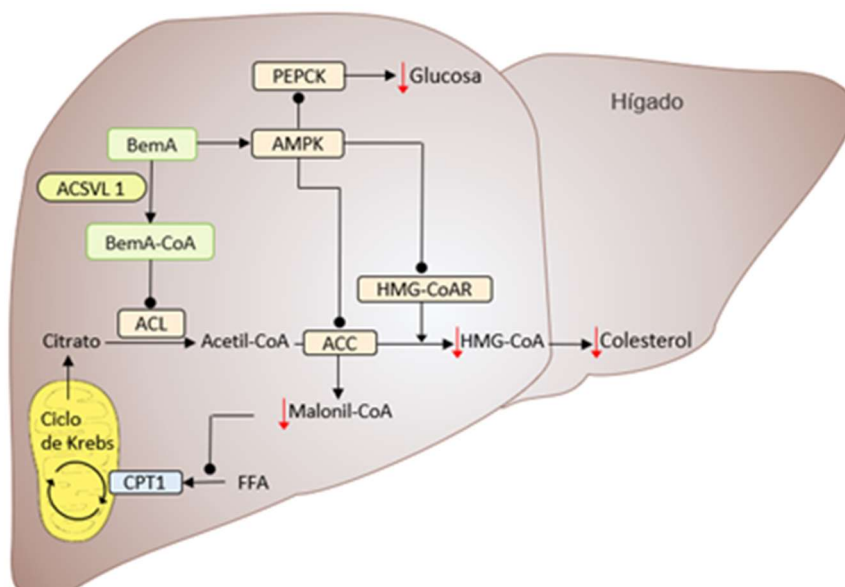


Figura I-8. Mecanismo de acción del BemA. En el hígado, el BemA actúa directamente activando la vía de señalización de AMPK reduciendo la actividad de las enzimas que actúan en la síntesis de lípidos (ACC y HMG-CoA) y la síntesis de carbohidratos (PEPCK y G6Pasa). El BemA es convertido a BemA-CoA por acción de la ACSVL-1, este derivado Co-A inhibe a ACL y consecuentemente, disminuye los niveles de acetil-CoA, el sustrato principal para la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Adaptado de Pinkosky *et al.*, 2013.

Diversos efectos beneficiosos sobre el metabolismo de los lípidos y la glucosa han sido demostrados en varios modelos animales. En un modelo de hámster, además de reducir el colesterol sérico y el peso corporal, el BemA disminuyó los lípidos hepáticos. El tratamiento con 100 mg/Kg de BemA en ratas hembra Zucker durante 3 meses, es capaz de reducir el colesterol, los triglicéridos y los FFA, mientras que incrementa los niveles de HDL y β -hidroxibutirato. Además, reduce los niveles de glucosa e insulina en ayunas, al mismo tiempo que reduce la ganancia de peso corporal (Cramer *et al.*, 2004; Pinkosky *et al.*, 2013).

En cultivo celular de hepatocitos, BemA 10 y 30 μ M incrementa la β -oxidación de ácidos grasos, sin alterar las vías de β -oxidación mitocondrial, ya que más bien acelera el importe de ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria vía CPT1 (Cramer, *et al.* 2004). En ratones *Ldlr*^{-/-}, alimentados con una HFD suplementada con 30mg/Kg de BemA durante de 12 semanas, además de producir efectos beneficiosos sobre los niveles de la glucosa y lípidos circulantes, el tratamiento con BemA atenuó el hígado graso y la obesidad inducidos por la dieta. Adicionalmente, el tratamiento redujo hasta un 44% el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en la aorta sinusal (Samsouandar *et al.*, 2017).

BemA además posee efectos antiinflamatorios. El BemA es capaz de atenuar los niveles de hsCRP en pacientes que presentan dislipidemias, un biomarcador de inflamación (Ballantyne *et al.*, 2012). En cultivo celular de macrófagos humanos, BemA activa AMPK y ejerce su efecto antiinflamatorio vía LKB1 (*liver kinase B1*). En un modelo de ratones obesos, BemA restaura la actividad de AMPK, reduce la fosforilación de JNK y disminuye la expresión del marcador de específico para macrófagos F4/80 (Filippov *et al.*, 2013).

Numerosos ensayos en humanos se han realizado con la finalidad de evaluar la seguridad y la eficacia del uso clínico del BemA. El primer ensayo clínico de fase I en humanos se evaluó la seguridad, la tolerabilidad y la farmacocinética de una monodosis diaria de BemA en 18 sujetos sanos. El BemA fue seguro, bien tolerado y sin efectos secundarios limitantes de la dosis (Bilen & Ballantyne, 2016). En otro ensayo clínico llevado a cabo en 56 pacientes con hipercolesterolemia y antecedentes de intolerancia a las estatinas, el tratamiento con monodosis diaria de hasta 240 mg de BemA redujo hasta un 30% los niveles de colesterol plasmático en relación al placebo, sin producir reacciones adversas significativas en el músculo (Thompson *et al.*, 2015).

El primer estudio de fase 2 fue diseñado para evaluar la eficacia y seguridad de BemA en la reducción del colesterol tipo LDL (LDL-C) en pacientes con hipercolesterolemia. Los niveles de LDL se redujeron hasta un 27% en pacientes tratados con 120 mg de BemA, así como también redujo los niveles de biomarcadores aterogénicos, como la ApoB. Otros siete estudios de fase 2, que incluyeron un total de 977 pacientes con antecedentes de intolerancia a las estatinas, de los cuales 669 recibieron el fármaco activo, demostrando que BemA reduce el LDL-C en monoterapia, así como combinado con ezetimiba (Thompson *et al.*, 2016; Bilen & Ballantyne, 2016).

Los estudios de fase 3 se llevaron a cabo en un mayor número de personas (aproximadamente 4000 pacientes) con la finalidad de obtener más datos sobre la eficacia y la seguridad del BemA como monoterapia o en combinación con estatinas, así como también combinado con ezetimiba en pacientes con intolerancia a las estatinas. Los resultados confirman la eficacia y seguridad de BemA administrado vía oral para reducir los lípidos plasmáticos, especialmente en pacientes que no toleran las estatinas (Bilen & Ballantine, 2016; Laufs *et al.*, 2019).

Actualmente el BemA cuenta con la aprobación de la EMA (*European Medicines Agency*) y la FDA para su uso como monoterapia o combinado con estatinas u otros fármacos en el tratamiento de la hipercolesterolemia primaria y otras dislipidemias mixtas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Numerosos estudios apuntan a que el consumo de dietas con alto contenido en grasas, así como en bebidas azucaradas, son los factores más comunes que predisponen a la aparición de NAFLD. Hasta el momento no se cuenta con terapias farmacológicas aprobadas para el tratamiento del hígado graso, por lo cual es fundamental comprender su fisiopatología y así establecer nuevas dianas terapéuticas.

Los modelos animales de hígado graso que mejor mimetizan la enfermedad en humanos, utilizan dietas con alto contenido en grasas y colesterol, que además de desarrollar obesidad, generalmente presentan inflamación y no permiten diferenciar entre la esteatosis simple y la esteatosis con inflamación. Por otra parte, en pacientes con NAFLD la lipogénesis de novo (DNL) contribuye de forma importante al depósito de lípidos en el hígado. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la suplementación con fructosa líquida al 10% (p/v) induce la DNL y produce esteatosis hepática sin producir inflamación.

HIPÓTESIS

La administración de una dieta rica en grasas saturadas (HFD, *high-fat diet*), desprovista de colesterol, en ratas hembras Sprague-Dawley, inducirá esteatosis hepática simple sin inflamación, y la combinación de esta dieta junto a la suplementación de fructosa líquida 10% (p/v) (HFHFr, *high-fat/high-fructose*) agravará el cuadro metabólico debido a la inducción de la DNL. Ello nos permitirá obtener un modelo animal que emulará de forma fidedigna el hígado graso simple. En este modelo, el tratamiento con una dosis moderada de cafeína (CAF) reducirá la acumulación de lípidos a través de una mejora en la autofagia y de otros mecanismos moleculares asociados. Asimismo, el tratamiento con ácido bempedoico (BemA) reducirá la esteatosis hepática mediante la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y la activación de su catabolismo.

OBJETIVOS

1. Analizar las principales alteraciones metabólicas inducidas por la dieta HFD y HFHFr en las ratas hembras *Sprague-Dawley*, focalizando en los mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis del hígado graso y sus efectos metabólicos en tejidos periféricos.
2. Determinar los efectos de una dosis moderada de CAF, como tal o en forma de extracto de café verde, sobre la reducción de los lípidos hepáticos y los mecanismos moleculares subyacentes en el modelo ratas HFHFr.
3. Evaluar los efectos del BemA sobre la esteatosis hepática inducida en el modelo HFHFr e identificar los principales mecanismos implicados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Durante la presente tesis se realizaron 3 estudios *in vivo*, empleando un total de 80 ratas hembra de la cepa *Sprague Dawley* proveídos por la empresa Envigo (Barcelona, España). Las ratas con 2 meses de edad y un peso corporal entre 200-220 g fueron aclimatadas en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona durante los 7 días previos al comienzo de los estudios. Para cada estudio, los animales fueron divididos aleatoriamente en los grupos experimentales (2 ratas/caja). Las ratas fueron mantenidas en las instalaciones bajo condiciones de temperatura (20–24°C) y humedad (40–60%) constantes, respetando los ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. En todo momento, los animales contaron con libre acceso a agua y comida. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron llevados a cabo de acuerdo a los principios y las guías establecidas por el Comité de Bioética de la Universitat de Barcelona (Gobierno Autónomo de Catalunya Acta 5/1995 del 21 de julio). El comité de ética de experimentación animal de la Universitat de Barcelona aprobó todos los protocolos experimentales en los animales bajo resolución de autorización del proyecto nro. 10106.

2. Dietas empleadas

Las ratas del grupo CT (control) fueron alimentadas con una dieta control exclusiva para roedores (ref. 2018 Teklad Global, 18% proteína, fórmula nutricional en la **tabla III-1**) y agua de bebida. Los animales del grupo HFD (*high-fat diet*) fueron alimentados con una dieta enriquecida en ácidos grasos palmítico y esteárico (23.2% de grasas saturadas; Teklad Custom Diet TD.180456, fórmula nutricional en la **tabla III-1**) especialmente elaborada a base de manteca de cacao y libre de colesterol para evitar el desarrollo de inflamación. Por último, las ratas del grupo HFHFr (*high-fat/high-fructose*), así como las que recibieron los tratamientos farmacológicos, fueron alimentadas con la dieta HFD y una suplementación de 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida, con recambios de la solución de fructosa cada dos días.

Tabla III-1. Composición de las dietas utilizadas para alimentar a las ratas

Fórmula	Dieta estándar	Dieta HFD (g/kg)
caseína	* las cantidades exactas no están especificadas, ver ingredientes.	195.0
L-cisteína		3.0
Fécula de maíz		336.96
Maltodextrina		120.0
Manteca de cacao		210.0
Aceite de soja		20.0
Celulosa		50.0
Mezcla de minerales		43.0
Mezcla de vitaminas		19.0
Bitartrato de colina		3.0
TBHQ, antioxidantes		0.04
	% peso (% calorías)	
Proteínas	18.6 (24)	17.3 (15.5)
Carbohidratos	44.2 (58)	41.7 (37.5)
Grasas	6.2 (18)	23.2 (46.9)
Kcal/g	3.1	4.4

* Ingredientes dieta estándar (*Teklad Global 2018*, 18% de proteína): trigo molido, maíz molido, salvado de trigo, harina de soja descascarada, harina de gluten de maíz, aceite de soja, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, levadura de cerveza, sal yodada, L-lisina, DL-metionina, cloruro de colina, caolín, óxido de magnesio, acetato de vitamina E, complejo de bisulfito sódico de menadiona (fuente de vitamina K), óxido manganoso, sulfato ferroso, óxido de zinc, niacina, pantotenato cálcico, sulfato de cobre, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, mononitrato de tiamina, acetato de vitamina A, yodato de calcio, suplemento de vitamina B12, ácido fólico, biotina, suplemento de vitamina D3, carbonato de cobalto.

3. Fármacos administrados

La cafeína (CAF) fue administrada incorporada a la dieta sólida (HFD) de forma pura (nro. CAS 58-08-2, Sigma-Aldrich) y en forma de extracto de café verde (GCE, *green coffee extract*). El GCE fue proveído gentilmente por la empresa Applied Food Science (Austin, TX, USA), obtenido por un proceso de extracción con 70:30 de etanol:agua, filtración, evaporación y secado por atomización (*spray dried*). La dosis de CAF utilizada en las ratas fue equivalente a la dosis promedio de CAF ingerida en personas que consumen café de forma moderada (Grosso *et al.*, 2015; Imatoh *et al.*, 2015), obtenido a través de un cálculo de conversión de dosis entre especies (Nair *et al.*, 2016). El valor de la dosis teórica de CAF fue de 5 mg/kg, que junto al valor de consumo promedio de dieta sólida (28g de HFD/rata/día), fueron utilizados para obtener la concentración de CAF a ser incorporada en la dieta, que resultó equivalente a 178 mg/kg de HFD. En el caso del grupo GCE, dicha concentración de CAF correspondió a una concentración de extracto 8.24g de GCE/kg. Al finalizar el estudio se calcularon los valores de dosis real de cafeína que recibieron las ratas de ambos grupos (CAF y GCE). En el caso del grupo CAF fue de 5.0 ± 0.5 mg/kg y para el grupo GCE fue de 5.3 ± 0.4 mg/kg, correspondiente a una dosis de extracto de 244.8 ± 17.1 mg/kg. Estos datos revelaron que en promedio ambos grupos (CAF y GCE) recibieron la misma dosis de cafeína (5 mg/kg). Según el cálculo de conversión de dosis inter-especie basada en el área de superficie corporal (Nair *et al.*, 2016), este valor resultó ser equivalente a 66 mg de cafeína para una persona de 70 kg, lo que corresponde a una taza de café expreso por día, que contiene en promedio entre 2.4 a 4.5 mg/ml de cafeína (Angeloni *et al.*, 2019).

En el caso del ácido bempedoico, la solución de BemA se preparó partir de una disolución acuosa de sal disódica (BemA, ref. HY-12357, MedChemExpress, NJ, Princenton, EEUU) usando una relación molar 2:1 de NaOH:BemA en agua. Para la solución de dosificación, la solución stock fue diluida en el vehículo (carboximetilcelulosa al 0,5% y 0,025% de Tween-20, con un pH final de 7-8).

4. Diseño experimental

El modelo experimental utilizado en los tres estudios de esta tesis se basó en la suplementación de las dietas señalados en las **Figuras III-1, III-2 y III-3**, respectivamente. En cada estudio tuvo una duración de 90 días y se realizó controles semanales del peso de cada animal y del consumo de dieta sólida por caja. Además, el consumo de líquidos (agua y/o solución de fructosa, según corresponda) fue registrado cada dos días. Los tratamientos farmacológicos fueron realizados diariamente durante el último mes del protocolo experimental. En todos los estudios, una semana antes de finalizar el tratamiento, se realizó el test de tolerancia oral a la glucosa (ITOG, descripción en el apartado 7). Al finalizar el estudio se recolectaron *in situ* las medidas de los parámetros bioquímicos de las ratas (descripción en el apartado 8.1). Inmediatamente después, los animales fueron sometidos al proceso de eutanasia, que consistió en anestesia previa con ketamina/xilacina (9 mg /40 µg por cada 100 g peso corporal, respectivamente) vía i.p., seguida de exanguinación por punción cardíaca.

Las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca se recolectaron en microtubos (*Microtube* 1.1 ml Z-Gel, Srastedt) específicos para la obtención de suero. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 10.000 G durante 5 minutos a temperatura ambiente. El suero resultante fue alicuotado y guardado a -20°C hasta su utilización. Por otra parte, las muestras de tejido hepático, adiposo y muscular fueron diseccionadas, pesadas, congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su utilización.

A continuación, se detallan los esquemas del protocolo experimental de cada estudio:

- **Esquema del estudio 1:** Se utilizaron 24 ratas hembra (n=8/grupo), divididas aleatoriamente en 3 grupos experimentales: CT, HFD y HFHFr.

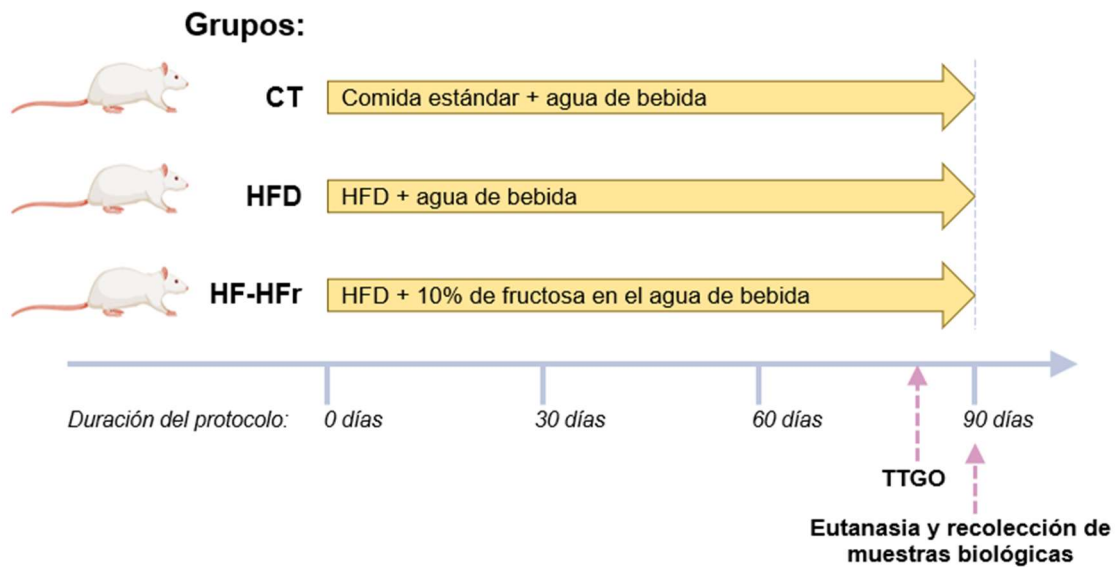


Figura III-1. Esquema del diseño experimental del estudio 1. Cada grupo experimental recibió agua y comida durante los 90 días de tratamiento. En la última semana de tratamiento se realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa (TTGO). CT (control), HFD (*high-fat diet*) y HFHFr (*high-fat/high-fructose*).

- **Esquema del estudio 2:** Se utilizaron 48 ratas (n=12/grupo) que fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos experimentales: CT, HFHFr, CAF y GCE. Los grupos que recibieron los tratamientos farmacológicos recibieron la misma suplementación dietética que el grupo HFHFr, a diferencia que, en el último mes, la HFD fue reemplazada por la dieta HFD con CAF (5 mg/kg) y GCE (245 mg/kg=5 mg CAF/kg) cada grupo respectivamente, según se describe en la **Figura III-2**. En este estudio en particular, en la última semana del protocolo se realizó el test del campo abierto.

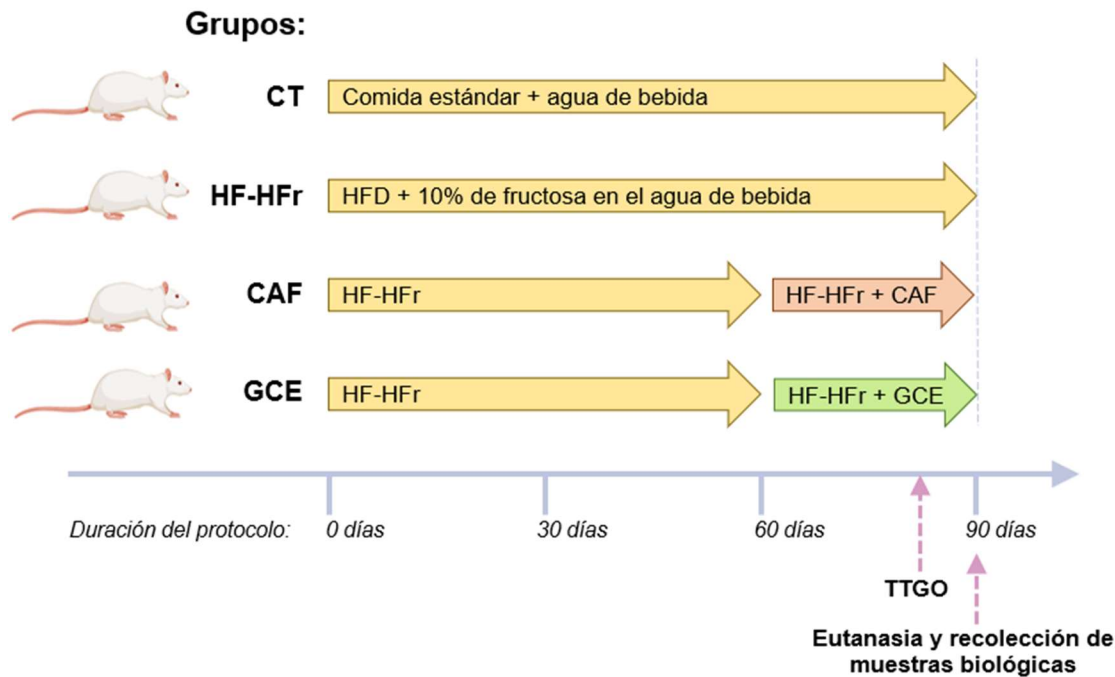


Figura III-2. Esquema del diseño experimental del estudio 2. Cada grupo experimental recibió agua y comida durante 90 días. En los últimos 30 días, los grupos CAF y GCE recibieron los fármacos incorporados a la dieta sólida. En la última semana de tratamiento se realizaron el test de campo abierto y el TTGO. CT (control), HFHFr (*high-fat/high-fructose*), CAF (HFHFr + CAF) y GCE (HFHFr + GCE).

- **Esquema del estudio 3:** Para este estudio se utilizaron en total 24 ratas ($n=8/\text{grupo}$) distribuidas aleatoriamente en 3 grupos experimentales (CT, HFHFr y BemA). Todos los animales recibieron las distintas suplementaciones dietéticas durante los 90 días de tratamiento. Sin embargo, como se observa en la **Figura III-3**, en los últimos 30 días, se realizó el tratamiento farmacológico vía oral entre las 8 y las 10 de la mañana, respetando el volumen de dosificación de 10 ml/kg. El grupo BemA recibió una dosis de 30 mg/kg/día de ácido bempedoico y, los grupos CT y HFHFr, recibieron el vehículo.

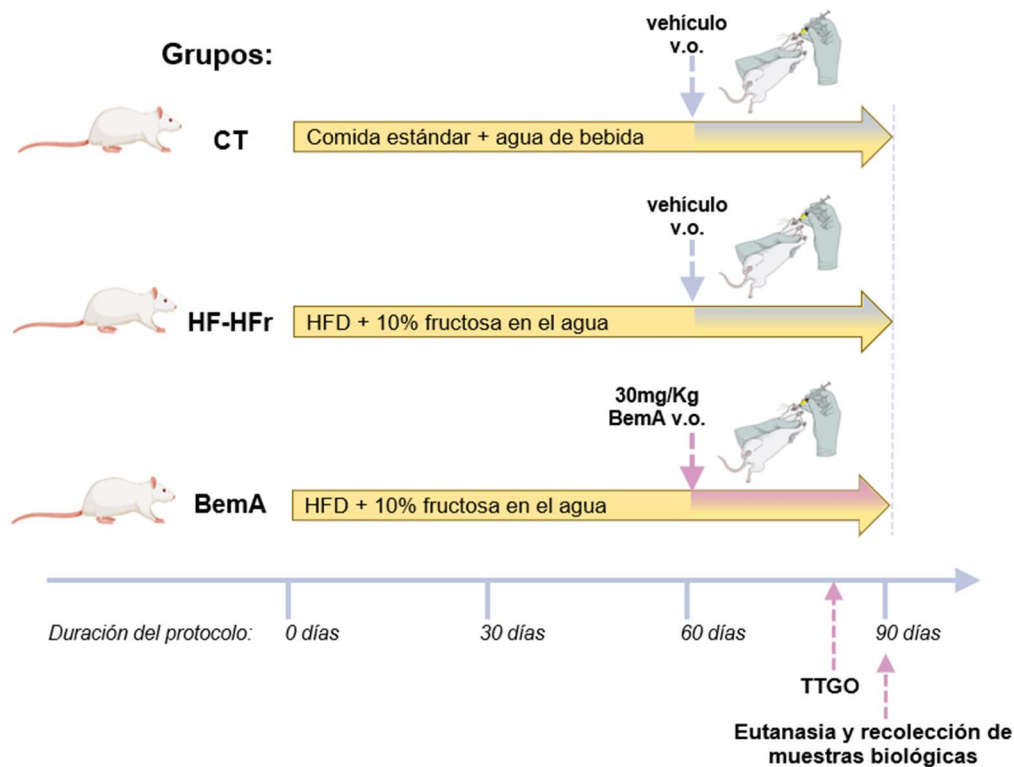


Figura III-3. Esquema del diseño experimental del estudio 3. Todos los grupos experimentales recibieron agua y comida durante los 90 días del protocolo. Durante los 30 días se realizó el tratamiento farmacológico diario vía oral y en la última semana de tratamiento el TTGO. CT (control), HFHFr (*high-fat/high-fructose*), BemA (HFHFr + BemA).

5. Test de actividad locomotora

El test del campo abierto fue utilizado para evaluar los efectos de la cafeína sobre actividad locomotora en las ratas. Inicialmente descrito por Calvin Hall en 1934, el test consiste en observar la actividad general de los animales en una caja oscura rodeada de paredes altas (40 x 40 x 40 cm) y provista de pistas visuales en la sala de experimentación, que permite a los animales ubicarse espacialmente en su ambiente. El test fue realizado durante 3 días en la última semana del protocolo experimental. El ensayo se realizó en condiciones de luz tenue (12 lux) durante 60 minutos de exposición cada día. El dispositivo fue limpiado con etanol al 10% entre cada animal a fin de eliminar rastros de olores y las heces. Los dos primeros días correspondieron a la sesión de habituación y el tercer día se realizó la sesión del test de campo abierto. Durante la sesión test se grabó la actividad de los animales con una videocámara, que posteriormente fue analizada a fin de determinar los valores de tiempo y distancia recorrida con el software de seguimiento Smart 3.0 (PanLab, Cornellá, Barcelona, España).

6. Test de tolerancia oral a la glucosa

El test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) fue realizado una semana antes de finalizar el tratamiento con la finalidad de evaluar el metabolismo periférico de la glucosa. Previo ayuno de 6 horas, se realizó una medida basal del nivel de glucosa e inmediatamente se administró un bolo de una solución de glucosa (2 g/kg) vía oral. Posteriormente, se midió la glicemia a los 15, 30, 60 y 120 minutos. Las medidas de glucosa se realizaron *in situ* con muestras de sangre obtenidas por punción de la vena caudal al final de la cola, utilizando tiras reactivas y el glucómetro Accutrend® Plus System Cobas (Roche Farma, Barcelona, España). A su vez, se colectó muestra de sangre a los 0, 15, 60 y 120 minutos para determinar los niveles de insulina sérica por el método de ELISA (descripción en el apartado 8.3).

7. Determinación de parámetros bioquímicos

7.1 Niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre

Los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos fueron determinados con un glucómetro glucometro Accutrend® Plus System Cobas (Roche Farma, Barcelona, España). El día de la eutanasia, los animales fueron sometidos a un ayuno de 2 horas y posteriormente se extrajo una gota de sangre de la vena caudal de la cola a fin de medir los parámetros bioquímicos utilizando las siguientes tiras reactivas:

- Glucosa: Accutrend® Plus Glucose, ref. 11447475 (Roche Farma); con rango de detección de 20-600 mg/dL.
- Triglicéridos: Accutrend® Plus Triglycerides, ref. 11538144 (Roche Farma); con rango de detección de 70-600 mg/dL.
- Colesterol: Accutrend® Plus Cholesterol, ref. 11418262 (Roche Farma); con rango de detección de 150-600 mg/dL.

7.2 Determinación de parámetros bioquímicos por el método colorimétrico

Las determinaciones de los niveles séricos de los parámetros bioquímicos se midieron por duplicado utilizando kits colorimétricos adaptados a microplaca. Con la finalidad de evitar la degradación de los componentes del suero, las alícuotas se descongelaron de acuerdo a la cantidad a ser utilizada en cada determinación. Las determinaciones basadas en el método colorimétrico de punto final fueron realizadas en el lector espectrofotométrico de microplacas de ThermoScientific Multiskansky (ref. 51119600DP, Waltham, MA, EEUU). Entre ellas, los ácidos biliares totales y los niveles de ácidos grasos no esterificados, mientras que el nivel de las transaminasas hepáticas, fueron obtenidos por el método cinético utilizando el lector espectrofotométrico de microplacas de Bio-Rad BenchMark Plus (CA, EEUU).

- Alanina aminotransferasa: GPT (ALT)-LQ, ref. MI41274 (Spinreact, Girona, España).
- Aspartato aminotransferasa: GOT (AST)-LQ, ref. MI41264 (Spinreact, Girona, España).
- Ácidos grasos no esterificados: MaxDiscovery™ *Non-Esterified Fatty Acids*; ref. 5620-01(Biooscientic, Austin, TX, USA).
- Ácidos biliares totales: ref. 1001030 (Spinreact, Girona, España).

7.3 Ensayos inmunoenzimáticos: ELISA

Las determinaciones de las concentraciones séricas de insulina, leptina, adiponectina y FGF15 (*Fibroblast Growth Factor 15*) se realizaron utilizando kits específicos basados en la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado utilizando el lector espectrofotométrico de microplacas de ThermoScientific Multiskansky (ref. 51119600DP, Waltham, MA, EEUU).

Determinaciones realizadas por el método de ELISA:

- Insulina (ref. EZRMI-13K; Millipore, Billerica, MA, EE.UU.)
- Leptina (ref. EZRL-83K; Millipore, Billerica, MA, EE.UU.)
- Adiponectina (ref. EZRADP-62K, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.)
- FGF15 (ref. MBS2024189-9, MyBioSource, San Diego, California, EE.UU.)

8. Valoración histopatológica del hígado

Las valoraciones histológicas de las muestras de hígado se realizaron a través de las tinciones de hematoxilina-eosina (H&E) y de Oil Red O (ORO). La presencia de *lipids droplets* y de otras alteraciones morfológicas se realizó a través de la tinción de H&E. Esta tinción se basa en una doble coloración de las estructuras celulares. La hematoxilina, principalmente básica, se une a estructuras basófilas como los ácidos nucleicos, otorgándoles una coloración azulada; mientras que la eosina tiñe componentes acidófilos como por ejemplo el citoplasma celular, otorgando un color que va de rosado a rojizo. Por otra parte, la esteatosis hepática fue valorada a través de la tinción de ORO, que se basa en la utilización de un compuesto liposoluble que permite teñir triglicéridos, lípidos y lipoproteínas.

Después de la eutanasia, se procedió inmediatamente a la disección de hígado y perfusión con NaCl al 0.9% para seleccionar las muestras de tejido hepático para las diferentes tinciones. Las muestras destinadas a la tinción ORO se sumergieron en OCT (Optimal Cutting Temperature, (Tissue-Tek®, Torrance, CA, EEUU) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su uso. Mientras que aquellas muestras destinadas a las tinciones de hematoxilina-eosina se conservaron en tubos falcón con formol al 10% por 24 horas y luego se embebieron en solución etanólica al 30% (Scharlau).

Todos los cortes histológicos y las tinciones fueron realizados por el Laboratorio de Histopatología Animal del Hospital Clínic (Universitat de Barcelona). Para la tinción de H&E, las muestras fueron deshidratadas e incrustadas en bloques de parafina utilizando un procesador automático de tejidos Leica TP1020 y un módulo de incrustación de parafina Leica EG1150 H (Leica Microsistemas, Barcelona, España). Tanto las muestras de H&E como las de ORO se cortaron en láminas de 5 µm de espesor para la tinción.

Las imágenes de las tinciones se obtuvieron con un microscopio Leica DMSL equipado con una cámara DP72 (Leica Microsistemas, Barcelona, España) y se analizaron con el software Image J 1.49 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). El área de tinción ORO positiva se calculó como el porcentaje del área teñida positivamente en relación al área total de la imagen analizada.

9. Análisis de contenido de lípidos hepáticos

A fin de determinar las concentraciones de triglicéridos y colesterol en el hígado, se utilizó el método descrito por Qu y colaboradores (2006). Primeramente, se pesaron 40 mg de tejido hepático que fueron homogeneizados inmediatamente con 800 μ L de acetona grado HPLC. Las muestras se incubaron durante toda la noche con agitación constante en un orbital a temperatura ambiente, y luego se dejó reposar durante 15 minutos para permitir la sedimentación del resto de tejido no homogeneizado. La suspensión resultante del extracto acetónico fue empleada para la determinación de los lípidos, utilizando los kits colorimétricos de la marca Spinreact (Girona, España) específicos para triglicéridos (ref. 41030) y colesterol (ref. MD41021). Los resultados fueron expresados en miligramos de triglicéridos/colesterol por gramo de hígado.

9.1 Medición de ésteres metílicos de ácidos grasos en TG hepáticos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, *fatty acid methyl esters*) de los TG hepáticos se determinaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas de ionización electrónica. Se partió de 75 mg de hígado que fueron homogeneizados en 1 ml de NaCl al 0,9% en un tubo de vidrio (previamente lavado con n-hexano) utilizando el homogeneizador de tejidos OMNI TH (Omni International, Kennesaw, GA). El homogeneizado se añadió con 100 μ L del estándar interno trionadecanoína (solución 100 μ g/ml; Nu-Chek Prep, Elysian, MN) y los lípidos se extrajeron con 2 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Después de centrifugar 5 min a 3500 rpm, la fase orgánica se transfirió a un nuevo tubo de vidrio y se evaporó hasta sequedad bajo corriente de N₂ a 30°C. Los TG se aislaron mediante extracción en fase sólida como se describe en el trabajo de Burdge y colaboradores (2000).

Los ácidos grasos se hidrolizaron y metilaron siguiendo una adaptación del método descrito por Agren y colaboradores (1992). Brevemente, se añadieron al tubo 100 μ L de n-tolueno y 500 μ L de solución de trifluoruro de boro-metanol (14%), que se tapó y se colocó en un baño seco a 100 ° C durante 60 minutos. Después de enfriar, se agregaron 500 μ L de agua destilada y 500 μ L de n-hexano. Los tubos se agitaron durante 1 minuto y luego se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm para separar las capas. La capa de hexano se colocó en un tubo de ensayo y se evaporó hasta sequedad bajo N₂ a 30°C. Los extractos se reconstituyeron con 100 μ L de n-hexano y se transfirieron a un vial inyector automático.

Los FAME se analizaron mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas de ionización electrónica (GC/MSEI), utilizando un GC Agilent 6890N equipado con un muestreador automático Agilent 7683 y un detector de espectrometría de masas Agilent 5973N. Los FAME se separaron con una columna capilar J&W DB-FastFAME (Agilent). La temperatura del inyector se fijó en 250 °C y se realizaron inyecciones de 1 μ l. Se usó helio como gas portador (14 psi, modo de presión constante).

Los FAME eran detectados usando el modo de monitoreo de iones (SIM). Se monitorearon varios iones m/z comunes a los FAME saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) utilizando el método descrito por Thurnhofer y Vetter (2005). Se prepararon nueve mezclas de estándares de calibración externos FAME (Supelco 37 Component FAME Mix, Merck) en hexano, que mantenidos a -20 °C hasta el análisis. Se agregaron 30 μ L de cada mezcla a un tubo, se enriquecieron con 1000 μ L de ISTD C19: 0-metil éster (solución 100 μ g/ml), se evaporaron a sequedad con N₂ a 30 ° C, reconstituido con 100 μ L de hexano y se transfieren a un vial inyector automático. Los equivalentes de C19:0 añadidos a las muestras como TG ISTD fueron los mismos que la cantidad de éster metílico de C19:0 añadida a los calibradores externos. La concentración de FAME en las muestras se calculó mediante regresión lineal de la relación del área de pico con respecto a la del estándar interno. Las concentraciones normalizadas se calcularon dividiendo las concentraciones por el peso del tejido hepático o por la concentración de proteína en los casos de aumento del peso del hígado (grupo BemA).

9.2 *Análisis lipídico en homogenados de hígado de rata*

Los niveles de diacilgliceroles (DAG), ceramidas (Cer) y hexosilceramidas (HexCer) en hígados de rata se determinaron a partir de homogeneizados de hígado como se describió en el apartado anterior. A cada homogeneizado se le añadió 50 μL de una solución estándar interna que contenía una mezcla de 10 compuestos deuterados (Avanti Polar Lipids). Los lípidos se sometieron a extracción líquido-líquido utilizando 2 ml de cloroformo / metanol (2: 1 v/v). Después de la centrifugación (5 min a 3500 rpm), se transfirieron 100 μL de la fase orgánica a un nuevo tubo (previamente lavado con n-hexano) que se evaporó con corriente de N_2 a 30 °C. Los extractos se reconstituyeron en 100 μL de la fase móvil consistente en metanol, se transfirieron a viales de HPLC y se inyectaron 10 μL en el sistema de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LCMS/MS).

10. Actividad de β -oxidación de los ácidos grasos en el hígado

La actividad de β -oxidación de los ácidos grasos fue determinada utilizando el método de Lazarow (1981). El ensayo de la cuantificación de la actividad de β -oxidación de ácidos grasos se basa en la conversión del derivado insoluble palmitoil-CoA marcado con ^{14}C en el compuesto ácido soluble acetil-CoA ^{14}C , que es detectado al final del proceso.

Para este método es necesario extraer previamente el sobrenadante postnuclear (SNPN) de las muestras de hígado, en el cual se encuentran las mitocondrias y los peroxisomas que son los principales orgánulos donde se lleva a cabo el proceso de β -oxidación de los ácidos grasos. A fin de obtener el SNPN, se pesaron 200 mg de tejido hepático fresco, previamente perfundido, y se le añadió 1 ml de tampón de homogeneización (**Tabla III-2**). Posteriormente, las muestras fueron disgregadas en el homogeneizador Potter-Elvehjem, centrifugadas a 700 G durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante almacenado a -80°C hasta su uso. Paralelamente, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (descripción en el apartado 14.4).

Tabla III-2. Composición del tampón de homogeneización para la obtención de sobrenadante post-nuclear

Reactivo	Concentración
KH₂PO₄ pH 7.4	50 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
DTT (Sigma-Aldrich)	1 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	30 mM
Sacarosa (PanReac)	0.25 M
Agua bidestilada	c.s.

Para medir la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos en las muestras, se partió un volumen de SNPN equivalente 30 μ g de proteína, que se agregó junto al medio de reacción (ver componentes **tabla III-3**) hasta completar un volumen final de 500 μ l.

Tabla III-3. Composición del medio de reacción para la determinación de la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos en SNPN.

Reactivo	Concentración
NAD (Sigma-Aldrich)	200 mM
FAD (Sigma-Aldrich)	10 mM
DTT (Sigma-Aldrich)	1 mM
BSA (Sigma-Aldrich)	75 μ g/ml
CoA (Sigma-Aldrich)	100 μ M
L-carnitina (Sigma-Aldrich)	1 mM
Palmitoil CoA (Sigma-Aldrich)	10 μ M
Palmitoil-CoA ¹⁴C (Amersham Biosciences)	0.3 μ L (15 nCi)
Sacarosa (Panreac)	0.25 M
Tris-HCl 50 mM pH 8	c.s. para 500 μ l

Posteriormente, se realizó una homogeneización en vórtex e inmediatamente incubación a 37°C en un baño María durante 11 minutos. Transcurrido el periodo de incubación, se añadieron 250 μ l de ácido perclórico frío al 7% a cada tubo y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 15.000 rpm durante 2 minutos a 4°C con la finalidad de separar el palmitoil-CoA¹⁴C insoluble del producto de la reacción acetil-

CoA¹⁴C (soluble). Finalmente, para llevar a cabo la lectura de la radioactividad, 500 µl del sobrenadante se transfirieron a un vial conteniendo 7 ml de líquido de centelleo (ref. 6013159, Ultima Gold MV, PerkinElmer). La lectura fue realizada en un contador de centelleo (LKB Wallac, 12a). Los resultados se expresaron en nmol de palmitoil-CoA¹⁴C oxidado/min/mg proteína.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

11. Determinación de los niveles de expresión de mRNA

11.1 Obtención de RNA total a partir de tejido hepático

Para extraer el RNA total a partir de muestras de hígado, se pesaron 60 mg de tejido congelado que se homogeneizó con 1 ml del reactivo de extracción TRIzol[®] (ref. 15596026, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) utilizando un homogeneizador eléctrico Potter-Elvehjem. Las muestras homogeneizadas fueron transferidas a tubos de polipropileno libres de RNAsas y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron a cada tubo 200 µl de cloroformo (Scharlab) seguida de agitación vigorosa durante 15 segundos. Luego se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 G durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo tubo al que se añadió 500 µl de isopropanol (Scharlab) seguida de una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000 G durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet se limpió con 1 ml de etanol frío al 75% (v/v). Las muestras se centrifugaron a 7500 G durante 5 minutos a 4°C y, después de descartar el sobrenadante, se dejó secar el pellet durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se resuspendió el pellet con 150 µL de agua libre de RNAsas (agua tratada con DEPC al 0,1% y autoclavada). Por último, se incubaron las muestras a 60°C durante 10 minutos a 55-60°C y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

11.2 Obtención de RNA total a partir de tejido adiposo

Para la extracción de mRNA a partir de tejido adiposo (blanco y marrón) se utilizó el kit *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (ref. 74804, Qiagen, Düsseldorf, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 50 mg de tejido que se colocaron junto a dos bolas de acero de 5mm en un tubo de 2 ml, al cual se le añadió 1 ml de reactivo Qiazol (reactivo de lisis). Las muestras fueron disgregadas en el molino de bolas *TyssueLyser LT* (Qiagen, Düsseldorf, Alemania) a 50 Hz durante 10 minutos. El lisado obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 μ L de cloroformo (Sharlab), seguido de 15 segundos de agitación vigorosa e incubación durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras se centrifugaron posteriormente a 12.000 G durante 15 minutos a 4°C, y el sobrenadante (fase acuosa) fue transferido a un nuevo tubo. Inmediatamente se agregó 600 μ L de etanol al 70% (4°C) y se homogeneizó durante 3 segundos. La solución resultante se transfirió a las columnas de extracción que fueron centrifugadas a 8.000 G durante 15 segundos. El mRNA retenido en la columna fue lavado a temperatura ambiente con 700 μ L de buffer RW1 (seguida de una centrifugación a 8000G durante 15 segundos) y dos veces con 500 μ l de buffer RPE (seguida de centrifugaciones a 8000G durante 2 minutos). La columna fue transferida a un nuevo tubo colector, se le agregó 30 μ L de agua *RNase free* (Qiagen) y se centrifugó a 8.000 G durante un minuto con la finalidad de retirar el mRNA retenido en la columna y transferir al tubo colector. El filtrado resultante se almacenó a -80°C hasta su utilización

11.3 Obtención de RNA total a partir de músculo

El aislamiento de RNA a partir de músculo fue similar al método de obtención de RNA a partir de tejido hepático con ligeras modificaciones debido a la estructura más fibrosa que presenta el músculo en relación al hígado. El músculo elegido para la obtención de RNA fue cuádriceps. Para ellos, se pesaron 150 mg de tejido congelado y se homogeneizaron con 1 ml de **TRIsure™**, utilizando el disgregador mecánico *Polytron® PT 10-35*. A partir de este punto, el procedimiento fue similar al de la extracción de RNA de tejido hepático con ligeras modificaciones.

La primera fue una centrifuga inicial tras la homogeneización de 12.000 G durante 10 minutos a 4°C, con el objetivo de eliminar material insoluble. La segunda modificación fue una extracción doble clorofórmica, con el fin de limpiar al máximo posibles restos de fenol que posteriormente podrían interferir en la calidad y pureza del RNA extraído. Finalmente, se realizó el lavado del pellet de RNA con etanol al 75% (v/v) y se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNasas (agua tratada con DEPC al 0,1% y autoclavada).

11.4 Cuantificación y valoración de la integridad del RNA

La determinación de la concentración y pureza del RNA extraído se evaluó por espectrofotometría. Para la determinación de la concentración se realizaron lecturas de la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). Adicionalmente, las absorbancias a 230 y 280 nm fueron registradas con la finalidad de valorar la pureza de la muestra. Muestras con valores de 260/280 próximos a 2 se consideran de alta pureza. Valores de hasta 1.7 fueron considerados aceptables para este estudio, debido a que ratios menores indican contaminación por proteínas o compuestos fenólicos. Por su parte, las muestras con valores 260/230 de hasta 1.5 fueron consideradas aceptables para el análisis, valores inferiores la presencia de contaminantes.

11.5 Síntesis de cDNA

La reacción de retrotranscripción permite producir cDNA (DNA de cadena complementaria) a partir de los mRNAs extraídos de las células y los tejidos. Las muestras de cDNA obtenidas son mucho más estables y permiten estudiar la expresión de los genes en el momento específico en que se recolectó la muestra. Esta reacción es catalizada por la enzima transcriptasa reversa, una DNA polimerasa que utiliza cebadores (llamados también *random hexamers*) para iniciar la síntesis de cDNA a partir de todas moléculas de mRNA presentes en las muestras. Además, se proporciona a la reacción diferentes nucleótidos (dNTPs), que permiten la elongación la cadena de cDNA y que junto con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) ayudan a estudiar el nivel de expresión de los genes.

En la **tabla III-4** se detallan los reactivos utilizados para cada reacción de retrotranscripción, así como las proporciones necesarias para un volumen final de reacción de 20 μ L. La mezcla de los reactivos junto con las muestras, fueron preparadas en tubos de polipropileno EppendorfTM y mantenidas en hielo hasta el inicio de la reacción. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en el termociclador MJ Mini- Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) siguiendo el siguiente programa: las primeras etapas de 65°C por 5 minutos, 37°C por 2 minutos y 25°C por 10 minutos permiten la desnaturalización de posibles estructuras secundarias del RNA, seguida de una etapa a 37°C por 50 minutos en la que tiene lugar la retrotranscripción, y una etapa a 70°C por 15 minutos cuyo objetivo es la inactivación de la enzima, y finalmente, las muestras alcanzan la temperatura de 8°C para que posteriormente, el cDNA pueda ser conservado a -20°C.

Tabla III-4. Reactivos y concentración para la reacción de retrotranscripción

Reactivo	Concentración
Random hexamers (Roche)	6.25 ng/ μ L
dNTPs (Sigma-Aldrich)	500 μ M (cada uno)
Tampón 5x <i>First Strand</i> (Invitrogen)	1x (50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂)
DTT (Invitrogen)	10 mM
*M-MLV-RT (Invitrogen)	10 U/ μ L
RNase out (Invitrogen)	1 U/ μ L
RNA total	1-3 μ g
Agua RNase free	c.s. para 20 μ l

*M MLV-RT (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase).

11.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

La técnica de la PCR permite amplificar el número de copias de la secuencia molde de DNA. Durante el proceso primeramente ocurre la desnaturalización del DNA, seguida de la hibridación de los oligonucleótidos específicos o *primers* a sus secuencias complementarias y de la posterior extensión de la cadena de DNA por acción de la enzima DNA polimerasa. Las cadenas resultantes sirven de molde para los siguientes ciclos, obteniéndose de esta forma después de n ciclos, 2ⁿ moléculas de la secuencia de DNA deseada.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o PCR cuantitativa (RT-qPCR) es una variante de la PCR convencional que permite monitorear el progreso de la reacción a través del tiempo y recopilar los datos a medida que está ocurriendo. Cuanto mayor sea el número de copias de inicio de la secuencia molde (cDNA), antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia. En la variante de la técnica de qPCR que hemos utilizado, se añade una sustancia marcada con SYBR® Green, un fluoróforo cuya fluorescencia aumenta en el orden de 1000 veces más cuando se intercala con el DNA bicatenario, lo permite medir la cantidad de producto de PCR a través de los sensores acoplados al termociclador que detectan la señal de fluorescencia. De esta manera se puede medir la tasa de generación de un producto específico, cuya fluorescencia se cuantifica después de cada ciclo de amplificación.

La RT-qPCR fue realizada en placas especiales de 96 pocillos (Applied biosystems, Thermo fisher scientific). A cada pozo se añadió de 10 a 50 ng de la muestra (cDNA), 10 μ L de *Power Sybr® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), 0.4 μ L de la mezcla de *primers forward* y *reverse* a la concentración de 100 nM y cantidad necesaria de agua libre de RNAsas para completar el volumen final de reacción de 20 μ L por pozo. La concentración cDNA de partida fue seleccionada a partir de las curvas de eficiencia de los *primer* para cada gen de interés con el objetivo de optimizar los experimentos.

Los *primers* utilizados fueron diseñados con el *software* Primer3-BLAST (herramienta disponible *on-line* del NIH, *National Library of Medicine*, EEUU) considerando los parámetros de tamaño de amplicón entre 70 a 150 bp, longitud de *primers* entre 20 a 22 bp, la temperatura de *Melting* entre 57 y 63°C y la presencia de unión exón-exón en la secuencia de cada par de *primers* siempre y cuando fuese posible a fin de evitar la amplificación de DNA genómico. Las secuencias de los *primers* utilizados en este trabajo se detallan en la **tabla III-5**.

La reacción fue llevada a cabo en el termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific). Las condiciones utilizadas para la qPCR constaron de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación, donde cada ciclo consistió en 15 segundos de incubación a 95°C, seguidos por las etapas de elongación a 60°C durante 60 segundos y finalmente la etapa de *Melting curve*.

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo por duplicado y fueron normalizadas con genes de referencia mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (TBP para las muestras de hígado, β -actina para las muestras de tejido adiposo, APRT para músculo esquelético).

Tabla III-5. Secuencia de *primers* utilizados en la RT-qPCR para muestras de rata

Gen	Nro. GenBank	Secuencia	Amplicón
<i>β3-AR</i>	NM_013108.2	Forward: 5'-AGA AACTCACCGCTCAACAGG-3' Reverse: 5'-TTCTCCAGAAGTCAGGCTCCTT-3'	88 pb
<i>β-Actin</i>	NM_031144.3	Forward: 5'-GGCCCGAGTTGATTGACTAT-3' Reverse: 5'-CATCCAGCATCTTTGGAATG-3'	111 pb
<i>Acaa2</i>	NM_130433.1	Forward: 5'-CCCTGCTATCATGGGGATCG-3' Reverse: 5'-GAGCAAATGCTTCATTCACGTCT-3'	110 pb
<i>Acs11</i>	NM_012820.2	Forward: 5'-TGTGGGGTGGAAATCATCGG-3' Reverse: 5'-TTGGGGTTGCCTGTAGTTCC-3'	131 pb
<i>Acad1</i>	NM_012819.2	Forward: 5'-CCCGATTGCAAAAAGCCTACG-3' Reverse: 5'-ACTGACGATCTGTCTTGCGA-3'	97 pb
<i>Acs11</i>	NM_012820.1	Forward: 5'-TGTGGGGTGGAAATCATCGG-3' Reverse: 5'-TTGGGGTTGCCTGTAGTTCC-3'	131 pb
<i>Acly</i>	NM_016987.2	Forward: 5'-CCCTTCGTCCCCACAGT-3' Reverse: 5'-TCTCCTTCCCGGTAGCAT-3'	65 pb
<i>Acox1</i>	NM_017340.2	Forward: 5'-GTGAGGCGCCAGTCTGAAA -3' Reverse: 5'-ACTGCTGGGTTTGAAAATCCA-3'	70 pb
<i>Angptl3</i>	NM_001025065.1	Forward: 5'-TACTGTGACACCCAATCAGGCAC-3' Reverse: 5'-CTGTGTCAACACACCCAATAATAC-3'	185 pb
<i>ApoC3</i>	NM_012501.2	Forward: 5'-GCCTGCCAGTTTTATCCCT-3' Reverse: 5'-CACGATGAGGAGCATTCGGG-3'	81 pb
<i>Aprt</i>	NM_001013061.1	Forward: 5'-CCCCTGTATCAGCCTCCTATTCT-3' Reverse: 5'-CCCGGTTCTAAGGCATCTTTC-3'	77 pb
<i>Bax inhibitor1</i>	NM_019381.2	Forward: 5'-CTCACAGCCATGAGACGGAG-3' Reverse: 5'-CCCAGGCCAACTCCTGTAAG-3'	115 pb
<i>Bloc1s1</i>	NM_001105941.2	Forward: 5'-TCTCCACATCCCCGATTTCCCTTA-3' Reverse: 5'-CCAGGCCTACATGAACCAGAG -3'	146 pb
<i>Bip (Grp78)</i>	NM_013083.2	Forward: 5'-TGATAATCAGCCCACCGTAACA -3' Reverse: 5'-CAAATGTACCCAGAAGGTGATTGTC-3'	83 pb
<i>Bsep</i>	NM_031760.1	Forward: 5'-ACGGAACAGTCTGTGGGTTG-3' Reverse: 5'-GACTCCTGCGTAGATGCCAG-3'	71 pb
<i>Catalasa</i>	NM_012520.2	Forward: 5'-CGCCTGTGTGAGAACATTGC-3' Reverse: 5'-TAGTCAGGGTGGACGTCAGT-3'	95 pb
<i>Cd36</i>	NM_031561.2	Forward: 5'-CGTATGGTGTGCTGGACATTG-3' Reverse: 5'-CTTGCATGTAGGAAATGTGGAAGA-3'	79 BP
<i>Chop</i>	NM_001109986.1	Forward: 5'-CCAGCAGAGGTCACAAGCAC-3' Reverse: 5'-CGCACTGACCACTCTGTTTC-3'	127 pb
<i>ChREBPα*</i>	NM_001393706.1	Forward: 5'-AGCATCGATCCGACACTCAC-3' Reverse: 5'-TGTTTCAGCCGAATCTTGTCC-3'	130 pb

<i>ChREBPβ*</i>	NM_133552.2	Forward: 5'-AGCATCGATCCGACACTCAC-3' Reverse: 5'-TGTTTCAGCCGAATCTTGTCC-3'	-
<i>Col6a1</i>	XM_215375.8	Forward: 5'-TCTTGCATCTGGTTGTGGCT-3' Reverse: 5'-ATAGCTCGGAGAGCATTGGC-3'	154 pb
<i>Cpt1a</i>	NM_031559.2	Forward: 5'-TGCAGAACACGGCAAAATGA-3' Reverse: 5'-CCGACCTGAGAGGACCTTGA-3'	70 pb
<i>Cpt1b</i>	NM_013200.2	Forward: 5'-CAGTGTGCCAGCCACAATTC-3' Reverse: 5'-TAGGCTTCGTTCATCCAGCAA-3'	66 pb
<i>Cyp7a1</i>	NM_012942.2	Forward: 5'-TACCTGCAAACTGATGGGGAA-3' Reverse: 5'-GCTTCTGTGTCCAAATGCCTTC-3'	139 pb
<i>Cyp27a1</i>	NM_178847.3	Forward: 5'-GGGGTAGACACGACATCCAA-3' Reverse: 5'-AGCTTTTAGCAGGGGCATGT-3'	159 pb
<i>Dnajb9</i>	NM_012699.3	Forward: 5'-CCAATCGACGCACAGTACAGA-3' Reverse: 5'-TTCCCTCTCCGCTGAGTGA-3'	82 pb
<i>Dgat2</i>	NM_001012345.1	Forward: 5'-GGAACCGCAAAGGCTTTGTA-3' Reverse: 5'-GGAATAGGTGGGAACCAGATCA-3'	65 pb
<i>Dio2</i>	NM_031720.5	Forward: 5'-GTGATGCTGCCCTATGTGTG-3' Reverse: 5'-AACAAATAGGTTTCTGGGAACITTT-3'	62 pb
<i>Edem1</i>	NM_138677.2	Forward: 5'-CCAGCATGGGCTTCTACCAG-3' Reverse: 5'-CCTTGGCCGATGAAGCCAG-3'	119 pb
<i>Ehhadh</i>	NM_133606.1	Forward: 5'-GGCAGGCTAAAGCCCTACAG-3' Reverse: 5'-GTTCCCAAGCCAAGAACGC-3'	133 pb
<i>Elov12</i>	NM_001109118.1	Forward: 5'-TCTCAGGGGAATCCTCACCTT-3' Reverse: 5'-CTGGAGAGAACGAGCTCCAC-3'	81 pb
<i>Elov15</i>	NM_134382.1	Forward: 5'-TGGAACATTTTCGATGCGTCAC-3' Reverse: 5'-TTTGACTCGTGTGTCTCGGG-3'	71 pb
<i>Elov16</i>	NM_134383.3	Forward: 5'-AGCACCCGAAGTGGTATA-3' Reverse: 5'-CCCACAAGGCGTAGTAAGAG-3'	195 pb
<i>F4/80</i>	NM_001007557.1	Forward: 5'-CAGATGGGGGATGACCACAC-3' Reverse: 5'-AACTCTCCGTGGTGTGTCAGTG-3'	116 pb
<i>FadS2</i>	NM_031344.2	Forward: 5'-TCATCGACCGCAGGTCTAC-3' Reverse: 5'-CGGAAGGCATCCGTAGCAT-3'	105 pb
<i>Fas</i>	NM_017332.1	Forward: 5'-CCAACCGGCTCTCTTTCTTCT-3' Reverse: 5'-GGCTAGAGGAGCAGGCTGTGT-3'	72 pb
<i>Fgf21</i>	NM_130752.1	Forward: 5'-CCTTGAAGCCAGGGGTCATT-3' Reverse: 5'-GGATCAAAGTGAGGCGATCCA-3'	100 pb
<i>Gadd34</i>	NM_001304816.1	Forward: 5'-CTGGTCCAGGCAGACCATC-3' Reverse: 5'-CTGTTTGTCTCACACCCAAGG-3'	83 pb
<i>G6Pasa</i>	NM_013098.2	Forward: 5'-GGCTCACTTTCCCATCAGG-3' Reverse: 5'-ATCCAAGTGCGAAACCAACAG-3'	146 pb
<i>Gpx1</i>	NM_030826.4	Forward: 5'-TCGGTTTCCCGTGCAATC-3' Reverse: 5'-TGAGGGAATTCAGAATCTCTTCATT-3'	69 pb
<i>Gck</i>	NM_001270849.1	Forward: 5'-ACTGCCGAGATGATGAAGCA-3' Reverse: 5'-GCCCTTGGTCCAATTGAGGA-3'	70 pb
<i>Gyk</i>	NM_024381.2	Forward: 5'-TGGCCTAATGAAAGCTGGGG-3' Reverse: 5'-AGCACCTGTTCCATACGTG-3'	131 pb
<i>Inos</i>	NM_012611.3	Forward: 5'-CCCAGGAGGAGAGATCCG-3' Reverse: 5'-AGCCATGACCTTCCGATTA-3'	81 pb

<i>IL6</i>	NM_012589.2	Forward: 5'-ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGGAA-3' Reverse: 5'-TGCATCATCGCTGTTTCATACAA-3'	79 pb
<i>Mtp</i>	NM_001107727.1	Forward: 5'-TCTCTGCTGACCCGCATTTT-3' Reverse: 5'-GCTACCGGATCTCATCGGAC-3'	122 pb
<i>Mt-Cyb</i>	AB033702.1	Forward: 5'-CCCTAGTACTATTCTTCCCAGACCT-3' Reverse: 5'-AGGGGGTTAGCGGGTGTAT-3'	64 pb
<i>Mcp1</i>	NM_031530.1	Forward: 5'-CTGTCTCAGCCAGATGCAGTTAA-3' Reverse: 5'-TGGGATCATCTTGCCAGTGA-3'	69 pb
<i>Ldlr</i>	NM_175762.3	Forward: 5'-AGACCCAGAGCCATCGTAGT-3' Reverse: 5'-TTGATCTTGGCAGGTGTCCC-3'	77 pb
<i>Lpk</i>	NM_012624.3	Forward: 5'-GAACATTGCACGACTCAACTTCT-3' Reverse: 5'-CGGATGTTGGCGATGGAT-3'	69 pb
<i>Lpl</i>	NM_012598.2	Forward: 5'-CTGAAAGTGAGAACATTCCCTTCA-3' Reverse: 5'-CGTGTAATCAAGAAGGAGTAGGTT-3'	75 pb
<i>Nlpr3</i>	NM_001191642.1	Forward: 5'-GTGGAGATCCTAGGTTTCTCTG-3' Reverse: 5'-CAGGATCTCATTCTCTTGGATC-3'	70 pb
<i>Nfr2</i>	XM_006234396.2	Forward: 5'-TGAAGACTGTATGCAGCTTTTGG-3' Reverse: 5'-GGCAAGCGACTGAAATGTAGGT-3'	85 pb
<i>Pcsk9</i>	NM_199253.2	Forward: 5'-ACATGTCACAGAGTGGGACG-3' Reverse: 5'-TCCCGGTTACGCATCATAGC-3'	73 bp
<i>Pgc-1α</i>	NM_031347.1	Forward: 5'-CAGAACAAACCCTGCCATTGTT-3' Reverse: 5'-GCTTTTGCTGTTGACAAATGCT-3'	77 pb
<i>Pepck</i>	NM_198780.3	Forward: 5'-ACGGTGGGAACACTCACTGCTTG-3' Reverse: 5'-TGCCTTCGGGGTTAGTTATGC-3'	123 pb
<i>Plin2</i>	NM_001007144.1	Forward: 5'-TCTCGGCAGGATCAAAGACG-3' Reverse: 5'-TCCTGGCGAATTCAATCAGATG-3'	89 pb
<i>Pnpla3</i>	NM_001282324.1	Forward: 5'-AGTCTCCCTCTCGATCACATCA-3' Reverse: 5'-TGTTGAAGAACGGGTGGAGG-3'	94 pb
<i>Pparα</i>	NM_013196.2	Forward: 5'-TGGAGTCCACGCATGTGAAG-3' Reverse: 5'-CGCCAGCTTTAGCCGAATAG-3'	64 pb
<i>Prdm16</i>	XM_032890777.1	Forward: 5'-CGGATGTTCCCAACAAAT-3' Reverse: 5'-ACGCTCTTCTGTGTGGACAA-3'	60 pb
<i>Scap</i>	NM_001100966.1	Forward: 5'-GCCAGAGTGGTATGTGGGTGC-3' Reverse: 5'-CCAGTTGGAATGCTCGGGAC-3'	134 pb
<i>Scd1</i>	NM_139192.2	Forward: 5'-CAGAGCCAGGTGCCACTTTT-3' Reverse: 5'-TGCTAGAGGGTGTACCAAGCTTT-3'	104 pb
<i>Shp</i>	NM_057133.1	Forward: 5'-TGATGGCTCCCAAAACCTCC-3' Reverse: 5'-AGGAATTCTGCCCTGAAGCA-3'	89 pb
<i>Sod2</i>	NM_017051.2	Forward: 5'-CGTCACCGAGGAGAAGTACCA-3' Reverse: 5'-AGGCTGAAGAGCAACCTGAGTT-3'	70 pb
<i>Srebp1c</i>	NM_001276707.1	Forward: 5'-CAGCCCCTAGAATGAGCACTGT-3' Reverse: 5'-AGCGAGTCTGCCCTTGATGAAG-3'	85 pb
<i>Tbp</i>	NM_001004198.1	Forward: 5'-TGGGATTGTACCACAGCTCCA-3' Reverse: 5'-CTCATGATGACTGCAGCAAACC-3'	132 pb
<i>Tnfα</i>	NM_012675.3	Forward: 5'-ATCCGAGATGTGGAAGTGGC-3' Reverse: 5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTA-3'	151 pb
<i>Tlr4</i>	NM_019178.1	Forward: 5'-TTGTTCCCTTTCCTGCCTGAGA-3' Reverse: 5'-TGATCCATGCATTGGTAGGTAATATT-3'	83 pb

<i>Ucp1</i>	NM_012682.2	Forward: 5'-AGACAGAAGGATTGCCGAAACT-3' Reverse: 5'-TCTTGCTTCCCAAAGAGGCAG-3'	150 pb
<i>Ucp3</i>	NM_013167.2	Forward: 5'-AAAGGGACTTGGCCCAACAT-3' Reverse: 5'-GACAGGGGAAGTTGTCAAGTGAA-3'	121 pb
<i>Vldlr</i>	NM_013155.2	Forward: 5'-CCAGGAACAGGACTGCAGAG-3' Reverse: 5'-GCCACCGTTATIGACCAAGC-3'	82 pb
<i>Xbp1s</i>	NM_001271731.1	Forward: 5'-GAGTCCGCAGCAGGTG-3' Reverse: 5'-CGTCAGAATCCATGGGAA -3'	64 pb
<i>Xbp1u</i>	NM_001004210.2	Forward: 5'-TCCGCAGCACTCAGACTACGT-3' Reverse: 5'-ATGCCCAAAGGATATCAGACTC-3'	130 pb

*Extraído de White *et al.*, 2018

12. Ensayo de micro-arrays para PPAR

Con la finalidad de estudiar modificaciones en la expresión de genes relacionados con la vía de señalización de PPAR α , se utilizó el panel de expresión génica PPAR SignArrays® 96 de AnyGenes® (Paris, Francia), exclusivo para *Rattus norvegicus* y personalizado para el instrumento Step One Plus. Este panel permitió analizar 84 genes de interés específicos para la esta vía, con 8 genes de referencia necesarios para la normalización robusta de la qPCR y 4 controles de calidad. Primeramente, se preparó una dilución 1/12 a partir de la muestra de cDNA, utilizando 20 μ l de muestra en un volumen final de 240 μ l de agua ultra pura. El panel SignArrays® 96 fue centrifugado 60 segundos a 1000 G a temperatura ambiente. En un tubo de 2 ml se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente (**tabla III-6**). Utilizando una pipeta multicanal, se colocó 20 μ l de la mezcla en cada pozo, exceptuando los controles que no llevaron el cDNA, cuyo volumen de reacción fue completado con agua ultra pura. Las condiciones de programación utilizadas por cada la qPCR del array fueron a las mismas descritas para la RT-qPCR (ver apartado 11.6). Para el análisis de las CT resultantes se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ con las condiciones referidas por fabricante.

Tabla III-6. Mezcla y proporción de reactivos para las muestras

Reactivos	Volumen por pozo	Volumen para 96 pozos
2X Perfect Master Mix SYBR Green®	10 μ l	1000 μ l
H₂O ultra pura	8 μ l	800 μ l
cDNA diluido a 1/12	2 μ l	200 μ l
Volumen total	20 μ l	2000 μ l

Tabla III-7. Expresión de genes evaluados en el panel de PPAR

Gen	Nro. GenBank	Abreviatura
Acetyl-CoA acyltransferase 2	NM_130433.1	Acaa2
Acyl-CoA dehydrogenase, long chain	NM_012819.1	Acadl
Acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	NM_016986.2	Acadm
acyl-CoA oxidase 1	NM_017340.2	Acox1
acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl	NM_053339.1	Acox3
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820.1	Acs11
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	NM_057107.1	Acs13
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	NM_053623.1	Acs14
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	NM_053607.1	Acs15
adiponectin, C1Q and collagen domain containing	NM_144744.3	Adipoq
angiopoietin-like 4	NM_199115.2	Angptl4
Apolipoprotein A1	NM_012738.1	Apoa1
apolipoprotein A5	NM_080576.2	Apoa5
Apolipoprotein C3	NM_012501.2	Apoc3
Apolipoprotein E	NM_001270681.1	ApoE B3
aquaporin 7	NM_019157.2	Aqp7
CD36 molecule	NM_031561.2	Cd36
clusterin	NM_053021.2	Clu
carnitine palmitoyltransferase 1A	NM_031559.2	Cpt1a
carnitine palmitoyltransferase 1B	NM_013200.1	Cpt1b
carnitine palmitoyltransferase 2	NM_012930.1	Cpt2
cAMP responsive element binding protein 1	NM_134443.1	Creb1
CREB binding protein	NM_133381.3	Crebbp
cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1	NM_178847.3	Cyp27a1
cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	NM_012942.2	Cyp7a1
diacylglycerol O-acyltransferase 1	NM_053437	Dgat1
enoyl-CoA hydratase 1	NM_022594.1	Ech1
enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	NM_133606.1	Ehhadh

elastin	NM_012722.1	Eln
E1A binding protein p300	XM_017595367.1	Ep300
electron transfer flavoprotein dehydrogenase	NM_198742.2	Etfdh
fatty acid binding protein 1	NM_012556.2	Fabp1
fatty acid binding protein 2	NM_013068.1	Fabp2
fatty acid binding protein 3	NM_024162.1	Fabp3
fatty acid binding protein 4	NM_053365.1	Fabp4
fatty acid binding protein 5, epidermal	NM_145878.1	Fabp5
fatty acid binding protein 6	NM_017098.1	Fabp6
fatty acid binding protein 7	NM_030832.2	Fabp7
fatty acid desaturase 2	NM_031344.2	Fads2
FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	NM_024145.2	Fgr
glycerol kinase	NM_024381.2	Gk
hypoxia inducible factor 1 subunit alpha	NM_024359.1	Hif1a
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2	NM_173094.2	Hmgcs2
heat shock protein family D member 1	NM_022229.2	Hspd1
integrin-linked kinase	NM_133409.2	Ilk
Kruppel-like factor 10	NM_031135.2	Klf10
lipin 1	NM_001012111.1	Lpin1
lipoprotein lipase	NM_012598.2	Lpl
mediator complex subunit 1	NM_001134361.1	Med1
malonyl-CoA decarboxylase	NM_053477.1	Mlycd
matrix metalloproteinase 9	NM_031055.1	Mmp9
nuclear receptor coactivator 3	NM_053454.1	Ncoa3
nuclear receptor coactivator 6	NM_001276714.1	Ncoa6
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	NM_031627.2	Nr1h3
oxidized low density lipoprotein receptor 1	NM_133306.2	Olr1
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	NM_198780.3	Pck1
phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	NM_001108377.2	Pck2
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	NM_031081.1	Pdk1

phospholipid transfer protein	NM_001168543.1	Pltp
peroxisome proliferator activated receptor alpha	NM_013196.1	Ppara
peroxisome proliferator-activated receptor delta	NM_013141.2	Ppard
peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_013124.3	Pparg
PPARG coactivator 1 alpha	NM_031347.1	Ppargc1a
PPARG coactivator 1 beta	NM_176075.2	Ppargc1b
peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1	NM_001106363.1	Pprc1
phosphatase and tensin homolog	NM_031606.1	Pten
peptide YY (mapped)	NM_001034080.1	Pyy
retinoid X receptor alpha	NM_012805.2	Rxra
retinoid X receptor beta	NM_206849.3	Rxrb
retinoid X receptor gamma	NM_031765.1	Rxrg
stearoyl-CoA desaturase	NM_139192.2	Scd
sirtuin 1	NM_001372090.1	Sirt1
solute carrier family 22 member 5	NM_019269.1	Slc22a5
solute carrier family 27 member 1	NM_053580.2	Slc27a1
solute carrier family 27 member 2	NM_031736.1	Slc27a2
solute carrier family 27 member 4	NM_001100706.1	Slc27a4
solute carrier family 27 member 5	NM_024143.2	Slc27a5
solute carrier family 27 member 6	NM_001106145.1	Slc27a6
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	NM_001011966.1	Smarcd3
sorbin and SH3 domain containing 1	XM_017589541.1	Sorbs1
SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	NM_031977.1	Src
trimethylguanosine synthase 1	NM_001107904.1	Tgs1
thioredoxin interacting protein	NM_001008767.1	Txnip
uncoupling protein 1	NM_012682.2	Ucp1
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	NM_017101.1	Ppia
actin, beta	NM_031144.3	Actb
TATA box binding protein	NM_001004198.1	Tbp

beta-2 microglobulin	NM_012512.2	B2m
ribosomal protein lateral stalk subunit P0	NM_022402.2	Rplp0
hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_012583.2	Hprt1
transferrin receptor	NM_022712.1	Tfrc
glucuronidase, beta	NM_017015.2	Gusb
solute carrier family 27 member 5	NM_024143.2	Slc27a5
solute carrier family 27 member 6	NM_001106145.1	Slc27a6
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	NM_001011966.1	Smarcd3
sorbin and SH3 domain containing 1	XM_017589541.1	Sorbs1
SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	NM_031977.1	Src
trimethylguanosine synthase 1	NM_001107904.1	Tgs1
thioredoxin interacting protein	NM_001008767.1	Txnip
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	NM_017101.1	Ppia
actin, beta	NM_031144.3	Actb
TATA box binding protein	NM_001004198.1	Tbp
beta-2 microglobulin	NM_012512.2	B2m
ribosomal protein lateral stalk subunit P0	NM_022402.2	Rplp0
hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_012583.2	Hprt1
transferrin receptor	NM_022712.1	Tfrc
glucuronidase, beta	NM_017015.2	Gusb

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

13. Extracción de proteínas

13.1 Obtención de extracto de proteína total de hígado

Para la obtención de proteína total, 100-150 mg de tejido hepático se disgregaron con 1ml tampón de lisis (**tabla III-8**) con ayuda del homogeneizador Potter-Elvehjem. Las muestras homogeneizadas se incubaron en agitación constante a 4°C durante 1.5 h. A continuación, se realizó una centrifugación de 15000 G durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue fraccionado en alícuotas y conservado a -80°C hasta su uso.

Tabla III-8. Reactivos y concentraciones utilizados para el tampón de lisis

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH = 8 (AppliChem)	50 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
Igepal® (Sigma-Aldrich)	1%
NaF (Sigma-Aldrich)	10 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
Nappi (Sigma-Aldrich)	2 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Leupeptina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Na ₃ VO ₄ (Sigma-Aldrich)	1 mM
NaM (Sigma-Aldrich)	10 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	1 µM
Agua ultrapura	c.n.

13.2 Obtención de extracto de proteína nuclear de hígado

La obtención de extracto de proteína nuclear de hígado se realizó utilizando el kit de extracción nuclear de Abcam (ref. ab113474, Cambridge, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por gramo de tejido se añadieron 5 ml de tampón de extracción y se incubó en hielo durante 15 min. A continuación, los homogenados se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadió el tampón de extracción para resuspender el *pellet* (extracto nuclear) y se mantuvo en hielo durante 15 minutos con agitación en vortéx (5 segundos) cada 3 minutos. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm a 4 ° C, se recogieron los sobrenadantes que fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

13.3 Obtención de extracto de proteína total de músculo

En cuanto a la obtención de proteínas a partir de músculo esquelético, se pesaron 150 mg de muestra y se homogeneizó con 1 ml tapón de lisis (**tabla III-8**) con ayuda del homogenizador mecánico (Polytron® PT 1200E). Siguiendo el mismo protocolo de extracción utilizado para hígado a partir de este punto. El extracto de proteína fue fraccionado en alícuotas y conservado a -80 ° C hasta su uso.

13.4 Extracto de proteína total a partir de tejido adiposo

Para extraer proteína total de los tejidos se pesaron 70 mg de tejido adiposo marrón o blanco y se homogeneizó con 1 ml de buffer de extracción (**tabla III-9**) con ayuda del disgregador TissueLyser LT a 50 Hz por 10 minutos, seguida de una centrifugación a 13,000 G durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se fraccionó en alícuotas que se conservaron a -80 ° C hasta su uso.

Tabla III-9. Buffer de extracción para tejido adiposo

Reactivo	Concentración
Hepes pH = 8 (AppliChem)	30 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
Glicerol (Sigma-Aldrich)	10%
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)	1%
Desoxicolato de sodio (DOC)	0.5%
Cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™, Roche, ref. 11697498001)	1 unidad por cada 50 ml de buffer de extracción
Inhibidor de fosfatasa (PhosSTOP™, Roche, ref. 04906837001)	1 unidad por cada 10 ml de buffer de extracción

14. Determinación de la concentración de proteína

Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método Bradford (1976) adaptado a la lectura en microplaca. El ensayo se basa en la formación de un complejo entre la proteína y el colorante azul de Coomassie G-250, momento en el cual ocurre el viraje de la coloración de del reactivo de marrón un tono azulado. La intensidad de la absorción del producto de reacción a la longitud de onda de 595 nm es proporcional a la concentración de la proteína que se determina por interpolación en una recta de calibrado preparada con concentraciones conocidas (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 µg/µl) de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) como patrón. Para el método en microplaca primeramente se realizó una dilución 1:5 del reactivo de Bradford en agua bidestilada. Luego en cada pozo se agregaron 10 µl de la solución patrón o de la muestra y 190 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro de microplaca (Bio-Rad, Benchmark plus).

15. Ensayo de Western blot

A fin de analizar las modificaciones en la expresión proteica en los diferentes tejidos se utilizó la técnica de *Western blot*. Esta técnica permite la separación y posterior visualización de proteínas mediante 3 pasos principales: separación de electroforesis en función de su peso molecular, transferencia de proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinideno (PVDF) y detección de las proteínas por inmunoquimioluminiscencia.

15.1 Electroforesis

Para la electroforesis se utilizaron geles de poliacrilamida (PAGE) llevado a cabo en condiciones de desnaturalización en presencia de SDS (dodecilsulfato sódico). Estos geles estaban constituidos de dos fases: un gel concentrador y uno separador. El gel concentrador se elaboró con un porcentaje bajo de acrilamida-bisacrilamida (3-5%) a fin de concentrar las proteínas en una banda fina y definida, y un gel separador, más concentrado (8-12%), el cual permitió la separación de las proteínas en función de su peso molecular. El porcentaje de cada gel fue definido en función al peso molecular de la proteína a ser analizada. Los reactivos y los volúmenes necesarios para la elaboración de los 2 geles se especifican en la tabla siguiente:

Tabla III-10. Reactivos requeridos para la preparación de los dos geles de SDS-PAGE.

Reactivos	Gel concentrador (4%)	Gel separador (8%)
Acrilamida-bisacrilamida (29:1) 40% (ref. BP1408-1, Fisher Bioreagents)	750 μ l	5.63 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (Applichem)	---	5.63 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6.8 (Applichem)	938 μ l	---
SDS 10%	75 μ l	255 μ l
PSA 10% (Sigma-Aldrich)	45 μ l	300 μ l
Temed (Sigma-Aldrich)	12 μ l	30 μ l
Agua bidestilada	c.s. 7.5 ml	c.s. 22.5 ml

La cantidad de proteína total o de extracto nuclear cargado en los geles se encontró dentro del rango de 10-30 µg de proteína (se realizaron estudios preliminares para determinar la cantidad de proteína a cargar en el gel, con la finalidad de que la relación cantidad de proteína cargada/señal quimioluminiscente fuese lineal), en un volumen final comprendido entre 10-20 µl. La mitad de volumen de carga correspondiente a la proteína fue diluida en el tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y la otra mitad en tampón de carga *Sample Buffer* 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.012% (p/v) y agua bidestilada c.s., de manera que la concentración final del *Sample Buffer* en la muestra fuese 1X. Con la finalidad de desnaturalizar las proteínas, las muestras preparadas fueron llevadas a ebullición durante 5 minutos a 100°C en un baño seco (Techne Dri-block DB-2A). Seguidamente, se cargó el gel de electroforesis, juntamente con un marcador de peso molecular (Precision Plus protein™ *dual color Standards*, Bio-Rad), que permitió determinar la posición de la proteína de interés en el gel. La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de migración Tris base 25 mM, glicina (Applichem) 192 mM, SDS 0.1%, agua bidestilada c.s.), utilizando una fuente de energía (Bio-Rad, PowerPac Basic) a un voltaje constante de 100V y a temperatura ambiente.

15.2 Transferencia de proteínas

Después de la electroforesis, se realizó el proceso de transferencia de las proteínas del gel a una membrana de transferencia PVDF (Inmobilon®-P; Merck Millipore) de tamaño de poro de 0.45 µm, utilizando el sistema *mini Trans-Blot*® (Bio-Rad). La transferencia se realizó a intensidad de corriente constante de 200 mA a 4°C durante 100-120 minutos. La duración de la transferencia fue seleccionada de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés. La composición del tampón de transferencia empleado fue: tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v) y agua bidestilada c.s.

15.3 Inmunodetección de proteínas

A fin de identificar la proteína de interés se realizó la inmunodetección, en la cual se incubaba la membrana con un anticuerpo primario específico y, posteriormente, con un anticuerpo secundario conjugado con un enzima peroxidasa. Después de la transferencia, la membrana se lavó 3 veces con solución de TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM, agua bidestilada, c.s.) con un 0.1% (v/v) tween®20 (TBS Luego, se bloqueó con solución de un 5% (p/v) de leche desnatada en TBS-T o para proteínas fosforiladas la solución de bloqueo comercial WestVision (ref, SP-7000, Vector – Palex Medical SA, Barcelona, España), durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos utilizados y sus condiciones de incubación se resumen en la **tabla III-11**. El tiempo de incubación utilizado para la incubación de los anticuerpos primarios fue durante noche (12 horas) a 4°C, mientras que los anticuerpos secundarios fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se agregó el reactivo ECL (Pierce™ ECL Western, Blotting Substrate, ref: 32106, Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) o ECL plus (Immobilon® Western, Chemiluminescent HRP Substrate, ref. WBKLS0500, Millipore, Burlington, MA, EEUU), que mediante una reacción de quimioluminiscencia permitió visualizar la proteína. El revelado de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo con el ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad) y su cuantificación mediante el *software* Image Lab® (Bio-Rad).

Tabla III-11. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas

Antígeno	Casa comercial (ref.)	Origen	Dilución final
Anticuerpos primarios			
ACC	Cell Signaling (# 3662)	Rabbit	1:1000
Phospho-ACC (Ser ⁷⁹)	Cell Signaling (# 3661)	Rabbit	1:1000
β -Actina	Sigma Aldrich (A5441)	Mouse	1:2500
AKT	Cell Signaling (# 9272)	Rabbit	1:1000
Phospho-AKT (Ser ⁴⁷³)	Cell Signaling (# 4058)	Rabbit	1:1000
AMPK α	Cell Signaling (# 2532)	Rabbit	1:1000
Phospho-AMPK α (Thr ¹⁷²)	Cell Signaling (# 2535)	Rabbit	1:1000
β 3-AR	Santa Cruz (sc-515763)	Mouse	1:1000
AS160	Cell Signaling (# 2670)	Rabbit	1:1000
Phospho-AS160 (Thr ⁶⁴²)	Cell Signaling (# 8881)	Rabbit	1:1000
ATF6	Cell Signaling (# 3662)	Rabbit	1:500
ACLY	Cell Signaling (# 4332)	Rabbit	1:1000
Beclina1	Abcam (ab16998)	Rabbit	1:1000
ChREBP (P-13)	Santa Cruz (sc-21189)	Goat	1:1000
CYP7A1 (E-10)	Santa Cruz (sc-518007)	Mouse	1:1000
FAS (A-5)	Santa Cruz (sc-55580)	Mouse	1:1000
Fructoquinasa (KHK)	Santa Cruz (sc-50029)	Rabbit	1:1000
FXR (H-130)	Santa Cruz (sc-13063)	Rabbit	1:1000
GAPDH	Millipore (MAB374)	Mouse	1:1000
HNF4 α	Santa Cruz (sc-6556)	Rabbit	1:1000
IRE1 α (14C10)	Cell Signaling (# 3294)	Rabbit	1:1000
Phospho-IRE1 α (Ser ⁷²⁴)	Abcam (ab48178)	Rabbit	1:500
IRS-2 (M-19)	Santa Cruz (sc-1555 R)	Rabbit	1:1000
JNK	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
Phospho-JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵)	Santa Cruz (sc-6264)	Mouse	1:1000
Lipina-1	Abcam (ab181389)	Rabbit	1:1000
LDLR	Santa Cruz (sc-18823)	Mouse	1:1000

LC3BII/I	Cell Signaling (# 2775S)	Rabbit	1:1000
MTTP	Santa Cruz (sc-135994)	Mouse	1:1000
mTOR	Santa Cruz (sc-8319)	Rabbit	1:1000
Phospho-mTOR (Ser²⁴⁸¹)	Millipore (09-343)	Rabbit	1:1000
PERK	Santa Cruz (sc-13073)	Rabbit	1:1000
Phospho-PERK (Thr⁹⁸¹)	Santa Cruz (sc-32577)	Rabbit	1:1000
PEPCK-C (I-17)	Santa Cruz (sc-74823)	Rabbit	1:1000
PGC1-α	Cayman (101707)	Rabbit	1:1000
PNPLA3	Invitrogen (# PA5-117066)	Rabbit	1:1000
PPARα	Biovision (3585-100)	Rabbit	1:1000
PPARβ/δ (C-20)	Santa Cruz (sc-1983)	Goat	1:500
PPARγ (H-100)	Santa Cruz (sc-7196 X)	Rabbit	1:10.000
Phospho-PKD/PKCμ (Ser⁹¹⁶)	Cell Signaling (#2051)	Rabbit	1:1000
PKD/PKCμ (D4J1N)	Cell Signaling (#90039)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKD/PKCμ (Ser^{744/748})	Cell Signaling (#2054)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKC (pan) (βII Ser⁶⁶⁰)	Cell Signaling (#9371)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKCα/β II (Thr^{638/641})	Cell Signaling (#9375)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKCδ (Thr⁵⁰⁵)	Cell Signaling (#9374)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKCδ/θ (Ser^{643/676})	Cell Signaling (#9376)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKCθ (Thr⁵³⁸)	Cell Signaling (#9377)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKCζ/λ (Thr^{410/403})	Cell Signaling (#9378)	Rabbit	1:1000
p62/SQSTM1	Abcam (ab56416)	Mouse	1:1000
Receptor de insulina β (CT-3)	Santa Cruz (sc-57342)	Mouse	1:1000
SHP (S-13)	Santa Cruz (sc-22040)	Goat	1:500
SREBP1c	Santa Cruz (sc-366)	Rabbit	1:500
TBP	Sigma Aldrich	Mouse	1:2500
β-tubulina	Sigma Aldrich	Mouse	1:2500
UCP1 (A-6)	Santa Cruz (sc-518024)	Mouse	1:1000
UCP3	Santa Cruz (sc-7756)	Goat	1:500
Vinculina	Santa Cruz (sc-73614)	Mouse	1:10.000

VLDLR(6A6)	Santa Cruz (sc-18824)	Rabbit	1:500
XBP1	Santa Cruz (sc-32138)	Goat	1:500
Anticuerpo secundario			
Anti-Goat IgG HRP	Santa Cruz (sc-2020)		1:3000
Anti-Mouse IgG HRP	Sigma Aldrich (NA931V)		1:3000
Anti-Rabbit IgG HRP	Sigma Aldrich (NA934V)		1:3000

16. Ensayo de actividad funcional del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR)

La determinación de la actividad funcional del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR) se realizó utilizando kits comerciales de células reporteras para la luciferasa (INDIGO, Biosciences - Pensilvania, EE. UU.). Estos kits utilizan células de mamíferos no humanos que expresan el promotor de PPAR vinculado a la enzima luciferasa. De esta manera, la actividad funcional de PPAR será proporcional a la intensidad de la luminiscencia medida partir de una reacción catalizada por esta enzima. La luciferasa cataliza la mono-oxidación de D-luciferina, en una reacción dependiente de Mg^{+2} que consume O_2 y ATP como co-substratos, y rendimientos como productos oxiluciferina, AMP, PPI, CO_2 y emisión de fotones.

El análisis se realizó utilizando kits específicos de 96 pocillos para PPAR α y PPAR γ de ratas y, por otra parte, un único kit específico de 96 pocillos distribuidos para PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ de humanos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este ensayo las células reporteras fueron previamente incubadas durante 6 horas en una placa de 96 pocillos proveída por el kit. Posteriormente, el medio fue descartado, y las células fueron tratadas con el fármaco y con los agonistas de referencia diluidos en un medio especial proveído por el kit, durante un periodo de 24 horas. Finalmente, el medio fue descartado y se agregó el reactivo de detección de la luciferasa. La intensidad de luminiscencia de la reacción de la enzima se cuantificó utilizando un lector de placas de luminiscencia *Modulus Microplaca* (Turner Biosystems) y se reportó en términos de unidades de luz relativa (RLU). La concentración eficaz 50 (CE50) se calculó utilizando el *software* Statgraphics.

Las concentraciones de BemA utilizadas en todos los ensayos fueron de 0.1, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 1.4 mM. Por otra parte, las concentraciones de los agonistas de referencia utilizados se encontraban establecidas por el fabricante para cada tipo de PPAR y se especifican a continuación:

- **PPAR α de ratas:** 0.412, 1.23, 3.70, 11.1, 33.3, 100 y 300 nM de GW590735.
- **PPAR γ de ratas:** 8.23, 24.7, 74.1, 222, 667, 2000 y 6000 nM de rosiglitazona.
- **PPAR α de humanos:** 0.412, 1.23, 3.70, 11.1, 33.3, 100 y 300 nM de GW590735
- **PPAR β/δ de humanos:** 0.41, 0.123, 0.370, 1.11, 3.33, 10, 30 y 90 nM de GW0742
- **PPAR γ :** 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 nM de rosiglitazona.

17. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos de los ensayos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de un número de muestras, indicado en cada pie de figura. Las diferencias estadísticamente significativas de dos condiciones se calcularon utilizando el test de t-Student para datos no pareados. En el caso de comparaciones de más de dos condiciones se utilizó ANOVA de una vía (para un solo factor) o de dos vías (dos factores), según corresponda. El contraste *a posteriori* utilizado fue el test de comparaciones múltiples de Šidák. Por otra parte, en el caso de inferencias no paramétricas, se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguida del test de Dunn para las comparaciones múltiples. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el *software GraphPad Prism* versión 7.00. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

ESTUDIO 1: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO HFHFr EN RATAS HEMBRA SPRAGUE-DAWLEY

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) frecuentemente se asocia con la obesidad y con la resistencia a la insulina, aunque una parte importante de los pacientes desarrollan la patología sin sobrepeso, en su mayoría mujeres. El objetivo del primer estudio fue caracterizar un modelo de NAFLD de tipo no obeso en ratas hembra que, a diferencia de otros modelos, emula la etapa inicial del espectro fisiopatológico de la NAFLD, la esteatosis hepática sin inflamación.

1.1 La dieta HFHFr incrementa la ingesta calórica, sin modificar la ganancia de peso corporal

La suplementación con fructosa líquida junto a una dieta rica en grasa (HFD, *high-fat diet*) indujo cambios en el patrón de ingesta calórica sin alterar el peso corporal de las ratas. El análisis del área bajo la curva (AUC, *area under curve*) de la ingesta de líquidos fue similar entre los grupos que consumieron agua, es decir los grupos CT y HFD (**Figura IV-1A**), mientras que las ratas del grupo que consumió fructosa (HFHFr, *high-fat, high-fructose*), tuvieron un incremento significativo del consumo líquido, 2.3 y 3.6 veces superior en relación a los grupos CT y HFD, respectivamente (**Figura IV-1A**). Por otra parte, el consumo global en gramos de dieta sólida disminuyó 0.8 veces ($p < 0.01$) en el grupo HFD en relación al CT, y aún más en el grupo HFHFr en relación al CT (0.5 veces, $p < 0.001$) y HFD (0.7 veces, $p < 0.001$) (**Figura IV-1B**).

La reducción de la cantidad de dieta sólida ingerida en el grupo HFHFr no fue suficiente para compensar el aporte energético proveniente de la fructosa, y por ello estos animales tuvieron la mayor ingesta calórica en relación a los otros grupos de estudio. Considerando el aporte calórico de la solución de fructosa (0.4 kcal/g), y de las dietas estándar (2.9 kcal/g) y HFD (4.4 kcal/g), se calculó el AUC de la ingesta calórica total. El análisis reveló que el grupo HFHFr recibió el mayor aporte calórico (1.6 veces vs CT, $p < 0.001$; 1.3 veces vs HFD, $p < 0.001$), seguido por la ingesta calórica del grupo HFD (1.2 veces, $p < 0.01$) en comparación al grupo CT (**Figura IV-1C**).

Al fin de analizar el efecto de la ingesta calórica sobre el metabolismo, se controló el peso corporal de los animales durante los tres meses de estudio. Los resultados indican que tanto el peso corporal al final del tratamiento (**Figura IV-2A**), así como la ganancia de peso corporal durante el estudio (**Figura IV-2B y IV-2C**) fueron similares en todos los grupos.

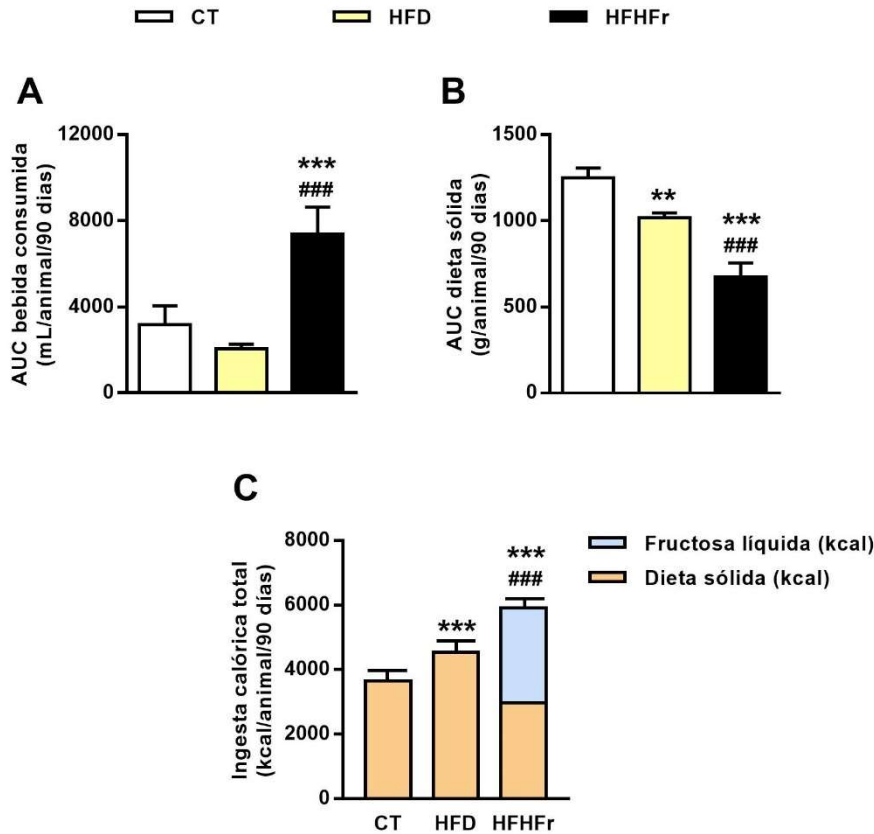


Figura IV-1. Patrón de ingesta dietética de los diferentes grupos experimentales. **(A)** AUC del volumen de líquido ingerido, **(B)** AUC de la cantidad de dieta sólida consumida y **(C)** consumo calórico total durante los 3 meses de estudio en kcal. AUC: *area under curve*, CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). **p<0.01; ***p<0.001 vs CT; ###p<0.01 vs HFHFr.

Por otra parte, en relación a los pesos de los órganos involucrados en el metabolismo, se observó únicamente que las ratas del grupo HFHFr tuvieron un aumento significativo del peso del hígado en relación al grupo HFD (**Figura IV-2D**). Los pesos de los tejidos adiposo blanco subcutáneo (sWAT, *subcutaneous white adipose tissue*) y visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*) al final del tratamiento fueron similares entre los grupos de estudio (**Figura IV-2D**). Estos resultados sugieren en conjunto que la suplementación de fructosa líquida

exacerba los efectos de la dieta HFD sobre la ingesta calórica, aumentando el peso del hígado sin producir cambios en el peso corporal.

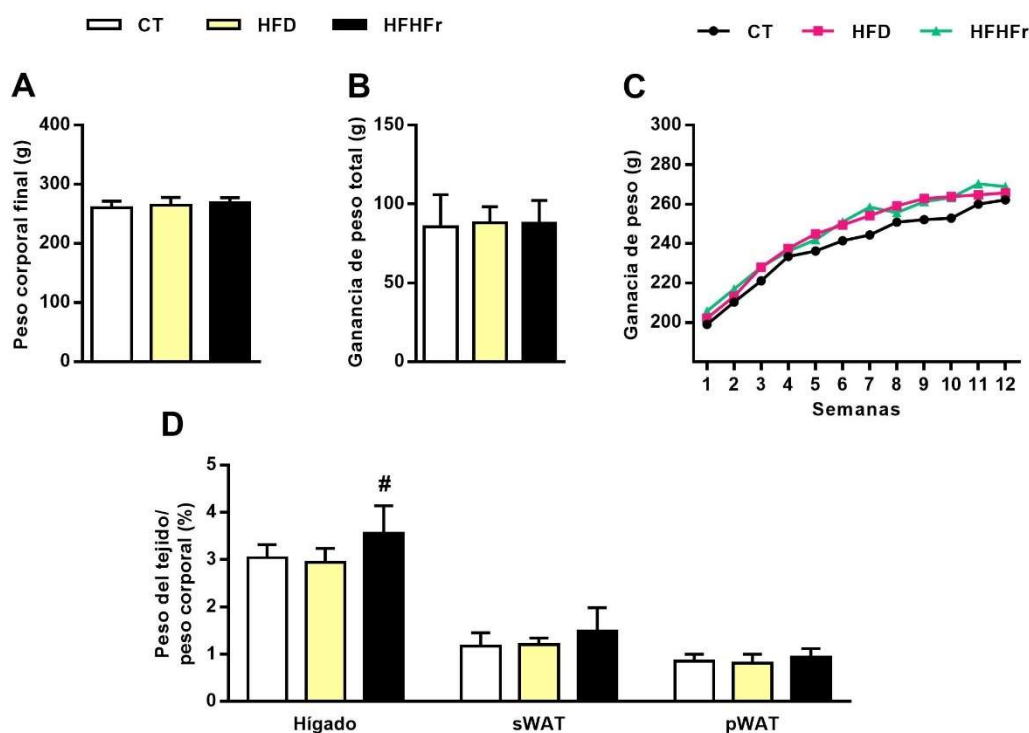


Figura IV-2. Parámetros zoométricos. **(A)** Peso corporal al final del estudio, **(B)** ganancia de peso durante el tratamiento y **(C)** pesos de tejidos relativos al peso corporal en %: peso hígado, peso tejido adiposo blanco subcutáneo (sWAT, *subcutaneous white adipose tissue*) y perigonadal (pWAT, *visceral white adipose tissue*). Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. [#] $p<0.05$ vs HFD.

Respecto a la concentración de especies lipídicas en sangre (**Figura IV-3A** y **IV-3B**), se observó que únicamente los niveles de triglicéridos (TG) del grupo HFHFr se encontraron significativamente elevados en relación al grupo CT (1.7 veces, $p<0.01$) y al grupo HFD (1.7 veces, $p<0.01$). Por otra parte, los niveles sanguíneos de colesterol no se modificaron por ninguna de las intervenciones dietéticas (**Figura IV-3B**). Así mismo, la concentración de ácidos grasos libres (NEFA, *non-esterified fatty acids*) y la de ácidos biliares (BA, *bile acids*) totales (**Figuras IV-3C** y **IV-3D**) medidos en el suero de las ratas en condiciones de ayuno no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

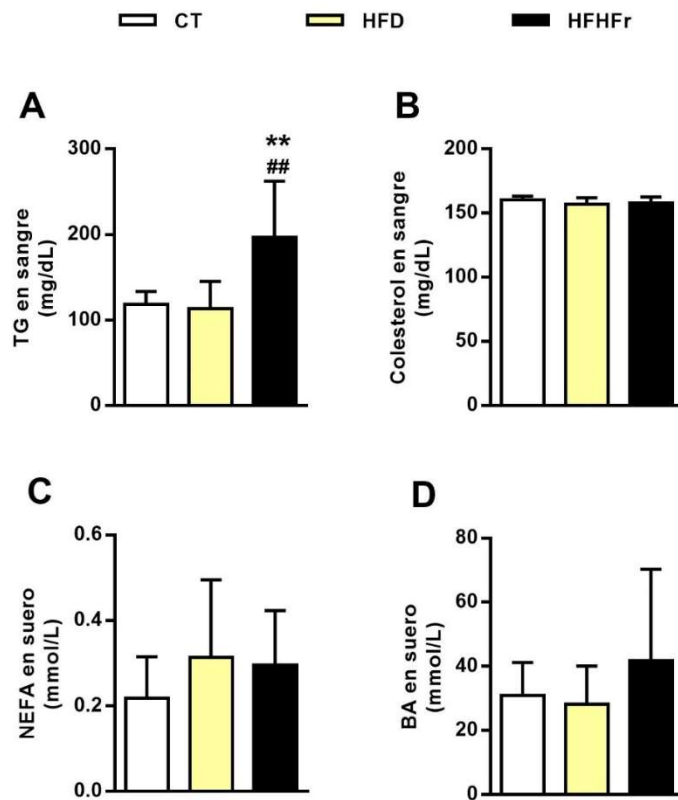


Figura IV-3. Niveles sanguíneos de los parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo lipídico. **(A)** niveles de triglicéridos, **(B)** colesterol y **(C)** niveles de ácidos grasos libres (NEFA, *non-esterified fatty acids*) y **(D)** ácidos biliares (BAs, *bile acids*) totales en suero. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/ high-fructose*. **p<0.01 vs CT; ##p<0.01 vs HFD.

1.2 La adición de fructosa a la dieta HFD incrementa la termogénesis en el tejido adiposo marrón

El hecho de que las intervenciones dietéticas no incrementaran el peso corporal de las ratas a pesar del mayor consumo calórico en relación con la dieta control nos llevó a determinar marcadores de actividad termogénica en tejido adiposo marrón (BAT, *brown adipose tissue*). En la **Figura IV-4A**, se observa que las ratas del grupo HFHFr tuvieron un incremento significativo de 3.9 veces (vs CT, p<0.01) en la expresión de la proteína UCP1 (*uncoupling protein 1*) y de 1.6 veces (vs CT, p<0.01) en la expresión del receptor adrenérgico β_3 (β_3 -AR). Por otro lado, el grupo HFD también evidenció un incremento significativo de 2.7 veces (vs CT, p<0.05) de la expresión de UCP1, así como de 1.6 veces (vs CT, p<0.01) de la expresión proteica de β_3 -AR. En cambio, la expresión de UCP3 se mantuvo similar entre los grupos (**Figura IV-4A**).

Adicionalmente, se determinó la expresión de PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*), un marcador de biogénesis mitocondrial relacionado con la respiración mitocondrial (Alcalá *et al.*, 2017). Como se observa en la **Figura IV-4A**, los niveles de expresión proteica de PGC-1 α se incrementaron significativamente en los grupos HFD (1.5 veces vs CT, $p < 0.05$) y HFHFr (1.8 veces vs CT, $p < 0.01$).

El análisis de la expresión génica de dichos marcadores termogénicos en el BAT evidenció en el grupo HFHFr una tendencia al aumento de la expresión génica de *PGC-1 α* en relación al control (**Figura IV-4B**). En cambio, los niveles de UCP1, UCP3, $\beta 3$ -AR, *Mt-Cyb* y *Prdm16* no se modificaron entre los grupos. Curiosamente, el mRNA de la enzima yodotironina desyodasa 2 (*Dio2*) se encontró significativamente disminuido en el grupo HFD (**Figura IV-4B**).

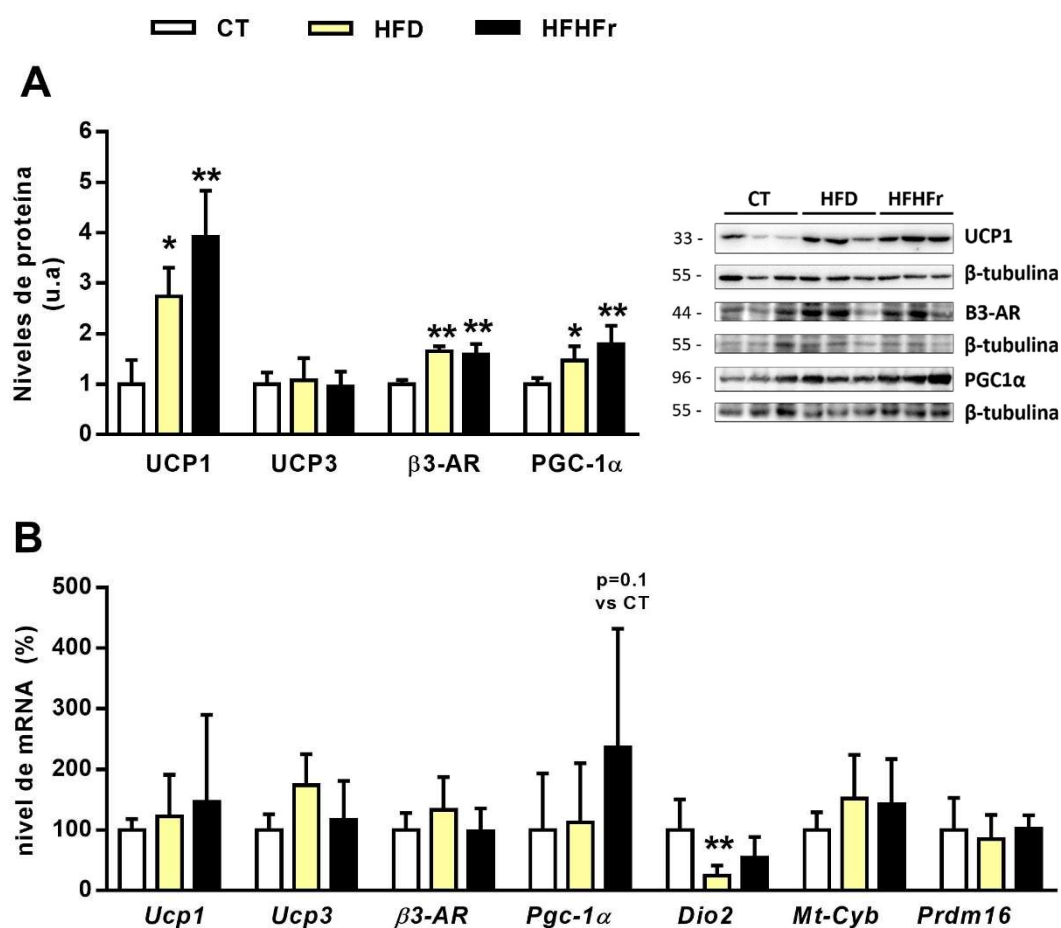


Figura IV-4. Las intervenciones dietéticas activan la termogénesis en BAT (*brown adipose tissue*). **(A)** Niveles de expresión proteica y **(B)** niveles de mRNA de marcadores termogénicos en BAT. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose* * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs CT.

A fin de analizar la termogénesis en el tejido adiposo blanco se determinó la expresión de UCP1 en los extractos proteicos de sWAT y pWAT. Como se muestra en la **Figura IV-5**, a pesar de no observarse cambios significativos en la expresión proteica de UCP1 en el pWAT (**Figura IV-5A**), los niveles de esta proteína se redujeron significativamente en el sWAT del grupo HFHFr (0.5 veces vs CT, $p < 0.01$). Asimismo, se observó una tendencia a disminuir la expresión de UCP1 ($p = 0.06$, vs CT) en el grupo HFD.

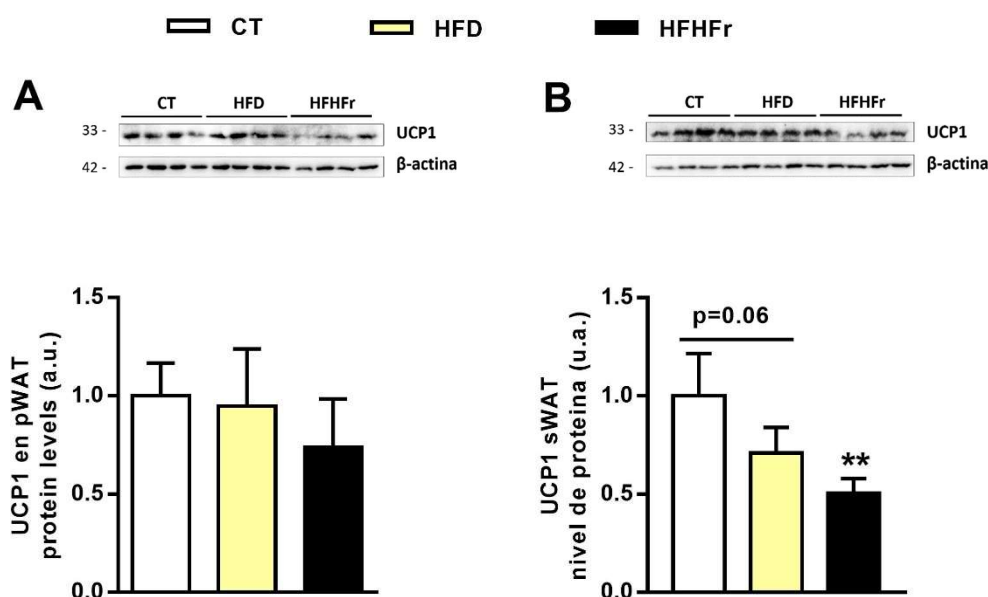


Figura IV-5. Niveles de expresión proteica de UCP1 en los tejidos adiposo blanco perigonadal y subcutáneo. **(A)** Niveles de expresión de UCP1 en pWAT. **(B)** nivel de UCP1 en sWAT. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n = 7-8$ ratas/grupo). UCP1: *uncoupling protein 1*, CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. ** $p < 0.01$ vs CT.

Adicionalmente, se determinaron los niveles séricos de las hormonas adiponectina y leptina, debido al papel que cumplen en la regulación del metabolismo. Los niveles de adiponectina fueron similares en todos los grupos (**Figura IV-6**), a diferencia de la leptinemia, que resultó significativamente incrementada en el grupo HFHFr (1.6 veces, $p < 0.05$) en relación al grupo HFD (**Figura IV-6B**). Por otra parte, los niveles séricos de la entero-hormona FGF15 (*fibroblast growth factor 15*, análogo del FGF19 en humanos) fueron similares entre los grupos CT y HFD. Sin embargo, la dieta HFHFr redujo significativamente ($p < 0.01$) los valores séricos de FGF15 en relación al grupo CT (**Figura IV-6C**).

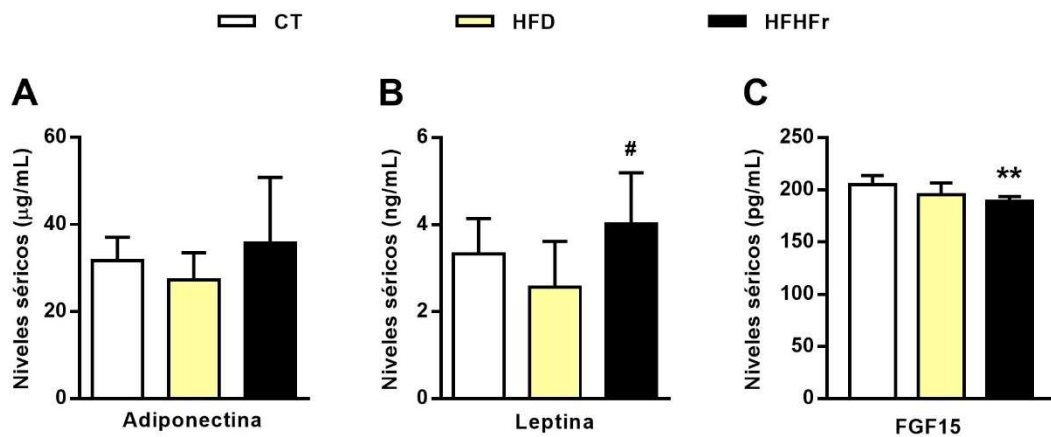


Figura IV-6. Niveles de hormonas metabólicas en suero. Niveles basales de (A) adiponectina, (B) leptina y (C) FGF15 en suero de ratas. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). FGF15: *fibroblast growth factor*, CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. **p<0.01 vs CT, #p<0.05 vs HFD.

1.3 La adición de fructosa líquida a la dieta de ratas mantenidas con HFD potencia la esteatosis hepática sin producir inflamación

El análisis del contenido de lípidos hepáticos y de las imágenes de los cortes histológicos de hígado reveló cambios significativos inducidos por las dietas. Como se observa en la **Figura IV-7A**, aunque la HFD indujo un cierto aumento en el contenido de TG en el hígado, ya sea determinado bioquímicamente (1.6 veces vs CT, p<0.05) o con la tinción histológica Oil Red-O (ORO) (1.8 veces vs CT), la inducción de hígado graso fue mucho más acentuada con la suplementación de fructosa líquida. Los hígados HFHFr presentaron una acumulación significativa de TG hepáticos tanto en el análisis bioquímico (2.3 veces vs CT) como en el análisis de la superficie coloreada positivamente con ORO en los cortes histológicos (11.0 veces vs CT), el *gold standard* para la evaluación de la esteatosis (**Figura IV-7B**).

A pesar de que los pesos de los hígados de las ratas HFHFr se encontraron incrementados, no se observó ningún signo de necrosis hepática en las muestras de los cortes hepáticos teñidos con Hematoxilina & Eosina (H&E) (**Figura IV-7C**) en ninguna de las intervenciones dietéticas en comparación con los controles.

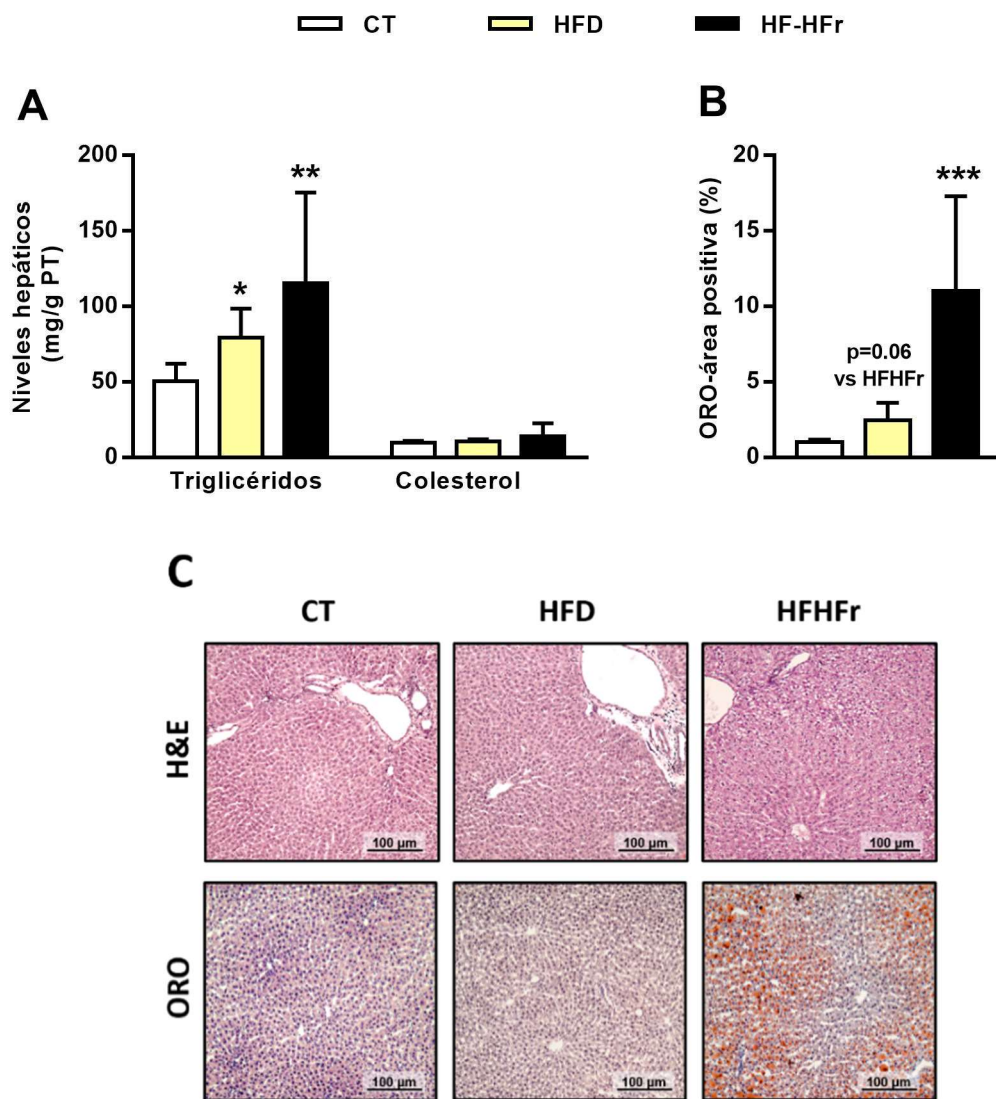


Figura IV-7. Análisis de la esteatosis hepática inducida por las intervenciones dietéticas HFD y HFHFr. **(A)** Niveles de triglicéridos y colesterol hepáticos, **(B)** cuantificación de la tinción ORO expresada como porcentaje de área coloreada positivamente con ORO en relación al área total de la imagen y **(C)** Imágenes de los cortes histológicos de hígado coloreados con la tinción H&E y ORO. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs CT.

1.4 La adición de fructosa es responsable de la inducción de la lipogénesis de *novo* en el grupo HFHFr

Estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraron que la suplementación con fructosa líquida en ratas alimentadas con dieta estándar aumenta la lipogénesis en el hígado, produciendo esteatosis hepática sin inflamación (Baena *et al.*, 2016). A fin de analizar los

efectos de la adición de fructosa a la dieta HFD sobre la DNL, se determinó la expresión génica y proteica de diferentes enzimas que participan de dicha ruta biosintética.

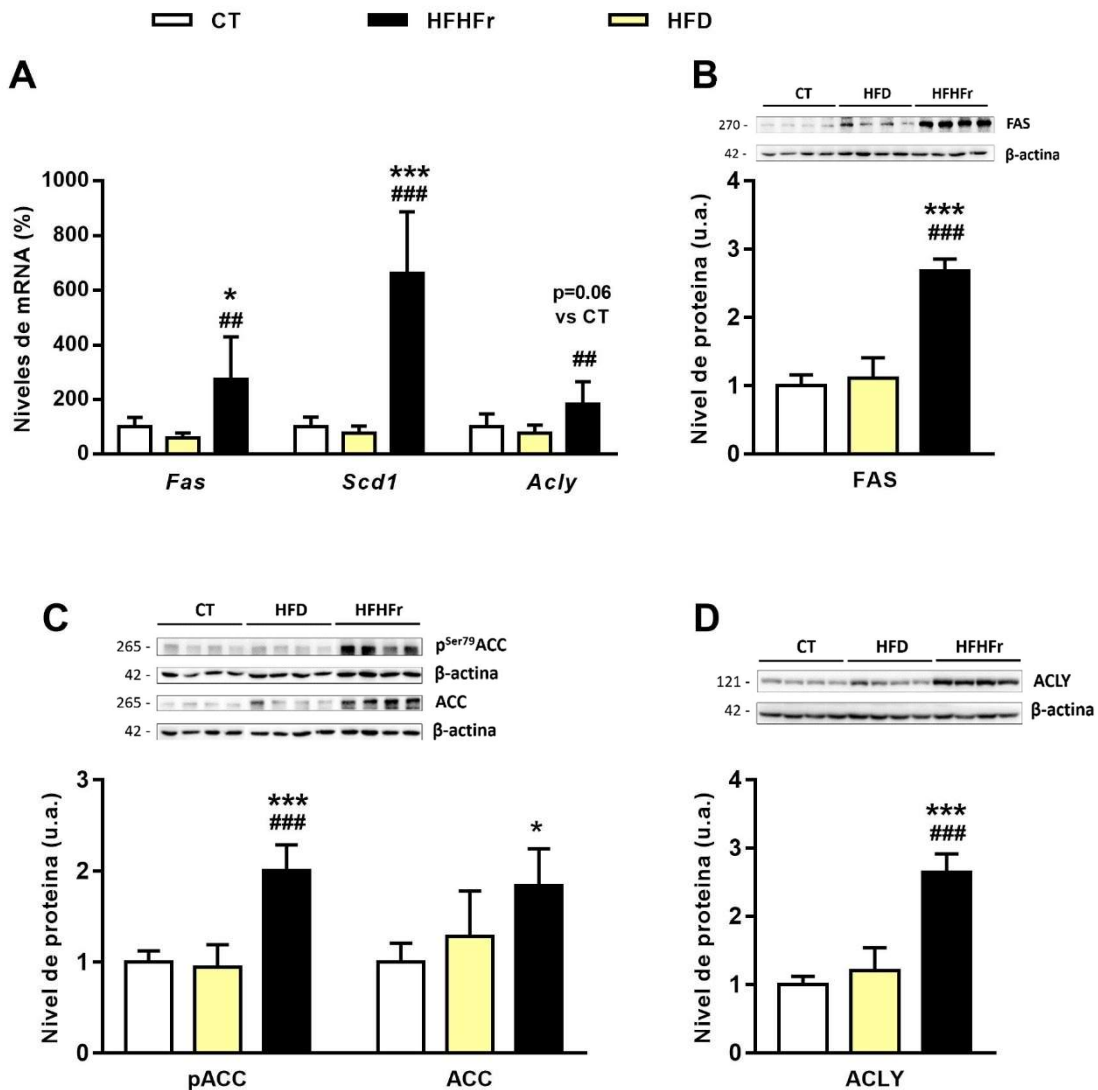


Figura IV-8. Enzimas que participan en la lipogénesis de *ново* hepática. **(A)** Niveles de mRNA de *Fas* (*Fatty acid synthetase*), *Scd1* (*Stearoyl-CoA desaturase-1*) y *Acly* (*ATP citrate lyase*), **(B)** niveles proteicos de FAS, **(C)** ACC y P-ACC y **(D)** ACLY en las muestras de hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. *p<0.05; ***p<0.001 vs CT; ##p<0.01; ###p<0.001 vs HFD.

Los niveles de mRNA correspondientes a los genes *Fas* (*fatty acid synthetase*), *Scd1* (*stearoyl-CoA desaturase-1*) y *Acly* (*ATP citrate lyase*) se encontraron significativamente incrementados en el grupo HFHFr en relación a los grupos CT y HFD, sugiriendo que la adición de fructosa líquida a la dieta HFD es necesaria para inducir la DNL (**Figura IV-8A**). Así mismo, los niveles proteicos de las enzimas FAS, la forma fosforilada (Ser⁷⁹) y total de ACC (*acetyl-CoA*

carboxylase), y *ACLY* aumentaron significativamente en el grupo HFHFr en relación a los grupos control y HFD (**Figura IV-8B, IV-8C y IV-8D**).

Por otra parte, se llevó cabo el análisis de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de las enzimas lipogénicas. En ambas dietas, HFD y HFHFr, se observó un aumento significativo de la forma madura de SREBP1c en extractos hepáticos de proteína total (**Figura 9A**). La forma precursora de SREBP1c por su parte, se incrementó significativamente en el grupo HFHFr (1.9 veces, $p < 0.001$) en relación al grupo CT, sin experimentar cambios significativos en el grupo HFD.

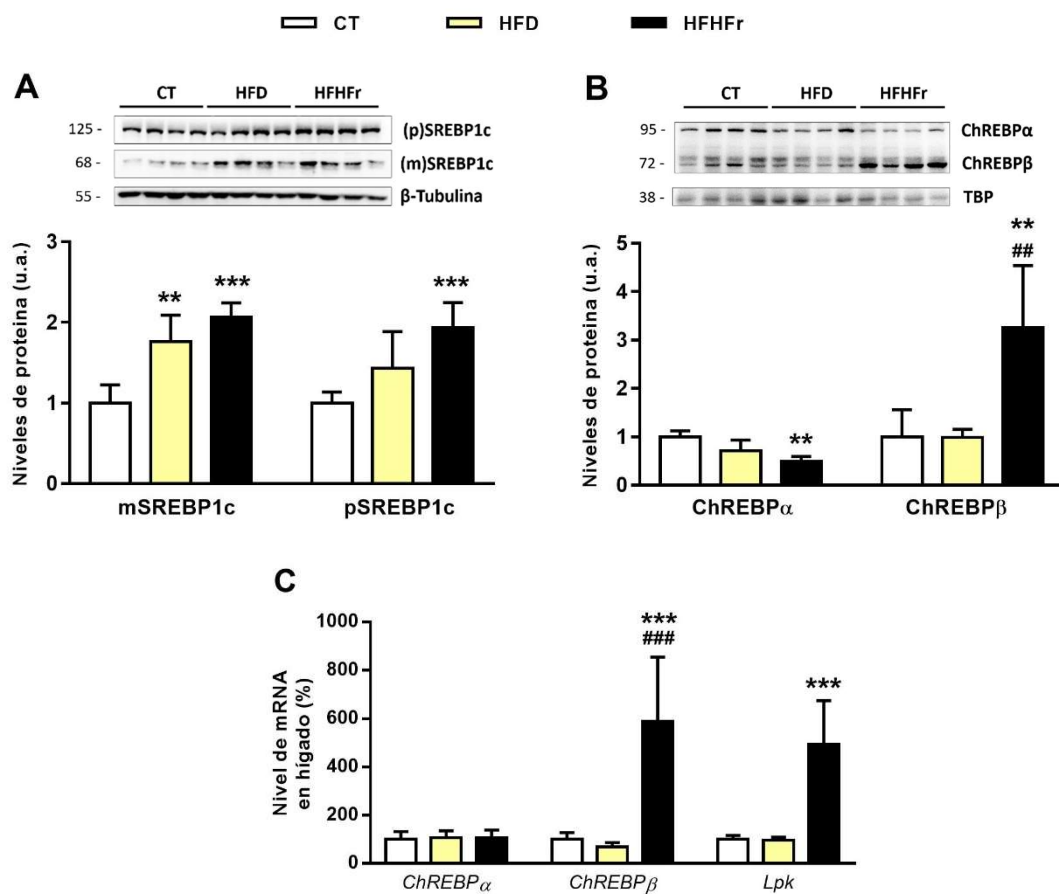


Figura IV-9. Factores de transcripción que regulan la DNL en el hígado. **(A)** Niveles proteicos en hígado de las formas madura y precursora de SREBP1c en proteína total, **(B)** niveles proteicos y **(C)** expresión génica de las isoformas de ChREBPα y ChREBPβ en extracto nuclear. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ /grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *High-fat/ high-fructose*. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs CT. ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs HFD

En el extracto nuclear de las muestras de hígado, la expresión proteica de ChREBPα disminuyó significativamente en el grupo HFHFr (0.5 veces; $p < 0.01$) en relación al control, paralelo al aumento (3.2 veces, $p < 0.01$) de la isoforma ChREBPβ en el grupo HFHFr en

relación al CT y HFD (**Figura IV-9B**). Asimismo, la expresión génica de *ChREBPβ*, así como de su gen diana *Lpk* fueron inducidos en el hígado por la adición de fructosa a la dieta HFD (**Figura IV-9C**). Por otra parte, la dieta HFD no afectó la expresión de ninguna de las isoformas de ChREBP.

El análisis de las concentraciones de los principales ácidos grasos presentes en los TG hepáticos, indicó que en las muestras del grupo HFD (**Figura IV-9A**) el principal cambio detectado fue un aumento en la concentración de los dos ácidos grasos saturados (SFA *saturated fatty acid*) aportados por la dieta, ácido palmítico (16:0) (2.6 veces vs CT) y ácido esteárico (18:0) (7.4 veces vs CT), aunque en el caso del ácido palmítico, no se llegó a alcanzar la significación estadística. Las muestras de hígado de las ratas HFHFr, a pesar de que consumieron menos dieta sólida que las ratas HFD, mostraron un marcado aumento (**Figura IV-9B**) en la concentración de varios ácidos grasos como el palmítico (6.3 veces, $p < 0.001$), el esteárico (13.9 veces, $p < 0.001$), el oleico (18:1 n-9) (17.6 veces, $p < 0.01$), y especialmente el ácido palmitoleico (16:1 n-7) (39.2 veces, $p < 0.001$) en relación al grupo CT, lo que apunta a un claro aumento de la DNL hepática en estos animales.

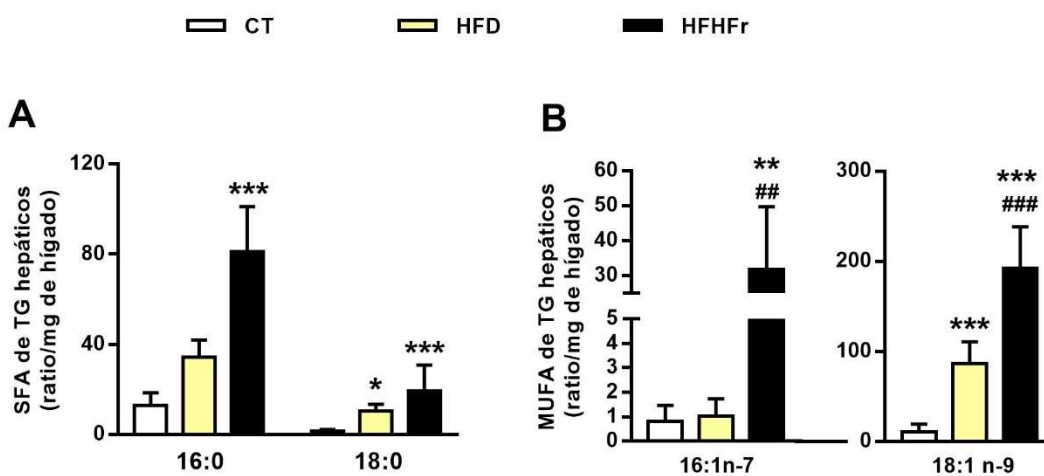


Figura IV-10. Composición de los ácidos grasos de los triglicéridos hepáticos. **(A)** ácidos grasos saturados (SFA) y **(B)** ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) de la fracción de los triglicéridos hepáticos. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs CT; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs HFD.

El palmitato sintetizado *de novo*, como también los lípidos provenientes de la dieta, pueden ser modificados por elongasas y desaturasas ubicadas en el retículo endoplásmico, a fin de producir otras especies lipídicas. Estas enzimas son reguladas coordinadamente con la expresión de las enzimas lipogénicas. Se ha visto que SREBP1c es capaz de inducir la

expresión de la enzima Elovl6 (*elongation of long-chain fatty acid member*) en el hígado, la cual desempeña un papel fundamental en el desarrollo de NAFLD al modificar la composición de los ácidos grasos (Matsuzaka *et al.*, 2012).

En la **Figura IV-11A** se observa que la dieta HFHF_r incrementó los niveles de los mRNA de las *Elovl* tipo 2 (1.9 veces, $p < 0.01$) y tipo 6 (7.0 veces, $p < 0.05$) en relación al control. Adicionalmente, HFHF_r indujo (2.0 veces, $p < 0.05$) la expresión génica de la desaturasa *FadS2* (*Fatty acid desaturase 2*) en relación al CT.

Similar al grupo HFHF_r, el grupo HFD mostró niveles significativamente incrementados de *Elov2* (2.0 veces, $p < 0.01$) y *FadS2* (1.9 veces, $p < 0.05$) en relación al grupo CT. La expresión de *Elov6* no fue afectada por la dieta HFD. Por otro lado, la expresión génica de la *Elov5* no mostró diferencias significativas entre los grupos (**Figura IV-11A**).

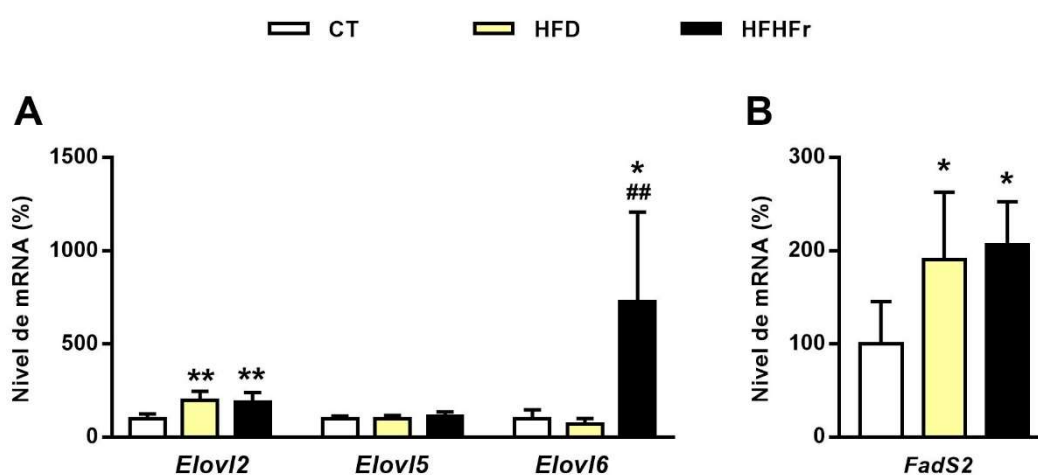


Figura IV-11. Niveles de expresión génica en el hígado de enzimas relacionadas a la elongación de ácidos grasos (A) *Elovl* 2, 5 y 6 (B) y desaturasa *FadS2*. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). *Elovl6*: *elongation of long-chain fatty acid member*. *FadS2*: *fatty acid desaturase 2*, CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHF_r: *high-fat/high-fructose*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs CT; ## $p < 0.01$ vs HFD.

1.5 Efectos sobre el catabolismo de los ácidos grasos en el hígado

A fin de explorar otros mecanismos que podrían modular los niveles de TG hepáticos, se determinó la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos en el hígado. El análisis de los resultados que se muestran en la **Figura IV-12A**, reveló que la actividad de β -oxidación en el hígado de las ratas disminuyó 0.7 veces en el grupo HFHF_r en relación al CT ($p < 0.01$) y 0.6 veces en relación al grupo HFD ($p < 0.001$). Uno de los principales reguladores de la β -oxidación es el factor de transcripción PPAR α , el cual promueve la activación de genes involucrados en la β -oxidación mitocondrial y peroxisómica. Los niveles de mRNA de *Ppara* no se modificaron con ninguna de las intervenciones dietéticas (**Figura IV-12C**).

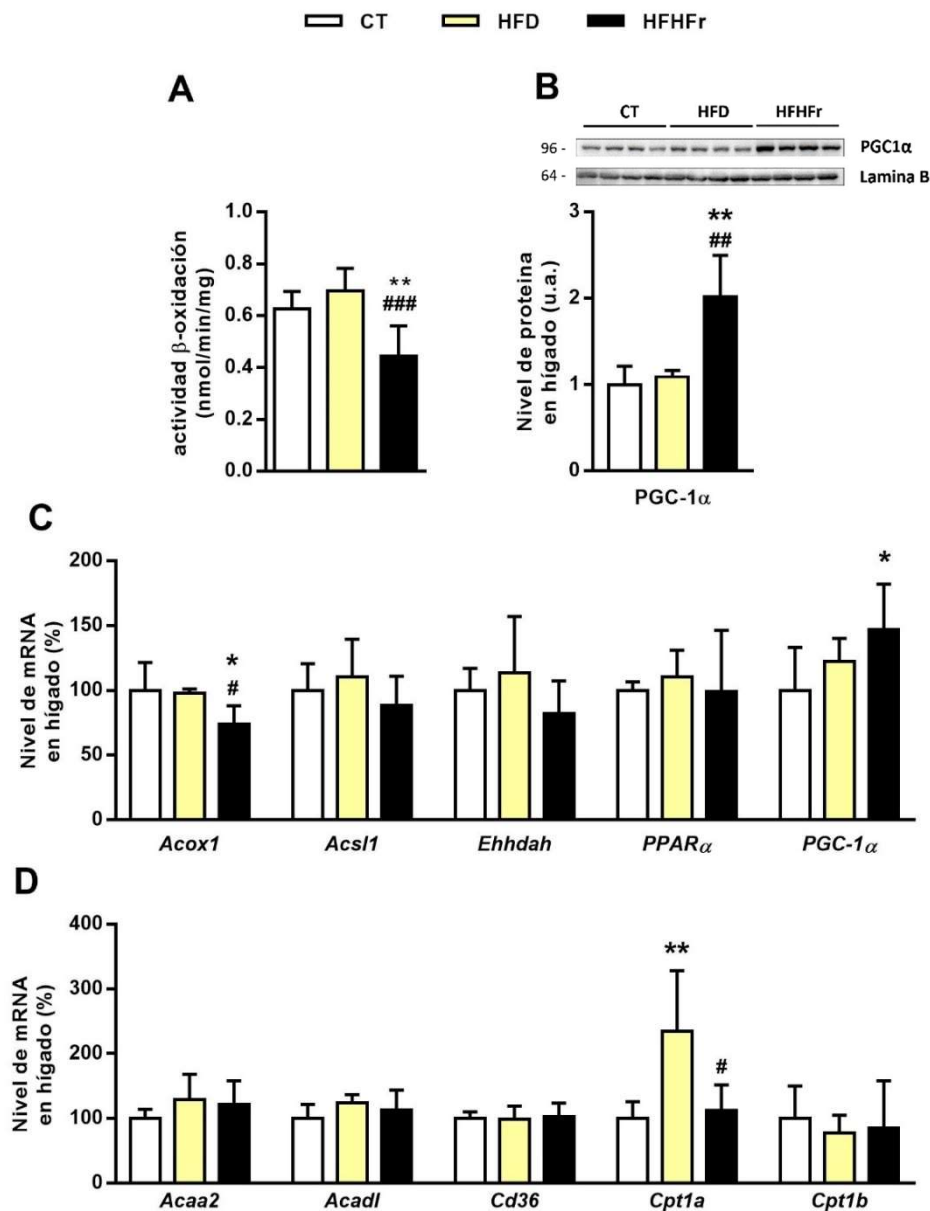


Figura IV- 12. Análisis del catabolismo de ácidos grasos en el hígado. **(A)** Actividad de β -oxidación en el hígado, **(B)** Niveles de expresión proteica de PGC-1 α en extracto nuclear, **(C)** expresión de genes relacionados con la β -oxidación peroxisómica y **(D)** expresión de genes relacionados con la β -oxidación mitocondrial. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. *p<0.05; **p<0.01 vs CT; #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001 vs HFD.

Adicionalmente, cuantificamos la expresión de PGC-1 α hepática, una proteína que no solo es responsable de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo (Austin & St-Pierre, 2012), sino que también juega un papel crucial en la regulación de genes relacionados con la β -oxidación (Muio & Koves, 2007). Tal como se muestra en la **Figura IV-12B**, la expresión proteica de PGC-1 α aumentó significativamente (2 veces vs CT y HFD, p<0.01) en el grupo

HFHFr. Así mismo, el nivel del mRNA de *Pgc-1a* se incrementó 1.5 veces ($p < 0.05$) en el grupo HFHFr en relación al grupo control (**Figura IV-12C**).

Entre los genes que codifican enzimas involucradas en el proceso de β -oxidación peroxisómica se evaluaron la acil Co-A oxidasa 1 (*Acox1*), la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (*Ehhadh*) y la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, miembro de la familia 1 (*Acs1l*). Entre ellas (**Figura IV-12C**), únicamente se observó una disminución significativa (0.7 veces, $p < 0.05$) de la *Acox1* en el grupo HFHFr en relación a los grupos HFD y CT.

Del mismo modo, se evaluó la expresión de otros genes relacionados directa e indirectamente con la β -oxidación mitocondrial: la ácido graso translocasa (*CD36*), la carnitina palmitoil transferasa 1a y 1b (*Cpt1a*; *Cpt1b*), acetil-CoA aciltransferasa 2 (*Acaa2*) y la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (*Acadl*). De este grupo de enzimas mitocondriales, únicamente la CPT1a mostró un aumento significativo en el grupo HFD en relación al grupo CT (2.3 veces, $p < 0.01$), cuyo aumento fue revertido por la adición de fructosa (0.5 veces vs HFHFr, $p < 0.05$). En conjunto, estos resultados indican que la adición de fructosa a la HFD es capaz de disminuir la β -oxidación de los ácidos grasos, tanto mitocondrial como peroxisómica, contribuyendo al acúmulo de lípidos en el hígado.

1.6 Efecto de las intervenciones dietéticas en el transporte de lípidos

Con la finalidad del explorar el transporte de lípidos en el hígado se determinó la expresión génica y proteica de diversos factores implicados en este proceso. En la **Figura IV-13** se observa que los niveles de expresión génica de los receptores para las lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y de muy baja densidad (VLDLR) fueron similares entre todos los grupos. Adicionalmente, se estudió la expresión de *Pcsk9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), un gen que codifica para una proteína que induce la degradación del LDLR y que también puede regular al VLDLR (Stoekenbroek *et al.*, 2019). En nuestro modelo, los niveles PCSK9 fueron similares entre todos los grupos (**Figura IV-13A**). Además, los niveles de *Mttp* (*microsomal triglyceride transfer protein*), un gen que codifica para la proteína MTTP, necesaria para la secreción de VLDL en el hígado, no se modificaron con las intervenciones dietéticas (**Figura IV-13A**).

Además, se analizaron otros genes del metabolismo lipídico que podrían modificarse con las dietas, entre ellas el mRNA de *Pnpla3*, que codifica para una enzima que posee actividad lipasa sobre los TG almacenados en los *lipid droplets* de los hepatocitos (Trépo *et al.*, 2016). Como se observa en la **Figura IV-13A**, únicamente el grupo HFHFr mostró niveles significativamente incrementados (29.2 veces, $p < 0.01$) del mRNA de *Pnpla3* en relación al grupo control y de 18.2 veces más ($p < 0.01$) en relación al grupo HFD. Asimismo, al analizar el nivel de proteína de PNPLA3, esta resultó significativamente incrementada (3 veces, $p < 0.05$) en el grupo HFHFr en relación al CT (**Figura IV-13B**). Estos resultados sugieren que la fructosa induce la expresión de esta enzima en el hígado, lo que aumentaría la lipólisis de los TG hepáticos y favorecería el flujo de lípidos hacia la sangre. Por otra parte, se midió la expresión del gen *Dgat2*, que codifica para la enzima que utiliza específicamente los ácidos grasos provenientes de la DNL para formar los TG. Como se muestra en la Figura 13A, se observó un aumento marginalmente significativo de 1.3 veces del mRNA *Dgat2* en relación a los grupos CT y HFD. Adicionalmente, el nivel de expresión del gen de la Perlipina2 (*Plin2*), un marcador de formación de los *lipid droplets* (Greenberg *et al.*, 1991; Meda *et al.*, 2020), mostró un aumento significativo en el grupo HFHFr en relación al CT (1.6 veces, $p < 0.01$).

Otros factores que podrían alterar la cinética de los lípidos son la angiopoyetina 3 (*Angt13*) y la apolipoproteína C-III (*APOC3*) ambos con actividad inhibitoria sobre la LPL (Khetarpal *et al.*, 2014; Kersten, 2017). Como se observa en la **Figura IV-13A**, los niveles de expresión génica de *Angt13* y *ApoC3* fueron similares entre los grupos experimentales.

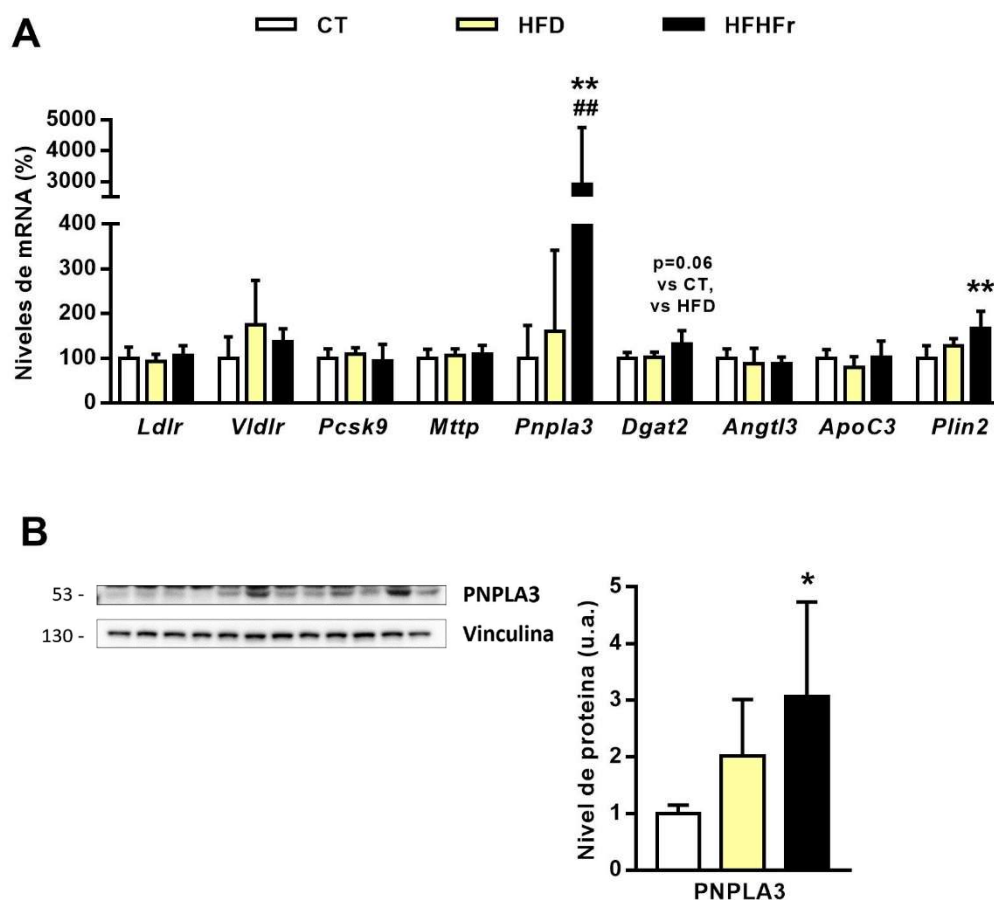


Figura IV-13. Factores relacionados al transporte de lipoproteínas en el hígado. **(A)** Expresión de genes relacionados al transporte de lipoproteínas y **(B)** expresión proteica de PNPLA3 en hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). *Ldlr*: receptor para lipoproteínas de baja densidad, *Vldlr*: receptor para lipoproteínas de muy baja densidad, *Pcsk9*: *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*, *Mttp*: *microsomal triglyceride transfer protein*, *Pnpla3*: *Patatin like phospholipase domain containing 3*, *Dgat2*: *Diacylglycerol O-acyltransferase 2*, *Angt13*: *angiopoyetina 3*, *ApoC3*: *Apolipoproteína C-III*. CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. *p<0.05, **p<0.01 vs CT; ##p<0.01 vs HFD.

1.7 Efecto de las dietas sobre el metabolismo de los ácidos biliares

Los BA también pueden actuar como moléculas de señalización y regular el metabolismo en hígado y tejidos extrahepáticos, así como su propia síntesis (Hylemon *et al.*, 2009). A fin de analizar los factores que controlan los niveles de BA, se estudió la expresión génica y proteica de enzimas que participan en la síntesis de los BA. Como se observa en la **Figura IV-14A** y **IV-14B**, la dieta HFD disminuyó significativamente (p<0.01) los niveles de expresión génica y proteica de la enzima *Cyp7a1* hepática. Por otra parte, los niveles de expresión génica de *Cyp27a1* fueron similares entre los grupos (**Figura IV-14A**).

Se analizaron igualmente los principales factores de transcripción que regulan dicha síntesis. Entre ellos, se exploró la expresión del gen *Shp* (*short heterodimer partner*) y de *Bsep* (*bile salt export pump*). La expresión génica y proteica de SHP, así como la expresión génica de *Bsep*, no se modificó con los tratamientos (**Figura IV-14A y IV-14B**). Por otra parte, en las ratas HFHFr, los niveles del factor nuclear 4 alfa de hepatocito (HNF4 α) se incrementaron marginalmente ($p=0.06$) en relación al control (**Figura IV-14B**). Además, el nivel de expresión del receptor X farnesoide (FXR), un receptor para BA, aumentó significativamente (1.5 veces, $p<0.05$) en el extracto nuclear de las ratas HFHFr, en comparación a los grupos HFD y CT (**Figura IV-14B**).

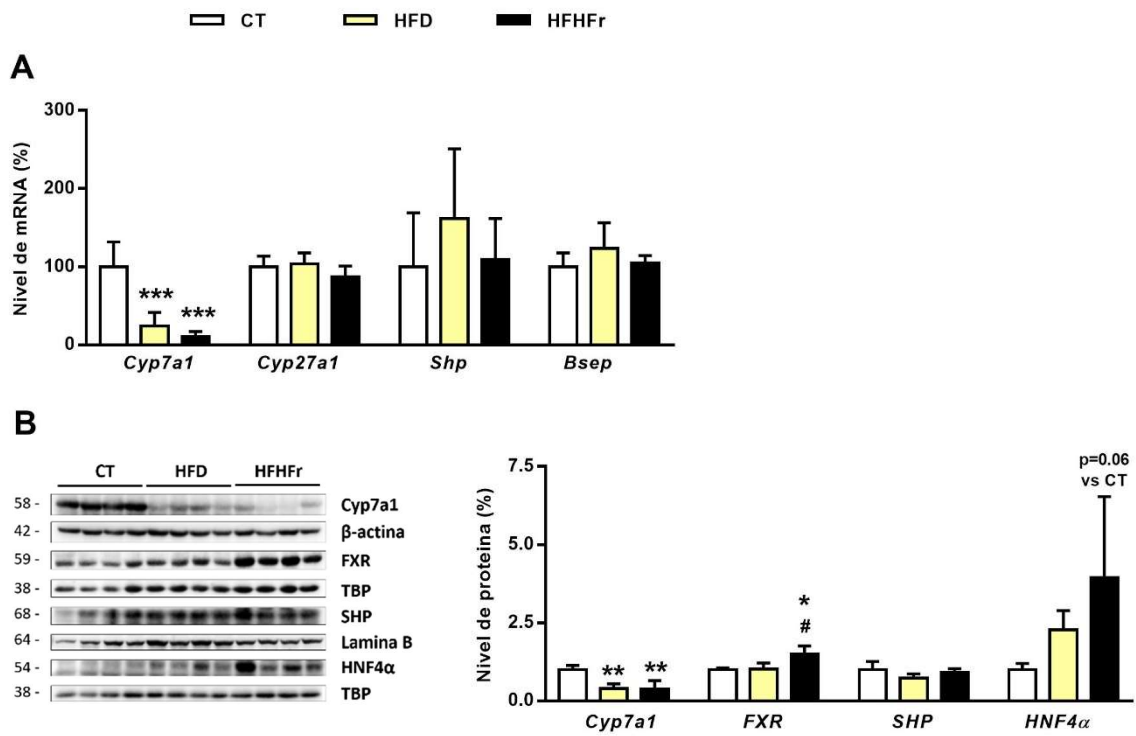


Figura IV-14. Factores que modulan la síntesis de ácidos biliares. **(A)** Expresión génica y **(B)** expresión proteica de genes que regulan el metabolismo de ácidos biliares en el hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD. (n=7-8 ratas/grupo). *Cyp7a1*: *cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1*, *Cyp27a1*: *cytochrome P450 family27 subfamily A member 1*, SHP: *short bet-erodimer partner*, HNF4 α : hepatocyte nuclear factor 4 α , CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs CT; # $p<0.05$ vs HFD.

1.8 La esteatosis hepática en el grupo HFHF_r se desarrolla en ausencia de inflamación

En algunos casos, los pacientes que padecen de esteatosis hepática simple pueden evolucionar a NASH por mecanismos asociados a estrés oxidativo y procesos inflamatorios (Todoric *et al.*, 2020). En la clínica es común observar que los niveles de ALT y AST a menudo aumentan moderadamente en pacientes con hígado graso, indicando un grado de necrosis hepatocitaria asociada a la progresión a NASH (Palmer *et al.*, 1990). Según nuestros resultados, en ambos grupos dietéticos (HFD y HFHF_r), los valores de las transaminasas no resultaron incrementados (**Figura IV-15A** y **IV-15B**), lo que concuerda con las imágenes de la tinción de H&E que no mostraron ningún grado de necrosis (**Figura IV-7**).

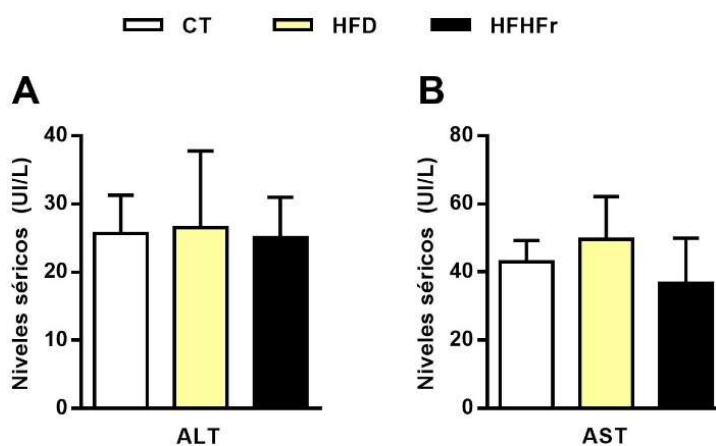


Figura IV-15. Niveles de transaminasas hepáticas en suero. **(A)** alanino transaminasas (ALT) y **(B)** aspartato transaminasas (AST) en el suero de las ratas. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHF_r: *high-fat/high-fructose*.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de marcadores de estrés oxidativo en el hígado (**Figura IV-16A**) como la catalasa (*Cat*), glutatión peroxidasa 1 (*Gpx1*) y superóxido dismutasa 2 (*Sod2*), y marcadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral α (*Tnf α*) y el marcador para macrófagos F4/80 (**Figura IV-16B**). Las únicas modificaciones observadas fueron la disminución significativa de los marcadores de estrés oxidativo *Gpx1* ($p < 0.01$) y *Sod2* ($p < 0.05$) en las ratas suplementadas con HFD y HFHF_r en relación al control. Todos estos resultados en conjunto concuerdan con los valores normales de las transaminasas hepáticas y de colesterol hepático descritos anteriormente, sugiriendo que la esteatosis hepática inducida en los grupos HFD y HFHF_r no se encuentra asociada a un incremento del estrés oxidativo e inflamación hepática.

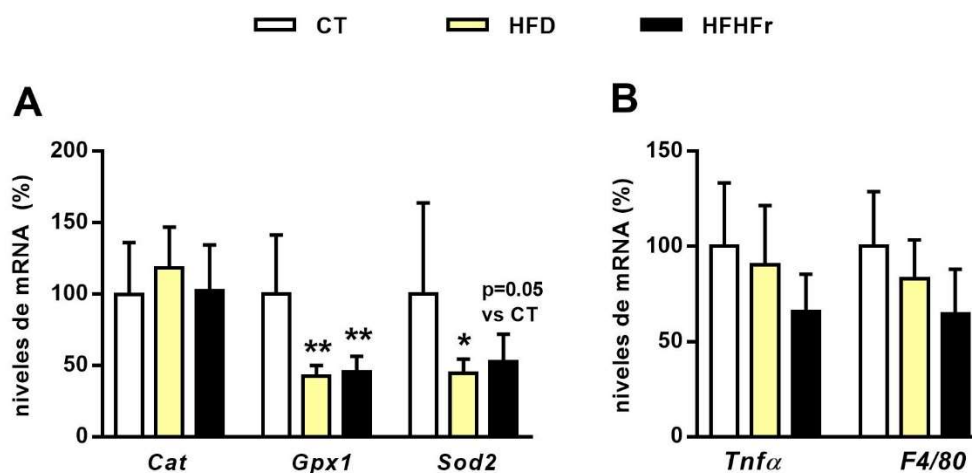


Figura IV-16. Marcadores pro-inflamatorios y de estrés oxidativo. Niveles de mRNA **(A)** de enzimas que participan en el estrés oxidativo y **(B)** de demarcadores pro-inflamatorios. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). *Cat*: catalasa, *Gpx1*: glutatión peroxidasa 1, *Sod2*: superóxido dismutasa 2, *Tnfα*: factor de necrosis tumoral α , CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs CT.

1.9 La adición de fructosa a la dieta HFD activa selectivamente IRE1 α en el hígado

Otra vía que podría estar alterada en el desarrollo de la esteatosis hepática simple es la UPR. A fin de estudiar un posible efecto de las dietas sobre el estrés de retículo endoplásmico, se analizaron las tres ramas principales de la UPR. Se observó que únicamente la dieta HFHFr fue capaz de inducir la fosforilación en Ser⁷²⁴ de la proteína de membrana IRE1 α ($p < 0.001$) en relación a los grupos CT y HFD, sin afectar los niveles de la proteína total (**Figura IV-17A**), lo que indica activación de esta proteína. En cambio, la dieta HFHFr disminuyó los niveles de las proteínas p(Thr⁹⁸¹)-PERK en relación al CT ($p = 0.09$) y PERK total ($p < 0.05$) respecto a los grupos CT y HFD (**Figura IV-17B**). Por otra parte, la expresión de la forma precursora y madura de la proteína ATF6 α permanecieron invariables entre los grupos (**Figura IV-17C**).

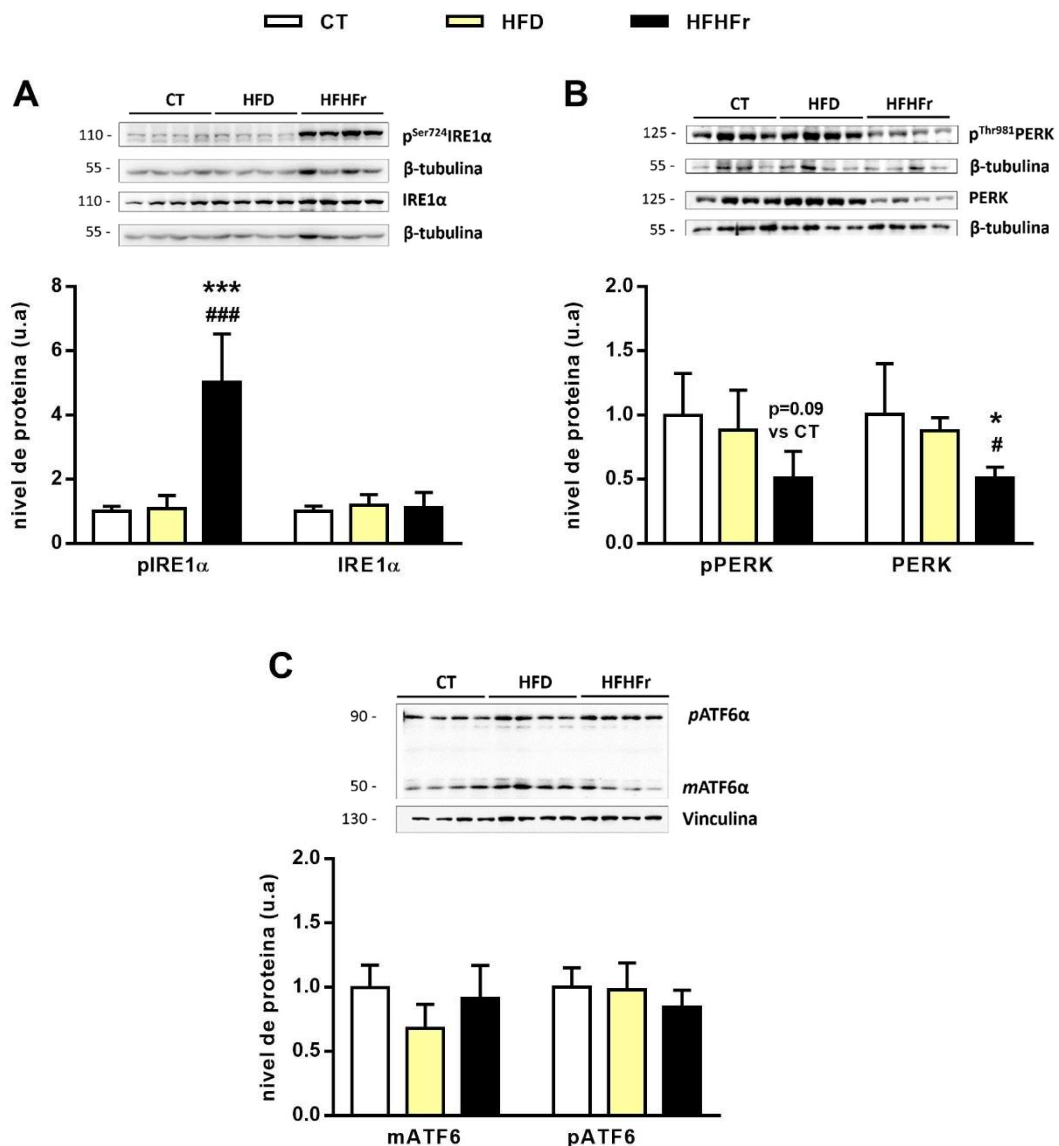


Figura IV-17. Niveles de proteínas de las tres ramas principales de la UPR. **(A)** pIRE e IRE total, **(B)** PERK y P-PERK y **(C)** formas madura y precursora de ATF6 α . Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose* *p<0.05; ***p<0.001 vs CT; #p<0.05; ###p<0.001 vs HFD.

Adicionalmente, con la finalidad de estudiar las consecuencias de dichas modificaciones, se analizaron los niveles de expresión génica de varias moléculas activadas en las vías de señalización mediadas por IRE y PERK. Como se observa en la **Figura IV-18A**, los niveles de mRNA de dichas moléculas no se modificaron significativamente por las dietas. La activación IRE1 α también puede inducir la degradación selectiva de ciertos mRNAs en un proceso denominado RIDD (*regulated IRE1 α -dependent decay*), reduciendo así la importación de proteínas al lumen del RE (Sicari *et al.*, 2020). A fin de evaluar dicho proceso se midió el nivel de expresión de dos mRNA afectados por RIDD, Col6a1 y Bloc1s1 (**Figura IV-18B**),

los cuales no variaron significativamente. En conjunto, estos resultados indican que la activación de IRE observada por HFHFr no se traduce en una activación de la vía clásica de la UPR.

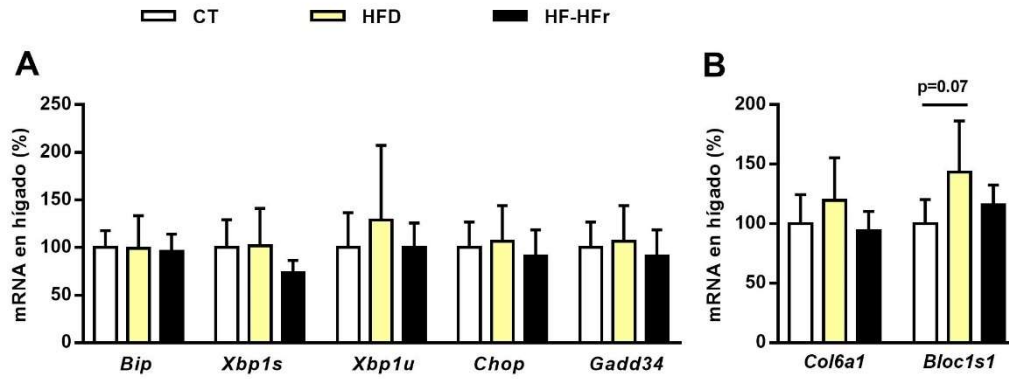


Figura IV-18. Niveles de mRNA de las principales moléculas relacionadas con la activación de (A) IRE y PERK, y (B) la actividad RIDD de IRE. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*

Prosiguiendo con el estudio de la vía de IRE, se analizaron los niveles de expresión de la forma fosforilada y total de JNK. En la **Figura IV-19**, podemos apreciar que tanto p(Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵)-JNK como JNK total fueron similares entre las diferentes intervenciones dietéticas, sugiriendo que la activación de IRE1 α no se produce por esta vía.

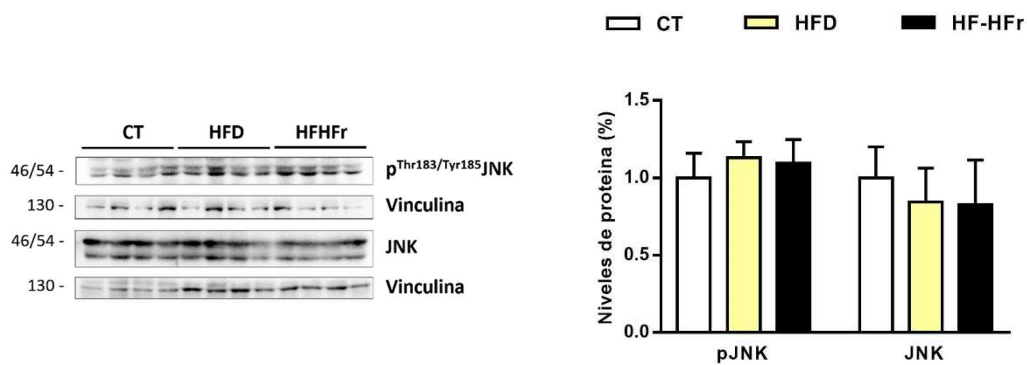


Figura IV-19. Expresión proteica de las forma fosforilada y total de JNK en hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD. (n=7-8 ratas/grupo). JNK: *c-Jun n-terminal kinase*, CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*.

1.10 Efectos de las dietas HFD y HFHFr sobre la sensibilidad periférica a la insulina

Para valorar el posible efecto de las dietas sobre la sensibilidad a la insulina se realizó la medición de parámetros basales vinculados al metabolismo de la glucosa, así como el análisis del test de tolerancia oral a la glucosa (ITOG). Estudios previos de nuestro grupo evidencian que la suplementación sub-crónica de fructosa puede inducir alteraciones en la sensibilidad a la insulina en ratas alimentadas con dieta estándar (Baena *et al.*, 2016).

Los resultados del presente estudio muestran que las intervenciones dietéticas no alteraron los niveles basales de glucosa en ayunas (**Figura IV-20A**). Por otra parte, la suplementación con HFD no alteró los niveles basales de insulina, en cambio, en el grupo HFHFr se observó un incremento de 1.9 veces ($p < 0.05$) de la insulina basal en relación al control (**Figura IV-20B**). El índice de sensibilidad a la insulina (ISI), calculado a partir de los valores de glucosa e insulina basal (Belfiore *et al.*, 1998), indicó que únicamente el grupo HFHFr (**Figura IV-20C**) tuvo una disminución significativa (0.7 veces, $p < 0.05$) de la sensibilidad a la insulina respecto al grupo CT, concordando con el aumento significativo de sus valores basales de insulina.

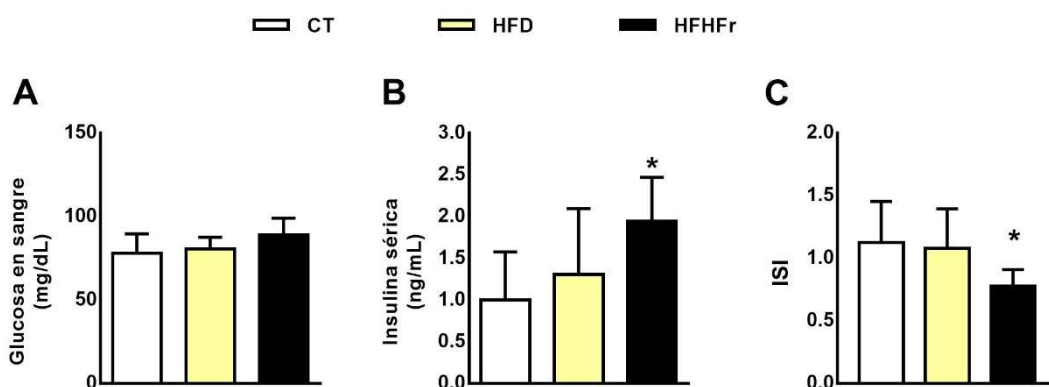


Figura IV-20. Parámetros basales relacionados al metabolismo de la glucosa. **(A)** Concentración basal de glucosa en sangre, **(B)** nivel de insulina sérica e **(C)** índice de sensibilidad a la insulina (ISI). Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, * $p < 0.05$ vs CT.

Igualmente, para profundizar en el efecto de las dietas sobre la sensibilidad a la insulina, una semana antes de finalizar el estudio se realizó un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) en los tres grupos de intervención. Todos los animales mostraron una curva de glucosa, así como una AUC de glucosa similar (**Figura IV-21A y IV-21B**), indicando que los animales son capaces de mantener los niveles de glucosa en un rango normal frente al bolo de glucosa. Sin embargo, al analizar los niveles de insulina correspondiente a la TTOG, se detectó que los animales del grupo HFHF_r presentaron niveles superiores de insulina en el minuto 15 del test (**Figura IV-21C**), indicando una alteración en la respuesta a la insulina en estos animales. Sin embargo, las intervenciones dietéticas no alteraron la AUC de la insulina respecto al grupo CT (**Figura IV-21D**).

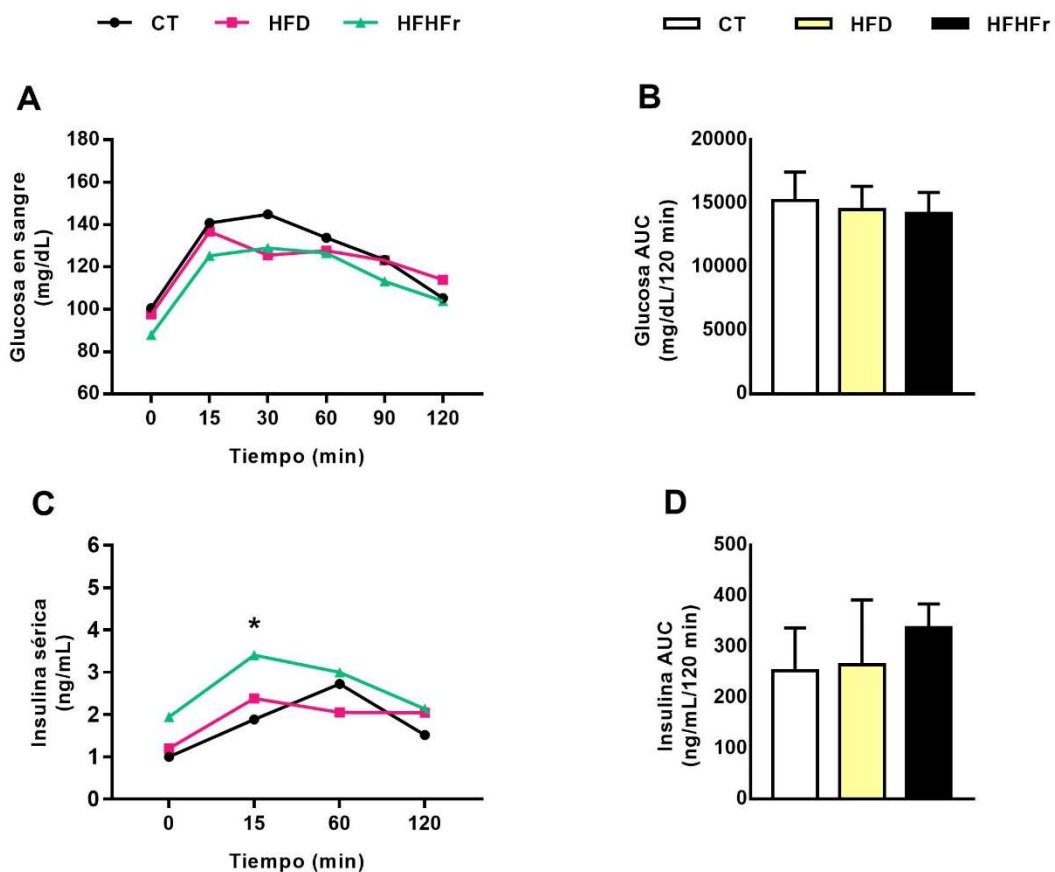


Figura IV-21. Parámetros basales de **(A)** curva de glucosa correspondiente al TTOG, **(B)** AUC de la curva de glucosa, **(C)** curva de insulina del TTOG y **(D)** AUC de la insulina. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa. AUC: *area under curve*. CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHF_r: *high-fat/high-fructose* *p<0.05 vs CT.

La acumulación hepática de diacilgliceroles (DAG) y ceramidas se relaciona con el aumento de la resistencia a la insulina (Perry *et al.*, 2014; Samuel *et al.*, 2019). Con la finalidad de evaluar posibles cambios en la composición de estas especies lipídicas en el hígado se analizó la concentración de las mismas en muestras de homogenado hepático de los animales. Las muestras de hígado de ratas HFD mostraron un mayor contenido en especies de ceramidas que contienen ácidos grasos saturados (C18:0, C20:0 y C22:0), mientras que el contenido de ceramida 24:1 se redujo significativamente (0.60 veces vs CT, $p < 0.05$). Estos cambios fueron totalmente revertidos en las muestras de ratas HFHFr, las cuales mostraron concentraciones de ceramidas similares a las presentadas por el grupo control (**Figura IV-22A**). Por el contrario, las muestras de hígados HFHFr mostraron un aumento significativo en la mayoría de las especies de DAG analizadas en comparación con las muestras de control, especialmente en el caso de DAG 18:1/16:0 (10.0 veces), DAG 16:0/18:0 (7.2 veces), DAG 18:1 (15.5 veces) y DAG 18:0/18:1 (12.6 veces). Las muestras de hígado de HFD presentaron cambios mínimos en las concentraciones de las diferentes especies de DAG estudiadas, excepto en el caso de DAG 18:0/18:1, con un aumento significativo de 10.6 veces en relación a los valores del control (**Figura IV-22B**).

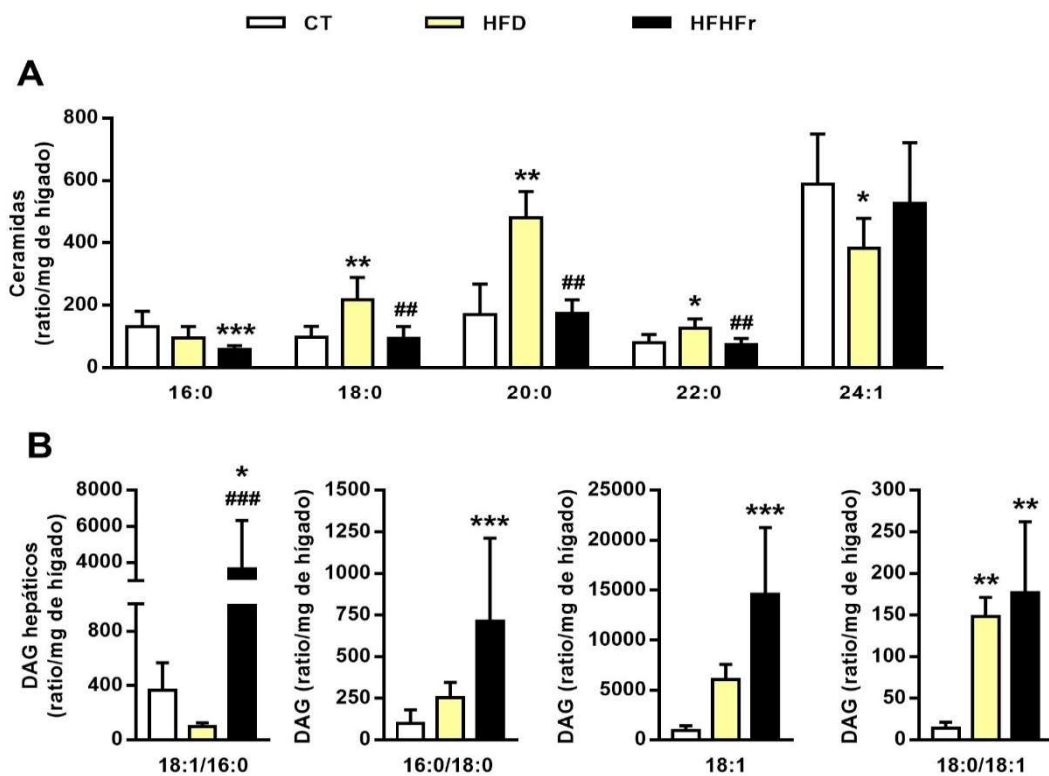


Figura IV-22. Análisis lipídico en homogenado de hígado de rata. **(A)** ceramidas (CER) y **(B)** diacilgliceroles (DAG). Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ ratas/grupo). CT:

control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose* * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs HFD.

Adicionalmente se determinó el grado de activación por fosforilación de varias isoformas de la proteína quinasa C (PKC) en muestras de hígado, un proceso que se ha relacionado directamente con la acumulación de DAG en el hígado y con la producción de resistencia a la insulina hepática (Perry *et al.*, 2014). El único cambio significativo encontrado fue una disminución de 0.60 veces ($p < 0.01$) en la cantidad de la isoforma de fosforilada de Ser⁹¹⁶-PKC μ , también conocida como PKD, en muestras de hígado de rata HFHFr frente a muestras control (**Figura IV-23A**). Por tanto, a pesar de aumentos significativos en las concentraciones de DAG en hígados de ratas HFHFr, estos cambios no dieron como resultado la activación de ninguna de las isoformas de PKC estudiadas.

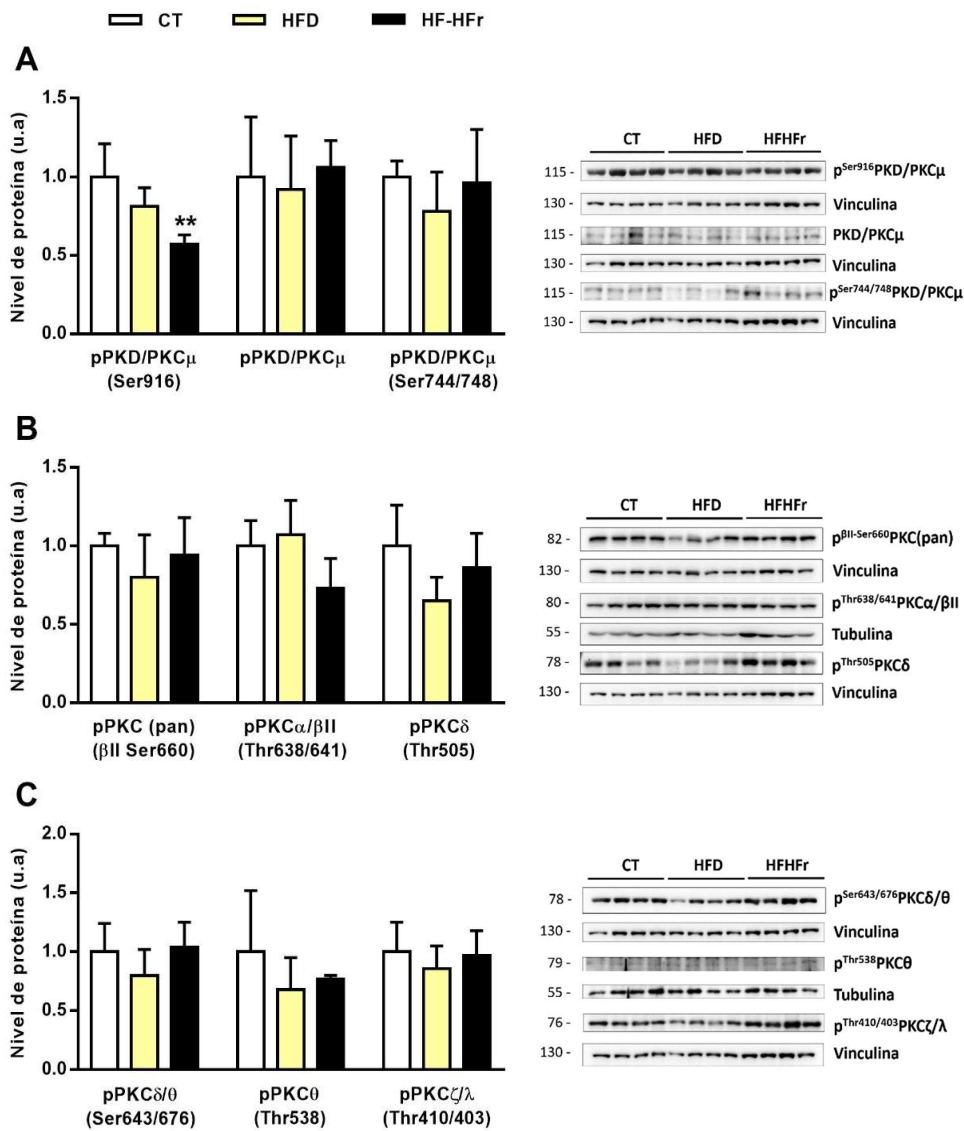


Figura IV-23. Expresión proteica de diferentes PKCs en el hígado (**A, B y C**). Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. **p<0.01 vs CT.

Para explorar si la disminución en la sensibilidad a la insulina era causada por un déficit de señalización a nivel hepático, se determinó la expresión de diferentes proteínas que participan en la cascada de señalización de la insulina en el hígado. Los resultados muestran que a pesar de que la dieta HFD no modificó la expresión del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2, **Figura IV-24A**), la adición de fructosa a la dieta HFD redujo significativamente ($p<0.01$) la expresión de IRS2 en el grupo HFHFr en relación a los grupos CT y HFD.

A fin de investigar los efectos de la alteración en los niveles de insulina sobre la gluconeogénesis hepática, se determinó la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la enzima limitante en la síntesis de glucosa. En las muestras del grupo HFD se detectó una manifestación temprana de resistencia a la insulina hepática en forma de un aumento de 1.5 veces ($p<0.01$) de la proteína PEPCK en relación al control (**Figura IV-24B**). Sin embargo, la dieta HFHFr produjo una disminución de 0.3 veces ($p<0.01$) de la expresión proteica de PEPCK en relación al control (**Figura IV-24B**). Del mismo modo, al analizar los niveles del mRNA de *Pepck* en el hígado, se detectó una disminución significativa ($p<0.01$) en las muestras del grupo HFHFr en relación al control (**Figura IV-24C**). Este efecto de la suplementación de fructosa líquida sobre la disminución en la expresión de IRS2 y PEPCK ha sido previamente descrito por nuestro grupo (Baena *et al*, 2016). Por otra parte, el mRNA de la *G6Pasa*, responsable también de la gluconeogénesis, evidenció una tendencia ($p=0.09$) a disminuir su expresión en el hígado del grupo HFHFr en relación al control (**Figura IV-24C**).

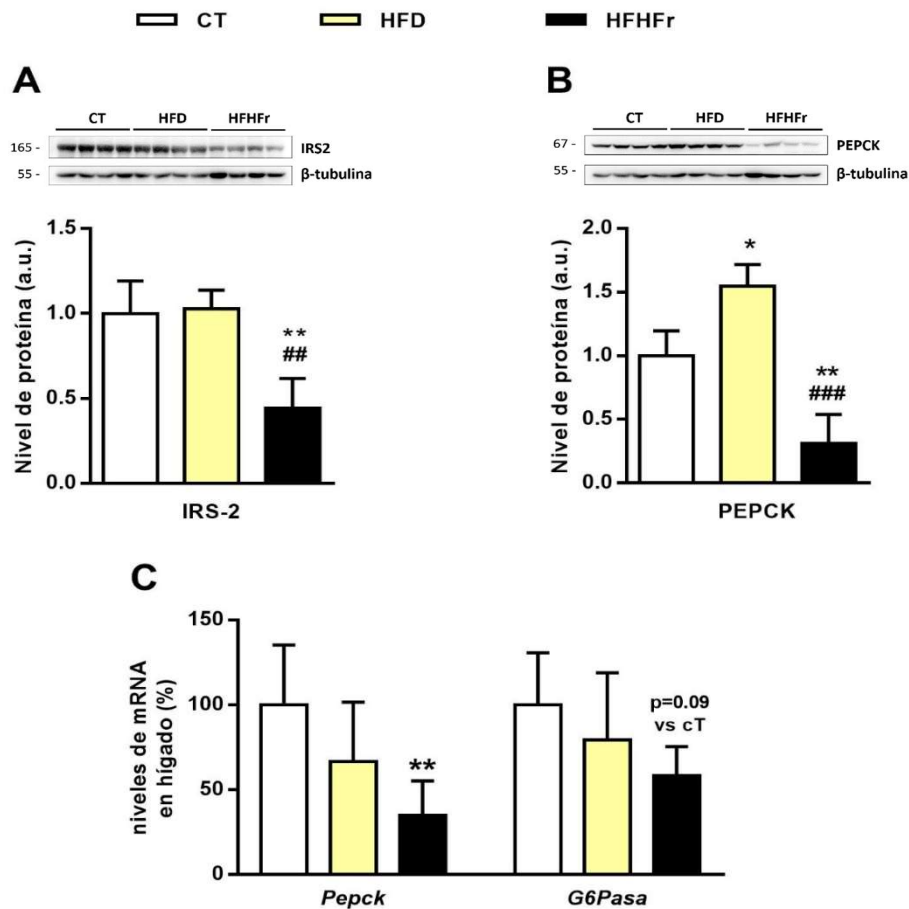


Figura IV-24. Efecto de la insulina sobre la gluconeogénesis hepática. **(A)** Nivel de expresión proteica de IRS2 y **(B)** PEPCK en hígado, y **(C)** niveles de mRNA de *Pepck* y *G6Pasa* en hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. *p<0.05, **p<0.01 vs CT; ##p<0.01###p<0.001 vs HFD.

En las muestras de músculo esquelético, ni la dieta HFD ni la HFHFr alteraron significativamente la expresión del receptor de insulina, el grado de fosforilación de la serina/treonina quinasa AKT (**Figura IV-25A** y **IV-25B**), ni el grado de fosforilación del sustrato Akt de 160 kDa (AS160) (**Figura IV-25C**). La formación del complejo macromolecular entre p(Thr⁶⁴²)-AS160 y la proteína de unión “14-3-3”, es necesario para promover la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en la superficie de los miocitos (Sakamoto *et al.*, 2008). Por tanto, estos datos en conjunto sugieren que los miocitos del músculo esquelético de las ratas HFHFr no presentan deficiencia en la vía de señalización de la insulina.

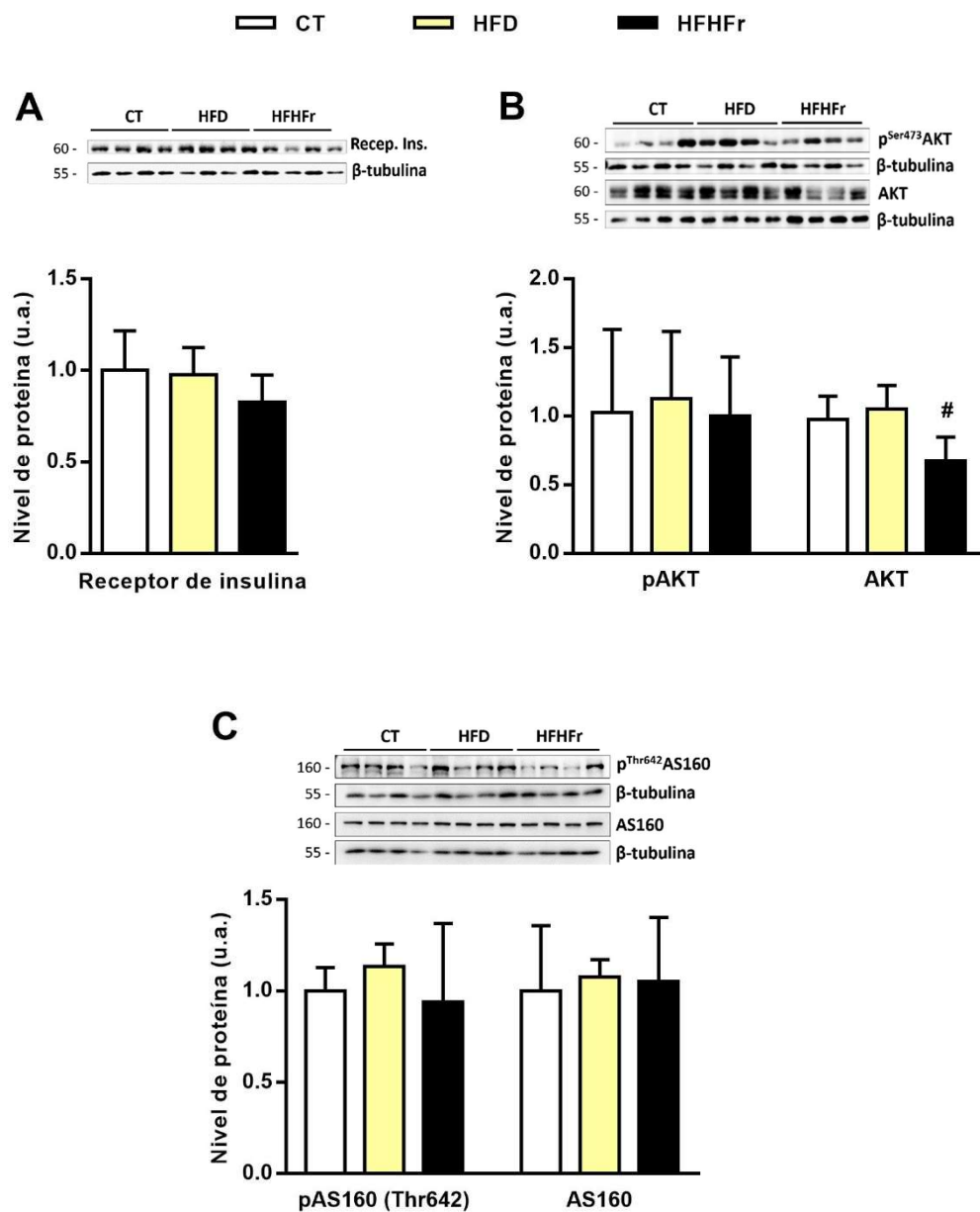


Figura IV-25. Efecto de las dietas sobre la vía de señalización de la insulina en el músculo esquelético. Niveles proteicos de **(A)** receptor de insulina, **(B)** las formas fosforilada y total de AKT y **(C)** p-(Thr⁶⁴²)-AS160 y AS160 total en músculo. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. #p<0.05 vs HFD.

Paralelamente, se analizó el catabolismo de ácidos grasos en el músculo esquelético a fin de verificar la utilización de ácidos grasos como fuente de energía. Como se observa en la **Figura IV-26A**, la β -oxidación de ácidos grasos en el músculo se incrementó significativamente ($p < 0.05$, 1.25 veces) en el grupo HFHF_r en comparación con las ratas del grupo HFD. En paralelo, se observó un incremento significativo en la expresión génica de lipoprotein lipasa (*Lpl*), *Acox1*, *Cpt1b* y *Vldlr* en el músculo de las ratas HFHF_r en relación al control (**Figura IV-26B**). En conjunto, los resultados obtenidos en músculo esquelético sugieren que, en los animales alimentados con dieta HFHF_r, se produce un cambio de sustrato energético en el músculo esquelético, con un incremento en la utilización de ácidos grasos y un descenso asociado en la utilización de glucosa, que podría ser el responsable de la reducción del ISI observada previamente.

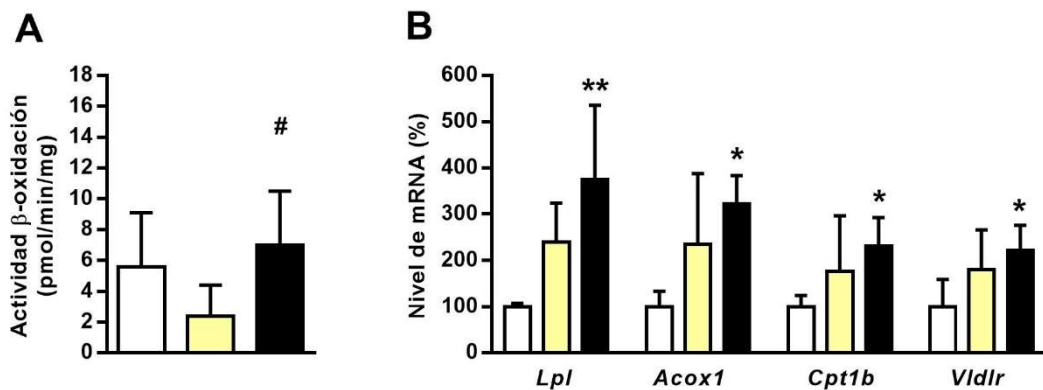


Figura IV-26. Efecto de las dietas la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. **(A)** Actividad de β -oxidación de ácidos grasos en músculo y **(B)** niveles de mRNA de factores relacionados a la oxidación de ácidos grasos en el músculo. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFD: *high-fat diet*, HFHF_r: *high-fat/high-fructose*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CT; # $p < 0.05$ vs HFD.

ESTUDIO 2: EFECTOS DE LA CAFEÍNA Y DEL EXTRACTO DE CAFÉ VERDE EN EL MODELO HFHF_r EN RATAS HEMBRA SPRAGUE-DAWLEY

En humanos se ha propuesto que una dosis moderada de café (1-2 tazas/día) podría tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo hepático (Bierdinc *et al.*, 2012; Poole *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios preclínicos en los que se ha demostrado que el tratamiento con cafeína reduce los lípidos hepáticos en animales alimentados con dieta grasa, utilizan dosis de cafeína equivalentes a un consumo alto de café en humanos, en algunos casos de más de 6 tazas diarias (Alferink *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2014). A fin de proporcionar un escenario más real, en el estudio 2 evaluamos los efectos de una dosis moderada de cafeína (CAF) pura (5 mg/Kg) o de un extracto de café verde (GCE, *green coffee extract*), proporcionando la misma dosis de CAF, sobre la acumulación de lípidos hepáticos en el modelo de ratas HFHF_r.

2.1 Los tratamientos con CAF y GCE no alteran los parámetros zoométricos en el modelo de rata HFHF_r

A fin de analizar los efectos generales de los tratamientos con CAF y el GCE sobre el consumo de dieta y el aporte calórico, se calculó el AUC de ingesta líquida y los gramos de dieta sólida ingerida durante el estudio, así como también las calorías consumidas. Además, se evaluó el peso corporal, la ganancia de peso corporal durante el tratamiento y los pesos del hígado y del tejido adiposo visceral blanco (vWAT *visceral white adipose tissue*) al finalizar el tratamiento.

Como ya se mencionó en el estudio 1, los grupos que recibieron la dieta HFHF_r mostraron un aumento significativo de la ingesta líquida y una reducción también significativa, del consumo de dieta sólida en relación al grupo CT (**Figura IV-27A** y **IV-B**). Los tratamientos con CAF y GCE no modificaron estos patrones de ingesta inducidos por la dieta HFHF_r (**Figura IV-25B**). El aporte calórico total fue mayor en los animales que recibieron la dieta HFHF_r, así como en los tratados con CAF y GCE en comparación al grupo control (**Figura IV-27C**).

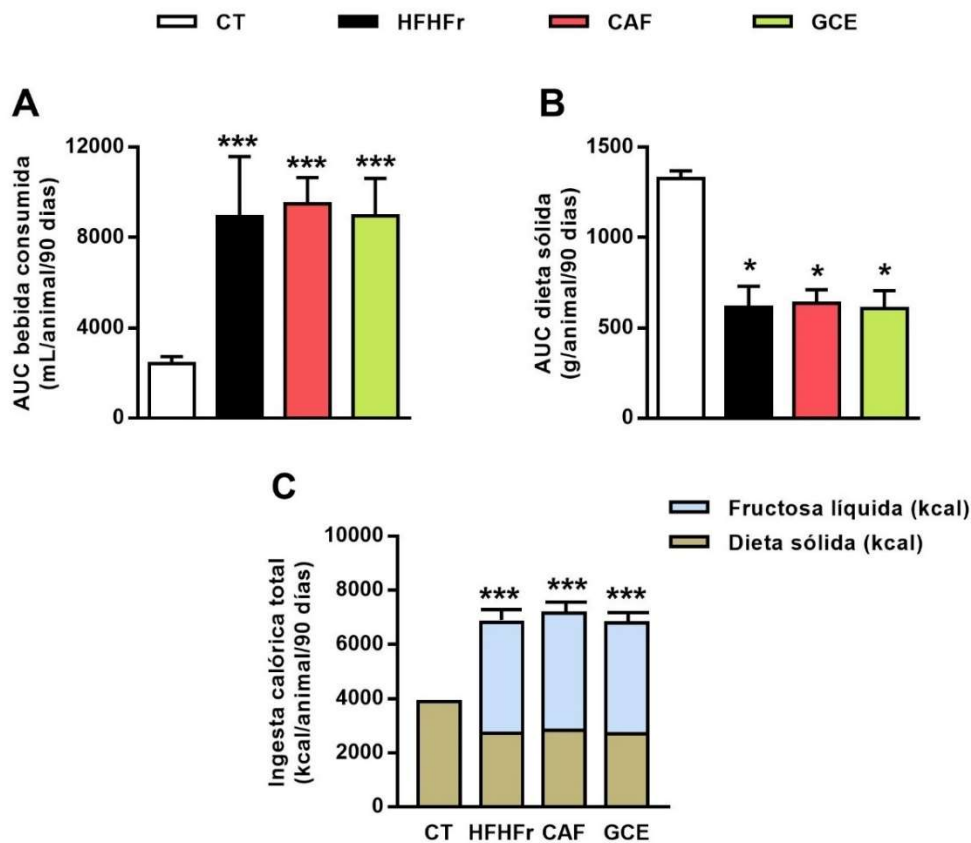


Figura IV-27. AUC del volumen líquido consumido **(A)** y la cantidad de ración consumida **(B)** por las ratas durante los 3 meses de estudio, así como los valores de consumo calórico total expresado en kcal **(C)**. AUC: *area under curve*. CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína, GCE: *green coffee extract*. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs CT.

El peso de los animales, así como la ganancia de peso corporal a lo largo del tratamiento fue similar entre todos los grupos (**Figura IV-28A** y **IV-28B**). En relación a los pesos del hígado y del vWAT, se observó que los grupos que consumieron HFHFr mostraron un aumento significativo del peso del hígado en relación al grupo CT (**Figura IV-28C**). El peso del vWAT al final del tratamiento no se modificó entre los grupos de estudio (**Figura IV-28C**).

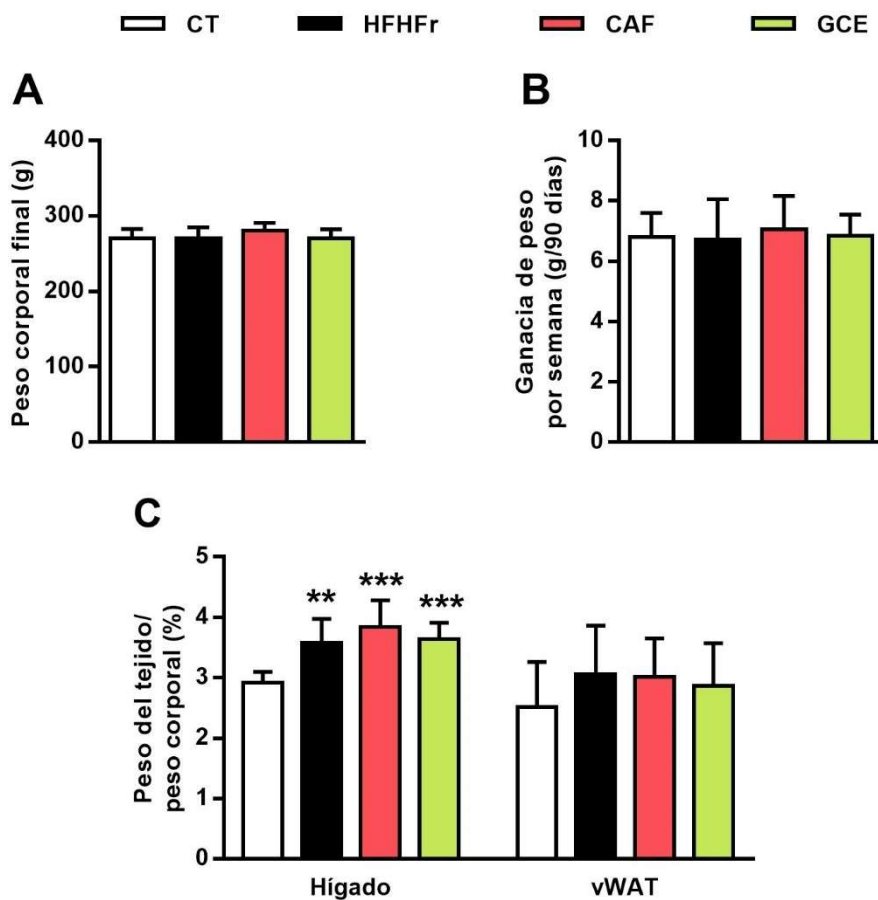


Figura IV-28. Parámetros zoométricos. **(A)** Peso corporal al final del estudio, **(B)** ganancia de peso corporal durante el tratamiento y **(C)** pesos del hígado y del tejido adiposo visceral blanco (vWAT, *visceral white adipose tissue*) relativos al peso corporal. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína, GCE: *green coffee extract*. **p<0.01, ***p<0.001 vs CT.

Debido a que la cafeína es un fármaco que puede estimular el sistema nervioso central y producir efectos ansiogénicos (Bhattacharya *et al.*, 1997), se analizó la actividad locomotora de los animales en el test de campo abierto (OF, *open field*). Previa habituación de los animales al dispositivo del campo abierto, la distancia total recorrida en el OF en el día del test fue similar entre todos los grupos (**Figura IV-29A**), sugiriendo que los tratamientos no afectaron la actividad locomotora. Adicionalmente, se evaluó la distancia recorrida en el centro del campo abierto, un parámetro que permite evaluar comportamientos relacionados con la ansiedad en las ratas. Como se aprecia en la **Figura IV-29B**, no se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida en el centro del campo abierto entre los grupos experimentales.

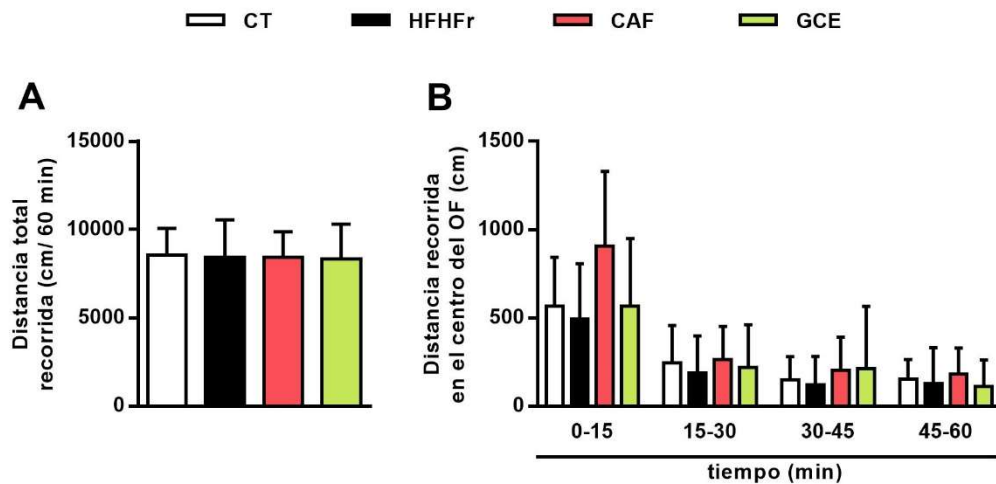


Figura IV-29. Actividad locomotora evaluada en el test de campo abierto (OF, *open field*). (A) Distancia total recorrida durante 60 minutos y (B) distancia recorrida en el centro del campo abierto durante los primeros 15 minutos. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=10-12$ ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína, GCE: *green coffee extract*.

En relación a los parámetros bioquímicos analizados en sangre, se observó que el único cambio significativo fue el aumento ($p<0.01$) de la trigliceridemia en todos los grupos que recibieron la dieta HFHFr (**Figura IV-30**). Los tratamientos con CAF y GCE no fueron capaces de revertir la hipertrigliceridemia inducida por la dieta HFHFr. Por otra parte, los niveles sanguíneos de colesterol (**Figura IV-30B**) se mantuvieron similares entre todos los grupos experimentales. Asimismo, los niveles de NEFA séricos no fueron modificados por la suplementación de la dieta HFHFr, ni por los tratamientos con CAF y GCE (**Figura IV-30**).

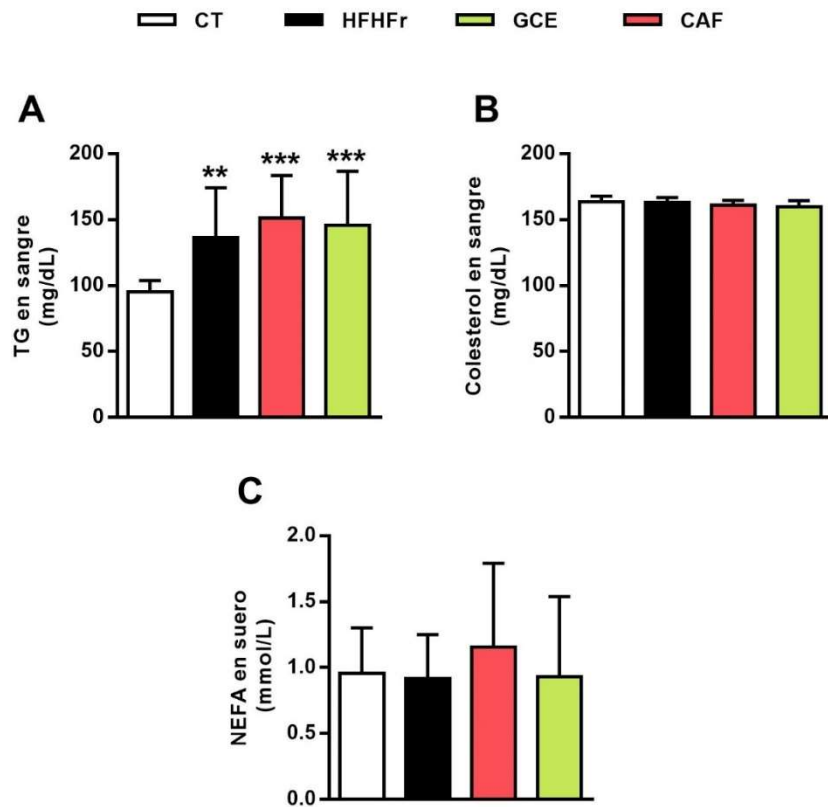


Figura IV-30. Parámetros bioquímicos en sangre. **(A)** niveles de triglicéridos, **(B)** colesterol y **(C)** NEFA (*non-esterified fatty acids*) en suero. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. **p<0.01, ***p<0.001 vs CT.

2.2 Los tratamientos con CAF o GCE no revierten las alteraciones sobre el metabolismo periférico de la glucosa inducidas por la dieta HFHFr

A pesar de que los niveles basales de la glicemia fueron similares entre todos los grupos (**Figura IV-31A**), el nivel basal de insulina en los grupos suplementados con HFHFr fue superior. Como se observa en la **Figura IV-31B**, aunque el aumento en el grupo HFHFr no alcanzó la significación estadística (1.8 veces, vs CT), los niveles de insulina sérica se encontraron significativamente incrementados en los grupos CAF (2.6 veces, p<0.05) y GCE (2.3 veces, p<0.05) en relación al control. Conforme a lo anterior, los valores del ISI se encontraron significativamente disminuidos en los grupos HFHFr, CAF y GCE (**Figura IV-31B**).

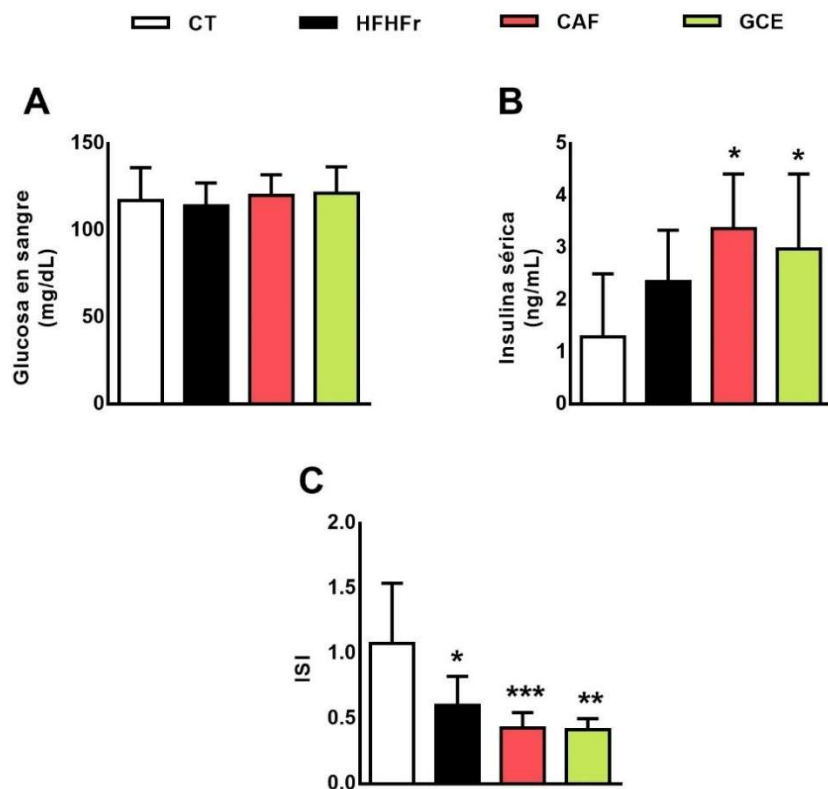


Figura IV-31. Parámetros bioquímicos relacionados al metabolismo de la glucosa. **(A)** Nivel basal de glucosa sanguínea **(B)** nivel basal de insulina sérica y **(C)** ISI (índice de sensibilidad a la insulina). Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). AUC: *area under curve*, CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT.

La curva de glucosa correspondiente al T*TOG, (**Figura IV-32A**) reveló que todos los grupos que recibieron la dieta HFHFr, tuvieron valores de glucosa significativamente incrementados en los tiempos de 15 y 30 minutos, aunque el AUC de la curva de glucosa (**Figura IV-32B**) fue similar entre todos los grupos.

En relación a la curva de insulina correspondiente al T*TOG (**Figura IV-32C**), se puede observar que a los 15 minutos todos los grupos suplementados con la dieta HFHFr presentaron valores de insulina significativamente incrementados en relación al grupo CT ($p < 0.001$), mientras que a los 30 minutos el grupo CAF fue el único que presentó valores significativamente superiores al grupo CT ($p < 0.05$). El AUC de la insulina fue significativamente mayor en los grupos que recibieron HFHFr en relación al control (**Figura IV-32D**). Estos datos sugieren que los tratamientos con CAF o GCE no fueron capaces de revertir los efectos de la dieta grasa suplementada con fructosa líquida sobre el metabolismo periférico de la glucosa.

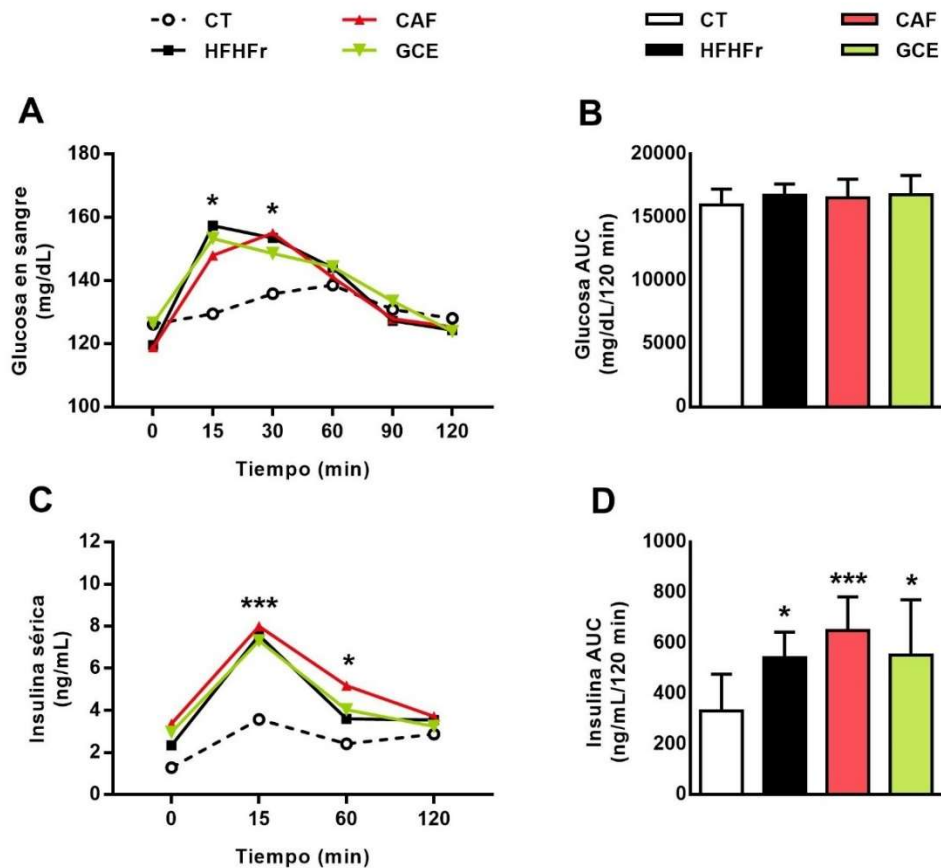


Figura IV-32. Evaluación de la sensibilidad periférica a la insulina. **(A)** curva de glucosa correspondiente al TTOG, **(B)** AUC de la curva de glucosa, **(C)** curva de insulina del TTOG y **(D)** AUC de la insulina. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa. AUC: *area under curve*, CT: control, HFHFr: *high-fat/ high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. *p<0.05, ***p<0.001 vs CT.

Además de la insulina, se determinaron los niveles séricos de otras dos hormonas que regulan la homeostasis energética. Los niveles de adiponectina en el suero de las ratas fueron similares entre todos los grupos (**Figura IV-33A**). Asimismo, los valores de leptina determinadas en suero no fueron afectados por la dieta ni por las intervenciones farmacológicas (**Figura IV-33B**).

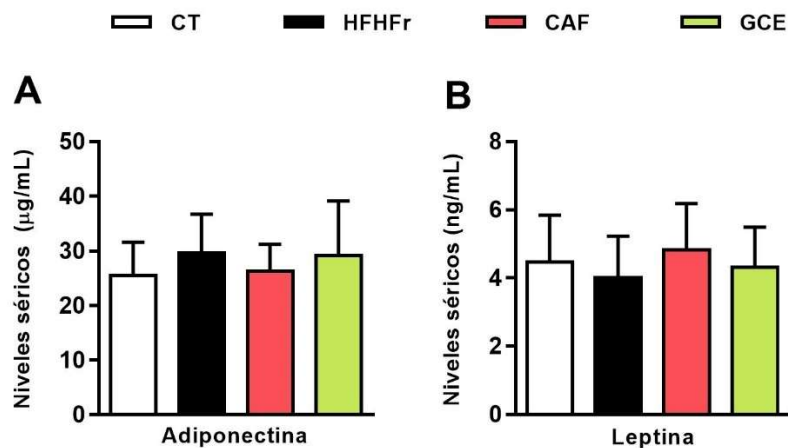


Figura IV-33. Niveles séricos de adiponectina (A) y leptina (B) al final del estudio. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*.

A fin de verificar los efectos del tratamiento con CAF y GCE sobre la gluconeogénesis hepática se determinaron los niveles de mRNA en hígado de las principales enzimas gluconeogénicas *Pepck* y *G6Pasa*. Ambas enzimas se encontraron disminuidas ($p < 0.05$) en los grupos suplementados con HFHFr (Figura IV-34) en relación al grupo CT. Ninguno de los tratamientos con los fármacos CAF y GCE revirtieron esta alteración.

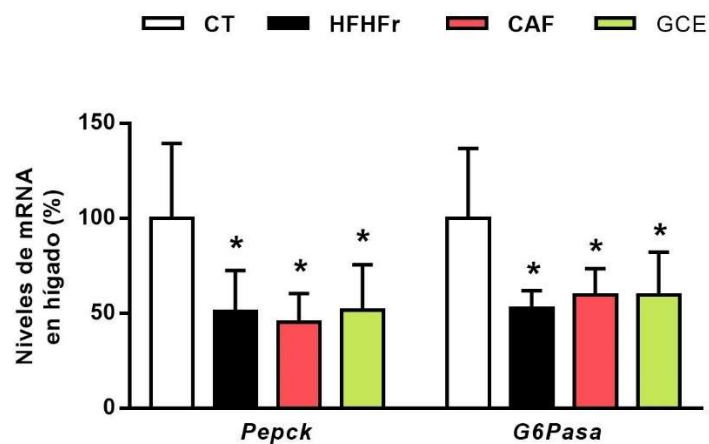


Figura IV-34. Enzimas gluconeogénicas hepáticas (A) Niveles de expresión génica de *Pepck* y *G6Pasa*. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). *Pepck*: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, *G6Pasa*: glucosa 6-fosfatasa. CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. * $p < 0.05$ vs CT.

2.3 El GCE ejerce efectos diferenciales de sobre la composición de TG hepáticos en comparación al tratamiento con CAF en el modelo HFHFr

Como ya se observó en el estudio 1, en el hígado se produjo un aumento significativo de la concentración de TG hepáticos en el grupo HFHFr en relación al CT (**Figura IV-35A**). A pesar de que los tratamientos con CAF y GCE no fueron capaces de revertir esta alteración, en el grupo GCE se observaron niveles de TG hepáticos significativamente más bajos que en el grupo CAF ($p < 0.05$). Se observó la misma tendencia ($p = 0.1$ vs CAF) cuando se cuantificaron los lípidos hepáticos a través de la tinción ORO (**Figura IV-35B**). En la **Figura IV-32C** se muestran las imágenes representativas de los cortes histológicos de hígado después de la tinción con H&E y ORO (**Figura IV-35C**).

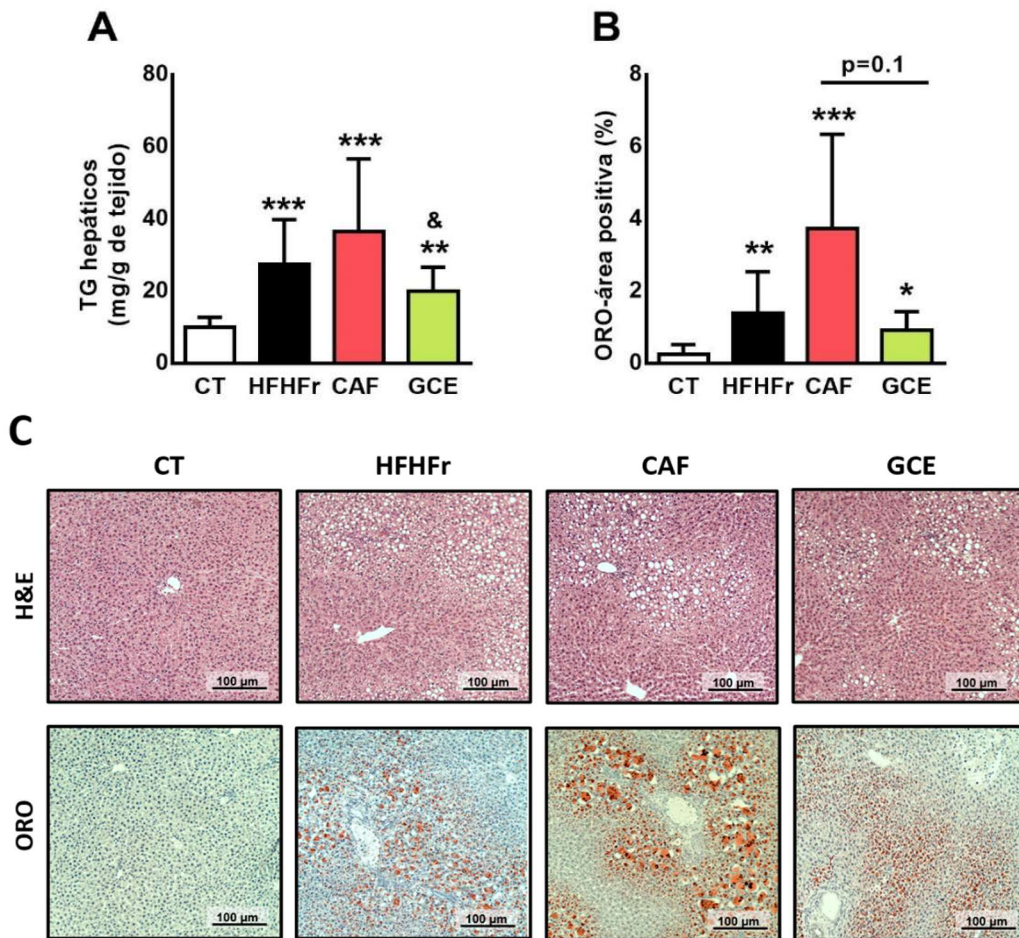


Figura IV-35. Análisis de la esteatosis hepática inducida por las intervenciones dietéticas y el tratamiento con CAF o GCE. **(A)** Niveles de triglicéridos hepáticos, **(B)** cuantificación de la tinción ORO expresada como porcentaje de área coloreada positivamente con ORO en relación al área total de la imagen e imágenes de las tinciones con H&H y ORO. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n = 10-12$ ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT; & $p < 0.05$ vs CAF.

El análisis lipidómico de las principales especies de ácidos grasos de los TG hepáticos también reveló efectos diferenciales del GCE en relación a la CAF. Al igual que en el estudio 1, la dieta HFHFr incrementó los niveles de SFA palmítico (16:0) y esteárico (18:0), y los tratamientos con CAF y GCE no revirtieron este efecto (**Figura IV-36A**). En relación a los MUFA (**Figura IV-36B** y **IV-36C**), el tratamiento con CAF no afectó el incremento de la concentración de ácido palmitoleico (16:1 n-7), oleico (18:1 n-9) y eicosenoico (20:1 n-9) inducido por la dieta HFHFr. Sin embargo, la adición de GCE a la dieta HFHFr, disminuyó significativamente la concentración de los ácidos grasos palmitoleico ($p < 0.05$) y eicosenoico ($p < 0.01$) en comparación con el grupo CAF.

En relación a la concentración de PUFA en la fracción de TG hepáticos (**Figura IV-36E**), los ácidos grasos araquidónico (20:4 n-6), eicosapentaenoico (20:5 n-3) y docosahexaenoico (22:6 n-3) resultaron significativamente disminuidos por el tratamiento con GCE en relación al control y la dieta HFHFr. Por otra parte, los niveles de ácido linoleico (18:2 n-6) no fueron modificados por la dieta ni los por los tratamientos (**Figura IV-36D**).

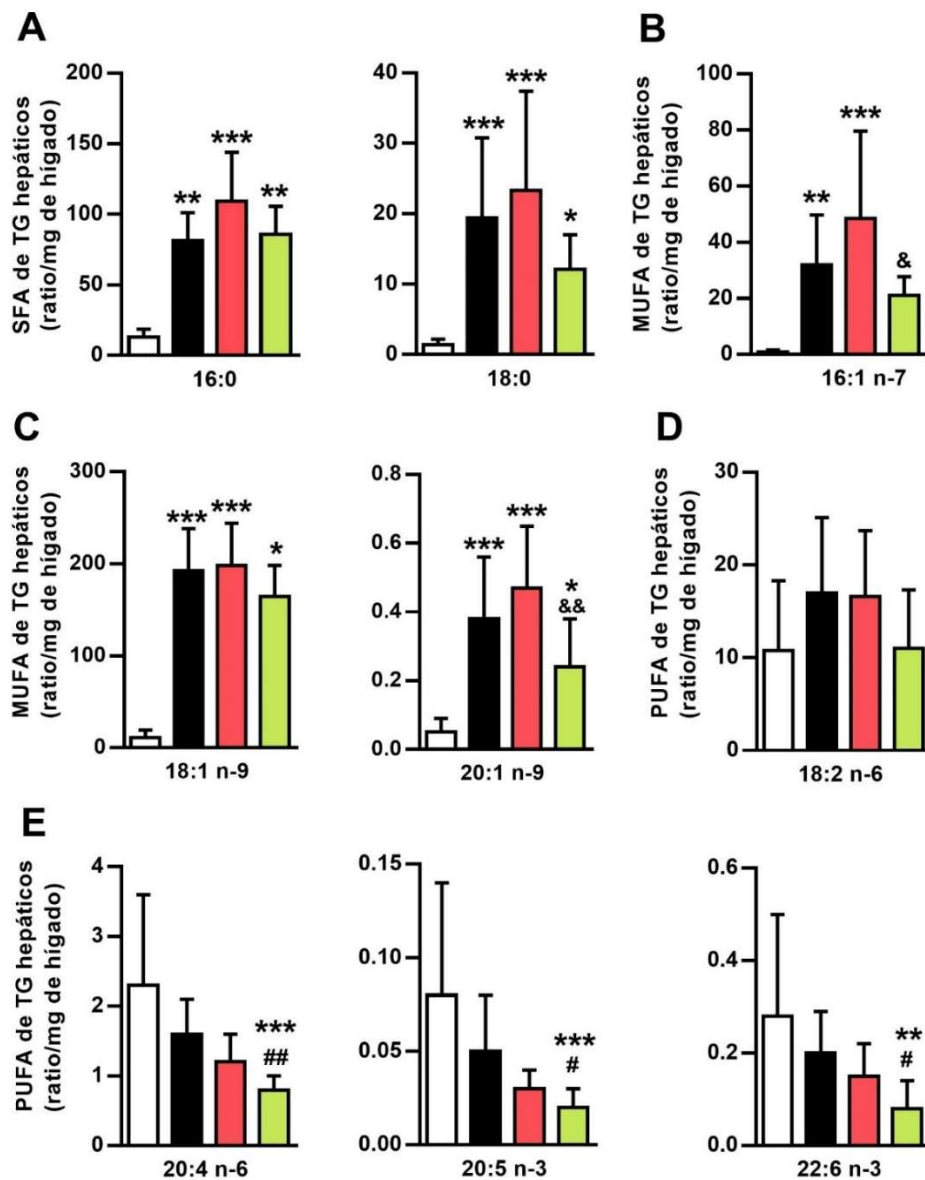


Figura IV-36. Composición de los ácidos grasos de los TG hepáticos. **(A)** ácidos grasos saturados (SFA), **(B y C)** ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y **(D y E)** ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ##p<0.01 vs HFHFr, &p<0.05, &&p<0.01 vs CAF.

En lo que respecta al análisis del contenido de DAG en el hígado, como se ha descrito en el estudio 1, se observó que la dieta HFHF_r incrementó los DAG formados por SFA y MUFA. La adición de GCE a la dieta HFHF_r atenuó significativamente el incremento del DAG 18:0/18:0 (**Figura IV-37A**), mientras que el tratamiento con CAF no modificó las alteraciones en los niveles de DAG conteniendo SFA y MUFA inducidas por la dieta HFHF_r (**Figura IV-37A**). En relación a los DAG que contienen PUFA, los grupos HFHF_r y CAF no modificaron los niveles de DAG 16:0/18:2 y DAG 18:0/20:4 hepáticos, mientras que el tratamiento con GCE redujo significativamente la cantidad de estos DAG (**Figura IV-34B**) en comparación con los grupos CT y HFHF_r. Por otra parte, la reducción en el nivel DAG 18:2/18:2 que produce la dieta HFHF_r no fue afectado por los tratamientos (**Figura IV-37B**).

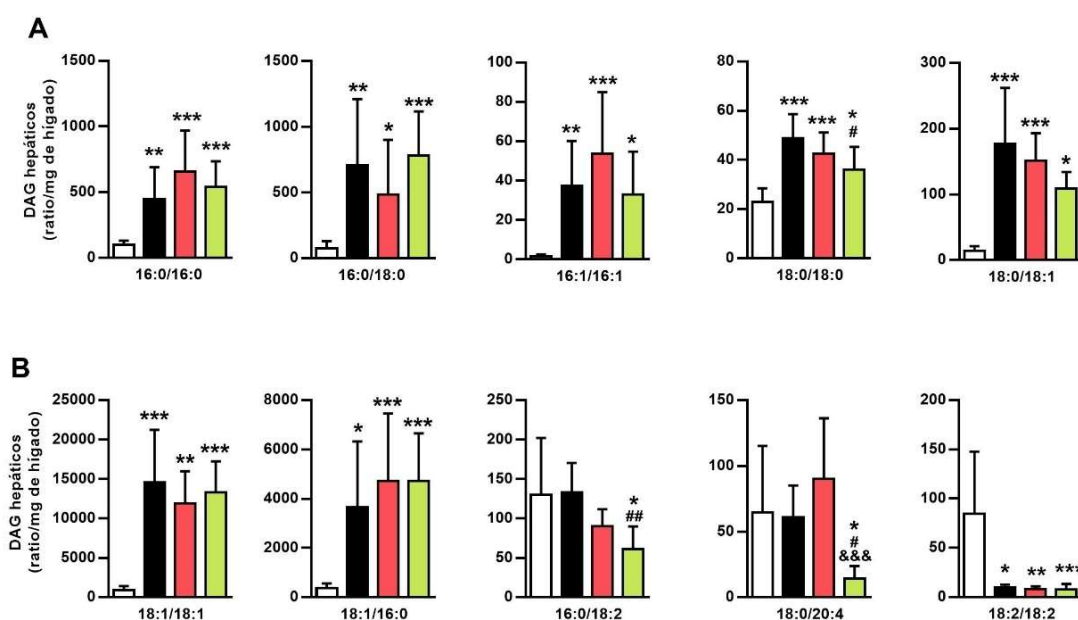


Figura IV-37. Contenido de diferentes especies de dialciliglicerolos hepáticos. **(A)** DAG compuestos por SFA y MUFA y **(B)** DAG que contienen MUFA y PUFA. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). CT: control, HFHF_r: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ##p<0.01 vs HFHF_r, &&&p<0.001 vs CAF.

También observamos algunos efectos farmacológicos sobre las especies de Cer y HexCer hepáticas (**Figura IV-38C, IV-38D**). Si bien las intervenciones farmacológicas no afectaron la reducción de las Cer 14:0 y 16:0 inducidas por dieta HFHF_r (**Figura IV-38A**), se observó que el tratamiento con CAF atenuó (p<0.05) el incremento de la Cer 18:1 inducido por dieta HFHF_r (**Figura IV-38B**).

De manera similar, el aumento de los niveles de HexCer 18:0 y HexCer 20:0 en el grupo HFHF_r, fue atenuado en el grupo GCE (**Figura IV-38C**). Además, el GCE ejerció efectos específicos sobre varias especies que no fueron modificadas por la dieta HFHF_r, ya que redujo el contenido hepático de Cer 20:0 y HexCer 16:0, 22:0 y 24:1.

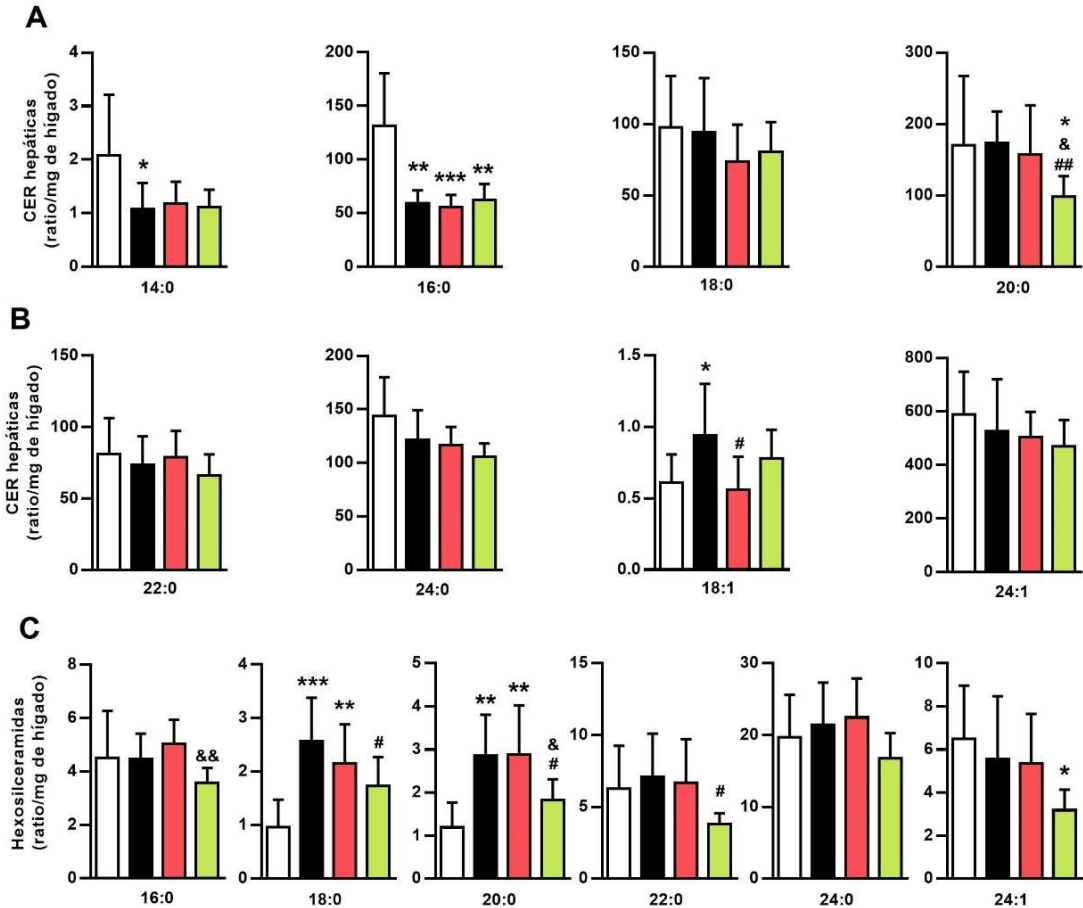


Figura IV-38. Contenido de las especies de diacilgliceroles (**A, B**) y hexosilceramida (**C**) hepáticas. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). CT: control, HFHF_r: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ##p<0.01 vs HFHF_r, &p<0.05, &&p<0.01 vs CAF.

Adicionalmente calculamos la ratio de HexCer/Cer, considerada como un indicador de la actividad de la glucosilceramida sintasa (GCS), la enzima responsable sintetizar las hexosilceramidas a partir de las ceramidas (Zhao *et al.*, 2009). Como se muestra en la **Tabla IV-1**, la relación de las HexCer/Cer 16:0, 18:0, 20:0 y 24:0 se incrementó similarmente en los grupos HFHF_r y CAF, mientras que el tratamiento con GCE redujo los niveles de la ratio de HexCer/Cer tipo 16:0 y 18:0 en relación al grupo HFHF_r.

Tabla IV-1. Ratio hexosilceramida/ceramida

	CT	HFHFr	CAF	GCE
16:0	0.038 ± 0.017	0.076 ± 0.009 ***	0.093 ± 0.022 ***	0.059 ± 0.014 *** #
18:0	0.010 ± 0.004	0.028 ± 0.004 ***	0.030 ± 0.007 ***	0.021 ± 0.003 *** # &&
20:0	0.007 ± 0.002	0.016 ± 0.004 ***	0.019 ± 0.004 ***	0.019 ± 0.003 ***
22:0	0.076 ± 0.026	0.104 ± 0.049	0.082 ± 0.025	0.060 ± 0.015
24:0	0.139 ± 0.033	0.178 ± 0.040 *	0.191 ± 0.025 **	0.157 ± 0.024

Valores expresados como media ± SD (n = 9-10). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: caféina y GCE: *green coffee extract*. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. CT. # p < 0.05 vs. HFHFr; && p < 0.01 vs. CAF.

2.4 A diferencia del tratamiento con CAF, el GCE podría reducir la DNL hepática vía inactivación de mTOR

A fin de estudiar los efectos de los tratamientos con CAF y GCE sobre la DNL, se analizaron los factores de transcripción que modulan la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos. Los valores de la forma madura (68 KDa) y precursora (125 KDa) de la proteína SREBP1c, el factor de transcripción estimulado por la insulina, no se modificaron significativamente entre los grupos (**Figura IV-39A**). Por otra parte, la dieta HFHFr disminuyó el nivel de expresión proteica de la isoforma ChREBP α (p<0.05 vs CT), mientras que el tratamiento con GCE revirtió este efecto (p<0.05 vs HFHFr) (**Figura IV-39B**). En cuanto a los niveles de mRNA de *CbREBP α* no se observó diferencias de expresión entre los grupos (**Figura IV-39C**).

En paralelo se analizó la expresión de la isoforma beta de ChREBP en el hígado (**Figura IV-39B y C**). El análisis de la expresión génica de *CbREBP β* indica que los niveles del mRNA se encontraron incrementados de forma variable en los grupos que recibieron HFHFr. Por el contrario, el tratamiento con CAF y GCE incrementó significativamente (p<0.05) el nivel de proteína *CbREBP β* en relación al grupo HFHFr. Además, el análisis de la expresión génica de *Lpk* (**Figura IV-39C**), un gen regulado por ChREBP, aumentó significativamente en los grupos CAF y GCE en relación a los grupos HFHFr, sugiriendo que los tratamientos con CAF y GCE en las ratas HFHFr potencian la actividad transcripcional de ChREBP.

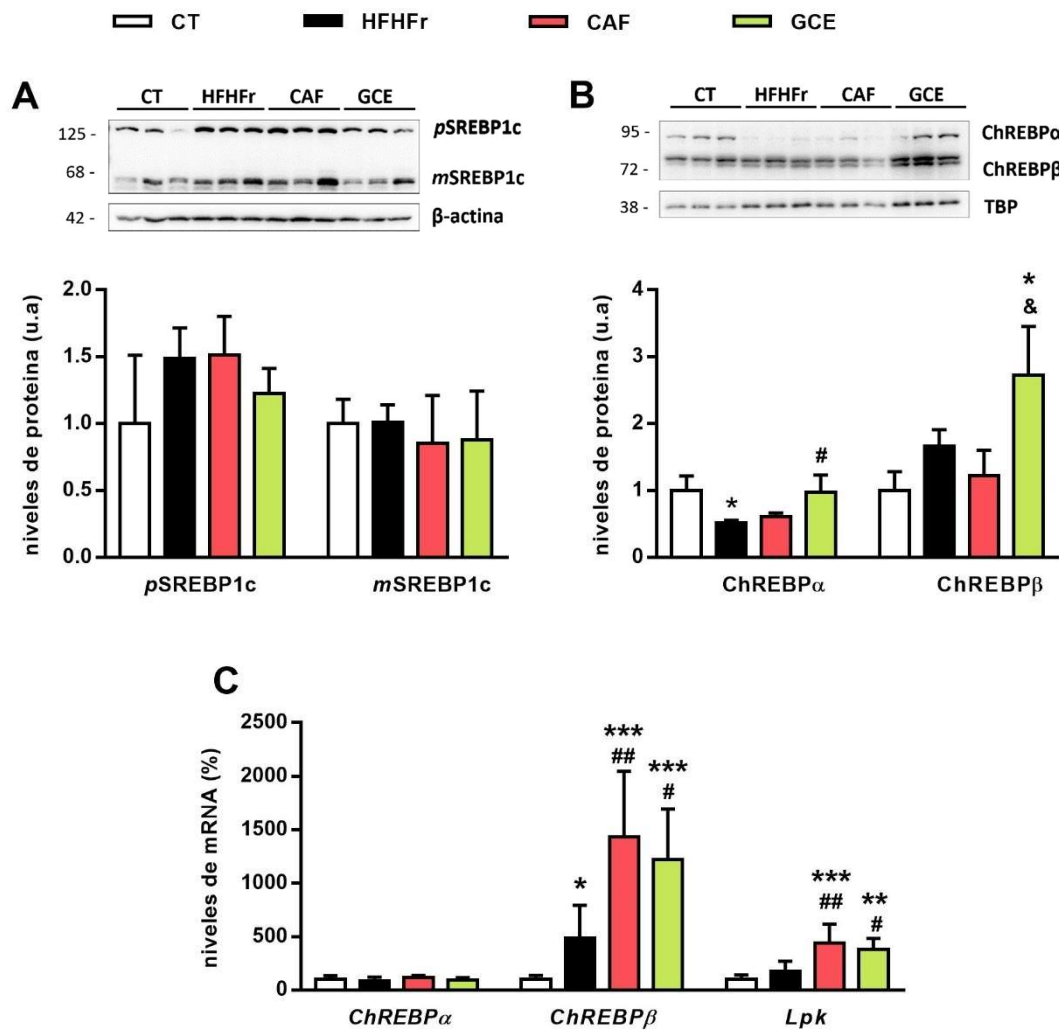


Figura IV-39. Efectos de los tratamientos sobre la expresión de los factores de transcripción que regulan la DNL. **(A)** Formas precursoras y madura de SREBP1c en proteína total e **(B)** isoformas α y β de ChREBP en el extracto nuclear de hígado y **(C)** Expresión génica de las isoformas α y β de ChREBP y de *Lpk*. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). SREBP: *Sterol regulatory element-binding proteins*, ChREBP: *carbohydrate-responsive element-binding protein*, CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05; ##p<0.01 vs HFHFr, &p<0.05 vs CAF.

A continuación, se realizó el análisis de los niveles de mRNA de las principales enzimas hepáticas relacionadas con la biosíntesis lipídica, controladas por los factores de transcripción mencionados anteriormente. Como ya se ha descrito en el estudio 1, la dieta HFHFr incrementó la expresión génica de *Fas* y *Scd1* respecto al grupo control, y el tratamiento con CAF, pero no con GCE, aumentó aún más la expresión de estas enzimas respecto al grupo HFHFr (**Figura IV-40A** y **IV-40B**). Los niveles de expresión proteica de FAS (**Figura IV-40C**) se encontraron significativamente incrementados en todos los grupos que consumieron la dieta HFHFr respecto al grupo control; sin embargo, GCE redujo los niveles de proteína

FAS respecto al grupo HFHFr. Con la finalidad de evaluar posibles efectos sobre proteínas que modulan la actividad transcripcional de SREBP-1c, se analizaron los niveles de lipina-1 en extracto nuclear hepático. Como se muestra en la **Figura IV-40E**, el grupo HFHFr mostró una disminución significativa en los niveles de lipina-1 en extracto nuclear. A su vez, los niveles nucleares de la lipina-1 están controlados por mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), que cuando está activada fosforila a la lipina-1 y provoca su exclusión nuclear. En consonancia con la disminución de lipina-1 en el extracto nuclear, se observó un incremento de la forma fosforilada, activa, de mTOR [p(Ser²⁴⁸⁴)-mTOR] en los hígados de las ratas del grupo HFHFr (**Figura IV-40D**). La adición de GCE a la dieta aminoró la reducción en los niveles de lipina-1 causada por la dieta HFHFr, aumentando la cantidad de esta proteína en extractos nucleares por encima de los niveles de CT (**Figura IV-40E**). De acuerdo con este incremento, en el grupo GCE los niveles de p(Ser²⁴⁸⁴)-mTOR retornaron a los valores de control, mostrando una reducción significativa en comparación con los grupos HFHFr y CAF (**Figura IV-40E**).

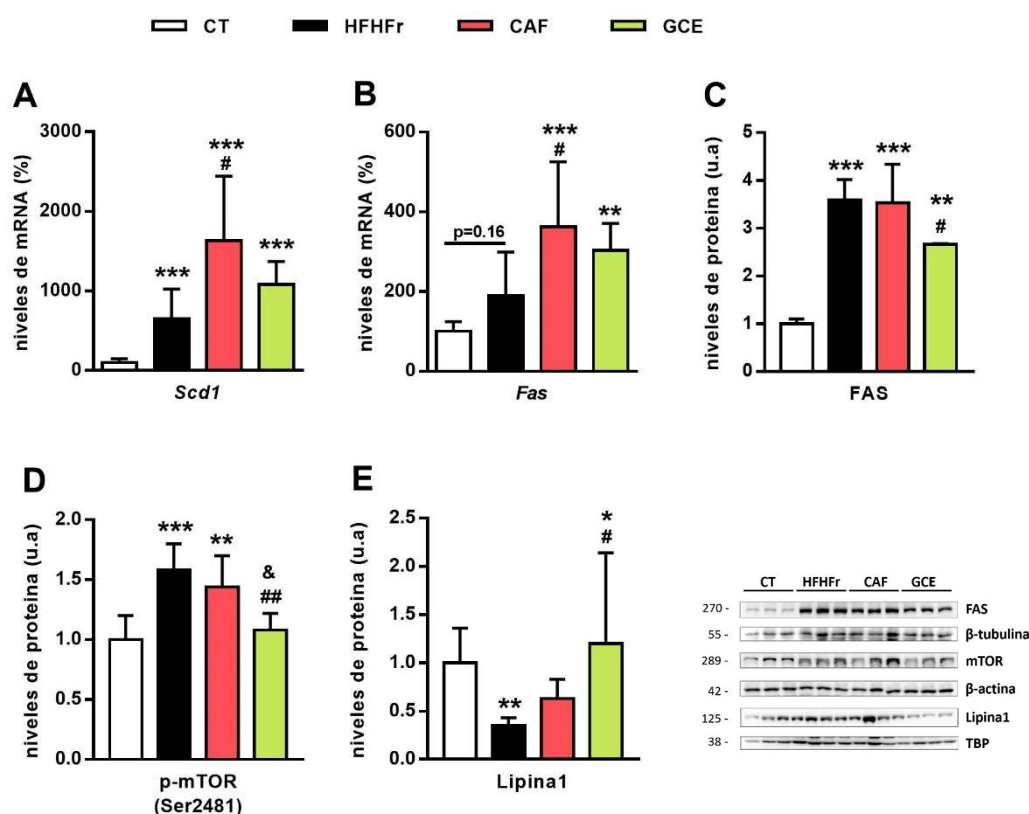


Figura IV-40. Efectos de los tratamientos con CAF y GCE sobre la expresión de factores y enzimas que intervienen en la DNL. Valores de expresión génica de (A) *Scd1* y (B) *Fas*, expresión proteica de (C) FAS y (D) p-mTOR en proteína total y (E) Lipina-1 en extracto nuclear de hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). FAS: *fatty acid synthase*, *Scd1*: *stearyl-CoA desaturase-1*, CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: *caféina* y GCE: *green coffee extract*. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ##p<0.01 vs HFHFr, &p<0.05 vs CAF.

2.5 Efectos de la CAF y GCE sobre el catabolismo de ácidos grasos en el hígado

Para explorar otros mecanismos potencialmente implicados en los efectos observados sobre los TG hepáticos, determinamos la actividad de β -oxidación en muestras de hígado. Los resultados mostraron que la adición de CAF o GCE no tuvo ningún efecto sobre la disminución de dicha actividad que se produce en respuesta a la dieta HFHFr (Figura IV-41A). Los niveles de ARNm de *Ppar α* y de los genes diana de PPAR α , la enzima *Acox1* y *Vldlr* no fueron modificados por la dieta o los tratamientos (Figura IV-41C y IV-41D). Sin embargo, los niveles de proteína de VLDLR, a pesar de no aumentar con la dieta HFHFr fueron significativamente más bajos en los grupos CAF y GCE en relación al CT, y en el caso de GCE incluso redujo la cantidad de esta proteína en comparación con el grupo HFHFr (Figura IV-41E).

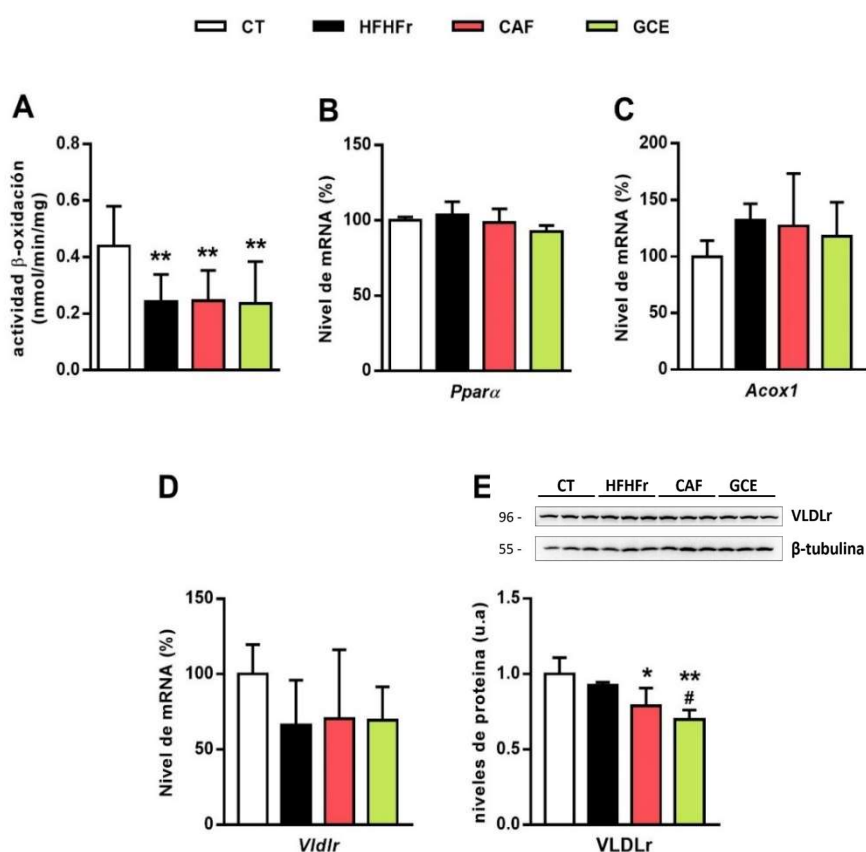


Figura IV-41. Efectos relacionados con el catabolismo de ácidos grasos en el hígado. (A) Actividad de oxidación de ácidos grasos en el hígado, niveles de expresión génica de (B) *Ppar α* , (C) *Aco* y (D) *Vldlr* y (E) nivel de proteína de VLDLR en proteína total. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). *Ppar α* : *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*, *Aco*: *acil-CoA oxidase*,

VLDLR: *very low-density lipoprotein receptor*, CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs CT; # $p < 0.05$ vs HFHFr.

Otra forma de catabolismo de lípidos es la autofagia de los *lipid droplets* en los hepatocitos. Como se muestra en la **Figura IV-42A**, la relación entre las proteínas LC3 (*microtubules-associated protein 1 light chain 3-B*) tipo II/I se redujo significativamente en el grupo HFHFr. Los tratamientos con CAF o GCE no revirtieron esta disminución. Adicionalmente, se determinaron los niveles de proteína del sustrato de autofagia p62/SQSTM que no resultaron modificados (**Figura IV-42B**) y de la proteína beclina-1, que mostraron un ligero aumento en el grupo CAF (**Figura IV-42C**).

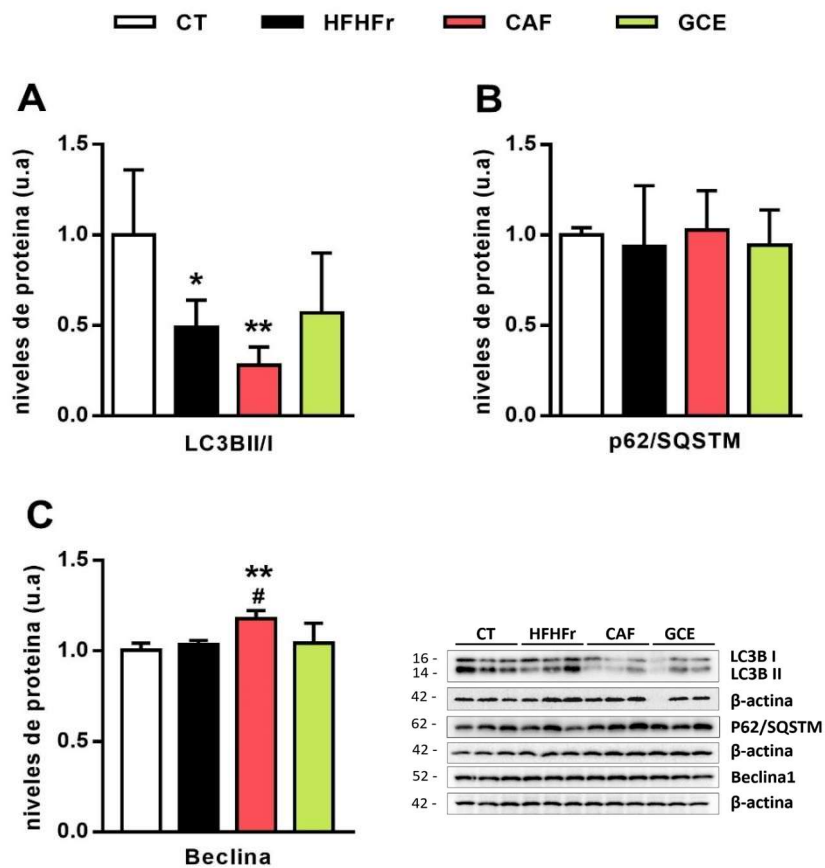


Figura IV-42. Efectos de la adición de CAF o GCE a la dieta HFHFr sobre proteínas implicadas en el proceso de autofagia. **(A)** Niveles de la proteína LC3BI/II, **(B)** niveles de las proteínas P62 y beclina-1 en proteína total de hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=10-12 ratas/grupo). LC3BII: *microtubules-associated protein 1 light chain 3-B*, CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: cafeína y GCE: *green coffee extract*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CT; # $p < 0.05$ vs HFHFr.

2.6 Efectos de los tratamientos con CAF y GCE sobre los marcadores de estrés de retículo endoplásmico, inflamación y estrés oxidativo

Adicionalmente se exploraron otras vías de señalización celular que podrían modular los niveles de lípidos hepáticos, como el estrés del retículo endoplásmico. Como ya se ha descrito en el estudio 1, la dieta HFHFr aumentó significativamente la fosforilación de IRE1 α en Ser⁷²⁴, sin que CAF ni GCE revirtieran este aumento (**Figura IV-43A**). El nivel de expresión del ARNm de XBP1s se redujo en todas las ratas que recibieron la dieta HFHFr, y los niveles de la proteína nuclear XBP1s se mantuvieron inalterados (**Figura IV-43D**), confirmando la ausencia del efecto de la activación de IRE sobre XBP1 en nuestro modelo. En estados tempranos del estrés de retículo endoplásmico, la actividad de IRE1 α puede ser negativamente regulada por la proteína Bax-i (*Bax inhibitor*), disminuyendo la actividad ribonucleasa de IRE (Lisbona *et al.*, 2009). En nuestros animales, el nivel de expresión génica de *Bax-i* (**Figura IV-43E**) se mantuvo similar entre los grupos. Adicionalmente, el nivel de expresión génica de Edem1, otro gen regulado por IRE1, no se alteró con la dieta HFHFr y mostró una expresión reducida en el grupo CAF (**Figura IV-43E**).

Por otra parte, tal como se describió en el estudio 1, los niveles del precursor (90 kDa) y la forma madura (50 kDa) de ATF6 α y de las formas fosforilada y total de la proteína PERK no fueron inducidos por la dieta HFHFR, y tampoco por los tratamientos con CAF o GCE (**Figura IV-43B, IV-43C**). La ausencia de activación de estas vías se confirmó por el análisis de la expresión génica de diversos genes implicados en la UPR como *Bip*, *Chop* y *Dnajb9* (**Figura IV-43E**).

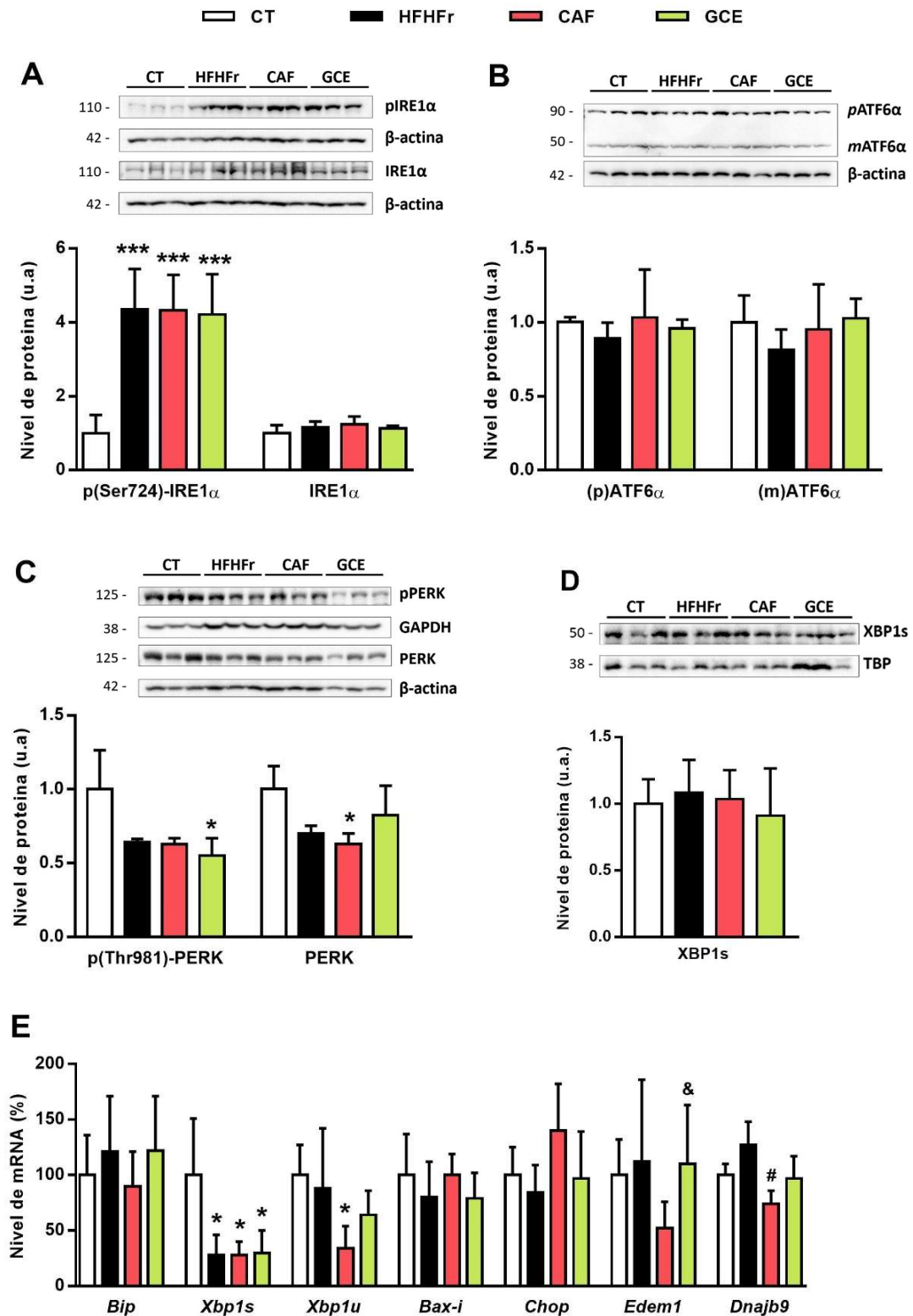


Figura IV-43. Efectos de los tratamientos con CAF y GCE sobre el estrés de retículo endoplásmico. (A) niveles de la forma fosforilada y total de la proteína IRE1α, (B) formas precursora y madura de la proteína ATF6α, (C) formas fosforilada y total de PERK, y (D) niveles de expresión génica de marcadores del estrés de retículo endoplásmico. Los resultados se expresan como la media ± SD (n=10-12 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, CAF: *cafeína* y GCE: *green coffee extract*. *p<0.05, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05 vs HFHFr; &p<0.05 vs CAF.

Finalmente, evaluamos la expresión de varios marcadores de inflamación y estrés oxidativo hepáticos. Al igual que en el estudio 1, la dieta HFHF_r no indujo una respuesta inflamatoria en el hígado. De hecho, se redujo la expresión de ARNm de varios genes relacionados con la inflamación, y los tratamientos con CAF y GCE no modificaron dichos cambios (**Figura IV-44A**). De acuerdo con estos resultados, los niveles séricos de las transaminasas hepáticas ALT y AST no aumentaron con la dieta o los tratamientos (**Figura IV-44B**).

De manera similar, la dieta HFHF_r no indujo estrés oxidativo en el hígado e incluso redujo la expresión de *Gpx1* ($p < 0.05$, **Figura IV-44C**). El grupo GCE mostró niveles más bajos de ARNm de *Sod2* en comparación con el grupo CAF (**Figura IV-44C**).

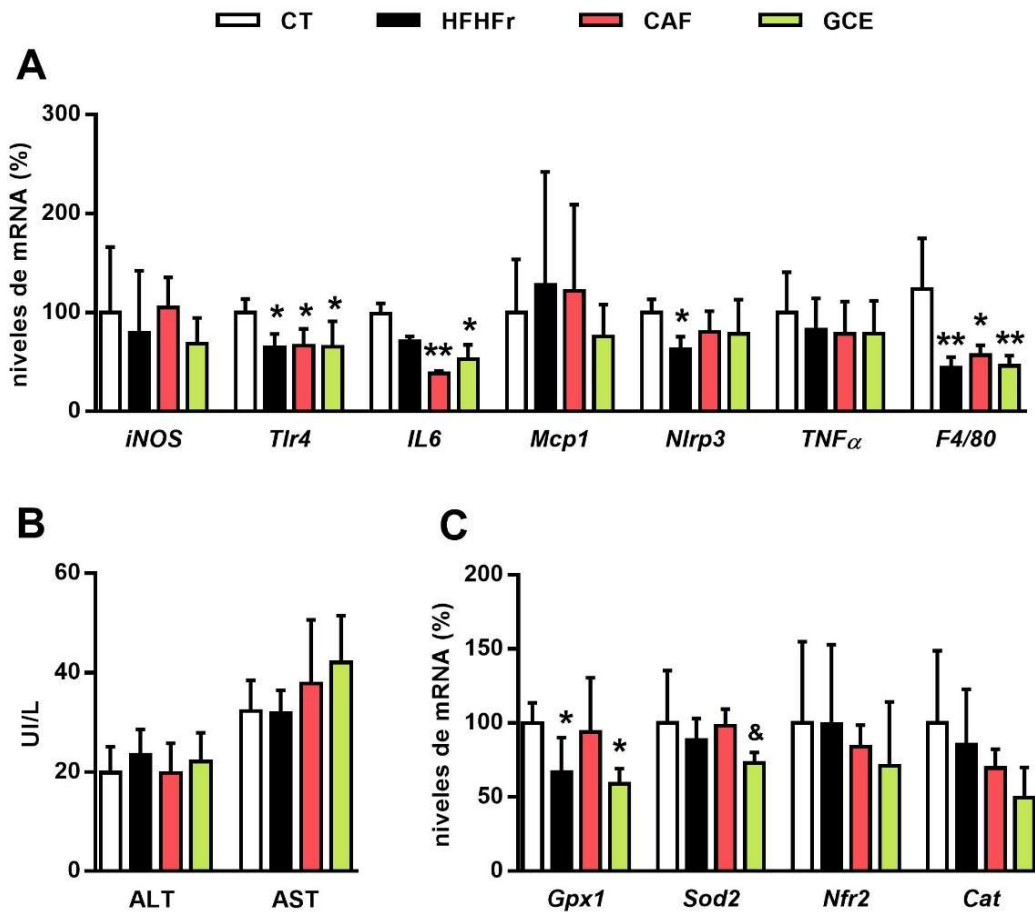


Figura IV-44. Principales marcadores de estrés oxidativo e inflamación. Niveles de mRNA de marcadores relacionados a **(A)** inflamación, **(B)** transaminasas hepáticas en suero y **(C)** expresión génica de marcadores de estrés oxidativo. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=10-12$ ratas/grupo). CT: control, HFHF_r: *high-fat/high-fructose*, CAF: *caféina* y GCE: *green coffee extract*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CT; & $p < 0.05$ vs CAF.

ESTUDIO 3: EFECTOS DEL ÁCIDO BEMPEDOICO EN EL MODELO HFHF_r EN RATAS HEMBRA SPRAGUE-DAWLEY

El ácido bempedoico (BemA) es un fármaco que recientemente ha sido aprobado para el tratamiento de la hipercolesterolemia en humanos. Hasta el momento se han establecido dos mecanismos de acción para este fármaco: la inhibición de la ACLY y la activación de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Pinkosky *et al.*, 2016). La inhibición de la ACLY en el hígado reduce tanto la síntesis de colesterol como la de los ácidos grasos, lo que le otorga un potencial terapéutico ideal para el tratamiento de la esteatosis hepática. Conforme a lo expuesto, el objetivo del estudio 3 fue evaluar los efectos del BemA en el modelo de hígado graso inducido en ratas por la dieta HFHF_r.

3.1 BemA disminuye la ingesta calórica de fructosa paralelamente al peso corporal

De igual manera que en los estudios anteriores, al finalizar el tratamiento con BemA se calculó el AUC del volumen promedio consumido de bebida y pienso, así como el consumo calórico total. Además, se evaluó la ganancia de peso corporal y de los pesos de los órganos involucrados en el metabolismo. El análisis de la AUC correspondiente al consumo global de líquido ingerido, reveló que las ratas de los grupos HFHF_r y BemA tuvieron un consumo significativamente mayor (2.3 y 1.8 veces más, respectivamente) en relación al grupo CT (**Figura IV-45A**). Como ya se ha descrito en los estudios anteriores, la cantidad de dieta sólida consumida de los grupos que recibieron el suplemento de fructosa (HFHF_r y BemA) fue significativamente menor (0.54 y 0.52 veces, respectivamente, $p < 0.01$) en relación al grupo control (**Figura IV-45B**). Considerando el aporte calórico de la fructosa y de las dietas, se observó que los animales del grupo HFHF_r recibieron el mayor aporte calórico, seguido por el grupo BemA en comparación al grupo control (**Figura IV-45C**).

Adicionalmente se analizó el consumo diario (en kilocalorías) de fructosa a lo largo del experimento (**Figura IV-45D**) y el área bajo la curva de dicho consumo antes y durante el tratamiento oral con BemA/vehículo (**Figura IV-45E**). Los resultados reflejan que el tratamiento vía oral con BemA redujo significativamente ($p < 0.01$) el consumo de fructosa y, por tanto, la ingesta calórica correspondiente en relación al grupo HFHF_r.

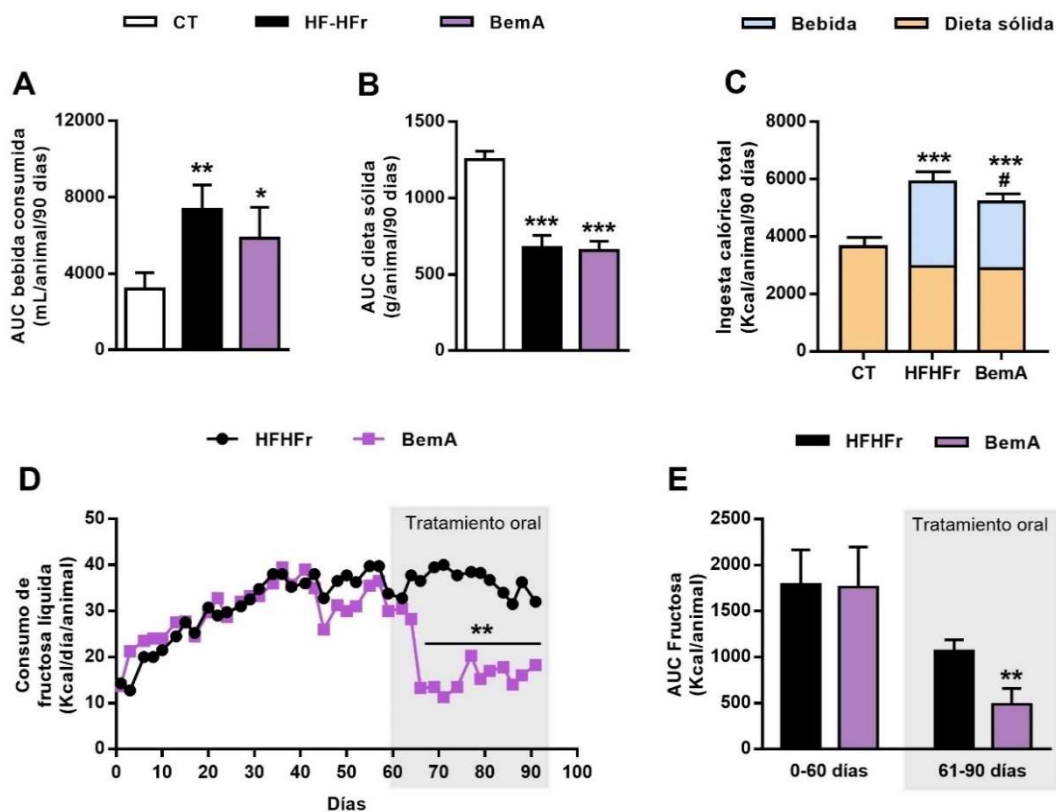


Figura IV-45. Efectos del tratamiento oral con BemA en el patrón de ingesta dietética del modelo HFHFfr. **(A)** AUC del volumen líquido consumido, **(B)** la cantidad de dieta sólida consumida por las ratas durante los 3 meses de estudio, **(C)** consumo calórico total expresado, **(D)** consumo calórico de fructosa a lo largo del tratamiento y **(E)** AUC de consumo calórico de la fructosa antes y durante el tratamiento con el fármaco/vehículos. AUC: *area under curve*. CT: control, HFHFfr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05 vs HFHFfr.

A pesar de observarse un incremento significativo de la ingesta calórica en el grupo BemA respecto al grupo CT, el peso corporal al finalizar el experimento fue menor en relación a los grupos CT y HFHFfr (**Figura IV-46A**). Esta diferencia se debe a que, en el último mes, el tratamiento con BemA redujo significativamente la ganancia de peso corporal (**Figura IV-46B**). Adicionalmente, el análisis de los pesos de los órganos reveló un aumento del peso del hígado en el grupo BemA en relación a los grupos CT y HFHFfr (**Figura IV-46C**). Sin embargo, el peso de los tejidos pWAT y sWAT se encontró significativamente disminuido en el grupo BemA en relación al grupo HFHFfr (**Figura IV-46D** y **IV-46E**).

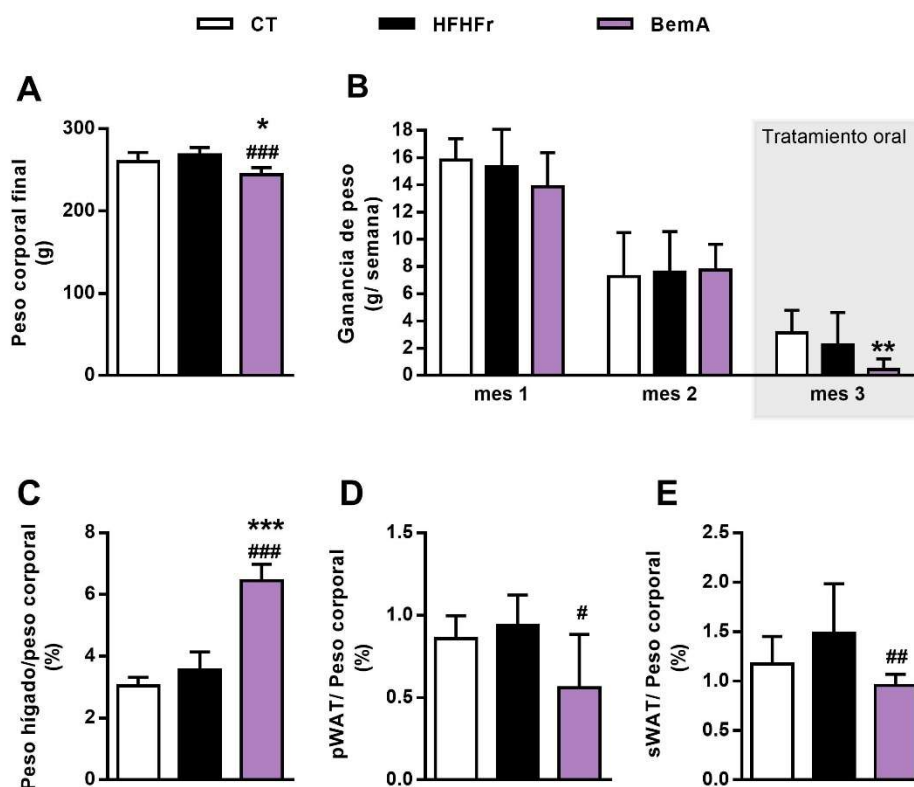


Figura IV-46. Efectos del tratamiento con BemA en el peso corporal y de órganos asociados al metabolismo. **(A)** Peso corporal, **(B)** promedio de la ganancia de peso semanal en cada mes de tratamiento **(C)** peso del hígado, **(D)** peso del tejido adiposo blanco perigonadal (pWAT) y **(E)** del subcutáneo sWAT. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 vs CT; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.01 vs HFHFr.

3.2 El tratamiento con BemA reduce la expresión de la fructoquinasa hepática en las ratas HFHFr

La fructoquinasa o cetoheixoquinasa (KHK, *ketohexokinase*) es la enzima limitante del metabolismo de la fructosa cuya expresión es inducible por la propia fructosa. Actúa en el primer paso de esta vía metabólica, convirtiendo la fructosa en fructosa-1-fosfato que, junto a otros subproductos, no solamente son dirigidos a la vía de la DNL, sino que también activan el factor de transcripción ChREBP, incrementando mucho más la biosíntesis de lípidos hepáticos (Linden *et al.*, 2018; Shepherd *et al.*, 2020). Como se observa en la **Figura IV-47A**, la expresión de la enzima KHK se incrementó significativamente ($p<0.01$) en el grupo HFHFr en relación al CT. Sin embargo, el tratamiento con BemA redujo significativamente la expresión de KHK hepática en relación a los grupos CT ($p<0.01$) y HFHFr ($p<0.001$).

El hecho de que la expresión de KHK sea inferior, incluso respecto al control, indica que existe un efecto directo de BemA sobre la expresión de KHK, no relacionado con la reducción del consumo de fructosa en el grupo BemA.

En la **Figura IV-47B** se observa que el tratamiento con BemA redujo el nivel de la proteína nuclear de ChREBP α en relación al grupo control ($p < 0.05$), así como también revirtió el aumento de la isoforma ChREBP β en relación al grupo HFHFfr ($p < 0.05$). En cuanto a la expresión génica de las isoformas de este factor de transcripción, no se observaron cambios en relación al mRNA de *ChREBP α* , mientras que los niveles de *ChREBP β* resultaron incrementados similarmente en los grupos HFHFfr y BemA en relación al control (**Figura IV-47C**). Por otra parte, el mRNA de *Lpk*, cuya expresión es directamente inducida por ChREBP β , se incrementó únicamente en las ratas del grupo HFHFfr (**Figura IV-47C**).

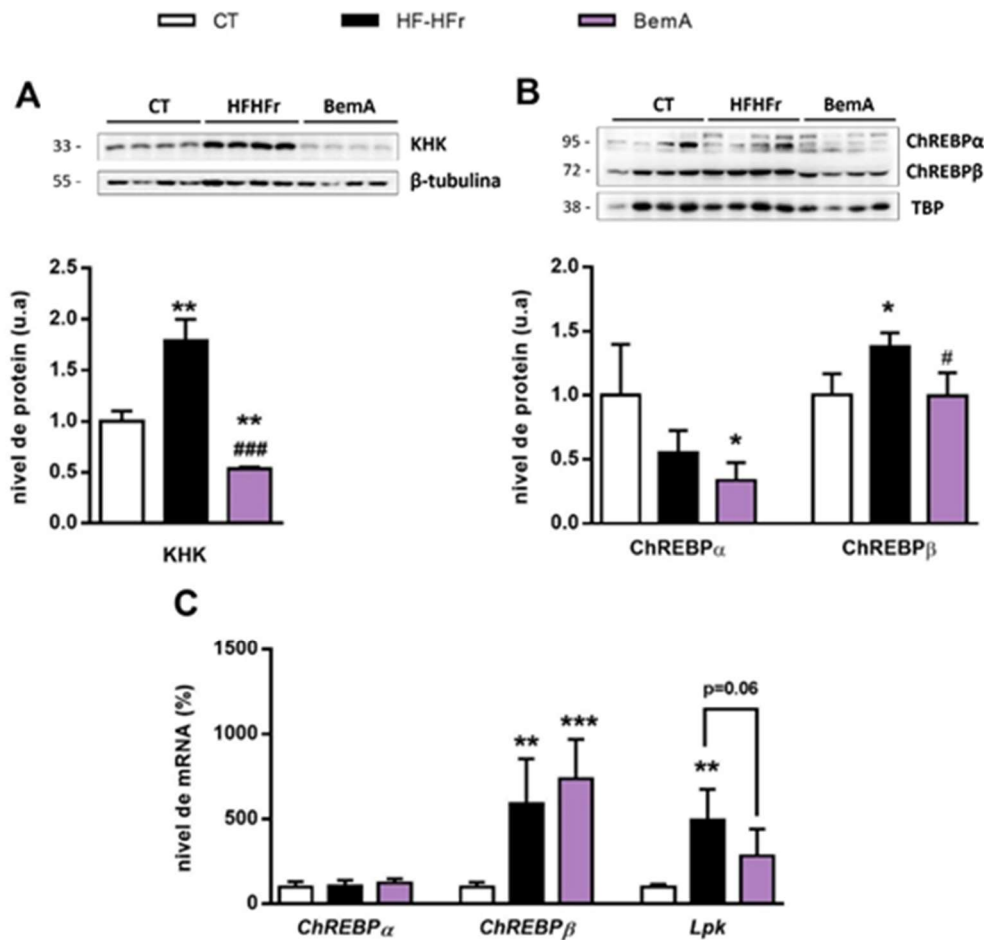


Figura IV-47. El ácido bempedoico reduce la expresión proteica de la fructoquinasa. **(A)** Niveles de expresión proteica de la fructoquinasa (KHK), **(B)** nivel de proteína en extracto nuclear de las isoformas α y β de ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) y **(C)** nivel de expresión de los mRNA de *ChREBP α* y *ChREBP β* . CT: control, HFHFfr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido

bempedoico. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ###p<0.01 vs HFHFr.

3.3 El tratamiento con BemA reduce la esteatosis hepática e induce hipertrofia en los hepatocitos

A fin de explorar el efecto del tratamiento con BemA sobre la esteatosis hepática se analizaron las imágenes de los cortes histológicos de hígado correspondientes a las tinciones H&E y ORO. En las imágenes de H&E se observó un mayor tamaño de los hepatocitos en el grupo BemA (**Figura IV-48A**) en relación a los grupos HFHFr y CT. A fin de analizar este efecto, se cuantificó el área nuclear en relación al área total de cada imagen de H&E. El resultado (**Figura IV-48B**) reveló una reducción del área nuclear en el grupo BemA en relación a los grupos CT (p<0.01) y HFHFr (p<0.05). Por otro lado, el análisis de las imágenes de la tinción ORO muestra que BemA redujo de forma muy marcada (p<0.001) el acúmulo de lípidos hepáticos en relación al grupo HFHFr (**Figura IV-48C y IV-48D**).

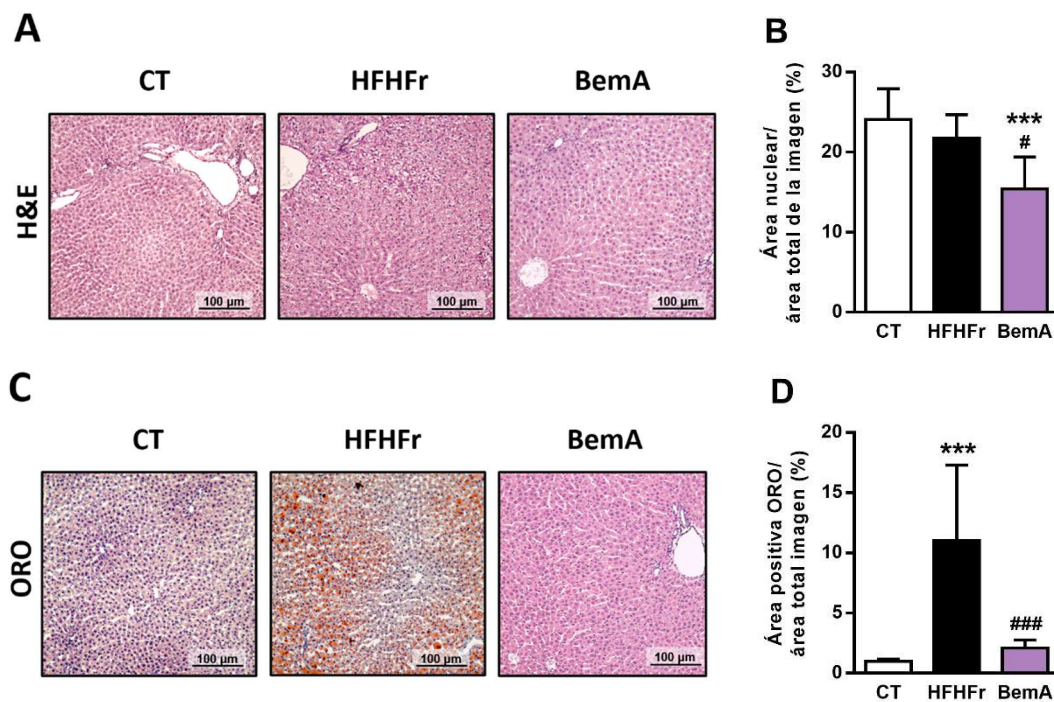


Figura IV-48. Análisis de imágenes de cortes histológicos de hígado coloreadas con **(A)** la tinción de H&E y **(C)** ORO, **(B)** porcentaje de área nuclear en relación al área total de la imagen y **(D)** cuantificación del área positiva para la coloración ORO y Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ###p<0.001 vs HFHFr.

De acuerdo con los resultados de la tinción ORO, la determinación de la concentración de lípidos hepáticos mostró que el tratamiento con BemA redujo la acumulación de TG hepáticos inducido por la dieta HFHF_r, aunque en este caso no se alcanzó la significancia estadística (**Figura IV-49A**).

Los niveles de colesterol hepático no resultaron alterados en ninguno de los grupos (**Figura IV-49B**). En relación a las especies de ácidos grasos que forman parte de los TG hepáticos, el incremento del contenido de los SFA palmítico y esteárico, y el de los MUFA palmitoleico y oleico en el grupo HFHF_r fue revertido significativamente ($p < 0.05$) por el tratamiento con BemA (**Figuras IV-49B, IV-49C, IV-49D y IV-49E**). Por otra parte, en relación a los PUFA linoleico, araquidónico y eicosapentaenoico no se modificaron por la dieta HFHF_r, sin embargo, el tratamiento con BemA redujo ($p < 0.05$) los niveles de estas especies lipídicas en relación al grupo control (**Figuras IV-49F, IV-49G y IV-49H**).

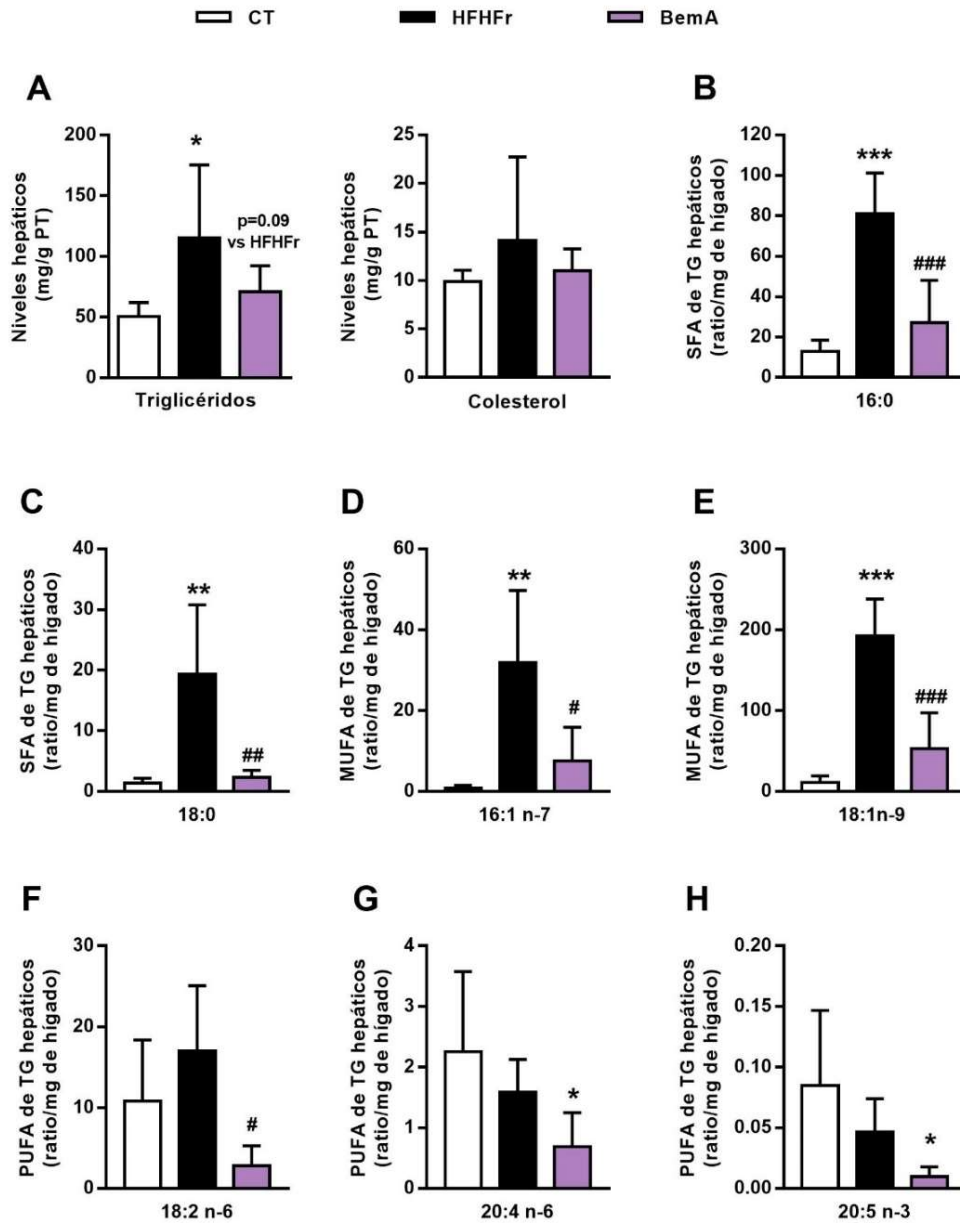


Figura IV-49. Análisis del contenido de lípidos en el hígado. **(A)** Niveles hepáticos de triglicéridos y colesterol, nivel de especies ácidos grasos de los TG hepático: SFAs **(B)** palmítico y **(C)** esteárico; MUFAs **(D)** palmitoleico, **(E)** oleico; PUFAs **(F)** linoleico, **(G)** araquidónico y **(H)** eicosapentanoico. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. *p<0.05, **p<0.01, p<0.001 vs CT; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs HFHFr.

3.4 Efectos de BemA sobre la DNL en el hígado de las ratas HFHFfr

Con la finalidad de explorar los efectos de BemA sobre la DNL, se determinó la expresión génica y proteica de enzimas relacionadas con esta ruta metabólica. Los niveles del mRNA de *Fas*, así como la expresión proteica de FAS, se incrementaron de forma similar en los grupos HFHFfr y BemA (**Figura IV-50A** y **IV-50B**). En cambio, el aumento en la expresión génica de *Scd1* producido por la dieta HFHFfr fue incrementado significativamente por el tratamiento con BemA ($p < 0.01$ vs HFHFfr, **Figura IV-50A**).

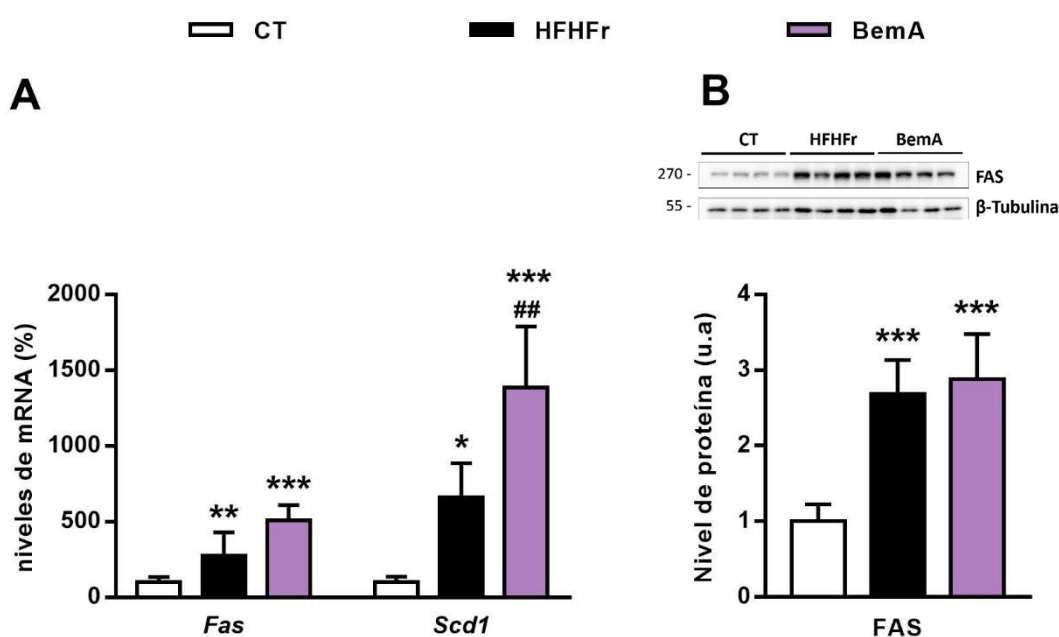


Figura IV-50. Expresión génica de enzimas lipogénicas en el hígado de los diferentes grupos experimentales. **(A)** Niveles de los mRNA de *Fas* y *Scd1*, y **(B)** expresión proteica de FAS en proteína total. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ ratas/grupo). CT: control, HFHFfr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT; ## $p < 0.01$ vs HFHFfr.

A continuación, se estudió el efecto de BemA sobre las vías de estrés de RE modificadas por la dieta HFHFfr en el estudio 1. Como se observa en la **Figura IV-51A**, el aumento en los niveles de fosforilación (Ser⁷²⁴) de IRE1 α inducido por la dieta HFHFfr no fue alterado por el tratamiento con BemA. De manera similar, no observamos cambios significativos en los niveles de expresión de la forma fosforilada y activa de la proteína PERK de los diferentes grupos experimentales (**Figura IV-51B**).

Al analizar la expresión de factores que podrían modificarse por la activación de IRE, verificamos que los niveles de expresión de la forma fosforilada y total de JNK fueron similares entre todos los grupos (**Figura IV-51C**). Así mismo, en la **Figura IV-51C**, observamos que la expresión génica de la chaperona *Bip*, relacionada con las vías de IRE, PERK y ATF6, fue similar entre los grupos. Además, la expresión génica de *Xbp1s* y *Xbp1u*, dependientes de la actividad endoribonucleasa de IRE, y los mRNA de *Gadd34* y *Chop* dependientes de la activación de PERK, no fueron modificados con ninguna de las intervenciones (**Figura IV-51D**).

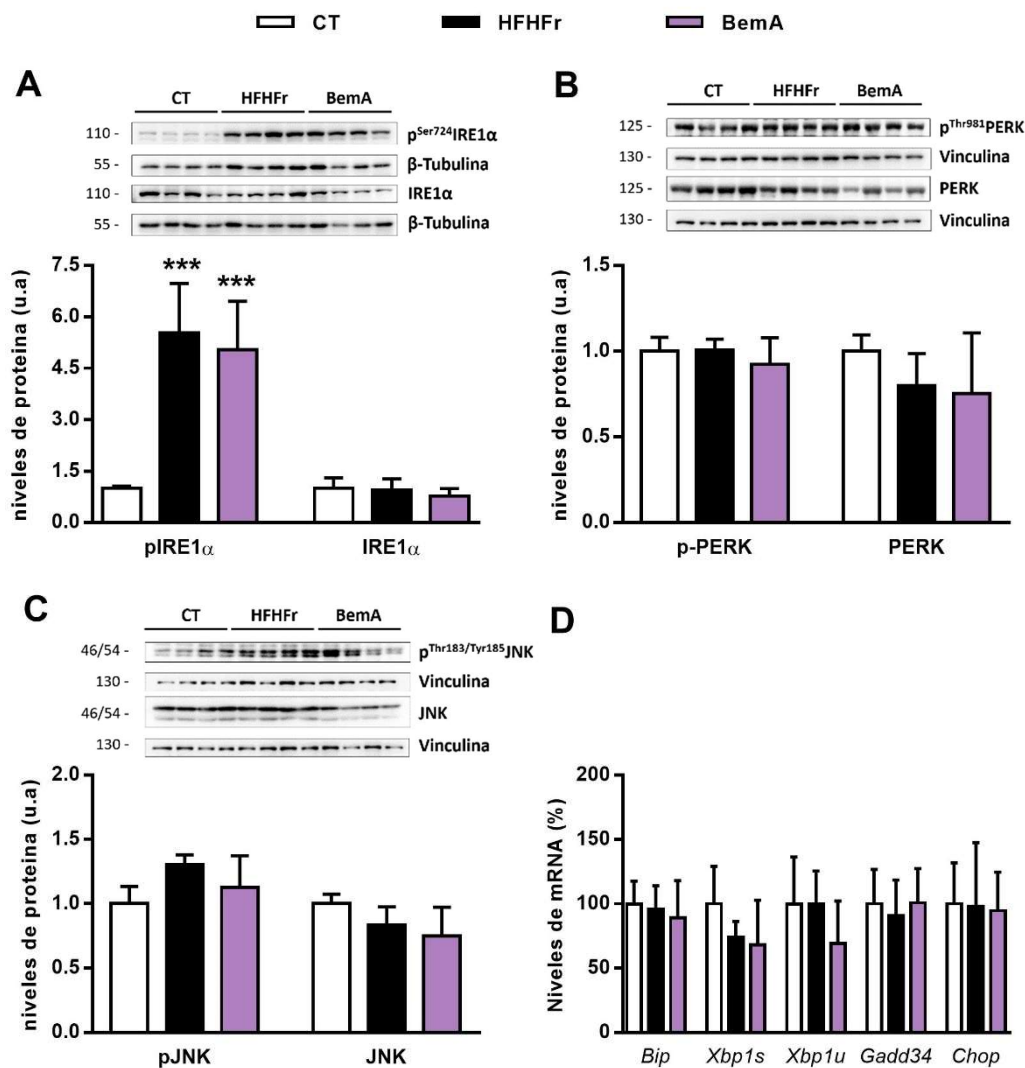


Figura IV-51. Efectos de BemA sobre los marcadores de estrés de RE. **(A)** niveles de expresión de las formas fosforilada y total de IRE, **(B)** PERK y **(C)** JNK, así como expresión génica de marcadores de RE. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. *** $p<0.001$ vs CT.

Además, se verificó el efecto de BemA sobre la expresión de varios marcadores de inflamación y estrés oxidativo en el hígado. Como se describió previamente en los estudios 1 y 2, la dieta HFHFr no produce inflamación ni estrés oxidativo. El tratamiento con el BemA no modificó los niveles séricos de los marcadores de daño hepático ALT y AST (**Figura IV-52A**), ni alteró los marcadores de estrés oxidativo hepático e incluso redujo los niveles de expresión génica de *Gpx1* ($p < 0.01$, vs CT) y *Sod2* ($p = 0.07$, vs CT) (**Figura IV-52B**). En relación a los marcadores de inflamación, BemA redujo marginalmente ($p = 0.06$) los niveles del mRNA de *Tnfa* en relación al grupo CT. Así mismo, tanto la dieta HFHFr, como la combinación con el tratamiento con BemA redujeron significativamente ($p < 0.05$, vs CT) el mRNA de *F4/80* (**Figura IV-52B**).

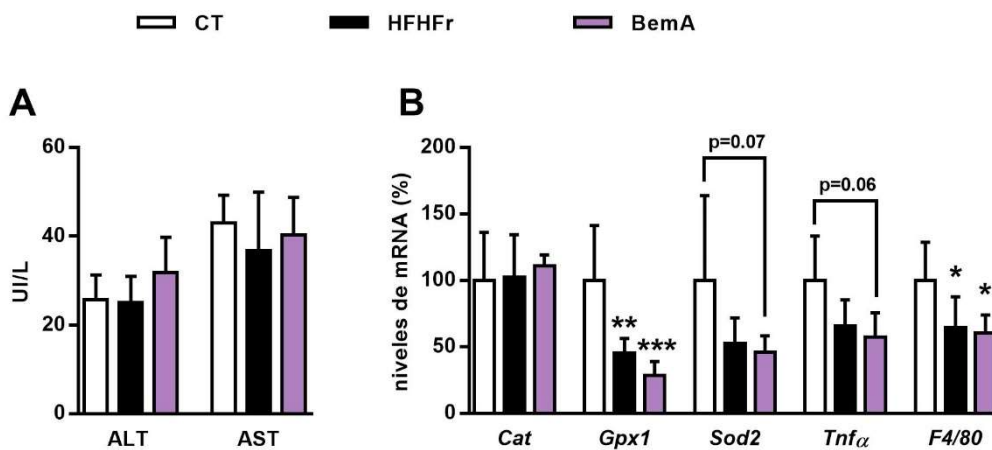


Figura IV-52 Marcadores de estrés oxidativo e inflamación. (A) Niveles de las transaminasas hepática en sangre y de (B) mRNA de enzimas y factores relacionados al estrés oxidativo (*Cat*, *Gpx1* y *Sod2*) e inflamación (*Tnfa* y *F4/80*). Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT.

3.5 BemA no modifica la termogénesis del BAT de las ratas HFHFr

A pesar de que el tratamiento con BemA no modificó la expresión génica de los principales marcadores de termogénesis en el BAT (**Figura IV-53A**), en el análisis de la expresión proteica se observó que el tratamiento con BemA redujo el nivel de expresión de UCP1 ($p < 0.01$) en relación al grupo HFHFr (**Figura IV-53B**), revirtiendo hasta el nivel de grupo CT. Este efecto concuerda con la reducción en el nivel de expresión de $\beta 3$ -AD en el grupo BemA en relación al grupo HFHFr (**Figura IV-53B**). La disminución de UCP1 y $\beta 3$ -AD producida por BemA sugiere que la reducción de peso observada en el grupo BemA no se produce por activación de la termogénesis en el BAT.

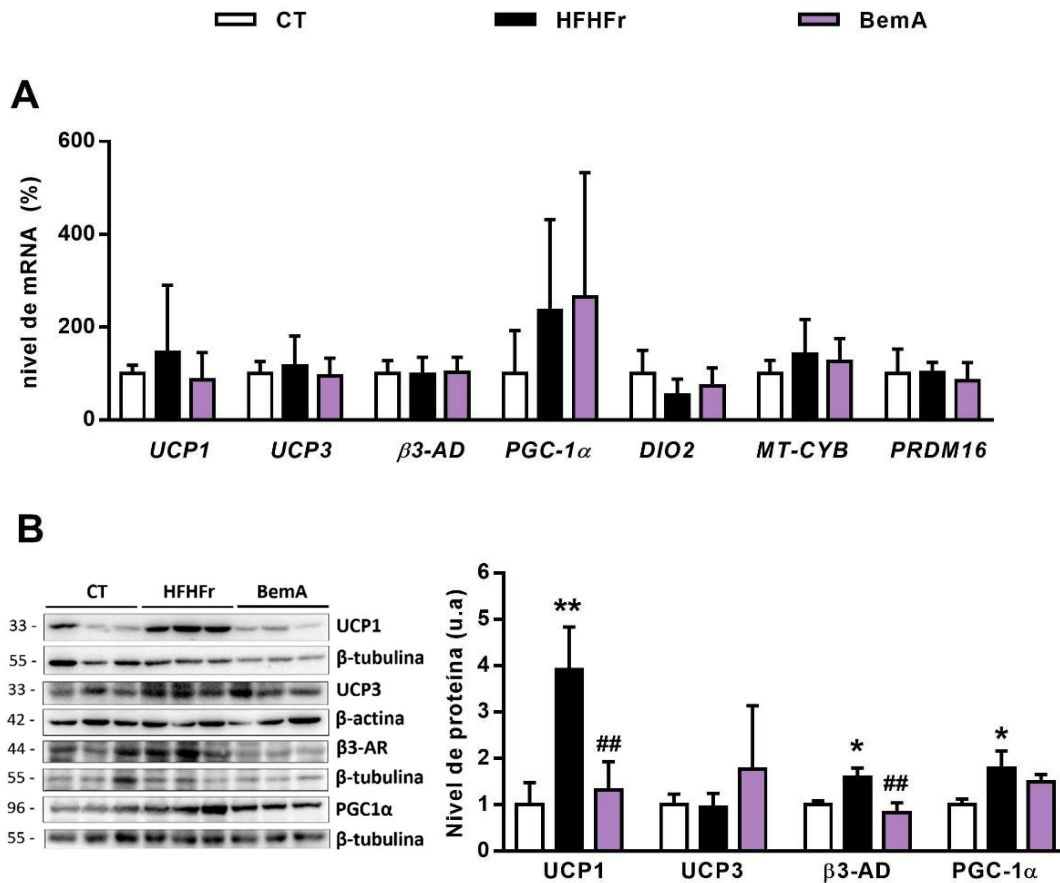


Figura IV-53. Efectos del tratamiento con BemA sobre factores termogénicos en el BAT. **(A)** niveles de expresión génica de principales factores termogénicos en BAT y **(B)** niveles de expresión proteica de UCP1, UCP3, β3-AD y PGC-1α. Los resultados se expresan como la media ± SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico *p<0.05, **p<0.01 vs CT; ##p<0.01 vs HFHFr.

3.6 Efectos del tratamiento con BemA sobre los parámetros sanguíneos y sobre el transporte de lípidos

Varios estudios en ratones suplementados con HFD afirman que el tratamiento con BemA reduce los niveles sanguíneos de triglicéridos y colesterol (Pinkosky *et al.*, 2013; Samsouondar *et al.*, 2017). En nuestro modelo, las ratas del grupo BemA mantuvieron la hipertrigliceridemia producida por la dieta HFHFr, a pesar de haber consumido menos fructosa (**Figura IV-54A**). Además, el tratamiento con BemA incrementó ligeramente el nivel sanguíneo de colesterol (**Figura IV-54B**). Adicionalmente, el análisis de los niveles séricos de los NEFA reveló un incremento marginalmente significativo (p=0.07) en el grupo BemA en relación al CT (**Figura IV-54C**). Asimismo, el tratamiento con BemA incrementó

significativamente ($p < 0.05$) los niveles séricos de ácidos biliares totales en relación a los grupos CT y HFHFr

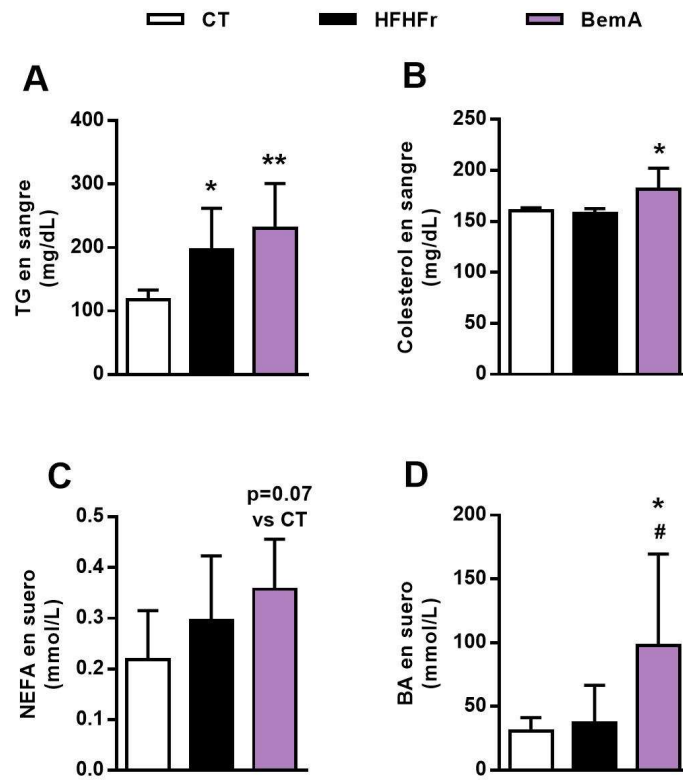


Figura IV-54. Efecto del tratamiento con BemA sobre parámetros bioquímicos en sangre. **(A)** niveles de triglicéridos, **(B)** colesterol, **(C)** glicemia, **(D)** niveles de ácidos grasos libres en suero (NEFA, *non-esterified fatty acids*) y **(E)** concentración de ácidos biliares (BA) en suero. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CT, # $p < 0.05$ vs HFHFr.

Existen ciertos factores en el hígado que podrían alterar la concentración de lípidos circulantes, entre ellos la lipólisis y la captación y exportación de lipoproteínas. Como hemos comentado previamente en el estudio 1, el aumento en la actividad de la lipasa hepática PNPLA3 se puede relacionar con el incremento de los niveles de triglicéridos sanguíneos (Trepó *et al.*, 2016). En el presente estudio, a pesar de que el grupo BemA consumió menos fructosa, el tratamiento farmacológico incrementó los niveles del mRNA de *Pnpla3* en relación a los niveles observados en el grupo HFHFr ($p < 0.05$, Figura 55A). Además, en relación al transporte de lipoproteínas, el nivel de expresión génica de *Mttp*, que codifica para la proteína microsomal encargada de la transferencia de TG hacia las lipoproteínas VLDL, no se modificó en los diferentes grupos experimentales (Figura IV-55A). Sin embargo, el nivel de la proteína de MTP resultó significativamente incrementado en los grupos HFHFr

y BemA (**Figura IV-55C**), lo que sugiere un mayor transporte de TG para incorporarse a las VLDL, que serán exportadas hacia la sangre.

La proteína PCSK9 es otro de los factores que puede alterar el transporte de lípidos, ya que disminuye la densidad de receptores LDL (LDLR) en la membrana de los hepatocitos y por lo tanto incrementa de forma indirecta la concentración de colesterol LDL en la sangre. En el modelo HFHFr, el tratamiento con BemA no modificó los niveles de expresión génica de *Pcsk9* y *Ldlr*, ni la expresión proteica de LDLR hepático (**Figuras IV-55B, IV-55C y IV-55D**).

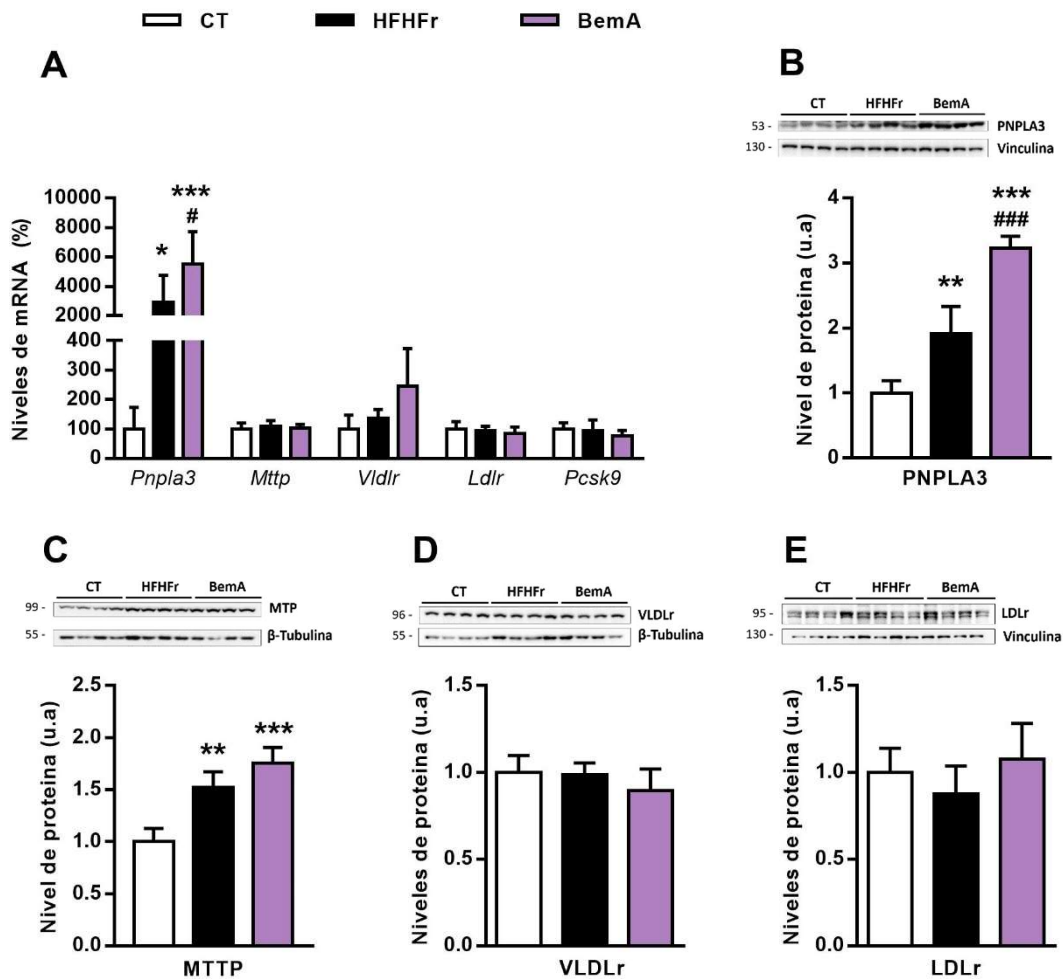


Figura IV-55. Factores que afectan el transporte de lípidos circulantes. **(A)** niveles de mRNA de *Pnpla3*, *Mttp*, *Vldlr*, *Ldlr* y *Pcsk9*, nivel de expresión proteica de **(B)** PNPLA3, **(C)** MTP, **(D)** VLDLr, y **(E)** LDLR en el hígado de las ratas. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ###p<0.001 vs HFHFr.

3.7 Efecto del BemA sobre la síntesis de BA en el modelo HFHFr

Con la finalidad de estudiar más a fondo las implicaciones del aumento de los BA totales en el grupo BemA, se analizó la expresión de genes y proteínas que regulan la síntesis hepática de los mismos. En nuestros animales, la expresión de la enzima limitante de la vía clásica de síntesis de BA, la Cyp7a1, tanto a nivel génico (**Figura IV-56A**) como proteico (**Figura IV-56B**), se encontró significativamente ($p < 0.001$) disminuida en los grupos HFHFr y BemA en relación al control. En cambio, la expresión de la Cyp27a1, responsable de la vía alternativa, fue similar en todos grupos (**Figura IV-56A**). Adicionalmente se puede observar en la **Figura IV-56B** que el nivel de proteína del receptor FXR, que controla la expresión de Cyp7a1, aumentó significativamente en el grupo HFHFr respecto al control. Además, el tratamiento con BemA incrementó mucho más los niveles de FXR ($p < 0.05$) en relación al grupo HFHFr. Este efecto farmacológico podría ser responsable del aumento significativo del mRNA de *Shp* en el grupo BemA en relación a los grupos CT y HFHFr (**Figura IV-56A**). Por otra parte, la expresión génica de BSEP no mostró variación significativa entre los animales (**Figura IV-56A**).

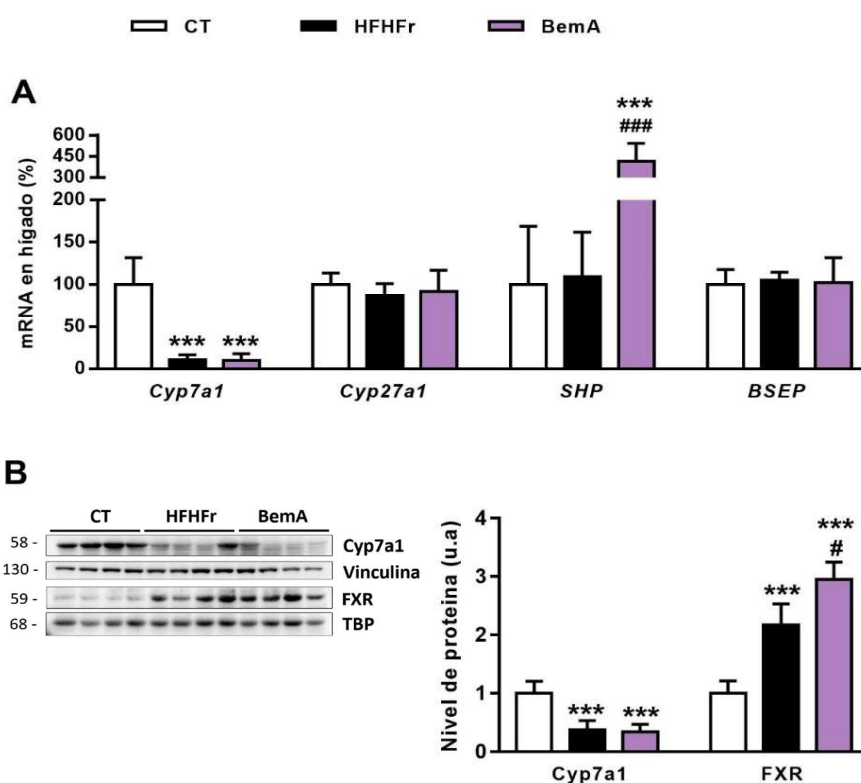


Figura IV-56. Niveles de **(A)** expresión génica y **(B)** proteica de factores que modulan la síntesis de ácidos biliares en el hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD. (n=7-8 ratas/grupo). Cyp7a1: *cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1*, Cyp27a1: *cytochrome P450 family 27 subfamily A*

member 1, SHP: *short heterodimer partner*, CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*. BemA: ácido bempedoico. *** $p < 0.001$ vs CT; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs HFHFr.

3.8 El tratamiento con BemA no modifica la sensibilidad periférica de la insulina en las ratas HFHFr

A fin de evaluar el efecto del tratamiento con el BemA sobre el metabolismo periférico de la glucosa, se determinaron la concentración basal de glucosa e insulina y se calculó el índice de sensibilidad a la insulina. Como se esperaba, la dieta HFHFr no modificó la glicemia basal, incrementó los niveles de insulina y, por tanto, redujo el ISI. Estas alteraciones no fueron modificadas tras el tratamiento con BemA (Figura IV-57A y Figura IV-57B).

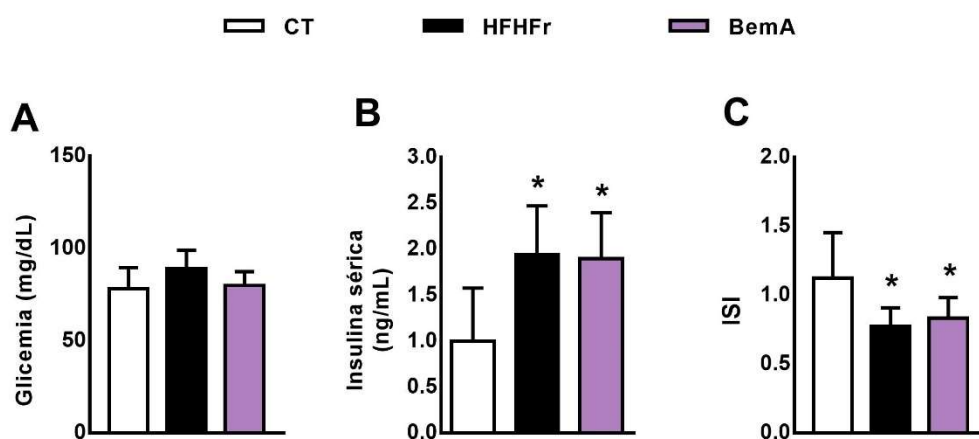


Figura IV-57. Niveles basales de (A) de glucosa en sangre e (B) insulina sérica. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, BemA: ácido bempedoico. * $p < 0.05$ vs CT.

Adicionalmente, se analizaron los valores de glucosa obtenidos a partir del TTOG. En la figura 58A se puede apreciar que las curvas de glucosa fueron similares entre los grupos. Así mismo, el AUC de la glucosa de los diferentes grupos no evidenciaron diferencias significativas (Figura IV-58B). Por otra parte, en la curva de la insulina de dicho test se observó un incremento significativo ($p < 0.01$) en el minuto 15 del test en los grupos HFHFr y BemA en relación al grupo CT (Figura IV-58D). Asimismo, el AUC de la insulina del grupo BemA (Figura IV-58E) resultó significativamente mayor en relación al grupo CT.

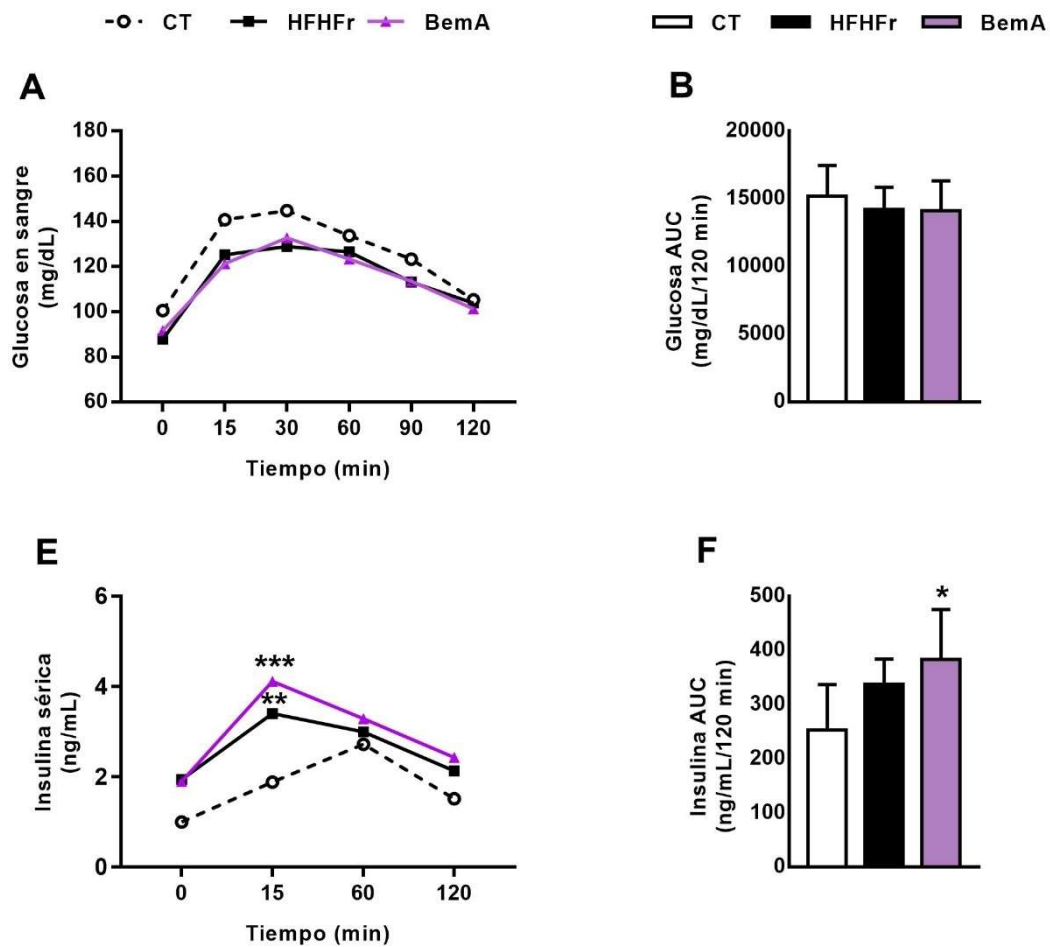


Figura IV-58. Evaluación del efecto de BemA sobre la sensibilidad a la insulina. **(A)** Curva de glucosa correspondiente al TTOG, **(B)** AUC de la curva de glucosa, **(C)** curva de insulina del TTOG y **(D)** AUC de la insulina. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=7-8$ ratas/grupo). TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa. AUC: *area under curve*. CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, BemA: ácido bempedoico. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs CT.

Además de la insulina, se determinaron los niveles séricos de otras hormonas que regulan el metabolismo. Los niveles de adiponectina determinados en el suero de las ratas resultaron similares en todos los grupos (**Figura IV-59A**). Sin embargo, el tratamiento con BemA redujo significativamente ($p<0.001$) los niveles de leptina en relación a los grupos HFHFr y CT (**Figura IV-59B**). Por otra parte, el tratamiento con BemA revirtió la reducción en los niveles de FGF15 producida por la dieta HFHFr (**Figura IV-59C**).

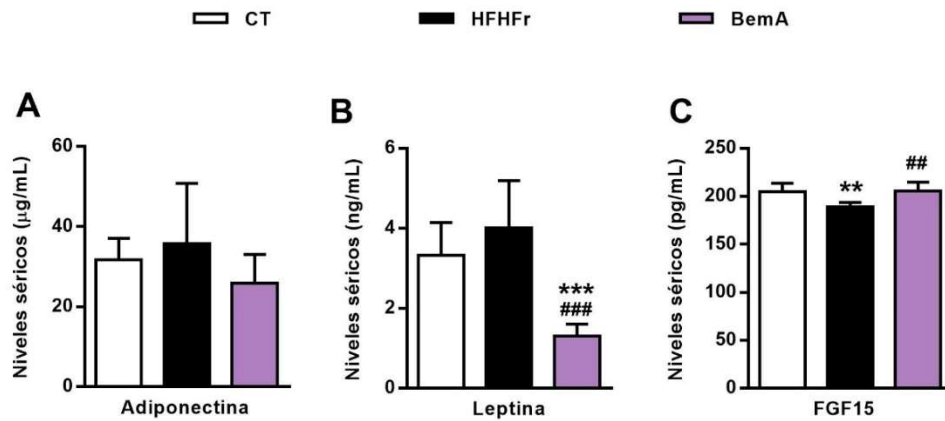


Figura IV-59. Efecto del BemA sobre los niveles de enzimas metabólicas. **(A)** Niveles séricos de adiponectina, **(B)** leptina y **(C)** FGF15 al final del estudio. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; ##p<0.01, ###p<0.001 vs HFHFr.

Para evaluar los efectos del tratamiento sobre la DNL hepática, se estudió la expresión de SREBP1c, un factor de transcripción inducido por la insulina. En el hígado de las ratas del grupo BemA se observó que la expresión tanto de la forma madura como precursora de SREBP1c se encontraron significativamente disminuidas (**Figura IV-60A**). SREBP1c regula la transcripción génica de varias enzimas, entre ellas la GCK. Como se observa en el Figura 60B, el nivel de mRNA de *Gck* también se redujo significativamente ($p<0.05$) en el hígado de las ratas BemA en relación al grupo HFHFr (**Figura IV-60A**).

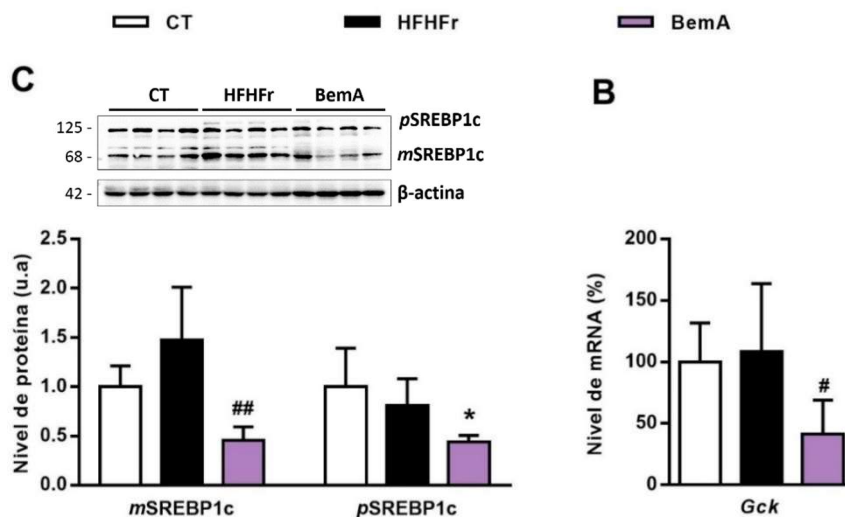


Figura IV-60. Efecto de BemA sobre la transcripción hepática inducida por insulina **(A)** Expresión proteica de la forma madura y precursora de SREBP1c y **(B)** expresión génica de la *Gck*. Los

resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose*, BemA: ácido bempedoico. *p<0.05 vs CT; #p<0.05, ###p<0.01 vs HFHFr.

3.9 Efectos de BemA sobre ACLY y AMPK en el hígado

Previamente en este estudio hemos descrito dos posibles mecanismos de acción de BemA no referenciados en la literatura, que podrían contribuir a la reducción de los triglicéridos hepáticos, la reducción en la expresión de KHK hepática y la estimulación de la expresión de la lipasa hepática PNPL3. Por otra parte, en la literatura se han establecido dos mecanismos acción para BemA: la inhibición de la enzima ACLY y la activación de la AMPK (Pinkosky *et al.*, 2016). A continuación, se presentan los resultados de los estudios de los efectos de BemA relacionados con estas vías en nuestro modelo de ratas HFHFr.

En el hígado, la enzima acil-CoA sintetasa 1 de cadena muy larga (ACSVL1, *very long-chain acyl-CoA synthetase 1*) cataliza la activación de BemA a su derivado CoA (BemA-CoA), el cual es responsable de la inhibición de la enzima ACLY (Pinkosky *et al.*, 2016; Pinkosky *et al.*, 2013). Como se observa en la Figura 61A, el mRNA de la *Acsvl1* resultó significativamente incrementado en el grupo BemA en relación a los grupos CT y HFHFr. En lo que respecta a ACLY, tanto la expresión proteica como génica de esta enzima se encontraron aumentados en comparación al CT y al grupo HFHFr (Figura IV-61B y IV-61C). El aumento de ACLY en el grupo BemA no parece ser una consecuencia directa de la inducción de DNL por el consumo de fructosa, ya que estas ratas consumieron menos fructosa, así que -más bien es el resultado de un efecto compensatorio debido a la inhibición enzimática de ACLY por parte de BemA.

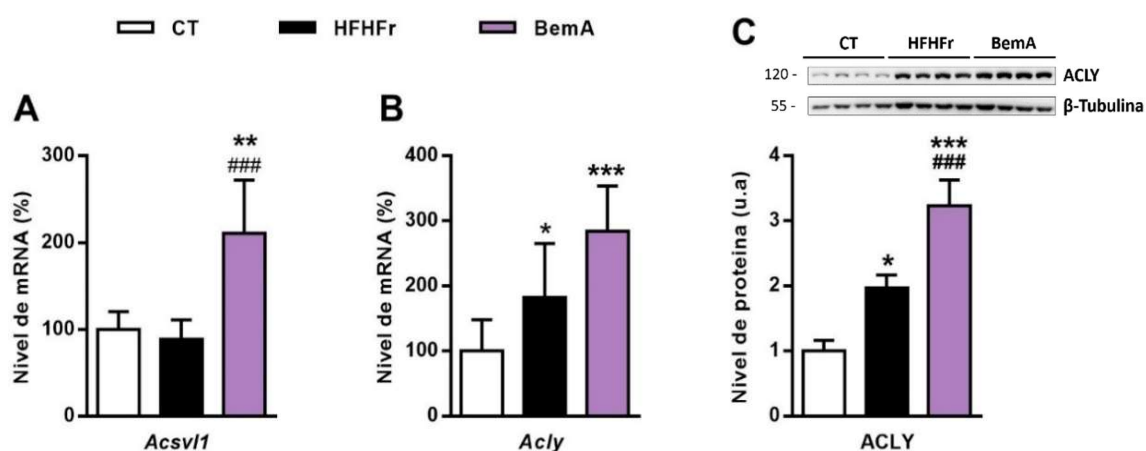


Figura IV-61. Efectos de BemA sobre la expresión de la enzima ACLY en el hígado (A) Expresión génica de *Acsvl1*, (B) expresión génica de *Acly* y (C) nivel de expresión de ACLY en proteína total de hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr:

high-fat/high-fructose, BemA: ácido bempedoico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT; ### $p < 0.001$ vs HFHFr.

Por otra parte, se evaluó el efecto directo de BemA sobre la activación del sensor metabólico AMPK. Como se observa en la **Figura IV-62A**, los niveles de expresión de p(Thr¹⁷²)-AMPK fueron similares en todos los grupos, sugiriendo que en nuestro modelo el tratamiento con BemA no modifica el grado de activación de AMPK, mientras que la proteína total de AMPK se redujo en el grupo BemA en relación al CT. La enzima AMPK inhibe la síntesis de ácidos grasos y promueve la oxidación de ácidos grasos al fosforilar la enzima ACC en la posición inhibitoria de Ser⁷⁹ de ACC. Para confirmar la no modificación en el grado de activación de AMPK, se verificaron los niveles de la proteína total y fosforilada de ACC. Como se observa en la **Figura IV-62B**, a pesar de que únicamente la forma total de ACC se incrementara significativamente, se observó que la forma fosforilada no se modificó significativamente.

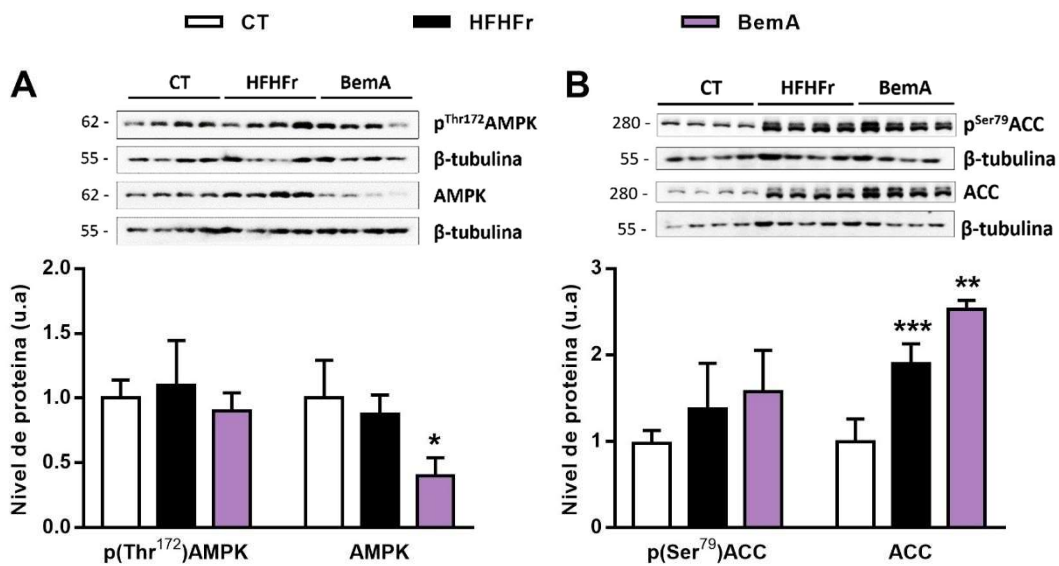


Figura IV-62. Estudio de las principales vías implicadas en el mecanismo de acción del BemA. **(A)** Niveles de mRNA y **(B)** nivel de expresión proteica de de acetil-CoA carboxilasa (ACLY) en hígado y **(C)** niveles de expresión proteica de la forma fosforilada (Ser⁷⁹) y total de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=8 ratas/grupo). CT: control, HFHFr: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT.

3.10 BemA posee actividad agonista sobre PPAR α y PPAR γ

Algunas referencias sugieren que BemA podría tener una actividad modesta como proliferador peroxisómico (Samsouandar *et al.*, 2017). Los fármacos que inducen proliferación de peroxisomas, aumentan la actividad de β -oxidación de ácidos grasos, producen hipertrofia celular y aumento en el peso del hígado en roedores (Lee *et al.*, 1995; Misra *et al.*, 2013). En nuestro modelo experimental observamos que el tratamiento con BemA no solamente revirtió la disminución de la β -oxidación de los ácidos grasos causada por la dieta HFHF r , sino que la incrementó a niveles significativamente superiores en relación al grupo CT y HFHF r (Figura IV-63A), produciendo igualmente hipertrofia hepatocitaria e incremento del peso hepático. Los fármacos que producen estos efectos en roedores, se comportan como agonistas del receptor PPAR, especialmente de la isoforma α (Burri *et al.*, 2010)

El análisis de la expresión génica de *Ppara* en el hígado no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura IV-63B). En cambio, el mRNA de *Acox1* se incrementó significativamente en el grupo BemA en relación a los grupos HFHF r y CT (Figura IV-63B), y el mRNA de *Cpt1a* mostró un ligero aumento ($p=0.07$) en relación al control (Figura IV-63B); la expresión de *Acox1* y *Cpt1a* se encuentra bajo el control transcripcional de PPAR (Hashimoto *et al.*, 1999; Bougarne *et al.*, 2018).

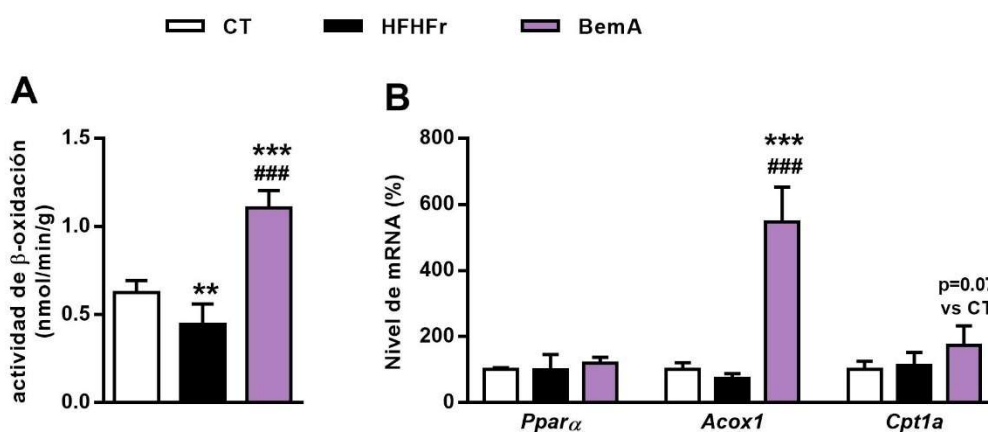


Figura 63. Evaluación de la actividad de β -oxidación de ácidos grasos en el hígado. (A) Actividad de β -oxidación de los ácidos grasos (B) nivel de mRNA de *Ppara*, *Acox1* y *Cpt1a*. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs CT; ### $p < 0.001$ vs HFHF r .

Con la finalidad de corroborar el efecto del tratamiento con BemA sobre la actividad del receptor nuclear PPAR se analizó la expresión de una serie de genes diana de PPAR en las muestras de hígado de los grupos BemA y HFHF_r. Para este análisis, se utilizó un panel de qPCR personalizado para 84 genes regulados por la activación de PPAR. Los resultados revelaron que el 26 % del total de los genes analizados fueron modificados significativamente (Figura 64) por la administración del fármaco en relación al grupo HFHF_r.

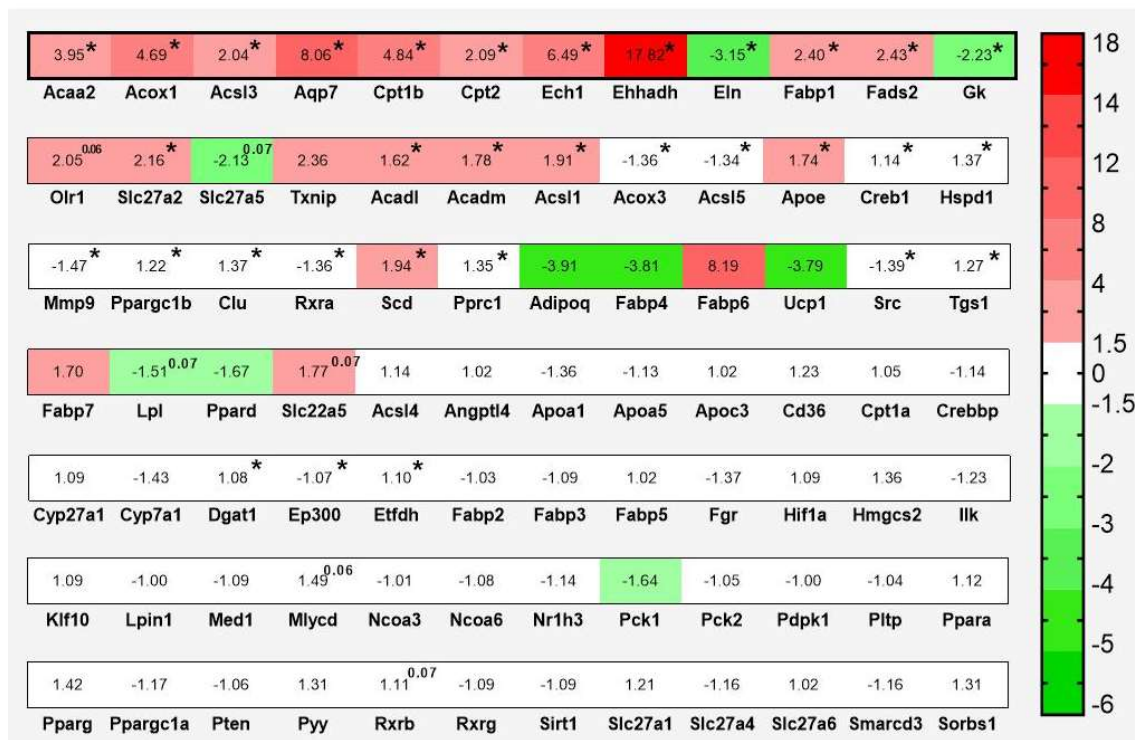


Figura IV-64. Análisis de transcriptoma representado como mapa de calor de 84 genes inducibles por la activación de PPAR en hígado de ratas. Los resultados se encuentran representados como el Log₂ de la variación de la expresión génica entre BemA/HFHF_r y el valor representa la media (n= 3, donde cada muestra representa un grupo de dos ratas). En escala de rojos se presentan los genes inducidos significativamente (valores superiores a 1.5, *p<0.05) y en escala de verdes los genes regulados a la baja (valores inferiores a -1.5, *p<0.05).

Finalmente, se validaron los genes activados por PPAR α que se incrementaron significativamente en el ensayo anterior tras el tratamiento con BemA. Algunos de estos genes ya fueron presentados previamente en este estudio: *Acox* y *Cpt1a* (Figura 63B) y *Acs11* (Figura IV-61A). En la figura 65A se muestra la validación de otros genes presentes en el array que participan en la β -oxidación peroxisómica, como la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (*Ehhadh*), y la delta-6-desaturasa (*Fads2*).

Asimismo, se confirmó que el tratamiento con BemA induce significativamente diversos genes relacionados con la β -oxidación mitocondrial (Figura 65B): la ácido graso translocasa *CD36*, la carnitina palmitoil transferasa 1b (*Cpt1b*), la acetil-CoA aciltransferasa 2 (*Acaa2*), y la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (*Acadl*). Ello sugiere que BemA es capaz de inducir tanto la β -oxidación peroxisómica como la mitocondrial.

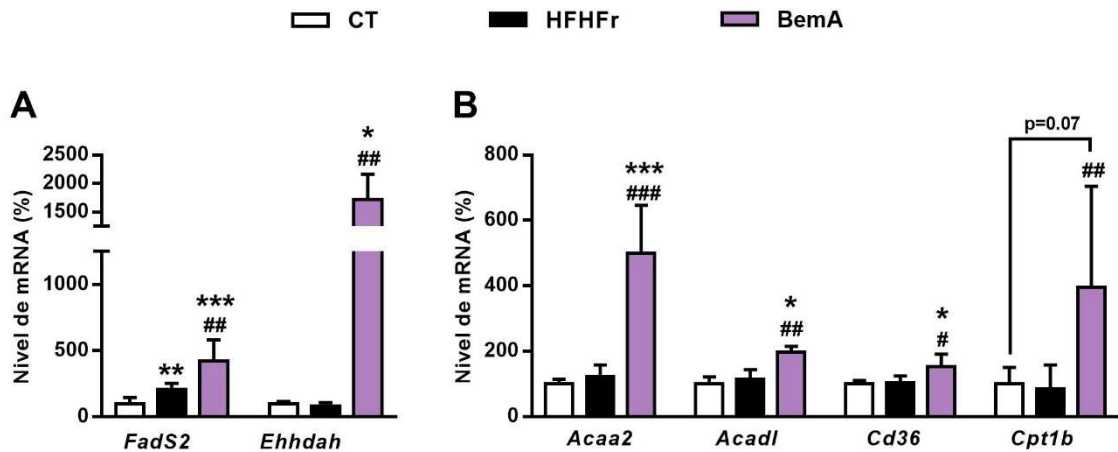


Figura IV-65. Validación de la expresión de genes inducidos por PPAR α en el hígado. **(A)** Expresión de genes relacionados con la β -oxidación peroxisomal y **(B)** expresión de genes relacionados con β -oxidación mitocondrial. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=5-6 ratas/grupo). CT: control, HFHF: *high-fat/high-fructose* y BemA: ácido bempedoico. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CT; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs HFHF.

Adicionalmente, se determinó la expresión proteica de las isoformas α , β/δ y γ de PPAR en extracto nuclear de hígado. Como se observa en la **Figura IV-66A**, la expresión proteica del PPAR α fue similar entre los grupos. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de PPAR β/δ (**Figura IV-66B**), mientras que el tratamiento con BemA indujo significativamente los niveles de PPAR γ en relación a los grupos CT y HFHF (**Figura IV-66C**).

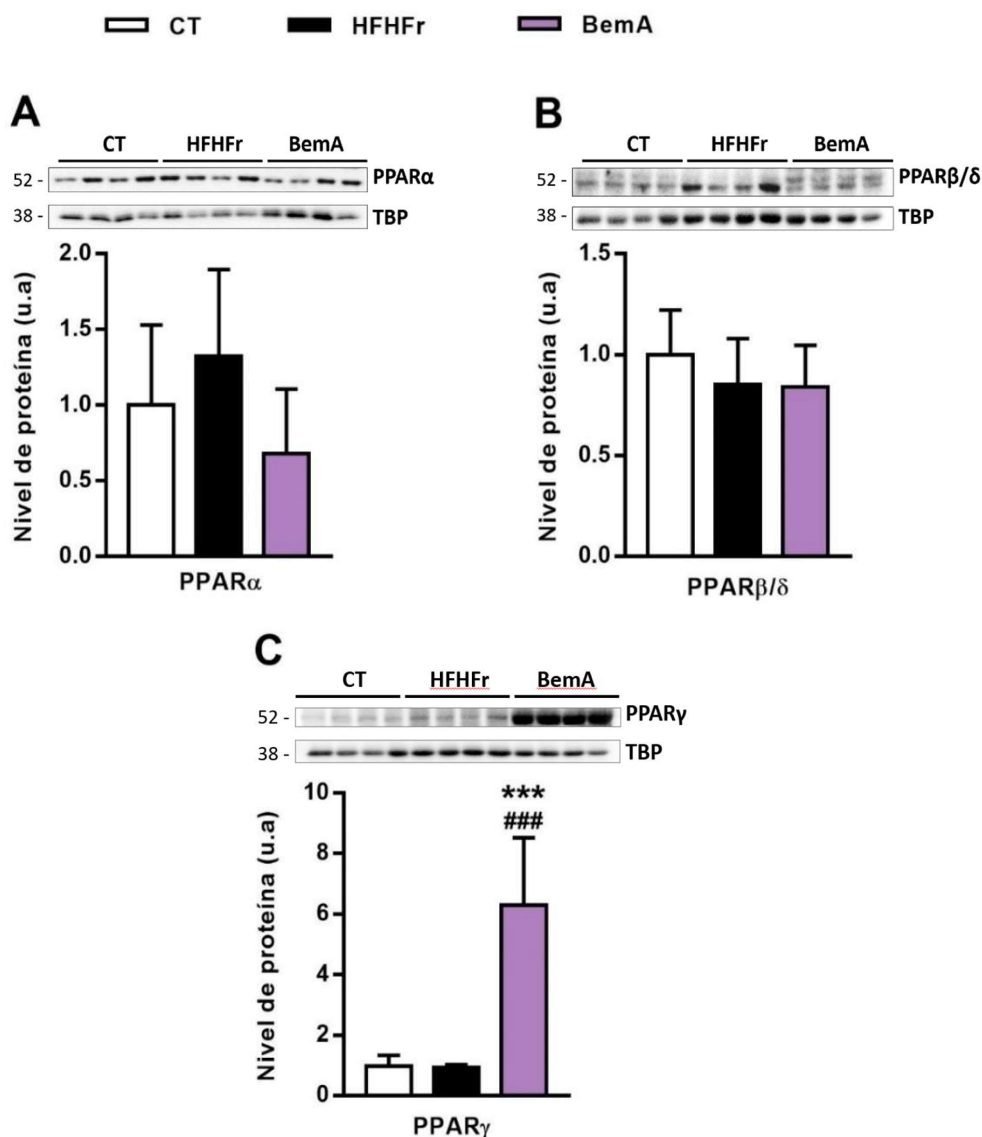


Figura IV-66. Expresión de las principales isoformas de PPAR en extracto nuclear de hígado. Nivel de proteína de **(A)** Ppar α , **(B)** PPAR β/δ y **(C)** PPAR γ y **(D)** nivel de mRNA de PPAR γ . Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=7-8 ratas/grupo). ***p<0.01 vs CT; ###p<0.001 vs HFHFr

La posible actividad agonista de BemA sobre los receptores PPAR α y PPAR γ en ratas y PPAR α , β/δ y γ en humanos BemA fue analizada a través del ensayo del gen reportero de la Luciferasa. Para el primer ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de BemA (0.1 μ M - 1.45 mM) y como control positivo se incluyó el agonista PPAR α de referencia GW 509735 (0.017 - 12 μ M).

Como se muestra en la **Figura IV-66A**, BemA es capaz de activar PPAR α a partir de la concentración de 15 μ M hasta la concentración máxima ensayada de 1.45 mM. La curva dosis-respuesta de BemA se sitúa a la derecha del agonista, indicando que posee una menor potencia que el GW 509735. La eficacia de BemA como agonista PPAR α es aparentemente mucho menor que la del agonista utilizado, siendo la CE50 (concentración eficaz 50) igual 781 μ M (**Tabla IV-2**). Por otra parte, el ensayo de PPAR γ de ratas (**Figura IV-66B**) reveló que, en el rango concentraciones (100 μ M – 1.45 mM) ensayadas de BemA, éste presentó actividad agonista sobre este receptor, y una CE50 de 876 μ M (**Tabla IV-2**).

En los ensayos de gen reportero para PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ humanos, se utilizaron las mismas concentraciones de BemA del ensayo anterior. El agonista PPAR α de referencia GW7647 se ensayó a concentraciones entre 0.4 - 300 nM, mientras que el rango de concentraciones del agonista PPAR β/δ GW0742 fue entre 0.08 - 60 nM. el del agonista de referencia PPAR γ rosiglitazona fue 31 - 2000 nM. Los resultados revelaron que BemA posee actividad agonista sobre PPAR α y PPAR γ humanos entre las concentraciones de 100 μ M hasta 1.45 mM (**Figura IV-66C** y **IV-66E**), con valores de CE50 de 168 μ M y 332 μ M, respectivamente. En relación a PPAR β , no se registró actividad de BemA a las concentraciones ensayadas (**Figura IV-66D**). Aunque las potencias observadas de BemA sobre PPAR α y PPAR γ humanos fueron menores que a los de sus agonistas de referencia, en el ensayo para PPAR γ se evidenció que BemA posee aparentemente una eficacia como mínimo similar a la del agonista de referencia, la rosiglitazona (**Tabla IV-2**).

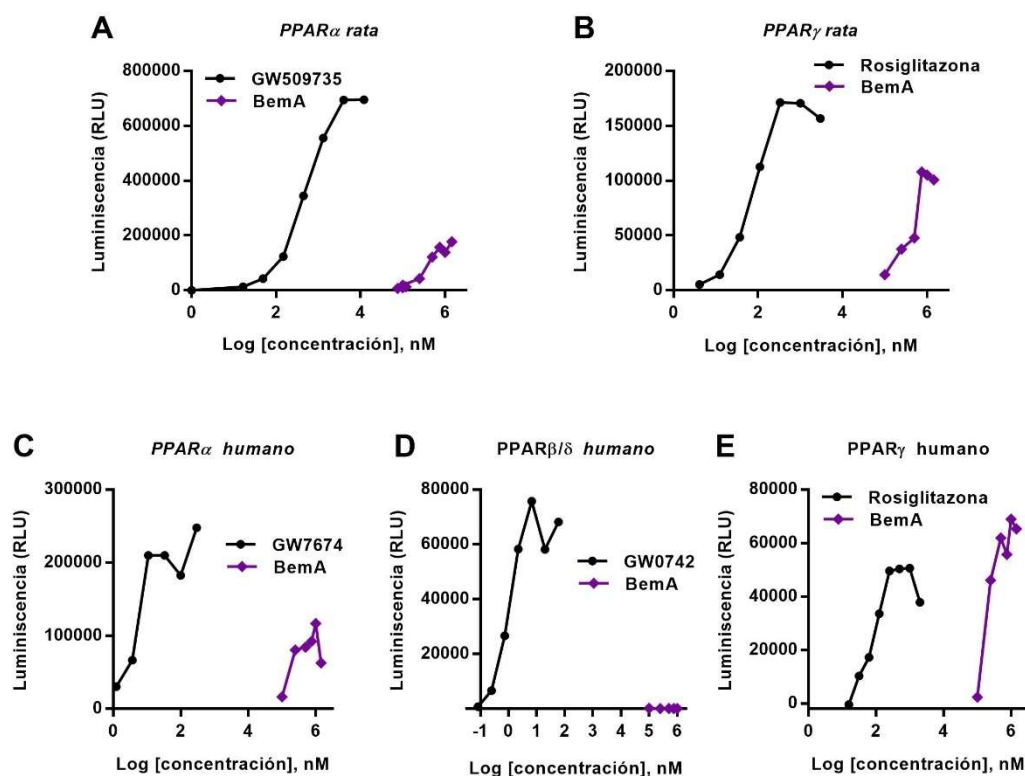


Figura IV-67. Representación de curvas de actividad PPAR obtenidas con el sistema luciferasa. **(A)** PPAR α ratas, **(B)** PPAR γ ratas, **(C)** PPAR α humano, **(D)** PPAR β/δ humano y **(E)** PPAR γ humanos. Los resultados se presentan como la media de triplicados ensayados para cada concentración del BemA y de los correspondientes agonistas.

Tabla IV-2. Valores CE50 y Emax para las diferentes curvas de agonistas ensayadas

		CE 50	E max
PPAR α rata	<i>BemA</i> :	781 μ M	261675 RLU
	<i>GW590735</i> :	561 nM	761689 RLU
PPAR γ rata	<i>BemA</i> :	876 μ M	181745 RLU
	<i>Rosiglitazona</i> :	78.3 nM	177321 RLU
PPAR α humano	<i>BemA</i> :	168 μ M	107342 RLU
	<i>GW7647</i> :	5.3 nM	236160 RLU
PPAR γ humano	<i>BemA</i> :	332 μ M	87195 RLU
	<i>Rosiglitazona</i> :	75.9 nM	51652 RLU

CE: concentración eficaz 50; BemA: ácido bempedoico; RLU: *Relative Luminescence Units*

5. DISCUSIÓN

La NAFLD abarca un espectro de patologías hepáticas cuya incidencia es cada vez mayor en la población a nivel mundial. Si bien está descrito que se trata de una enfermedad metabólica multifactorial, numerosos estudios destacan que uno de los principales factores desencadenantes es el consumo de dietas hipercalóricas o tipo *Western* (Kechagias *et al.*, 2008; Younossi *et al.*, 2016). En dicho contexto dietético, la presencia de azúcares en las bebidas azucaradas, en particular la fructosa, contribuyen al desarrollo y la severidad de esta patología (Vos & Lavine, 2016). Actualmente no se cuenta con terapias farmacológicas aprobadas para su tratamiento y, por lo tanto, comprender las alteraciones inducidas a nivel molecular es esencial para desarrollar nuevas terapias farmacológicas que permitan prevenir/tratar esta enfermedad.

A tal efecto, se han desarrollado numerosos modelos preclínicos basados en dietas grasas, los cuales desarrollan hígado graso junto a otras alteraciones metabólicas como obesidad y resistencia a la insulina (Oligschlaeger & Shiri-Sverdlov, 2020). Sin embargo, en humanos existe una proporción substancial de pacientes que desarrollan NAFLD sin sobrepeso (Ye *et al.*, 2020). Los modelos en ratas que combinan la suplementación de fructosa (25% p/v en el agua de bebida) con la HFD típica (conteniendo colesterol) constatan que después de 2 meses de suplementación con HFD sola o suplementada con fructosa, las ratas incrementan su peso corporal y desarrollan características similares a la esteatohepatitis humana (Auberbal *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2016; Jensen *et al.*, 2018). En humanos, sin embargo, deben transcurrir varios años para que se desarrolle inflamación y daño tisular en los hígados esteatósicos (Younossi *et al.* 2017).

En estudios previos de nuestro grupo hemos observado que la suplementación de 10% de fructosa (p/v) en el agua junto a una dieta estándar produce esteatosis hepática sin signos de inflamación en ratas hembra Sprague-Dawley (Baena *et al.*, 2016). No obstante, en dicho modelo, la esteatosis es moderada y revierte con el tiempo, aun manteniendo el consumo de fructosa (Sangüesa *et al.*, 2019). Además, este modelo no reproduce la situación más habitual en humanos, ya que el elevado consumo de fructosa, principalmente en forma de bebidas azucaradas, suele acompañarse de una dieta rica en grasa. Igualmente, otro estudio de nuestro grupo, en el que se utilizaron ratones LDL-R^{-/-}, evidenció que la combinación de una dieta tipo *Western* (0.21% de colesterol) y fructosa líquida, permite una mayor acumulación de triglicéridos en el hígado en comparación a la suplementación únicamente con dieta *Western* (sin suplemento de fructosa) o con dieta estándar (Sangüesa *et al.*, 2017). Sin embargo, en

dicho estudio los marcadores de inflamación y fibrosis se encontraron significativamente incrementados debido al contenido de colesterol de la dieta *Western* utilizada. La ingesta dietética de colesterol activa a las células de Kupffer y las células estrelladas, lo que desencadena inflamación y fibrosis hepática (Arguello *et al.*, 2015).

Considerando los hallazgos previos, el estudio 1 ha sido focalizado en la caracterización de un modelo preclínico de esteatosis hepática simple, sin inflamación, en rata. Esta fase inicial de la enfermedad ha sido tradicionalmente considerada como una condición benigna. Sin embargo, estudios recientes muestran que la esteatosis hepática simple presenta un potencial similar a NASH de evolucionar hacia fibrosis (Anstee *et al.*, 2019; Mazzolini *et al.*, 2020), por lo que resulta de gran interés poder revertir la acumulación hepática de lípidos ya en las etapas más tempranas de la enfermedad. Así pues, disponer de un modelo de esta fase inicial resulta esencial para poder estudiar con posterioridad los efectos de fármacos potenciales para el tratamiento/prevención de la esteatosis hepática.

El modelo fue desarrollado en ratas hembra de la cepa *Sprague-Dawley*, alimentadas con una dieta rica en grasas saturadas (47% calorías), que proporcionó la fuente exógena de ácidos grasos, junto a la suplementación de fructosa líquida (10% p/v) en el agua de bebida, con la finalidad de promover la DNL (Rebollo *et al.*, 2012; Jensen *et al.*, 2018). A fin de evitar el progreso a NASH, la composición de la dieta fue basada en manteca de cacao, una fuente de ácidos grasos saturados (especialmente palmítico y esteárico) que, por ser de origen vegetal, no contiene colesterol (Lipp *et al.*, 2001). Los resultados demuestran que la adición de fructosa líquida al 10% exacerba la esteatosis hepática inducida por la suplementación de dieta grasa, a través de la activación adicional de mecanismos moleculares que alteran el metabolismo no solamente a nivel hepático, sino también de tejidos extrahepáticos como el músculo esquelético y tejido adiposo marrón. Estos mecanismos desencadenan en el animal un estado de esteatosis hepática sin inflamación, con alteraciones del metabolismo periférico de la glucosa y sin obesidad.

Una vez establecido el modelo de esteatosis simple, se estudió el efecto del tratamiento con fármacos que potencialmente pudieran reducir la acumulación hepática de lípidos. En el estudio 2, se observó que la adición de cafeína a la dieta no revierte la esteatosis hepática en el modelo HFHFr. Sin embargo, la adición de GCE, conteniendo la misma dosis de cafeína, revela signos de mejora en la acumulación de TG hepáticos en relación a CAF, lo que

indicaría que los componentes químicos extras a la CAF presentes en el GCE, o el sinergismo entre ellos, permitirían la activación de mecanismos que modulen la esteatosis hepática.

Finalmente, en el estudio 3 hemos observado que el ácido bempedoico, un fármaco hipocolesterolemizante, no solamente reduce la esteatosis hepática en el modelo HFHFr por el mecanismo de acción reconocido para este fármaco (inhibición de la ACLY hepática), sino que también hemos detectado posibles nuevos mecanismos de acción no descritos previamente en la literatura, en particular la actividad agonista de BemA sobre los factores de transcripción PPAR α y γ , así como, la inhibición de la expresión de la KHK y la inducción de la expresión de la lipasa PNPLA3 en el hígado. Sin embargo, se ha de indicar que, al menos en nuestro modelo, la resultante final de la acción de BemA conduce a la reducción del acúmulo de lípidos hepáticos, pero no evita la hipertrigliceridemia producida por la dieta HFHFr.

Estudio 1: Caracterización del modelo de esteatosis hepática simple inducido por la suplementación de la dieta HFHFr

Los datos experimentales del estudio 1 revelaron que la suplementación durante 3 meses con las dietas HFHFr/HFD, no produjo cambios significativos en el peso corporal ni en la adiposidad, a pesar de que estos animales consumieron una cantidad de calorías muy superior a la del grupo control (**Figura VI-1C**). La ausencia de efecto sobre el peso corporal podría ser una consecuencia del aumento de la actividad termogénica inducida por las dietas HFHFr/HFD en el BAT de los animales. El consumo de dietas con alto contenido calórico induce la termogénesis en el BAT a través de la estimulación de la vía β 3-adrenérgica que, a su vez, activa a la proteína UCP1 mitocondrial para la generación rápida de calor por medio de la lipólisis (Rothwell & Stock, 1979; Alcalá *et al.*, 2017). En nuestras condiciones experimentales, ambas dietas aumentaron la expresión de UCP1 y β 3-AR en el BAT (**Figura VI-4**). Este efecto estuvo acompañado de un aumento en la expresión del marcador de biogénesis mitocondrial PGC1 α (**Figura IV-4**) en los grupos HFD y HFHFr, lo que sugiere un aumento de la respiración mitocondrial (Alcalá *et al.*, 2017). Estos resultados son reforzados por los hallazgos de Von Essen y colaboradores (2017), quienes afirman que la termogénesis inducida por la dieta es dependiente de la expresión de UCP1 ya que, al contrario de los ratones *Wild type*, los ratones UCP1^{-/-} no son capaces de activarla en respuesta al consumo de una dieta tipo HFD.

Un factor que podría inducir la termogénesis en el BAT es la actividad de las hormonas tiroideas reguladas por los BA (*bile acids*). En el BAT, los BA se unen a su receptor TGR5 (*G protein-coupled bile acid receptor*) para inducir la expresión del gen *Dio2* que convierte la tiroxina (T4) en triyodotironina (T3), lo que aumenta la transcripción del gen *UCP1* resultando en la activación de la termogénesis (Watanabe *et al.*, 2006). En nuestros animales, a pesar de que hubo un aumento en la expresión de UCP1, los niveles sanguíneos de BA totales fueron similares entre todos los grupos (**Figura IV-3D**). Además, la expresión del gen de *Dio2* disminuyó significativamente en las ratas HFD, sin mostrar cambios en el grupo HFHF_r en relación al control (**Figura IV-4B**). Estos resultados sugieren que la termogénesis inducida por la dieta en nuestro modelo aparentemente es independiente de la regulación de *Dio2*.

La temperatura de manutención de los animales en las instalaciones podría contribuir a la activación de la termogénesis independientemente de la activación de la vía *Dio2*. Según Castillo y colaboradores (2011), ratones *Dio2*^{-/-} suplementados con HFD y mantenidos a una temperatura ambiente de 22°C, consiguen controlar su peso corporal por medio de la activación del sistema simpático. Sin embargo, cuando se realiza el mismo experimento en condiciones de termoneutralidad (a 30°C en el caso de ratones), disminuyen su capacidad termogénica y aumentan de peso corporal. Por otra parte, la temperatura de termoneutralidad de las ratas se encuentra entre los 26 y 28 °C, por lo que la temperatura de manutención para ratas actualmente estipulada por las guías de cuidado animal (~ 22°C) podría inducir estrés crónico por frío e incrementar el metabolismo basal de los animales (Le & Brown, 2008; Maloney *et al.*, 2014). La temperatura utilizada en las instalaciones para nuestros animales se mantuvo entre 22 y 24°C, por lo que se sugiere que este factor podría contribuir a la activación del sistema simpático e inducir la termogénesis independientemente de la activación de la vía *Dio2*.

La leptina podría contribuir también a la regulación del peso corporal de los animales HFHF_r. Esta hormona regula el metabolismo por medio de dos mecanismos: 1) generando una señal de saciedad en el hipotálamo que se traduce en la reducción de la ingesta de alimentos sólidos y, 2) induciendo el gasto energético (Ahima & Antwi, 2008; Tseng *et al.*, 2010). Existen evidencias que sugieren que la actividad termogénica de la leptina se debe a que esta hormona incrementa la expresión de la proteína UCP1 en el BAT, vía activación del sistema simpático (Scarpace & Matheny, 1998; Keipert *et al.* 2020). Por tanto, el incremento

de los niveles séricos de leptina observado en las ratas HFHFr (**Figura IV-6B**), explicaría la reducción de la ingesta de dieta sólida de estos animales (**Figura IV-1B**), así como la activación de la termogénesis en el BAT vía UCP1/ β 3-AD (**Figura IV-4**), que ayudaría a compensar el exceso calórico consumido con respecto a la dieta HFD.

Adicionalmente, la activación de la termogénesis podría estar relacionada con el aumento de la síntesis hepática de algunos ácidos grasos en particular. El ácido oleico, así como el palmítico, tienen una gran capacidad termogénica (Krishnan & Cooper 2014; Shin & Ajuwon, 2018); en nuestro estudio, ambas intervenciones dietéticas aumentaron la síntesis de ácido oleico (18:1 n-9) en el tejido hepático (**Figura IV-10B**), como consecuencia de la desaturación del ácido esteárico dietético (Hodson *et al.*, 2013) o del incremento en la DNL. Este efecto podría contribuir en la inducción de marcadores de termogénesis en el BAT producidos por las dietas HFD y HFHFr.

Por otra parte, se examinó la actividad termogénica en los tejidos adiposo blanco subcutáneo (sWAT) y perigonadal (pWAT) a través del nivel de expresión de la proteína UCP1. En el pWAT los niveles de la proteína UCP1 permanecieron invariables entre los grupos. Sin embargo, en el sWAT, el nivel de expresión de UCP1 disminuyó significativamente en el grupo HFHFr y marginalmente en el HFD (**Figura IV-5B**). La disminución de la expresión de UCP1 en el grupo HFHFr podría estar relacionada con la reducción de los niveles de la enterohormona FGF15 observada únicamente en dicho grupo (**Figura IV-6C**). Según Morón-Ros y colaboradores (2021), en humanos el nivel de FGF19 (análogo de FGF15) está directamente asociado con la expresión del gen UCP1 en el tejido adiposo subcutáneo. En ratones, el tratamiento con FGF15 o FGF19 induce el *browning* de tejido adiposo blanco incrementando los niveles de la proteína UCP1. Los ratones que carecen de FGF15 muestran que el proceso de *browning* del tejido adiposo blanco se encuentra marcadamente deteriorado (Morón-Ros *et al.*, 2021). En nuestro modelo, las ratas HFHFr presentaron niveles disminuidos de FGF15 lo que podría explicar la reducción de la expresión de UCP1 en el sWAT, y por lo tanto podría significar una reducción el *browning* adipocitario de este tejido.

La suplementación con la dieta HFD, produjo una acumulación leve de lípidos en el hígado, sin promover signos claros de inflamación hepática y estrés oxidativo. Además, esta dieta no modificó ni los parámetros homeostáticos de la glucosa, ni los niveles de triglicéridos sanguíneos. Sin embargo, en el hígado de estos animales se observó un aumento de la

expresión de la enzima gluconeogénica PEPCK (**Figura IV-24B**), así como un incremento en la acumulación de algunas especies de ceramidas saturadas (18:0, 20:0 y 22:0) (**Figura IV-22A**). Estos cambios podrían representar signos de una manifestación temprana de resistencia a la insulina hepática, y sugieren que para que se produzca un desorden metabólico completamente desarrollado en el hígado únicamente con la dieta HFD, se deben utilizar períodos de suplementación superiores a tres meses. En ratones transgénicos que sobreexpresan PEPCK hepática se ha observado un patrón metabólico en el cual la vía de señalización de la insulina se encuentra selectivamente alterada en el hígado, lo que resulta en la reducción de la capacidad de la insulina para suprimir la expresión de los genes gluconeogénicos (Sun *et al.*, 2002). Además, en ratones alimentados con una dieta rica en grasa, el aumento del contenido hepático de ceramidas incrementa la actividad de aPKC (*atypical protein kinase C*), resultando en la inhibición de Akt (*protein kinase B*), lo que impide la fosforilación e inactivación de FoxO1 (*Forkhead box O1 protein*) y, consecuentemente, la actividad de este factor de transcripción incrementa de forma descontrolada la expresión de genes gluconeogénicos, como PEPCK (Sajan *et al.*, 2015).

La adición de fructosa líquida a la dieta HFD resultó en el incremento de la lipogénesis *de novo* (DNL) y la disminución de la β -oxidación de los ácidos grasos en el hígado. Como se ha descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio y otros grupos, la suplementación de fructosa líquida en animales induce la activación de ChREBP β , incrementando la expresión de genes lipogénicos, a la par que disminuye la actividad PPAR α , lo que se traduce en una reducción en la expresión de la acil-CoA oxidasa (ACO) (Roglans *et al.* 2007; Rebollo *et al.*, 2014; Baraille *et al.*, 2015), la principal enzima responsable de la oxidación peroxisómica de ácidos grasos de cadena larga. Estos efectos, combinados con el gran flujo de ácidos grasos exógeno proporcionado por la HFD, son probablemente responsables del enorme aumento en la deposición de triglicéridos en el hígado observado en las ratas HFHFr con respecto al grupo HFD.

Además, la adición de fructosa líquida a la HFD sólida indujo el aumento de la expresión del factor de transcripción hepático SREBP1c. Estudios de nuestro grupo, así como otros autores, indican que la suplementación crónica con fructosa en roedores incrementa los niveles de insulina, lo que resulta en el aumento de la expresión hepática de SREBP1c (Nagai *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 2004; Baena *et al.*, 2016). La insulina es un potente inductor de SREBP1c, aunque la fructosa también puede activar parcialmente a SREBP por vías

independiente a la de la insulina, potenciando su efecto. Se ha demostrado que ratones *knockout* del receptor de insulina hepático exhiben un aumento parcial de la activación de SREBP1c cuando son alimentados con una dieta con alto contenido en fructosa (Haas *et al.*, 2012).

La fructosa y sus metabolitos actúan como reguladores nutricionales de ChREBP β y SREBP1c, quienes de forma sinérgica promueven el aumento de los niveles de expresión de enzimas de la DNL (Dentin *et al.*, 2005; Ortega-Prieto & Postic, 2019). En el hígado de las ratas HFHF_r se produjo el incremento de los niveles, tanto génicos como proteicos, de las enzimas FAS, SCD1, ACC y ACLY (**Figura IV-8**), lo que claramente contribuyó a la esteatosis producida en el hígado de las ratas HFHF_r. En cambio, la dieta HFD por sí sola no fue capaz de modificar estos niveles, lo que corrobora que el factor responsable de la DNL en el modelo HFHF_r es la adición de fructosa líquida.

Es importante destacar que el desarrollo de hígado graso por la dieta HFHF_r no se asoció con ninguna manifestación de inflamación hepática o aumento del estrés oxidativo. Estudios de nuestro grupo han demostrado previamente en modelos en roedores que la fructosa líquida al 10-15% no modifica los niveles plasmáticos de endotoxinas o proteínas de unión a lipopolisacáridos (Baena *et al.*, 2016; Sanguesa *et al.*, 2017), marcadores de alteraciones en la permeabilidad de la barrera intestinal y del aumento del flujo de endotoxinas bacterianas proinflamatorias al hígado (Bergheim *et al.*, 2008; Spruss *et al.*, 2009).

Las ratas HFD no mostraron hipertrigliceridemia, lo que indica que probablemente los ácidos grasos de origen dietético no modifican la producción hepática de VLDL, mientras que HFHF_r no solo produjo hígado graso, sino también un marcado aumento de los TG sanguíneos. La hipertrigliceridemia en este grupo sugiere que parte de los ácidos grasos recién sintetizados debido a la suplementación con fructosa fueron drenados al compartimento sanguíneo incorporados en los TG de las VLDL. Esto parece estar relacionado con los efectos de la fructosa sobre el aumento de la actividad transcripcional de ChREBP, que describiremos a continuación, y a la reducción de la actividad de PPAR α . Es bien sabido que fármacos como los fibratos, ligandos y activadores de PPAR α , reducen la producción de VLDL y aumentan su catabolismo en la vasculatura, reduciendo así eficazmente la hipertrigliceridemia (Staels *et al.*, 1998; Bougarne *et al.*, 2018; Fruchart *et al.*, 2021). Por el

contrario, la inhibición de la actividad PPAR α en nuestro modelo podría contribuir al incremento de TG-VLDL en sangre.

La adiponutrina o PNPLA3 es una enzima codificada por el gen *Pnpla3*, cuya actividad lipasa permite la hidrólisis de los TG almacenado en los *lipid droplets* de los hepatocitos y que se encuentra también bajo el control transcripcional de ChREBP (Dubuquoy *et al.*, 2011). En las ratas HFHF_r, la fructosa fue responsable del aumento de la expresión hepática de PNPLA3, ya que la dieta HFD no produjo un aumento significativo en su expresión (**Figura IV-13A y IV-13B**). El incremento de la actividad de la adiponutrina favorece la transferencia de ácidos grasos desde el hígado, ya que éstos son re-esterificados en triglicéridos e incorporados en las VLDL para finalmente ser excretados en el torrente sanguíneo (Trépo *et al.*, 2016; Pingitore & Romeo, 2019). Así pues, la inducción de PNPLA3 mediada por ChREBP originaría mayor síntesis de VLDL, constituyendo un factor determinante en la aparición de la hipertrigliceridemia observada en el grupo HFHF_r.

El aumento de la producción de VLDL hepática inducida por la fructosa podría explicar también el incremento selectivo de la expresión de la forma activa de la proteína IRE detectada únicamente en las muestras de hígado de ratas HFHF_r. El incremento de la fosforilación de IRE se presentó sin provocar una respuesta UPR completa en el hígado de las ratas HFHF_r, ya que no hemos observado una activación completa de la vía de señalización de IRE ni de las otras ramas de la UPR. Aunque en la actualidad el mecanismo molecular involucrado no está definido de forma precisa, algunos trabajos han demostrado consistentemente que la actividad IRE es necesaria y está directamente involucrada en la producción de las VLDL hepáticas (Lee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Se ha de indicar, sin embargo, que otros estudios indican que la activación de la vía IRE previene la esteatosis hepática (Zhang *et al.*, 2011); en nuestro modelo, dicha activación no sería suficiente para prevenir el acúmulo de lípidos intrahepático.

Las diferentes intervenciones dietéticas aplicadas a cada grupo de animales proporcionaron fuentes distintas de ácidos grasos, cuyo destino final se reflejó en la marcada diferencia observada en la acumulación de ceramidas hepáticas y diacilgliceroles. En el caso de HFD, la fuente de ácidos grasos exógenos provenientes de la dieta se destinó al empaquetamiento y almacenamiento en forma de TG hepáticos, mientras que en la dieta HFHF_r, la adición de fructosa proporcionó ácidos grasos provenientes de la DNL cuyo destino final, en parte, fue

la exportación en forma de VLDL. Así mismo, el flujo de ácidos grasos saturados proporcionados únicamente por la HFD resultó en un aumento de la acumulación de ceramidas hepáticas, mientras que el aumento de DNL relacionado con la fructosa resultó en una reversión del contenido de ceramidas hepáticas hasta los valores control, y un incremento en el acúmulo de DAG.

Se ha observado que el contenido en ceramidas hepáticas se correlaciona con la resistencia a la insulina hepática en varios modelos de roedores. Un estudio en ratas *Wistar* alimentadas con una dieta rica en grasas durante cinco semanas mostró un aumento de las ceramidas hepáticas totales junto con un aumento de la resistencia a la insulina (Kurek *et al.*, 2014). En otro estudio, ratones alimentados con HFD durante 16-17 semanas mostraron un aumento de las ceramidas hepáticas (principalmente por aumentos en las especies 16:0, 20:0 y 22:0) e intolerancia a la glucosa; el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de ceramidas, previno el aumento de ceramidas hepáticas y mejoró la tolerancia a la glucosa (Bikman *et al.*, 2012). Por tanto, en nuestro estudio, el incremento en los niveles de ceramidas hepáticas observado en las ratas que recibieron HFD, es un marcador temprano de la aparición de resistencia hepática a la insulina, que se manifiesta antes de que sean aparentes cambios en la glucemia o la insulinemia.

Por otra parte, el contenido hepático de varias especies de DAG aumentó drásticamente con la dieta HFHFr. Una de las enzimas que participa en la síntesis de TG es la diacilglicerol O-aciltransferasa (DGAT), que cumple un papel crucial en la última etapa de la síntesis de triglicéridos al incorporar la tercera molécula de ácido graso a la molécula de diacilglicerol preformada. De las dos isoformas de DGAT expresadas en el hígado (DAGT1 y la DGAT2), la DGAT2 parece utilizar preferentemente ácidos grasos sintetizados de *nov*o, formando triglicéridos dirigidos a la exportación, empaquetados en forma de VLDL recién formadas (Zammit, 2013; Bhatt-Wessel *et al.*, 2018). En el hígado de las ratas HFHFr hemos detectado un aumento moderado, marginalmente significativo en la expresión de DAGT2 (**Figura IV-13A**). Estos resultados, apuntarían a un estado en la que la abundancia de los ácidos grasos y DAG recién formados no se correspondería con un aumento suficiente de la expresión/actividad de DGAT2, lo que podría conducir a la acumulación de especies de DAG en el hígado de las ratas que recibieron la dieta HFHFr.

A pesar del aumento en el contenido de DAG hepático, las ratas suplementadas con fructosa no evidenciaron un estado claro de resistencia a la insulina hepática, como ha sido previamente comentado, ya que mostraron una marcada reducción en la expresión de la proteína PEPCK hepática (**Figura IV-24B**), la enzima clave en el control de la actividad gluconeogénica en este órgano. Sin embargo, las ratas del grupo HFHFr mostraron signos de alteración en el metabolismo periférico de la glucosa, evidenciado por el aumento de la insulinemia y la reducción del ISI (**Figura IV-20B y IV-20C**). Muy recientemente, Smith y colaboradores (2021) han demostrado que un aumento de la β -oxidación en el músculo esquelético está relacionado con manifestaciones de intolerancia a la glucosa. Así, en nuestro modelo, los cambios detectados en la homeostasis de la glucosa en las ratas HFHFr, podrían atribuirse, al menos en parte, al aumento del flujo de triglicéridos hepáticos hacia el músculo esquelético, promoviendo un cambio en el uso de sustrato energético de glucosa a ácidos grasos en estos animales. Aunque una limitación del estudio es que no hemos analizado si las diferentes intervenciones dietéticas alteraron el contenido y la composición de lípidos en el músculo esquelético, nuestros datos apuntan a que, al menos para las ratas HFHFr, las alteraciones observadas en la homeostasis periférica de la glucosa resultan en un moderado estado de resistencia a la insulina debido a los cambios en el flujo de ácidos grasos originado en el tejido hepático, que se traduce en hiperinsulinemia y reducción del ISI.

En resumen, los resultados de este primer estudio señalan que la adición de fructosa líquida a la dieta HFD, incrementa la esteatosis hepática e induce hipertrigliceridemia, sin producir inflamación ni aumento del peso corporal, a pesar del elevado consumo calórico, por mecanismos propuestos que se ilustran en la **Figura V-1**.

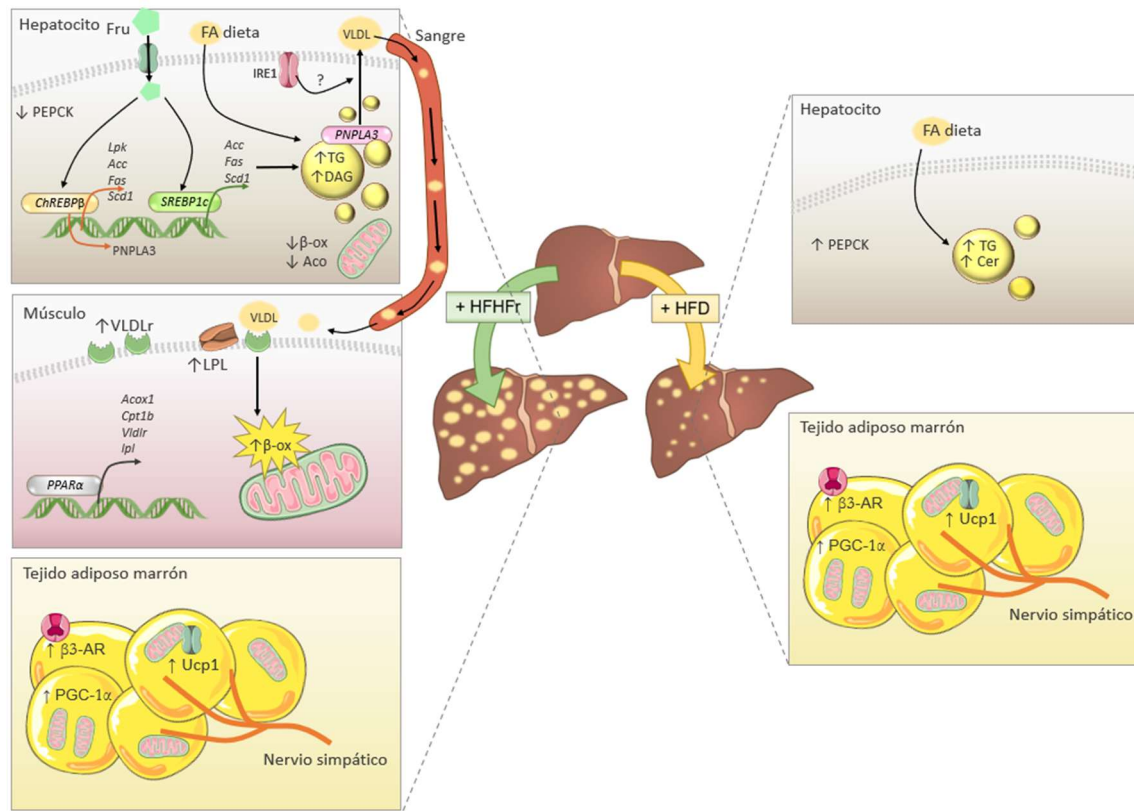


Figura V-1. Resumen resultados estudio 1. Mecanismos sugeridos para las alteraciones metabólicas inducidas por las dietas HFHF y HFD en el hígado y los órganos periféricos relacionados al metabolismo. En los hepatocitos, se produce un incremento en la acumulación de TG hepáticos por la dieta HFHF, que es debido a que la fructosa reduce la β -oxidación de los ácidos grasos y activa factores de transcripción que inducen enzimas de la DNL, en especial el factor de transcripción ChREBP, que además induce la expresión de la adiponutrina (*Pnpla3*). El aumento de la actividad de la adiponutrina incrementaría la lipólisis en el tejido hepático, lo que favorecería el flujo de ácidos grasos (en forma de VLDL) desde el hígado hacia la sangre, originando la hipertrigliceridemia. Además, en los hepatocitos se produce un cambio en el contenido de las especies lipídicas, en especial un aumento de los DAG. Adicionalmente, el incremento de la forma activa de IRE1 en este tejido podría contribuir al aumento de la producción de las VLDL. Los elevados niveles de VLDL en sangre y su captación por el músculo esquelético, provocarían un cambio en el sustrato energético en este tejido, favoreciendo la utilización de ácidos grasos, lo que concuerda con el aumento observado en la actividad de β -oxidación muscular. Por otro lado, la suplementación con HFD en ausencia de fructosa indujo una leve esteatosis hepática, incrementando además el contenido de ceramidas en el hígado, lo que originó un estado temprano de resistencia a la insulina, corroborado por el aumento en la expresión de la enzima gluconeogénica PEPCK en el hígado. En ambas dietas, el peso de los animales no sufrió variaciones a pesar del aumento del consumo calórico, posiblemente debido a un incremento de la actividad termogénica del tejido adiposo marrón, de acuerdo con el incremento de la expresión de marcadores termogénicos (UCP1, β 3-AR y PGC-1 α). Fru: fructosa; FA: fatty acids y Cer: ceramidas

Estudio 2: Efectos de la cafeína y el extracto de café verde en el modelo de esteatosis hepática simple inducido por la dieta HFHF_r

Habiendo obtenido un modelo de esteatosis hepática simple, nuestro objetivo fue determinar si la cafeína era capaz de reducir la carga de lípidos hepáticos y revertir otras alteraciones del metabolismo en el modelo HFHF_r. Se ha descrito que el café, una de las bebidas más consumidas en el mundo y una de las principales fuentes de cafeína en la dieta humana, podría tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo hepático (Poole *et al.*, 2017). Varios estudios han establecido una asociación entre una menor prevalencia de NAFLD con una mayor ingesta de café (Birerdinc *et al.*, 2012; Imatoh *et al.*, 2015). Recientemente, un estudio de meta-análisis reveló que el consumo regular de café no solamente se encuentra asociado con la reducción en el riesgo de aparición de hígado graso, sino también con una disminución en el riesgo de que se produzca fibrosis hepática en pacientes ya diagnosticados de NAFLD (Hayat *et al.*, 2020). Sin embargo, otros estudios en humanos, incluyendo uno de meta-análisis, no establecen claramente un efecto positivo del consumo regular de café sobre el NAFLD (Veronese *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2016).

Por otra parte, los estudios previos en modelos animales de esteatosis inducida por la dieta mostraron que varios componentes del café, incluida la cafeína, podrían ser eficaces para reducir el daño y la deposición de grasa en el hígado (Vitaglione *et al.* 2010, Alferink *et al.*, 2018). Las diferencias entre los resultados de los estudios en humanos y animales podrían deberse a las altas dosis de cafeína administradas a los animales de laboratorio, que en algunos estudios equivalían a 6 tazas de café al día, muy superior al consumo habitual en humanos (Chen *et al.*, 2014; Helal *et al.*, 2018). Para proporcionar un escenario más realista, tratamos ratas hembra del modelo HFHF_r con una dosis baja de cafeína (5 mg/kg/día); además, dado que en el café se encuentran cientos de moléculas además de la cafeína, como el ácido clorogénico y otros polifenoles (Hayat *et al.*, 2020), que podrían ser responsables de sus efectos beneficiosos, incluimos un grupo tratado con extracto de café verde (GCE) aportando la misma dosis de cafeína. Dicha dosis, después de la conversión basada en el área de superficie corporal, resultó equivalente a 66 mg de cafeína para un ser humano de 70 kg (Nair *et al.*, 2016). Esta cantidad corresponde aproximadamente a 1 taza (20-25 ml) de café expreso por día, que contiene entre 2.4 a 4.5 mg/ml de cafeína (Angeloni *et al.*, 2019).

En nuestro modelo, observamos que ni la CAF ni el GCE redujeron la hipertrigliceridemia ni la esteatosis hepática causadas por la dieta HFHFr. En comparación a otros estudios previos, la falta de efecto de la cafeína en nuestro estudio podría atribuirse a las diferencias en el diseño experimental utilizado, tales como la dosis baja de cafeína, la mayor duración del protocolo de suplementación dietético y la introducción de la fructosa líquida en la dieta. Sin embargo, resulta interesante que cuando se administró la misma dosis de cafeína proporcionada en forma de GCE, aunque el aumento de los niveles de TG hepáticos tampoco fue revertido en relación al grupo HFHFr, se observaron niveles significativamente más bajos de TG hepáticos en relación a las tratadas con CAF. Esta diferencia entre los grupos CAF y GCE nos llevó a explorar los posibles mecanismos implicados:

a) Activación de SREBP1c. Cuando analizamos la composición de ácidos grasos de los TG hepáticos, encontramos que las cantidades de ácido palmitoleico (16:1 n-7) y eicosenoico (20:1 n-9), incrementadas por la dieta HFHFr, se redujeron con el tratamiento con GCE comparado al de CAF. El ácido palmitoleico es un indicador de esteatosis hepática, ya que se genera a partir de la desaturación del ácido palmítico a través de SCD1 que, junto con FAS, son enzimas lipogénicas reguladas por SREBP1c.

En el estudio de caracterización del modelo, se observó que la dieta HFHFr incrementa los niveles hepáticos de SREBP1c. Sin embargo, estos resultados no se pudieron reproducir con significación estadística en el estudio 2, posiblemente debido a la variabilidad interindividual de los animales. Ello nos llevó a explorar mecanismos de activación transcripcional de SREBP1c, como es la vía de mTOR. Se ha descrito que la activación de mTOR provoca la fosforilación de la lipina-1, excluyéndola fuera del núcleo, lo cual favorece la actividad transcripcional de SREBP (Peterson *et al.*, 2011). Nuestros resultados mostraron que la dieta HFHFr incrementa la fosforilación de mTOR, lo que indica activación. Como consecuencia, se observa una reducción del nivel de la lipina-1 nuclear, lo cual según el modelo propuesto daría lugar a un aumento de la actividad transcripcional de SREBP1c. Estos cambios no fueron revertidos ni por la CAF ni por el GCE, aunque hay diferencias entre ambos grupos. Así, la expresión de *Scd1* fue mayor en el grupo CAF en comparación al grupo HFHFr, lo que sugiere que la CAF podría aumentar aún más la lipogénesis hepática e incrementar aún más la deposición de lípidos en el hígado. Sin embargo, ni la cantidad de TG hepáticos ni los niveles de proteína lipina-1 o de p-mTOR fueron diferentes entre los grupos CAF y HFHFr. En cambio, las ratas tratadas con GCE mostraron una reducción en la fosforilación de

mTOR y un nivel de expresión superior de la lipina-1 nuclear en relación a las ratas del grupo HFHF_r, lo que sugiere una reducción de la actividad transcripcional de SREBP1c. Esto podría explicar por qué la expresión de FAS y *Scd1* fue inducida en menor medida por el tratamiento con GCE en comparación a la CAF, en consonancia con los niveles más bajos de ácido palmitoleico y de TG totales observados en los hígados de las ratas tratadas con GCE.

b) Regulación de los niveles de distintas especies lipídicas en el hígado: En comparación con la CAF, el tratamiento con GCE modificó varias especies de DAG en el hígado. Como se ha comentado anteriormente, la dieta HFHF_r produce un incremento en la acumulación de diversos DAG hepáticos. Los niveles elevados de los DAG 18:0/18:0, 16:0/18:2 y 18:0/20:4 se redujeron en el grupo GCE en comparación al grupo HFHF_r, pero esta reducción no se observó en el grupo CAF. Aunque existe poca información sobre los efectos de especies concretas de DAG, se asume que generalmente los DAG juegan un papel importante, no solo en la resistencia a la insulina, sino también en la esteatosis hepática. Así, en un estudio de lipidómica en el que se caracterizaron diversas especies lipídicas en hígados esteatósicos humanos y murinos, el principal cambio detectado fue un marcado aumento en los niveles de DAG, sobre todo de especies saturadas y monoinsaturadas (Gorden *et al.*, 2011). Por lo tanto, la reducción de al menos algunos de los DAG acumulados en el hígado, podría considerarse un efecto positivo del GCE y relacionarse con la menor esteatosis de este grupo en relación al grupo CAF.

El análisis lipidómico de las muestras del estudio 2 incluyó también las ceramidas y sus derivados, la hexosilceramidas, así como la ratio HexCer/Cer. Esta ratio es considerada un indicador de la actividad de la glucosilceramida sintasa (GCS), la enzima que cataliza la síntesis de HexCer a partir de Cer. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con GCE, pero no con CAF, redujo la relación HexCer/Cer de aquellas especies que contienen ácidos grasos 16:0 y 18:0. Se ha informado que el tratamiento de ratones *ob/ob* con un inhibidor de la GCS reduce la acumulación de TG en el hígado (Zhao *et al.*, 2009). Por lo tanto, las proporciones más bajas de HexCer/Cer observadas en el grupo GCE también podrían estar asociadas con una actividad reducida de la GCS, lo que puede contribuir a los niveles más bajos de triglicéridos hepáticos en este grupo. Así pues, tanto la reducción de DAG como de la ratio HexCer/Cer producidas con el tratamiento con GCE pueden ser

mecanismos que median, al menos en parte, un efecto beneficioso sobre la esteatosis hepática.

c) Vías relacionadas con el catabolismo y el transporte de ácidos grasos. Ni el tratamiento con CAF ni con GCE consiguieron revertir la reducción de actividad de β -oxidación hepática inducida por la dieta HFHF_r, lo que indica que el mecanismo por el que GCE modula la esteatosis no es el incremento del catabolismo de ácidos grasos.

Debido a su papel en la degradación de los *lipids droplets*, la autofagia es otro mecanismo que puede conducir a la eliminación de la grasa hepática (Schulze *et al.*, 2017). Nuestro grupo demostró previamente que la suplementación con fructosa líquida en ratas hembra alimentadas con dieta estándar inhibe la autofagia hepática, como lo demuestra la relación LC3II/I más baja, lo que conduce a un aumento de los niveles de TG en el hígado (Baena *et al.*, 2015). En el estudio actual, también observamos una relación LC3II/I reducida y acumulación de TG en los hígados de ratas que recibieron la dieta HFHF_r, lo que sugiere la inhibición de la autofagia hepática. Las ratas tratadas con CAF mostraron la relación LC3II/I más baja en comparación con los otros grupos experimentales, lo que se correlaciona con el hecho de que en este grupo se observan los niveles más altos de TG en el hígado. Esto indica que, a pesar de producirse un ligero aumento en los niveles de proteína beclina-1, un marcador de autofagia, la CAF no activó esta vía en nuestro modelo. En ratones, sin embargo, se ha descrito que una dosis de 30 mg/Kg de CAF induce la autofagia en el hígado (Sinha *et al.*, 2014). La ausencia de activación de la autofagia en nuestro estudio podría deberse a la dosis de cafeína administrada, que en los otros estudios fue mucho mayor a la nuestra, y además a la utilización de un modelo animal diferente.

Por último, se examinaron los niveles de la proteína VLDLR. VLDLR es un receptor de lipoproteínas que contienen ApoE, entre ellas los quilomicrones y las VLDL, implicado en la captación de los lípidos que transportan, tras la lipólisis mediada por LPL o por endocitosis de la lipoproteína (Takahashi *et al.*, 2004). Aunque el papel de VLDLR en hígado es poco conocido, diversos estudios recientes apuntan a que un incremento en su expresión produce un aumento en la acumulación de lípidos en el hígado (Helal *et al.*, 2018). Asimismo, se ha observado un incremento en los niveles de este receptor en biopsias hepáticas de pacientes con esteatosis en comparación con sujetos control (Zarei *et al.*, 2018). Aunque en nuestro estudio los niveles de VLDLR no aumentaron con la dieta HFHF_r, fueron

significativamente más bajos en el grupo CAF y, especialmente, en el grupo GCE, incluso en relación al grupo control. Teniendo en cuenta la función de estos receptores, la disminución de su nivel de expresión podría contribuir, al menos en parte, a la menor acumulación de TG hepáticos observada en el grupo de GCE.

El GCE posee un alto contenido de compuestos como el ácido clorogénico y otros polifenoles, que podrían ser responsables de los diferentes efectos observados respecto al grupo tratado con CAF de forma aislada. Pocos estudios han comparado los efectos sobre la esteatosis hepática de la cafeína con otros compuestos del café. Entre ellos, Vitaglione y colaboradores (2010) demostraron que el café descafeinado reduce la acumulación de *lipid droplets* en los hepatocitos, en un modelo de NAFLD, lo que sugiere que la cafeína no es esencial para el efecto antiesteatósico del café (Vitaglione *et al.*, 2010). Otro estudio realizado en ratones concluyó que el tratamiento con ácido clorogénico reduce significativamente los niveles de TG hepáticos, mientras que la administración de cafeína pura es ineficaz en este sentido (Shimoda *et al.*, 2006). De manera similar, roedores tratados con catequinas o con catequinas combinadas con cafeína redujeron los niveles de TG en el hígado, mientras que la cafeína sola no lo hizo (Zhao *et al.*, 2017). En ratones alimentados con dieta grasa, la administración de ácido clorogénico o cafeína sola no redujo los TG hepáticos, pero una combinación de ambos compuestos fue eficaz (Xu *et al.*, 2019). Aunque los mecanismos moleculares involucrados no están claramente establecidos, este último estudio sugiere un efecto sinérgico en varias vías que controlan el metabolismo de los ácidos grasos, incluyendo SREBP1c y enzimas lipogénicas, como SCD1 y FAS. En la misma línea, nuestros resultados sugieren que los componentes de GCE, ya sea de forma independiente o en combinación con CAF, podrían modular la esteatosis hepática. Los mecanismos propuestos se muestran en la **Figura V-2**.

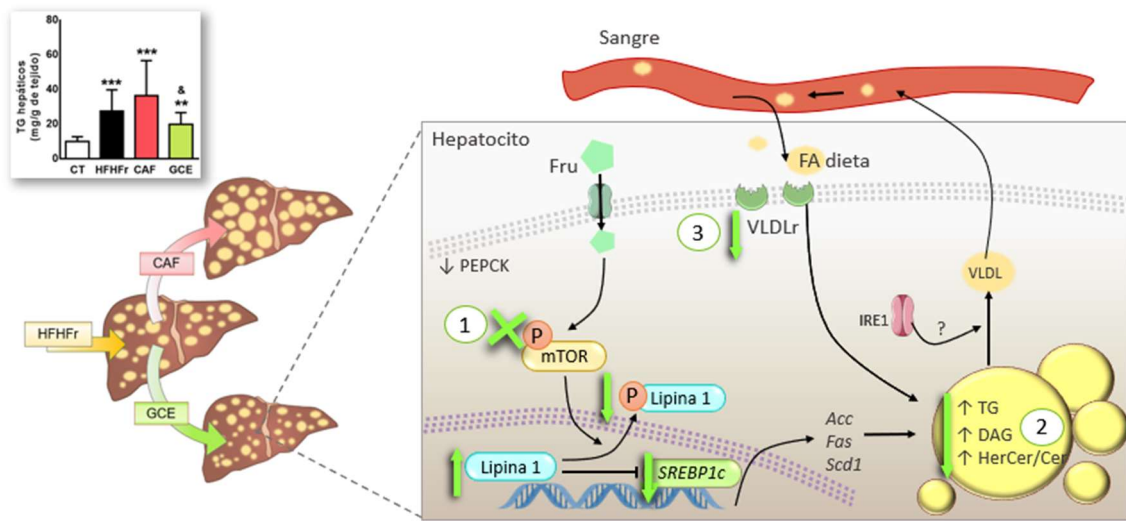


Figura V-2. Resumen resultados estudio 2. En los hepatocitos, el tratamiento con GCE reduce los TG hepáticos en relación al tratamiento con CAF sólida según los siguientes mecanismos: 1) Reducción de la lipogénesis debido a una menor fosforilación de mTOR y mayores niveles nucleares de lipina-1, afectando la expresión de FAS y SCD1; 2) menores niveles hepáticos de varias especies de DAG y una relación HexCer/Cer más baja; 3) una expresión reducida del VLDLR hepático. Fru: fructosa; FA: *fatty acids*.

Estudio 3: Efectos de BemA sobre las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta HFHFr en ratas hembra Sprague-Dawley

El ácido bempedoico (BemA) es un fármaco hipocolesterolemiante que recientemente ha sido aprobado por la EMA y la FDA para el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar heterocigota o las dislipidemias mixtas (asociadas a un riesgo cardiovascular elevado) en pacientes adultos. BemA está indicado en monoterapia o en combinación con otros hipolipemiantes, junto con restricciones dietéticas, cuando el tratamiento con estatinas no haya alcanzado una reducción suficiente del colesterol-LDL a la dosis máxima tolerable. El mecanismo descrito por el cual BemA reduce el colesterol-LDL en humanos es a través de la inhibición de la ATP-citrato liasa (ACLY), una enzima que se encuentra en una etapa biosintética previa a la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoAR) en la vía de la síntesis del colesterol en el hígado (Delevry *et al.*, 2021). De este modo, BemA bloquea la síntesis de colesterol, lo que desencadena un aumento en la expresión hepática del receptor de LDL y finalmente, reducción del nivel del colesterol-LDL circulante (Honigberg *et al.*, 2019). Además, la inhibición de la ACLY comporta también la reducción de la síntesis de ácidos grasos en el hígado, aunque este supuesto sólo se ha demostrado en modelos experimentales, no en humanos.

Estudios en roedores han demostrado la capacidad del fármaco para modular no solamente la actividad de la ACLY, sino también de inducir la activación del sensor metabólico AMPK. Estos estudios utilizan modelos de síndrome metabólico inducidos por dietas tipo HFD con alto contenido en colesterol, donde el tratamiento con BemA, no solamente reduce la síntesis de colesterol hepático, sino también la de triglicéridos, reduciendo así el nivel de lípidos plasmáticos, así como la resistencia a la insulina, obesidad, la inflamación y la esteatosis hepática (Pinkosky *et al.*, 2013; Pinkosky *et al.*, 2016; Samsoundar *et al.*, 2017). Estas propiedades otorgan a BemA el potencial terapéutico para el tratamiento de la esteatosis hepática simple en humanos y, por lo tanto, lo convierten en un buen candidato para nuestro estudio.

Hasta el momento no existen estudios acerca del efecto de BemA sobre el metabolismo de la fructosa. Un efecto interesante que observamos en nuestro modelo es que el tratamiento con BemA redujo significativamente el consumo de fructosa líquida. Cuando la fructosa pasa por la circulación portal es captada por los hepatocitos y metabolizada por la enzima KHK. Se ha observado que ratones deficientes en KHK están protegidos contra las alteraciones metabólicas inducidas por la fructosa, incluyendo el desarrollo de esteatosis hepática, ya que reducen su ingesta de fructosa en relación al grupo *wildtype*, y, además, presentan una menor ganancia de peso corporal, así como de tejido adiposo blanco (Ishimoto *et al.*, 2012). Un efecto similar se observó en nuestro estudio, ya que las ratas tratadas con BemA no solamente redujeron su consumo de fructosa líquida, sino que también presentaron una reducción en el peso corporal, aun consumiendo más calorías que el grupo CT. Así mismo, este efecto también estuvo acompañado de una reducción en los pesos de los tejidos sWAT y pWAT.

La KHK es la enzima limitante del metabolismo de la fructosa, que cataliza la conversión de la fructosa en fructosa-1-fosfato, lo que da como resultado una reducción en los niveles de ATP debido a la ausencia de inhibición enzimática por retroalimentación (Van der Berghe *et al.*, 1977). Además, la fructosa es capaz de inducir su propio metabolismo al incrementar la expresión proteica de la KHK hepática (Baena *et al.*, 2014). En las ratas HFHF_r, el consumo de la fructosa incrementó el nivel de expresión proteica de la KHK, mientras que el tratamiento con BemA redujo significativamente su expresión, incluso por debajo del nivel de expresión del grupo control (**Figura IV-47**), lo que sugiere que el efecto de BemA es directo sobre la expresión de KHK y no una consecuencia de la reducción en la ingesta líquida de fructosa. Probablemente, la reducción en la ingesta de fructosa líquida en el grupo BemA se deba, de hecho, a la intensa reducción en la expresión hepática de KHK producida por el fármaco.

Tal como esperábamos, el tratamiento con BemA redujo de forma muy marcada el acúmulo de lípidos hepáticos en relación al grupo HFHF_r. Este efecto antiesteatósico podría derivar, en parte, de la reducción en la expresión de KHK. Por otra parte, se han observado reducciones en la expresión de los factores de transcripción ChREBP y SREBP1c, que regulan la expresión de enzimas lipogénicos. Como ya se ha comentado, la fructosa y sus metabolitos no solamente son utilizados como sustratos para la biosíntesis de ácidos grasos, sino que también activan al factor de transcripción ChREBP, que incrementa aún más la expresión de las enzimas responsables de la DNL hepática, favoreciendo así el acúmulo de

lípidos en el hígado (Linden *et al.*, 2018; Shepherd *et al.*, 2020). En nuestro modelo, el incremento de la expresión proteica de la isoforma ChREBP β inducido por la dieta HFHF_r, se redujo significativamente con el tratamiento con BemA. Además, la expresión génica de *Lpk*, un gen regulado por ChREBP β , también se redujo en el hígado de las ratas tratadas con BemA, un efecto que podría ser una consecuencia de la reducción en la ingesta de la fructosa líquida.

En cambio, a pesar de que las ratas BemA exhibieron altos niveles de insulina en sangre, el tratamiento con BemA disminuyó los niveles de expresión proteica de la forma madura y precursora SREBP1c, incluso por debajo del grupo control, sugiriendo que el fármaco afecta directamente la expresión de este factor de transcripción, de forma no relacionada con el menor consumo de fructosa. Este hecho se vio reflejado en la reducción de la expresión génica de *Gck*, un gen regulado por SREBP1c (**Figura IV-60**). La glucoquinasa es la enzima clave en la regulación de la homeostasis de glucosa en el organismo. Se ha visto que ratones transgénicos que sobreexpresan la glucoquinasa por un periodo prolongado, presentan un aumento de la lipogénesis hepática y de los lípidos circulantes, lo que conduce a la resistencia a la insulina (Ferré *et al.*, 2003).

El tratamiento con BemA en varios modelos murinos experimentales ha mostrado un gran potencial en la reducción del colesterol y los triglicéridos plasmáticos. En ratones doble *knockout* (ApoE^{-/-} y Ampk β 1^{-/-}), el tratamiento con BemA reduce tanto los niveles de TG como de colesterol LDL sanguíneo (Pinkosky *et al.*, 2016). En cambio, en nuestro modelo de ratas suplementadas con HFHF_r, el tratamiento con el fármaco no redujo la hipertrigliceridemia inducida por la dieta, y contrariamente a lo esperado, produjo un leve aumento en los niveles de colesterol sanguíneo. Similar a nuestro resultado, Burke y colaboradores (2019) mostraron que el tratamiento con BemA no afecta los niveles de TG plasmáticos en un modelo de minicerdos *Ldlr*^{-/-}, aunque demostró ser efectivo en la reducción del colesterol. Por su parte, en humanos, un estudio de metaanálisis que incluye datos de ensayos clínicos de fase II y III, el tratamiento con BemA no modificó significativamente el nivel de triglicéridos, el número de partículas de VLDL y de la apolipoproteína A-1 (Cicero *et al.*, 2020).

Un mecanismo que podría explicar los efectos de BemA sobre los lípidos sanguíneos y hepáticos en nuestro modelo se relaciona con la actividad lipasa de la PNPLA3 hepática. Como comentamos en el estudio 1, la adición de fructosa a la dieta HFHF_r favorece la expresión de *Pnpla3* en el hígado. Sin embargo, a pesar de que las ratas BemA consumieron una menor cantidad de fructosa, el tratamiento con el fármaco incrementó significativamente los niveles de mRNA y de la proteína de PNPLA3 en relación al grupo HFHF_r (**Figura IV-55**). En los hepatocitos de individuos sanos, la actividad lipasa de la PNPLA3 disminuye el acúmulo de TG en el hígado y aumenta la exportación de estos lípidos en forma de partículas de VLDL (Trepó *et al.*, 2016). Si tenemos en cuenta que hemos observado una reducción de ChREBP β (**Figura IV-47**) tras la administración de BemA y que *Pnpla3* es un gen controlado por dicho factor de transcripción, nuestros resultados indican que BemA incrementa la expresión de PNPLA3 por un mecanismo que en estos momentos desconocemos, pero que parece ser independiente de ChREBP. Esto conduciría a un aumento de la actividad lipasa de PNPLA3, disminuyendo la acumulación de TG hepáticos y facilitando su exportación hacia el torrente sanguíneo en forma de VLDL.

Si consideramos que este efecto es contrarrestado por otros efectos derivados de la administración de BemA, como la reducción de la DNL o el incremento del catabolismo lipídico a través de PPAR α (ver más adelante), este incremento en la producción de VLDL explicaría, en nuestro modelo, la falta de efecto hipotriglicéremiante de BemA y el ligero incremento de colesterol sanguíneo observado. Asimismo, el incremento de los TG sanguíneos observado en los grupos HFHF_r y BemA está en consonancia con el aumento del nivel de expresión de la proteína MTTP en el hígado, indicando un incremento en el flujo del transporte de los TG para el ensamblaje en partículas VLDL y consecuentemente, su transporte hacia la sangre. En conjunto estos resultados indican que el incremento de PNPLA3, sería un mecanismo por el cual BemA moviliza los triglicéridos almacenados en el hígado para su secreción en forma de VLDL hacia la sangre, reduciendo al menos en parte, la esteatosis hepática inducida por la dieta HFHF_r en nuestro modelo.

El nivel de expresión hepática de distintos receptores de lipoproteínas es otro de los factores que controla las concentraciones de lípidos plasmáticos. Así, se ha descrito en hepatocitos humanos primarios y en los hígados de ratones Apoe^{-/-} que el tratamiento con BemA incrementa la expresión y actividad de LDLR, originando la disminución de los niveles de colesterol LDL (Burke *et al.*, 2019a; Burke *et al.*, 2019b). Sin embargo, las vías que intervienen

en el transporte y exportación de lípidos en el hígado de nuestro modelo no fueron afectadas, ya que los niveles de ARNm de *Ldlr*, *Vldlr*, *Pcsk9*, así como los de proteína de LDLR y VLDLR no fueron modificados por el tratamiento con BemA (**Figura IV-55**).

En clínica, BemA es considerado como un profármaco cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de ACLY por su forma activa, en forma de derivado CoA (BemA-CoA). BemA y su metabolito activo, ESP15228, requieren la activación por unión a la coenzima A (CoA), gracias a la acción de la acil-CoA sintetasa 1 de cadena muy larga (ACSVL1), que sintetiza BemA-CoA y ESP15228-CoA, respectivamente. La ACSVL1 se expresa principalmente en el hígado. En humanos, la inhibición de ACLY por BemA-CoA da como resultado una disminución de la síntesis de colesterol en el hígado y reduce el colesterol LDL en sangre mediante la regulación positiva de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (Bilen *et al.*, 2016; Ballantyne *et al.*, 2021). En nuestro modelo HFHF_r de esteatosis hepática simple, observamos un aumento en la expresión génica y proteica de la ACLY hepática (**Figura IV-61B** y **IV-61C**), debido probablemente a una respuesta compensatoria a la inhibición de la enzima por presencia del fármaco. Además, observamos un aumento en la expresión de la *Acsvl1*, indicando una mayor conversión del fármaco a su forma activa de derivado CoA, la forma capaz de inhibir la actividad de la ACLY en el hígado.

En algunos estudios en roedores, se ha descrito que BemA actúa como un activador directo de AMPK y, por tanto, un inhibidor indirecto de ACC (Pinkosky *et al.*, 2013; Pinkosky *et al.*, 2016). Al inducirse la activación de AMPK por BemA, se producen varios efectos en el organismo, como la reducción de los niveles de lípidos sanguíneos, el control de la glicemia y disminución de marcadores inflamatorios (Ballantyne *et al.*, 2013). En nuestro modelo en particular, no observamos un aumento en la forma fosforilada, activa de la AMPK en el hígado. Este hecho sugiere que, en nuestras condiciones de estudio, BemA no se comporta como un activador de AMPK. La falta de activación de este sensor metabólico fue confirmada al observarse que la fosforilación (Ser⁷⁹) de ACC en su posición inhibitoria, catalizada por p-AMPK, no se encuentra modificada en las muestras hepáticas de los animales tratados con BemA (**Figura V-62**). Según Pinkosky y colaboradores (2016), la acción de BemA sobre la AMPK a nivel hepático está restringida a roedores, especialmente en ratones, dado que el fármaco es capaz de activar la isoforma $\beta 1$ de la AMPK expresada en ratones, mientras que en humanos la isoforma $\beta 2$ no es activada. Además, se ha demostrado que el efecto de BemA sobre la capacidad de reducción de LDL es independiente

de la activación de AMPK, lo que sugiere que la inhibición de ACLY por el derivado CoA del fármaco es suficiente para obtener efectos beneficiosos sobre la lipemia (Pinkosky *et al.*, 2016).

El tratamiento con BemA en las ratas suplementadas con HFHF_r produjo un aumento del peso del hígado y revirtió la disminución de la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos inducida por la dieta HFHF_r, hasta niveles significativamente superiores en relación a la actividad del grupo control. Los estudios histológicos mostraron una clara hipertrofia de los hepatocitos en las muestras de BemA, que fue independiente de la acumulación de lípidos intrahepáticos ya que los niveles de colesterol y triglicéridos estaban reducidos en los hígados de este grupo. Una de las posibles causas de la hipertrofia compensatoria de los hepatocitos es la inflamación (Suzuki *et al.*, 2016). Sin embargo, ya se ha comentado que la inflamación del hígado producida en NASH es una complicación típica de la NAFLD (Eccleston *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2014), pero nuestro modelo es de esteatosis simple sin inflamación. Además, en nuestros animales tratados con BemA no hay evidencia de aumento del estrés oxidativo (CAT, SOD2 y GPX1) o de la inflamación (TNF- α y F4/80), lo que descarta que la inflamación sea una causa de la hipertrofia observada.

Similar a nuestros resultados, los fármacos agonistas de PPAR, que inducen proliferación peroxisómica en roedores, aumentan la actividad de β -oxidación de ácidos grasos, producen hipertrofia hepatocelular y aumento en el peso del hígado en estos animales (Lee *et al.*, 1995; Misra *et al.* 2013). Samsouder y colaboradores (2017), indicaron previamente que BemA podría tener una actividad modesta como proliferador peroxisómico en roedores, detectando un aumento en el peso del hígado de los animales tratados con BemA, que se correlacionó con un aumento en la actividad de β -oxidación, así como un incremento en la expresión génica de *Aco*, un gen que codifica la enzima limitante de la actividad β -oxidación de ácidos grasos peroxisómica. Asimismo, en el hígado de las ratas HFHF_r tratadas con BemA observamos un marcado aumento de la actividad de β -oxidación de ácidos grasos y en la expresión de *Aco*, conjuntamente con un leve incremento de la expresión de la *Cpt1a*, un gen específico de la β -oxidación de los ácidos grasos mitocondrial.

Estos resultados fueron confirmados al analizar los genes cuya expresión es inducida por activación PPAR α . Así, en un *array* diseñado específicamente para PPAR, observamos que un 26% de los genes incluidos en el test fueron modificados significativamente por la administración del fármaco. La validación de dichos genes por RT-qPCR reveló la inducción de varios genes que participan en la β -oxidación peroxisómica, como *Acox1*, *Cpt1a*, *Acsvl1*, *Ehhadh* y *FadS2*. En el caso de la *Ehhadh* el aumento fue bastante pronunciado. Este gen codifica una enzima indispensable en la producción de ácidos dicarboxílicos de cadena media que forma parte de la ruta clásica de β -oxidación peroxisómica, una vía que es altamente inducible por la activación de PPAR α (Houten *et al.*, 2012). Por otra parte, la validación del *array* también reveló que el tratamiento con BemA indujo genes relacionados directa o indirectamente con la β -oxidación mitocondrial, entre ellos la ácido graso translocasa *CD36*, la carnitina palmitoil transferasa 1b (*Cpt1b*), la acetil-CoA aciltransferasa 2 (*Acaa2*) y la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (*Acadl*). Ello sugiere que BemA es capaz de inducir tanto la β -oxidación peroxisómica como la mitocondrial, efecto que contribuiría a la disminución de la acumulación de lípidos hepáticos. Igualmente, estos resultados indican que el incremento en la expresión *Acsvl1* que, como hemos indicado anteriormente, activa BemA a su derivado CoA, es un efecto mediado probablemente por PPAR α .

Debido a estos resultados, realizamos una serie de ensayos para confirmar que BemA es un agonista PPAR y para distinguir si lo es de todas las isoformas de este factor de transcripción. El ensayo del gen reportero de la luciferasa reveló que, tanto en ratas como en humanos, BemA posee actividad agonista sobre los receptores PPAR α y PPAR γ . Aunque las potencias observadas para este fármaco sobre PPAR α y PPAR γ en humanos y en ratas fueron menores a los de sus agonistas de referencia, en el ensayo para PPAR γ de humanos se evidenció que BemA posee una eficacia como mínimo similar a la presentada por el agonista de referencia (rosiglitazona), alcanzando de hecho valores de Emax superiores a ésta. Los PPARs son un conjunto único de factores de transcripción regulados por ácidos grasos y diana terapéutica de fibratos y tiazolidindionas, que controlan tanto el metabolismo de los lípidos como la inflamación (Liss & Finck, 2017). La estructura química de BemA es básicamente la de un ácido graso alfa, omega-dicarboxílico, constituido por un esqueleto de ácido pentadecanodioico sustituido por grupos metilo en las posiciones 2 y 14, y por un grupo hidroxilo en la posición 8. Esta similitud estructural con los ácidos grasos podría conferirle la actividad agonista dual PPAR α / γ observada en el hígado de las ratas del modelo HFHF_r.

Hasta el momento, se han desarrollado varios agonistas duales de PPAR α / γ , denominados glitazares, que han demostrado mejoría en la resistencia a la insulina, la dislipidemia y el hígado graso en estudios con roedores (Brand *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de estos fármacos en la clínica no está aprobado debido a que presentan efectos secundarios cardiovasculares y renales (Henry *et al.*, 2009; Hamrén *et al.*, 2012). Asimismo, existen otros agonistas en estudio, como el GFT505, un agonista dual de PPAR α / δ , y el bezafibrato, un fibrato de uso clínico con actividad pan-agonista sobre los receptores PPARs, que han mostrado efectos beneficiosos en varios modelos de NASH en roedores: disminución de la expresión de citocinas inflamatorias y marcadores de fibrosis, disminución del contenido de triglicéridos hepáticos e inducción de la expresión de genes del catabolismo de los ácidos grasos. Los datos preliminares de los estudios de estos agonistas duales o pan-agonistas PPAR sugieren posibles efectos beneficiosos como una posible opción de tratamiento para NAFLD; sin embargo, estas investigaciones aún se encuentran en sus primeras etapas. Nuestros resultados indicarían que el efecto agonista de BemA sobre PPAR α y γ podría contribuir al efecto terapéutico en humanos y a una posible reducción en la esteatosis hepática, sin que los datos clínicos existentes hasta el momento hayan demostrado efectos adversos cardiovasculares asociados a otros agonistas duales α / γ .

En resumen, en este trabajo, se ha confirmado el efecto de BemA sobre los lípidos hepáticos, y se han revelado mecanismos de BemA, no descritos previamente en la literatura, que contribuyen a la reducción de la esteatosis hepática inducida en el modelo HFHF_r. Estos mecanismos se muestran en la **Figura V-3**.

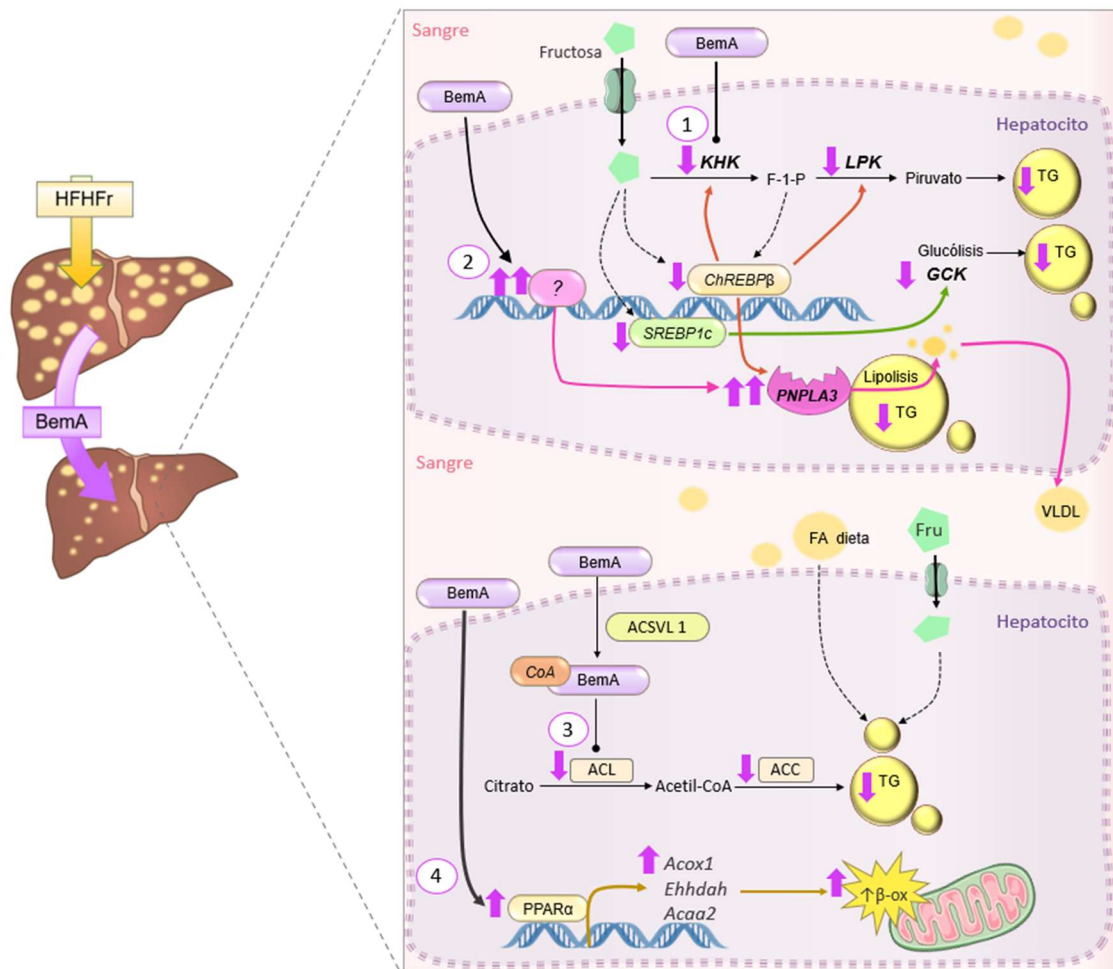


Figura V-3. Resumen resultados estudio 3. Mecanismos sugeridos para el efecto del BemA en la reducción de la esteatosis hepática inducida por la dieta HFHF. 1) Reducción de la expresión de la KHK hepática, que da lugar a una menor ingesta de fructosa líquida y, por tanto, disminuye la actividad de los factores de transcripción SREBP y ChREBP, reduciendo la DNL hepática; 2) Inducción de la expresión de la PNPLA3, que se traduciría en una mayor actividad lipasa, incrementando la exportación al plasma de TG en forma de VLDL; 3) el aumento de la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos como consecuencia de la actividad agonista de BemA sobre PPAR α en el hígado. Fru: fructosa y FA: *Fatty acids*.

6. CONCLUSIONES

Objetivo 1

1. La administración de una dieta rica en grasas saturadas (HFD, *high-fat diet*), desprovista de colesterol, a ratas hembra *Sprague-Dawley* durante 3 meses, induce una leve esteatosis hepática simple sin inflamación, ni incremento de peso y sin modificación de la trigliceridemia. Se detectan manifestaciones tempranas de resistencia hepática a la insulina (un aumento de la expresión de la enzima gluconeogénica PEPCK y algunas especies de ceramidas en el hígado), que no se traducen en alteraciones significativas en los indicadores de la homeostasis glucémica en sangre.

2. La combinación durante 3 meses de dieta HFD junto a la suplementación de fructosa líquida 10% (dieta HFHFr) en ratas hembra, induce una marcada esteatosis hepática simple sin inflamación ni incremento de peso, asociada a una clara hipertrigliceridemia. Esta hipertrigliceridemia se traduce en un cambio de sustrato energético en el músculo esquelético (incremento en la oxidación de ácidos grasos), asociado a hiperinsulinemia y disminución de la sensibilidad a la insulina.

3. En nuestras condiciones de estudio, ambas intervenciones dietéticas no modifican el peso corporal, a despecho de un marcado incremento en la ingesta calórica, a través de un incremento en la expresión de marcadores de actividad termogénica en el tejido adiposo marrón.

4. La suplementación de fructosa líquida es el factor clave en la producción de las alteraciones en el metabolismo lipídico hepático, debido a tres mecanismos de acción simultáneos: inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos, incremento de la DNL, especialmente a través de la activación del factor de transcripción ChREBP, responsables ambos de la potenciación del proceso esteatósico, e incremento en expresión de adiponutrina o PNPLA3, asociado a la aparición de hipertigliceridemia.

Objetivo 2

5. En las ratas del modelo HFHF_r, el tratamiento con una dosis moderada de CAF no reduce la acumulación de lípidos hepáticos.

6. La administración de GCE, conteniendo la misma dosis de CAF, da lugar a un menor acúmulo de TG hepático que la CAF aislada. Hemos identificado diversos mecanismos que pueden contribuir a esta diferencia:

- . Menor fosforilación de mTOR y un consecuente aumento de los niveles nucleares de la Lipina-1, lo cual inhibiría la expresión de enzimas lipogénicas como FAS y SCD1.

- . Niveles hepáticos reducidos de varias especies de DAG y una relación HexCer/Cer más baja

- . Menor expresión del VLDLR hepático

Objetivo 3

7. El tratamiento con ácido bempedoico (BemA) en ratas HFHF_r reduce la esteatosis hepática, sin modificar la hipertrigliceridemia y produciendo un leve, pero significativo, incremento en la colesterolemia.

8. Además del mecanismo de acción descrito para el BemA, como inhibidor de la actividad ACLY, hemos identificado tres posibles mecanismos de acción no identificados previamente para el BemA:

- . Reducción, por un mecanismo no identificado, a niveles inferiores a los expresados en el grupo control de la expresión de la KHK hepática, enzima clave en la aparición de las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de fructosa.

- . Actividad como agonista dual PPAR α/γ en rata y en células de origen humano.

- . Inducción de la expresión génica de la adiponutrina o PNPLA3 a través de un mecanismo diferente de la activación de ChREBP, responsable probablemente de la ausencia de efecto hipotriglicéidémico en nuestro modelo de rata HFHF_r.

REFERENCIAS

A

- Abdul-Wahed, A., Guilmeau, S., & Postic, C. (2017). Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell metabolism*, 26(2), 324–341. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.004>
- Ackerman, Z., Oron-Herman, M., Grozovski, M., Rosenthal, T., Pappo, O., Link, G., & al, e. (2005). Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. . *Hypertension*, 45:1012–1018.
- Agren, J. J., Julkunen, A., & Penttilä, I. (1992). Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *Journal of lipid research*, 33(12), 1871–1876.
- Ahima, R. S., & Antwi, D. A. (2008). Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 37(4), 811–823. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.08.005>
- Alferink, L.J.M.; Kieft-De Jong, J.C.; Darwish Murad, S. (2018). Potential Mechanisms Underlying the Role of Coffee in Liver Health. *Semin. Liver Disease*. 38, 193–214.
- Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., & Zanlungo, S. (2015). Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(9), 1765–1778. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.015>
- Armstrong, M. J., Barton, D., Gaunt, P., Hull, D., Guo, K., Stocken, D., Gough, S. C., Tomlinson, J. W., Brown, R. M., Hübscher, S. G., Newsome, P. N., & LEAN trial team (2013). Liraglutide efficacy and action in non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): study protocol for a phase II multicentre, double-blinded, randomised, controlled trial. *BMJ open*, 3(11), e003995. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003995>
- Armstrong, M. J., Hull, D., Guo, K., Barton, D., Hazlehurst, J. M., Gathercole, L. L., Nasiri, M., Yu, J., Gough, S. C., Newsome, P. N., & Tomlinson, J. W. (2016). Glucagon-like

- peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*, 64(2), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.038>
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(2), 200–214. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0102-7>
- Anderson, E. L., Howe, L. D., Jones, H. E., Higgins, J. P., Lawlor, D. A., & Fraser, A. (2015). The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, 10(10), e0140908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140908>
- Angeloni G., Guerrini L., Masella P., Bellumori M., Daluiso S., Parenti A., Innocenti M. (2019). What kind of coffee do you drink? An investigation on effects of eight different extraction methods. *Food Res. Int.*116:1327–1335. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.022>
- Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O., & Heikenwalder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(7), 411–428. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>
- Anthonsen, M. W., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Degerman, E. & Holm, C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**, 215–221.
- Alsabri, S., Mari, W., Younes, S., Alsadawi, M, & Oroszi, T. (2018). Kinetic and Dynamic Description of Caffeine. *Journal of Caffeine and adenosine research*, 8;1;3-9. <https://doi.org/10.1089/caff.2017.0011>
- Alcalá, M., Calderon-Dominguez, M., Bustos, E., Ramos, P., Casals, N., Serra, D., et al. (2017). Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Sci. Rep.* 7:16082. doi: 10.1038/s41598-017-16463-6
- Argo, C. K., & Caldwell, S. H. (2009). Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in liver disease*, 13(4), 511–531. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.07.005>

- Arneth, B., Arneth, R., & Shams, M. (2019). Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2467. <https://doi.org/10.3390/ijms20102467>
- Austin, S., & St-Pierre, J. (2012). PGC-1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of cell science*, 125(Pt 21), 4963–4971. <https://doi.org/10.1242/jcs.113662>
- Auberval, N., Dal, S., Bietiger, W., Pinget, W., Jeandidier, N., Maillard-Pedracini, E., Schini-Kerth V. & Sigrist S. (2014). Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6, 130 (2014). <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-130>

B

- Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell metabolism*, 5(6), 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>
- Baena, M., Sangüesa, G., Dávalos, A., Latasa, M. J., Sala-Vila, A., Sánchez, R. M., Roglans, N., Laguna, J. C., & Alegret, M. (2016). Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Scientific reports*, 6, 26149. <https://doi.org/10.1038/srep26149>
- Baena, M., Sangüesa, G., Hutter, N., Beltrán, J. M., Sánchez, R. M., Roglans, N., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2017). Liquid fructose in Western-diet-fed mice impairs liver insulin signaling and causes cholesterol and triglyceride loading without changing calorie intake and body weight. *The Journal of nutritional biochemistry*, 40, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.10.015>
- Baena, M., Sangüesa, G., Hutter, N., Sánchez, R. M., Roglans, N., Laguna, J. C., & Alegret, M. (2015). Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress. *Biochimica et biophysica acta*, 1851(2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.11.003>

- Baiceanu, A, P Mesdem, e M, Foufelle, F Lagouge. (2016) Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nature Reviews, Endocrinology*, 2016: volume 12; 710-722; doi: 10.1038/nrendo..2016.124.
- Bantle, J. (2009). Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *Journal of Nutrition*, 139:1263S– 1268S. doi:10.3945/jn.108.098020.
- Ballantyne, C. M., Davidson, M. H., Macdougall, D. E., Bays, H. E., Dicarlo, L. A., Rosenberg, N. L., Margulies, J., & Newton, R. S. (2013). Efficacy and safety of a novel dual modulator of adenosine triphosphate-citrate lyase and adenosine monophosphate-activated protein kinase in patients with hypercholesterolemia: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(13), 1154–1162. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.050>
- Ballantyne, C. M., Bays, H., Catapano, A. L., Goldberg, A., Ray, K. K., & Saseen, J. J. (2021). Role of Bempedoic Acid in Clinical Practice. *Cardiovascular drugs and therapy*, 35(4), 853–864. <https://doi.org/10.1007/s10557-021-07147-5>
- Baraille, F., Planchais, J., Dentin, R., Guilmeau, S., & Postic, C. (2015). Integration of ChREBP-Mediated Glucose Sensing into Whole Body Metabolism. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 30(6), 428–437. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2015>
- Bastin J. (2014). Regulation of mitochondrial fatty acid β -oxidation in human: what can we learn from inborn fatty acid β -oxidation deficiencies?. *Biochimie*, 96, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.012>
- Belfiore, F., Iannello, S., & Volpicelli, G. (1998). Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT- induced insulin, glucose, and FFA levels. *Molecular Genetics and Metabolism*, 63:134–41. doi:10.1006/mgme.1997.2658.
- Bhatt-Wessel, B., Jordan, T.W., Miller, J.H., Peng, L., (2018). Role of DGAT enzymes in triacylglycerol metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 655(April): 1–11, Doi: 10.1016/j.abb.2018.08.001
- Bhattacharya SK, Satyan KS, Chakrabarti A. (1997). Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *Journal of Psychopharmacology*. 11(3):219-224. doi:10.1177/026988119701100304

- Bilen, O., & Ballantyne, C. M. (2016). Bempedoic Acid (ETC-1002): an Investigational Inhibitor of ATP Citrate Lyase. *Current atherosclerosis reports*, 18(10), 61. <https://doi.org/10.1007/s11883-016-0611-4>
- Bikman, B. T., Guan, Y., Shui, G., Siddique, M. M., Holland, W. L., Kim, J. Y., Fabriàs, G., Wenk, M. R., & Summers, S. A. (2012). Fenretinide prevents lipid-induced insulin resistance by blocking ceramide biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 287(21), 17426–17437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359950>
- Birerdinc, A., Stepanova, M., Pawloski, L., & Younossi, Z. (2012). Caffeine is protective in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology and therapeutics*, 35(1):76-82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04916.x>.
- Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Krämer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., et al., 2008. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *Journal of Hepatology* 48(6): 983–92, Doi: 10.1016/j.jhep.2008.01.035
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2(6), 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Bougarne, N., Weyers, B., Desmet, S., Deckers, J., Ray, D., Staels, B., De Bosscher, K. (2018). Molecular Actions of PPAR α in Lipid Metabolism and Inflammation, *Endocrine Reviews*, Volume 39, Issue 5, 760–802, <https://doi.org/10.1210/er.2018-00064>
- Brachtel, D., & Richter, E. (1992). Absolute bioavailability of caffeine from a tablet formulation. *Journal of hepatology*, 16(3), 385. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(05\)80676-2](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(05)80676-2)
- Brand, C. L., Sturis, J., Gotfredsen, C. F., Fleckner, J., Fledelius, C., Hansen, B. F., Andersen, B., Ye, J. M., Sauerberg, P., & Wassermann, K. (2003). Dual PPAR α / γ activation provides enhanced improvement of insulin sensitivity and glycemic control in ZDF rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 284(4), E841–E854. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00348.2002>
- Browning, JD, LS Szczepaniak, R Dobbins, P Nuremberg, e JD Horton. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*, 2004: 40(6):1387-95. <https://doi.org/10.1002/hep.20466>

- Brunt, E., Janney, C., Di Bisceglie, A., Neuschwander-Tetri, B., Bacon, B. (1999). “Nonalcoholic steato- hepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.” *The American journal of gastroenterology*, 1999: 94: 2467–2474.
- Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Wilson, L. A., Belt, P., Neuschwander-Tetri, B. A., & NASH Clinical Research Network (CRN). (2011). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 53(3), 810–820. <https://doi.org/10.1002/hep.24127>
- Burdge, G. C., Wright, P., Jones, A. E., & Wootton, S. A. (2000). A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *The British journal of nutrition*, 84(5), 781–787.
- Burke, A. C., Telford, D. E., & Huff, M. W. (2019). Bempedoic acid: effects on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, 30(1), 1–9. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000565>
- Burke, A. C., Telford, D. E., Sutherland, B. G., Edwards, J. Y., Sawyez, C. G., Barrett, P., Newton, R. S., Pickering, J. G., & Huff, M. W. (2018). Bempedoic Acid Lowers Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Attenuates Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient (LDLR+/- and LDLR-/-) Yucatan Miniature Pigs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 38(5), 1178–1190. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310676>
- Burri, L., Thoresen, G. H., & Berge, R. K. (2010). The Role of PPAR α Activation in Liver and Muscle. *PPAR research*, 2010, 542359. <https://doi.org/10.1155/2010/542359>
- Bryant, N., Govers, R. & James, D. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 267–277. <https://doi.org/10.1038/nrm782>

C

- Carmichael, R., Wilkinson, K., & Craig, R. (2019). Insulin-dependent GLUT4 trafficking is not regulated by protein SUMOylation in L6 myocytes. *Nature- Scientifics Report*, 9; <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42574-3>.

- Castillo, M., Hall, J. A., Correa-Medina, M., Ueta, C., Kang, H. W., Cohen, D. E., & Bianco, A. C. (2011). Disruption of thyroid hormone activation in type 2 deiodinase knockout mice causes obesity with glucose intolerance and liver steatosis only at thermoneutrality. *Diabetes*, 60(4), 1082–1089. <https://doi.org/10.2337/db10-0758>
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S.A., Brunt, E.M. and Sanyal, A.J. (2018), The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 67: 328-357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., Masuoko, H., & Gores, G. (2011). Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 301(5), G825–G834. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00145.2011>
- Cicero AFG, Fogacci F, Hernandez AV, Banach M, on behalf of the Lipid and Blood Pressure Meta-Analysis Collaboration (LBPMC) Group and the International Lipid Expert Panel (ILEP) (2020) Efficacy and safety of bempedoic acid for the treatment of hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 17(7): e1003121. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003121>
- Chapman, R. W., & Lynch, K. D. (2020). Obeticholic acid-a new therapy in PBC and NASH. *British medical bulletin*, 133(1), 95–104. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldaa006>
- Chen, F., Esmaili, S., Rogers, G. B., Bugianesi, E., Petta, S., Marchesini, G., Bayoumi, A., Metwally, M., Azardaryany, M. K., Coulter, S., Choo, J. M., Younes, R., Rosso, C., Liddle, C., Adams, L. A., Craxì, A., George, J., & Eslam, M. (2020). Lean NAFLD: A Distinct Entity Shaped by Differential Metabolic Adaptation. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 71(4), 1213–1227. <https://doi.org/10.1002/hep.30908>
- Chen, S., Teoh, N. C., Chitturi, S., & Farrell, G. C. (2014). Coffee and non-alcoholic fatty liver disease: brewing evidence for hepatoprotection?. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 29(3), 435–441. <https://doi.org/10.1111/jgh.12422>

- Chen, CH., Huang, M., Yang, J., Nien, C., Yang, C., Yeh, Y., Yueh, S. (2006). Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population of Taiwan: metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese adults. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 40(8):745-52. <http://doi.or/10.1097/00004836-200609000-00016>.
- Ching Lau, J, X Zhang, & J Yu. (2017). Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *Journal of Pathology*. 241: 36–44. <https://doi.org/10.1002/path.4829>.
- Choi, B. K., Park, S. B., Lee, D. R., Lee, H. J., Jin, Y. Y., Yang, S. H., & Suh, J. W. (2016). Green coffee bean extract improves obesity by decreasing body fat in high-fat diet-induced obese mice. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(7), 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.05.017>
- Christianson, J. C., Olzmann, J. A., Shaler, T. A., Sowa, M. E., Bennett, E. J., Richter, C. M., Tyler, R. E., Greenblatt, E. J., Harper, J. W., & Kopito, R. R. (2011). Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nature cell biology*, 14(1), 93–105. <https://doi.org/10.1038/ncb2383>
- Cohen, J., Horton, J. & Hobbs, H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* 332; 1519-1523. <https://doi.org/10.1126/science.1204265>
- Conus, F., Rabasa-Lhoret, R. & Peronnet, F. (2007). Characteristics of metabolically obese normal-weight (MONW) subjects. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 32, 4–12. <https://doi.org/10.1139/h06-092>
- Cramer, C. T., Goetz, B., Hopson, K. L., Fici, G. J., Ackermann, R. M., Brown, S. C., Bisgaier, C. L., Rajeswaran, W. G., Oniciu, D. C., & Pape, M. E. (2004). Effects of a novel dual lipid synthesis inhibitor and its potential utility in treating dyslipidemia and metabolic syndrome. *Journal of lipid research*, 45(7), 1289–1301. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400018-JLR200>
- Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), 20108–20117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314219200>

Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ y Aouadi M. (2013). Insulin signaling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*, 56, 949-964.

D

Daglia, M., Racchi, M., Papetti, A., Lanni, C., Govoni, S., & Gazzani, G. (2004). In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(6), 1700–1704. <https://doi.org/10.1021/jf030298n>

Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology*, 114(4), 842–845. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70599-2)

Dentin, R., Girard, J., & Postic, C. (2005). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, 87(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.008>

Delevry, D, Gupta, E, Bempedoic acid: Review of a novel therapy in lipid management, *American Journal of Health-System Pharmacy*, Volume 78, Issue 2, 15 January 2021, Pages 95–104, <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxaa352>

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* , 93:S52–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70014-6)

Ding, L., Oligschlaeger, Y., Shiri-Sverdlov, R., Houben, T. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin, Heidelberg, https://doi.org/10.1007/164_2020_352

Dongiovanni, P., Anstee, Q. M., & Valenti, L. (2013). Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Current pharmaceutical design*, 19(29), 5219–5238. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990381>

Donnelly, KL, CI Smith, SJ Schwarzenberg, J Jessurun, MD Boldt, e EJ Parks. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with

nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 115(5):1343-51. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.

Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., & Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(19), 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1252-6>

Dubuquoy, C., Robichon, C., Lasnier, F., Langlois, C., Dugail, I., Foufelle, F., Girard, J., Burnol, A. F., Postic, C., & Moldes, M. (2011). Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *Journal of hepatology*, 55(1), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.024>

Dyson, J. K., Anstee, Q. M., & McPherson, S. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline gastroenterology*, 5(3), 211–218. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2013-100403>

E

Eisenberg S. (1983). Lipoproteins and lipoprotein metabolism. A dynamic evaluation of the plasma fat transport system. *Klinische Wochenschrift*, 61(3), 119–132. <https://doi.org/10.1007/BF01486366>

Eccleston, HB, KK Andringa, AM Betancourt, AL King, SK Mantena, e et al. (2011). Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice.” *Antioxidants and redox signaling*, 15: 447–459. doi:10.1089/ ars.2010.3395.

Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J., & Guan, K. L. (2011). The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*, 7(6), 643–644. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15123>

Ekstedt, M., Hagström, H., Nasr, P., Fredrikson, M., Stål, P., Kechagias, S., & Hultcrantz, R. (2015). Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 61(5), 1547–1554. <https://doi.org/10.1002/hep.27368>

Elshourbagy, N. A., Near, J. C., Kmetz, P. J., Sathe, G. M., Southan, C., Strickler, J. E., Gross, M., Young, J. F., Wells, T. N., & Groot, P. H. (1990). Rat ATP citrate-lyase. Molecular cloning and sequence analysis of a full-length cDNA and mRNA abundance as a function of diet, organ, and age. *The Journal of biological chemistry*, 265(3), 1430–1435.

F

Fon Tacer, K., Rozman, D (2011). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation. *Journal of Lipids*, vol. 2011, Article ID 783976, 14. <https://doi.org/10.1155/2011/783976>

Fassio, E., Alvarez, E., Dominguez, N., Landeira, G., Longo, C. (2004). Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology*, 40:820–826. <http://doi.org/10.1002/hep.20410>

Fielding, C. J., Shore, V. G. & Fielding, P. E. (1972). A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1493–1498.

Filippov, S., Pinkosky, S. L., Lister, R. J., Pawloski, C., Hanselman, J. C., Cramer, C. T., Srivastava, R. A., Hurley, T. R., Bradshaw, C. D., Spahr, M. A., & Newton, R. S. (2013). ETC-1002 regulates immune response, leukocyte homing, and adipose tissue inflammation via LKB1-dependent activation of macrophage AMPK. *Journal of lipid research*, 54(8), 2095–2108. <https://doi.org/10.1194/jlr.M035212>

Ferré, T., Riu, E., Franckhauser, S., Agudo, J., & Bosch, F. (2003). Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetologia*, 46(12), 1662–1668. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1244-z>

Frary, C. D., Johnson, R. K., & Wang, M. Q. (2005). Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(1), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.10.027>

Fuchs, CD, T Claudel, e M Trauner. (2014). Role of metabolic lipases and lipolytic metabolites in the pathogenesis of NAFLD. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 25, 576–585.

Fruchart, J. C., Hermans, M. P., Fruchart-Najib, J., & Kodama, T. (2021). Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Modulators (SPPARM α) in the Metabolic Syndrome: Is Pemafibrate Light at the End of the Tunnel?. *Current atherosclerosis reports*, 23(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s11883-020-00897-x>

G

Gorelick, F. S., & Shugrue, C. (2001). Exiting the endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular endocrinology*, 177(1-2), 13–18. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00438-5](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00438-5)

Gorden, D. L., Ivanova, P. T., Myers, D. S., McIntyre, J. O., VanSaun, M. N., Wright, J. K., Matrisian, L. M., & Brown, H. A. (2011). Increased diacylglycerols characterize hepatic lipid changes in progression of human nonalcoholic fatty liver disease; comparison to a murine model. *PloS one*, 6(8), e22775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022775>

Gray, S. M., Meijer, R. I., & Barrett, E. J. (2014). Insulin regulates brain function, but how does it get there?. *Diabetes*, 63(12), 3992–3997. <https://doi.org/10.2337/db14-0340>

Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Garty, N. B., Blanchette-Mackie, E. J., & Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *The Journal of biological chemistry*, 266(17), 11341–11346.

Grosso, G., Stepaniak, U., Micek, A., Topor-Mądry, R., Pikhart, H., Szafraniec, K., & Pająk, A. (2015). Association of daily coffee and tea consumption and metabolic syndrome: results from the Polish arm of the HAPIEE study. *European journal of nutrition*, 54(7), 1129–1137. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0789-6>

H

Haeusler, R., McGraw, T. & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biol* **19**, 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>

- Hall, CS. (1934). Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.*, 1934: 18:385–403.
- Hamel, FG, RG Bennett, JL Upward, e WC Duckworth. (2001). “Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes.” *Endocrinology*, 2001: 142: 2702–2706.
- Hamrén, B., Ohman, K. P., Svensson, M. K., & Karlsson, M. O. (2012). Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of the interrelationships between tesaglitazar exposure and renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of clinical pharmacology*, 52(9), 1317–1327. <https://doi.org/10.1177/0091270011416937>
- Han, Y. H., Kim, H. J., Kim, E. J., Kim, K. S., Hong, S., Park, H. G., & Lee, M. O. (2014). ROR α decreases oxidative stress through the induction of SOD2 and GPx1 expression and thereby protects against nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Antioxidants & redox signaling*, 21(15), 2083–2094. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5655>
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell*, 6(5), 1099–1108. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00108-8)
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271–274. <https://doi.org/10.1038/16729>
- Hardinga, H, Y Zhanga, D Scheunerb, e J Chenc. (2009). Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2009: 106, 1832–1837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809632106>.
- Hashimoto, T., Fujita, T., Usuda, N., Cook, W., Qi, C., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., & Reddy, J. K. (1999). Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 274(27), 19228–19236. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.19228>

- Haas, J. T., Miao, J., Chanda, D., Wang, Y., Zhao, E., *et al.* (2012). Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell metabolism*, 15(6), 873–884. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.002>
- Haüssinger D. (1990). Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *The Biochemical journal*, 267(2), 281–290. <https://doi.org/10.1042/bj2670281>
- Havel P. J. (2005). Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition reviews*, 63(5), 133–157. <https://doi.org/10.1301/nr.2005.may.133-157>
- Hayat, U., Siddiqui, A. A., Okut, H., Afroz, S., Tasleem, S., & Haris, A. (2021). The effect of coffee consumption on the non-alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis: A meta-analysis of 11 epidemiological studies. *Annals of hepatology*, 20, 100254. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.08.071>
- Hebbard, I. & George, J. (2010). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews*, 8; 34-44. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.191>.
- Helal MG, Ayoub SE, Elkashefand WF, Ibrahim TM. (2018). Caffeine affects HFD-induced hepatic steatosis by multifactorial intervention. *Hum Exp Toxicol* 37:983-90.
- Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, Rabbia M, Chognot C, Herz M (2009). Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet*. 374(9684):126-35.
- Holman, G.D. (2020) Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the *SLC2* family. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **472**, 1155–1175. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02411-3>
- Holloway, G. P., Luiken, J. J., Glatz, J. F., Spriet, L. L., & Bonen, A. (2008). Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta physiologica* (Oxford, England), 194(4), 293–309. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01878.x>

- Hooper, A. J., Adams, L. A., & Burnett, J. R. (2011). Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *Journal of lipid research*, 52(4), 593–617. <https://doi.org/10.1194/jlr.R008896>
- Honigberg, M. C., & Natarajan, P. (2019). Bempedoic Acid for Lowering LDL Cholesterol. *JAMA*, 322(18), 1769–1771. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.16598>
- Houten, S. M., Denis, S., Argmann, C. A., Jia, Y., Ferdinandusse, S., Reddy, J. K., & Wanders, R. J. (2012). Peroxisomal L-bifunctional enzyme (Ehhadh) is essential for the production of medium-chain dicarboxylic acids. *Journal of lipid research*, 53(7), 1296–1303. <https://doi.org/10.1194/jlr.M024463>
- Howell, JJ. & Manning, BD. (2011). mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 22:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.12.003>.
- Hodson, L., Skeaff, C. M., & Fielding, B. A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in lipid research*, 47(5), 348–380. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.03.003>
- Hsu, C., Wang, C., & Chiu, T. (2010). Caffeine and a selective adenosine A2A receptor antagonist induce sensitization and cross-sensitization behavior associated with increased striatal dopamine in mice. *Journal of Biomedical Science*, 17:4 <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-4>.
- Huang, D. Q., El-Serag, H. B., & Loomba, R. (2021). Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(4), 223–238. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00381-6>
- Hylemon, P. B., Zhou, H., Pandak, W. M., Ren, S., Gil, G., & Dent, P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *Journal of lipid research*, 50(8), 1509–1520. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900007-JLR200>

- Imatoh, T., Kamimura, S. & Miyazaki, M. (2015). Coffee but not green tea consumption is associated with prevalence and severity of hepatic steatosis: the impact on leptin level. *Eur J Clin Nutr* **69**, 1023–1027. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.23>
- Inagaki, T., Lin, V. Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2008). Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell metabolism*, 8(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.05.006>
- Ishimoto, T., Lanaspa, M. A., Le, M. T., Garcia, G. E., Diggie, C. P., et al (2012). Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4320–4325. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119908109>

J

- James, D.E., Stöckli, J. & Birnbaum, M.J. (2021). The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00390-6>
- Jornayvaz, F. R., Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2010). The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Annual review of nutrition*, 30, 273–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104726>
- Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Sato, Y., Kang, D. H., Tolan, D. R., Sanchez-Lozada, L. G., Rosen, H. R., Lanaspa, M. A., Diehl, A. M., & Johnson, R. J. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 68(5), 1063–1075. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.019>
- Jiang, M., Wu, N., Chen, X., Wang, W., Chu, Y., Liu, H., Li, W., Chen, D., Li, X., & Xu, B. (2019). Pathogenesis of and major animal models used for nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of international medical research*, 47(4), 1453–1466. <https://doi.org/10.1177/0300060519833527>
- Jing, G., Chen, J., Xu, G., and Shalev, A. (2016). Islet ChREBP-b is increased in diabetes and controls ChREBP-a and glucose-induced gene expression via a negative feedback loop. *Mol. Metab.* 5, 1208–1215. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.09.010>

Jump D. B. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Current opinion in lipidology*, 13(2), 155–164. <https://doi.org/10.1097/00041433-200204000-00007>

K

Kanazawa, T., Taneike, I., Akaishi, R., Yoshizawa, F., Furuya, N., Fujimura, S., & Kadowaki, M. (2004). Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279(9), 8452–8459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306337200>

Kakimoto, P, Alicia J. Kowaltowski, A (2016). Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biology*, Volume 8, Pages 216-225, ISSN 2213-2317, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.009>.

Kechagias, S., Ernerson, A., Dahlqvist, O., Lundberg, P., Lindström, T., Nystrom, F. H., & Fast Food Study Group (2008). Fast-food-based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects. *Gut*, 57(5), 649–654. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.131797>

Keipert, S., Lutter, D., Schroeder, B. O., Brandt, D., Ståhlman, M., Schwarzmayr, T., Graf, E., Fuchs, H., de Angelis, M. H., Tschöp, M. H., Rozman, J., & Jastroch, M. (2020). Endogenous FGF21-signaling controls paradoxical obesity resistance of UCP1-deficient mice. *Nature communications*, 11(1), 624. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14069-2>

Kersten S. (2017). Angiopoietin-like 3 in lipoprotein metabolism. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(12), 731–739. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.119>

Khetarpal, S. A., Zeng, X., Millar, J. S., Vitali, C., Somasundara, A., Zanoni, P., Landro, J. A., Barucci, N., Zavadoski, W. J., Sun, Z., de Haard, H., Toth, I. V., Peloso, G. M., Natarajan, P., Cuchel, M., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Tall, A. R., Kathiresan, S., DaSilva-Jardine, P., *et al.* (2017). A human APOC3 missense variant and monoclonal antibody accelerate apoC-III clearance and lower triglyceride-rich lipoprotein levels. *Nature medicine*, 23(9), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/nm.4390>

- Kim, H., Kim, H., Lee, K., Kim, D., Kim, S., et al. (2004). Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in non-obese, nondiabetic adults. *Archives of Internal Medicine*. 164(19):2169-75. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.19.2169>.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. *et al.* (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Klip, A., & Pâquet, M. R. (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes care*, 13(3), 228–243. <https://doi.org/10.2337/diacare.13.3.228>
- Krishnan, S., & Cooper, J. A. (2014). Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. *European journal of nutrition*, 53(3), 691–710. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0638-z>
- Kurek, K., Piotrowska, D. M., Wiesiolek-Kurek, P., Łukaszuk, B., Chabowski, A., Górski, J., & Zendzian-Piotrowska, M. (2014). Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 34(7), 1074–1083. <https://doi.org/10.1111/liv.12331>
- Kwak, M. S., & Kim, D. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *The Korean journal of internal medicine*, 33(1), 64–74. <https://doi.org/10.3904/kjim.2017.343>

L

- Laube, H., Klor, H., Fussganger, R., & Pfeiffer, E. (1973). The effect of starch, sucrose, glucose and fructose on lipid metabolism in rats. *Nutrition & Metabolism*, 15:273–280.
- Laufs, U., Banach, M., Mancini, G., Gaudet, D., Bloedon, L. T., Sterling, L. R., Kelly, S., & Stroes, E. (2019). Efficacy and Safety of Bempedoic Acid in Patients With Hypercholesterolemia and Statin Intolerance. *Journal of the American Heart Association*, 8(7), e011662. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011662>

- Lee, A. H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., & Glimcher, L. H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882), 1492–1496. <https://doi.org/10.1126/science.1158042>
- Lefkowitz, J. (2005). “Morphology of alcoholic liver disease. Clin.” *Clinics in liver disease*. 9, 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.11.001>.
- Lottenberg, A. M., Afonso, M., Lavrador, M. S., Machado, R. M., & Nakandakare, E. R. (2012). The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(9), 1027–1040. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.004>
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S., & Stanley, W. C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological reviews*, 90(1), 207–258. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2009>
- Le, N.-M.P. and Brown, J.W. (2008), Characterization of the Thermoneutral Zone of the Laboratory Rat. *FASEB J*, 22: 956.19-956.19. https://doi.org/10.1096/fasebj.22.1_supplement.956.19
- Lee, S. S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E. J., Owens, J. W., Kroetz, D. L., Fernandez-Salguero, P. M., Westphal, H., & Gonzalez, F. J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Molecular and cellular biology*, 15(6), 3012–3022. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.6.3012>
- Lerner, A. G., Upton, J. P., Praveen, P. V., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B. J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2012). IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell metabolism*, 16(2), 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.007>
- Leroux, A., Ferrere, G., Godie, V., Cailleux, F., Renoud, M. L., Gaudin, F., Naveau, S., Prévot, S., Makhzami, S., Perlemuter, G., & Cassard-Doulcier, A. M. (2012). Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 57(1), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.028>

- Lieber, C. S., Leo, M. A., Mak, K. M., Xu, Y., Cao, Q., Ren, C., Ponomarenko, A., & DeCarli, L. M. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of clinical nutrition*, 79(3), 502–509. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.3.502>
- Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., Lavail, M. M., & Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5852), 944–949. <https://doi.org/10.1126/science.1146361>
- Linden, A. G., Li, S., Choi, H. Y., Fang, F., Fukasawa, M., et al (2018). Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice. *Journal of lipid research*, 59(3), 475–487. <https://doi.org/10.1194/jlr.M081836>
- Lipp, M., Simoneau, C., Ulberth, F., Anklam, E., Crews, C., Brereton, P., Greyt, W., Schwack, W., Wiedmaier, C. (2001). Composition of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalents, *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 4, 399-408. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0984>.
- Liss, K. H., & Finck, B. N. (2017). PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie*, 136, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.009>.
- Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J. H., Walter, P., Reed, J. C., Glimcher, L. H., & Hetz, C. (2009). BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Molecular cell*, 33(6), 679–691. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.017>
- Liu, K., & Czaja, M. J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell death and differentiation*, 20(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.63>
- Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., Jeandidier, N., Maillard, E., Marchioni, E., Sigrist, S., & Dal, S. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & metabolism*, 13, 15. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0074-1>
- Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B., & Oh, B. J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*, 55(7), 434–438.

M

- Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Kuba, M., Nakagawa, Y., Ishii, K., Shimada, M., Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Takekoshi, K., Sone, H., Yahagi, N., Suzuki, H., Murata, S., Nakamuta, M., Yamada, N., *et al.* (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 56(6), 2199–2208. <https://doi.org/10.1002/hep.25932>
- Muniyappa, R; Montagnani, M; Kon Koh, K; Quon, M (2007). Cardiovascular Actions of Insulin, *Endocrine Reviews*, Volume 28, Issue 5, Pages 463–491. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0006>
- Ma, J., Hwang, S. J., Pedley, A., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Chung, R. T., Benjamin, E. J., Levy, D., Fox, C. S., & Long, M. T. (2017). Bi-directional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *Journal of hepatology*, 66(2), 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.022>
- Ma, Y., Brewer, J. W., Diehl, J. A., & Hendershot, L. M. (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *Journal of molecular biology*, 318(5), 1351–1365. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00234-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00234-6)
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., & Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences*, 39(5), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.008>
- Masterton, G. S., Plevris, J. N., & Hayes, P. C. (2010). Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 31(7), 679–692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04230.x>
- Macdonald, I. (1966). Influence of fructose and glucose on serum lipid levels in men and pre- and postmenopausal women. *Am. American Journal of Clinical Nutrition*, 18; 369-372. <https://doi.org/10.1093/ajcn/18.5.369>
- Madrigal-Matute, J., & Cuervo, A. M. (2016). Regulation of Liver Metabolism by Autophagy. *Gastroenterology*, 150(2), 328–339. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.042>

- Malhi, H., & Kaufman, R. J. (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of hepatology*, 54(4), 795–809. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.005>
- Maloney, S. K., Fuller, A., Mitchell, D., Gordon, C., & Overton, J. M. (2014). Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold?. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 29(6), 413–420. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2014>
- Mayes, P. (1993). Intermediary metabolism of fructose. *American Journal of Clinical Nutrition*, 58:754S–765S.
- Mazzolini, G., Sowa, J. P., Atorrasagasti, C., Küçükoglu, Ö., Syn, W. K., & Canbay, A. (2020). Significance of Simple Steatosis: An Update on the Clinical and Molecular Evidence. *Cells*, 9(11), 2458. <https://doi.org/10.3390/cells9112458>
- Meda, C., Barone, M., Mitro, N., Lolli, F., Pedretti, S. (2020). Hepatic ER α accounts for sex differences in the ability to cope with an excess of dietary lipids. *Molecular Metabolism*, Volume 32, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.009>
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*, 36(10), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., Magnuson, M. A., & Kahn, C. R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular cell*, 6(1), 87–97.
- Miller, L., Bly, C., Watson, M., & Bale, W. (1951). The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *The Journal of experimental medicine*, 94(5), 431–453. <https://doi.org/10.1084/jem.94.5.431>
- Mitchell, D., Knight, C., Hockenberry, J., Teplansky, R., & Hartman, T. (2014). Beverage caffeine intakes in the U.S. . *Food and Chemical Toxicology*, 63, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.042>.
- Misra, P., Viswakarma, N., & Reddy, J. K. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor- α signaling in hepatocarcinogenesis. *Sub-cellular biochemistry*, 69, 77–99. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5_5

- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H. J., & Ntambi, J. M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), 25164–25171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402781200>
- Molloy, J., Calcagno, C., Willians, C., Jones, F., Torres, D., & Harrison, S. (2012). Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. *Hepatology*, 55(2):429-36. doi: 10.1002/hep.24731.
- Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., Iroz, A., Bertrand-Michel, J., Al Saati, T., Cano, P., Mselli-Lakhal, L., Mithieux, G., Rajas, F., Lagarrigue, S., Pineau, T., Loiseau, N., *et al.* (2016). Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut*, 65(7), 1202–1214. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310798>
- Moore, K., & Hollien, J. (2015). Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Molecular biology of the cell*, 26(16), 2873–2884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0074>
- Morón-Ros, S., Uriarte, I., Berasain, C., Avila, M. A., Sabater-Masdeu, M., *et al.* (2021). FGF15/19 is required for adipose tissue plasticity in response to thermogenic adaptations. *Molecular metabolism*, 43, 101113. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101113>
- Morris, E. M., Rector, R. S., Thyfault, J. P., & Ibdah, J. A. (2011). Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis. *Antioxidants & redox signaling*, 15(2), 485–504. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3795>
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>
- Muoio DM, Newgard CB. (2008). Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(3):193-205. <https://doi.org/10.1038/nrm2327>.

Muoio, D. M., & Koves, T. R. (2007). Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC-1 α : implications for metabolic disease. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 32(5), 874–883. <https://doi.org/10.1139/H07-083>

Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Fagà, E., Silli, B., & Pagano, G. (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 37(4), 909–916. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50132>

N

Nair A., Jacob S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic Clin. Pharm.* 7:27. [//doi.org/10.4103/0976-0105.177703](https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703).

Nikpayam, O., Najafi, M., Ghaffari, S., Jafarabadi, M. A., Sohrab, G., & Roshanravan, N. (2019). Effects of green coffee extract on fasting blood glucose, insulin concentration and homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR): a systematic review and meta-analysis of interventional studies. *Diabetology & metabolic syndrome*, 11, 91. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0489-8>

Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A (2002). Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 May; 282(5):E1180-90.

Nagle, CA, EL Klett, e RA Coleman. (2009). Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance.” *Journal of Lipid Research*, 2009: Suppl:S74-9. doi: 10.1194/jlr.R800053-JLR200.

Nakamura, M. T., Yudell, B. E., & Loor, J. J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in lipid research*, 53, 124–144. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>

Nehlig, A., & Alexander, S. (2018). Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacological Reviews*, 70 (2) 384-411; <https://doi.org/10.1124/pr.117.014407>.

Nielsen, S., & Popkin, B. (2004). Changes in beverage intake between 1977 and 2001. *American Journal of Preventive Medicine*, 27:205–209. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2004.05.005>.

Nishioji, K., Mochizuki, N., Kobayashi, M., Kamaguchi, M., Sumida, Y., Nishimura, T., Yamaguchi, K., Kadotani, H., & Itoh, Y. (2015). The Impact of PNPLA3 rs738409 Genetic Polymorphism and Weight Gain ≥ 10 kg after Age 20 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Japanese Individuals. *PLoS one*, 10(10), e0140427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140427>

O

Oligschlaeger, Y., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). NAFLD Preclinical Models: More than a Handful, Less of a Concern?. *Biomedicines*, 8(2), 28. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8020028>

Oberhaensli, R. D., Galloway, G. J., Taylor, D. J., Bore, P. J., & Radda, G. K. (1986). Assessment of human liver metabolism by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *The British journal of radiology*, 59(703), 695–699. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-59-703-695>

Ortega-Prieto P., Postic C., (2019). Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Frontiers in Genetics*. Vol 10, Pag 472. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00472>

Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., & Abdelmalek, M. F. (2008). Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 48(6), 993–999. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.02.011>

P

Palmer, M., & Schaffner, F. (1990). Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology*, 99(5), 1408–1413. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)91169-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)91169-7)

- Park JB. (2013). Isolation and quantification of major chlorogenic acids in three major instant coffee brands and their potential effects on H₂O₂-induced mitochondrial membrane depolarization and apoptosis in PC-12 cells. *Food Funct.* 4:1632–1638. doi: 10.1039/c3fo60138b.
- Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., Guertin, D. A., Madden, K. L., Carpenter, A. E., Finck, B. N., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3), 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>
- Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(10), 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
- Petersen, K. F., Dufour, S., Savage, D. B., Bilz, S., Solomon, G., Yonemitsu, S., Cline, G. W., Befroy, D., Zeman, L., Kahn, B. B., Papademetris, X., Rothman, D. L., & Shulman, G. I. (2007). The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12587–12594. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705408104>
- Perry, R. J., Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 510(7503), 84–91. <https://doi.org/10.1038/nature13478>
- Piccinin, E., Villani, G., & Moschetta, A. (2019). Metabolic aspects in NAFLD, NASH and hepatocellular carcinoma: the role of PGC1 coactivators. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(3), 160–174. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0089-3>
- Pingitore, P., & Romeo, S. (2019). The role of PNPLA3 in health and disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1864(6), 900–906. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.06.018>
- Pinkosky, S. L., Filippov, S., Srivastava, R. A., Hanselman, J. C., Bradshaw, C. D., Hurley, T. R., Cramer, C. T., Spahr, M. A., Brant, A. F., Houghton, J. L., Baker, C., Naples, M., Adeli, K., & Newton, R. S. (2013). AMP-activated protein kinase and ATP-citrate lyase are two distinct molecular targets for ETC-1002, a novel small molecule

regulator of lipid and carbohydrate metabolism. *Journal of lipid research*, 54(1), 134–151. <https://doi.org/10.1194/jlr.M030528>.

Pinkosky, S. L., Newton, R. S., Day, E. A., Ford, R. J., Lhotak, S., Austin, R. C., Birch, C. M., Smith, B. K., Filippov, S., Groot, P., Steinberg, G. R., & Lalwani, N. D. (2016). Liver-specific ATP-citrate lyase inhibition by bempedoic acid decreases LDL-C and attenuates atherosclerosis. *Nature communications*, 7, 13457. <https://doi.org/10.1038/ncomms13457>

Poole, R., Kennedy, O. J., Roderick, P., Fallowfield, J. A., Hayes, P. C., & Parkes, J. (2017). Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ (Clinical research ed.)*, 359, j5024. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5024>

Pownall, H.J., Rosales, C., Gillard, B.K., Gotto, A. (2021). High-density lipoproteins, reverse cholesterol transport and atherogenesis. *Nature Reviews Cardiology*. 18, pages712–723. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00538-z>

Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., Tzatzarakis, M. N., & Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular medicine reports*, 12(5), 7293–7302. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4377>

Puri, P., Baillie, R. A., Wiest, M. M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M. J., & Sanyal, A. J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(4), 1081–1090. <https://doi.org/10.1002/hep.21763>

Q

Qu, S., Su, D., Altomonte, J., Kamagate, A., He, J., Perdomo, G., Tse, T., Jiang, Y., & Dong, H. H. (2007). PPAR α mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292(2), E421–E434. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00157.2006>

R

- Roshan, H., Nikpayam, O., Sedaghat, M., & Sohrab, G. (2018). Effects of green coffee extract supplementation on anthropometric indices, glycaemic control, blood pressure, lipid profile, insulin resistance and appetite in patients with the metabolic syndrome: a randomised clinical trial. *The British journal of nutrition*, 119(3), 250–258. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003439>
- Ramasamy I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 52(12), 1695–1727. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0358>
- Rayner, D.V., Thomas, M.E. & Trayhurn P. (1994). Glucose transporters (GLUTs 1–4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 72, 476–479. <https://doi.org/10.1139/y94-069>
- Ruderman, N., Chisholm, D., Pi-Sunyer, X., Schneider, S. (1998). The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes*, 47(5):699-713. <http://doi.org/10.2337/diabetes.47.5.699>.
- Rebollo, A., Baena, M., Roglans, N., Alegret, M. & Laguna, J.C. (2012). Fructose induces synthesis and reduces oxidation of liver fatty acids through ChREBP activation. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica*. 10, 4, 289-292. VI Congreso EPHAR.
- Rebollo, A., Roglans, N., Baena, M., Padrosa, A., Sánchez, R. M., Merlos, M., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2014). Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(2), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.014>
- Rebollo, A., Roglans, N., Baena, M., Sánchez, R. M., Merlos, M., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2014). Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(4), 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.01.002>
- Régnier, M., Polizzi, A., Smati, S., Lukowicz, L., Fougerat, A., Lippi, Y., Fouché, E., Lasserre, F., Naylies, C., Bétoulières, C., Barquissau, V., Mouisel, E., Bertrand-Michel, J., Batut, A., Al Saati, T., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Ellero-Simatos, S., Langin, D., Postic, C., *et al.* Hepatocyte-specific deletion of Ppar α promotes NAFLD in the

context of obesity. *Sci Rep* 10, 6489 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63579-3>

Realí, F., Morine, M. J., Kahramanoğulları, O., Raichur, S., Schneider, H. C., Crowther, D., & Priami, C. (2017). Mechanistic interplay between ceramide and insulin resistance. *Scientific reports*, 7, 41231. <https://doi.org/10.1038/srep41231>

Rinella, M. E., Elias, M. S., Smolak, R. R., Fu, T., Borensztajn, J., & Green, R. M. (2008). Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *Journal of lipid research*, 49(5), 1068–1076. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800042-JLR200>

Roglans, N., Vilà, L., Farré, M., Alegret, M., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., & Laguna, J. C. (2007). Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 45(3), 778–788. <https://doi.org/10.1002/hep.21499>

Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L. A., Boerwinkle, E., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*, 40(12), 1461–1465. <https://doi.org/10.1038/ng.257>

Rothwell N, Stock, M. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, 281 (1979), pp. 31-35

S

Sajan, M. P., Ivey, R. A., Lee, M. C., & Farese, R. V. (2015). Hepatic insulin resistance in ob/ob mice involves increases in ceramide, aPKC activity, and selective impairment of Akt-dependent FoxO1 phosphorylation. *Journal of lipid research*, 56(1), 70–80. <https://doi.org/10.1194/jlr.M052977>

Sangüesa, G., Montañés, J. C., Baena, M., Sánchez, R. M., Roglans, N., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2019). Chronic fructose intake does not induce liver steatosis and inflammation in female Sprague-Dawley rats, but causes hypertriglyceridemia related to decreased

- VLDL receptor expression. *European journal of nutrition*, 58(3), 1283–1297.
<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1654-9>
- Sangüesa, G., Roglans, N., Montañés, J. C., Baena, M., Velázquez, A. M., Sánchez, R. M., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2018). Chronic Liquid Fructose, but not Glucose, Supplementation Selectively Induces Visceral Adipose Tissue Leptin Resistance and Hypertrophy in Female Sprague-Dawley Rats. *Molecular nutrition & food research*, 62(22), e1800777. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800777>
- Sakamoto, K., & Holman, G. D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295(1), E29–E37. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90331.2008>
- Salminen, A., Hyttinen, J. M., & Kaarniranta, K. (2011). AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 89(7), 667–676. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0748-0>
- Saltiel, A. (2015). Insulin signaling in the control of glucose and lipid homeostasis. *Handbook of Experimental Pharmacology. Springer International Publishing Switzerland*, doi:10.1007/164_2015_14.
- Saltiel, A., Kahn, C. (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799a>
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2018). Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell metabolism*, 27(1), 22–41. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.002>
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Insulin Resistance, and Ceramides. *The New England journal of medicine*, 381(19), 1866–1869. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1910023>
- Saponaro, C.; Gaggini, M.; Carli, F.; Gastaldelli, A. (2015). The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*. 7, 9453-9474. <https://doi.org/10.3390/nu7115475>

- Scarpace, P. J., Matheny, M., & Tümer, N. (2001). Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats. *Neuroscience*, 104(4), 1111–1117. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00142-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00142-7)
- Shin, S., & Ajuwon, K. M. (2018). Divergent Response of Murine and Porcine Adipocytes to Stimulation of Browning Genes by 18-Carbon Polyunsaturated Fatty Acids and Beta-Receptor Agonists. *Lipids*, 53(1), 65–75. <https://doi.org/10.1002/lipd.12010>
- Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., & Igarria, A. (2020). A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems. *The FEBS journal*, 287(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/febs.15107>
- Simopoulos A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 56(8), 365–379. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00253-6)
- Stoekenbroek, R. M., Lambert, G., Cariou, B., & Hovingh, G. K. (2018). Inhibiting PCSK9 - biology beyond LDL control. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(1), 52–62. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0110-5>
- Sinha, R. A., Farah, B. L., Singh, B. K., Siddique, M. M., Li, Y., Wu, Y., Ilkayeva, O. R., Gooding, J., Ching, J., Zhou, J., Martinez, L., Xie, S., Bay, B. H., Summers, S. A., Newgard, C. B., & Yen, P. M. (2014). Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(4), 1366–1380. <https://doi.org/10.1002/hep.26667>
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., & Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242), 1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Santhekadur, P. K., Kumar, D. P., & Sanyal, A. J. (2018). Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. Santhekadur, P, D Kumar, e A Sanyal. “Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease.” *Journal of hepatology* , 2018: 68(2), 230–237. doi:10.1016/j.jhep.2017.10.031.
- Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J. L., García-Diz, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2018). Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. *European journal of nutrition*, 57(1), 269–278. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1316-8>

- Sesti, G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20:665–79. doi:10.1016/j.beem.2006.09.007.
- Semple, RK, A Sleight, PR Murgatroyd, CA Adams, L Bluck, e et al. “Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis.” *The Journal of Clinical Investigation*, 2009: 119(2):315-22. doi: 10.1172/JCI37432. .
- Senft, D, e Z Ronai. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences*. 40, 141–148.
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., & Fruchart, J. C. (1998). Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 98(19), 2088–2093. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.19.2088>
- Shen, H., Rodriguez, A. C., Shiani, A., Lipka, S., Shahzad, G., Kumar, A., & Mustacchia, P. (2016). Association between caffeine consumption and nonalcoholic fatty liver disease: a systemic review and meta-analysis. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 9(1), 113–120. <https://doi.org/10.1177/1756283X15593700>
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental cell*, 3(1), 99–111. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00203-4)
- Shen, H. M., & Mizushima, N. (2014). At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends in biochemical sciences*, 39(2), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.001>
- Schroder, K., Zhou, R., & Tschopp, J. (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?. *Science* (New York, N.Y.), 327(5963), 296–300. <https://doi.org/10.1126/science.1184003>
- Schulze, R. J., Drižytė, K., Casey, C. A., & McNiven, M. A. (2017). Hepatic Lipophagy: New Insights into Autophagic Catabolism of Lipid Droplets in the Liver. *Hepatology communications*, 1(5), 359–369. <https://doi.org/10.1002/hep4.1056>
- Schwimmer, J. B., Cledon, M. A., Lavine, J. E., Salem, R., Campbell, N., Schork, N. J., Shieh-morteza, M., Yokoo, T., Chavez, A., Middleton, M. S., & Sirlin, C. B. (2009).

- Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 136(5), 1585–1592.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.050>
- Shepherd, E. L., Saborano, R., Northall, E., Matsuda, K., Ogino, H., Yashiro, H., Pickens, J., Feaver, R. E., Cole, B. K., Hoang, S. A., Lawson, M. J., Olson, M., Figler, R. A., Reardon, J. E., Nishigaki, N., Wamhoff, B. R., Günther, U. L., Hirschfield, G., Erion, D. M., & Lalor, P. F. (2020). Ketohexokinase inhibition improves NASH by reducing fructose-induced steatosis and fibrogenesis. *JHEP Reports*, 3(2), 100217.
<https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100217>
- Shimoda, H., Seki, E., & Aitani, M. (2006). Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-9>
- Shibata, Y., Voeltz, G. K., & Rapoport, T. A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, 126(3), 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.019>
- Smith, B., Adams, L. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*. 7, 456–465
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.72>
- Smith, C. D., Lin, C. T., McMillin, S. L., Weyrauch, L. A., Schmidt, C. A., Smith, C. A., Kurland, I. J., Witczak, C. A., & Neuffer, P. D. (2021). Genetically increasing flux through β -oxidation in skeletal muscle increases mitochondrial reductive stress and glucose intolerance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 320(5), E938–E950. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00010.2021>
- Samsoondar, J. P., Burke, A. C., Sutherland, B. G., Telford, D. E., Sawyez, C. G., Edwards, J. Y., Pinkosky, S. L., Newton, R. S., & Huff, M. W. (2017). Prevention of Diet-Induced Metabolic Dysregulation, Inflammation, and Atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} Mice by Treatment With the ATP-Citrate Lyase Inhibitor Bempedoic Acid. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(4), 647–656.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308963>
- Sookoian, S., & Pirola, C. (2018). Systematic review with meta-analysis: the significance of histological disease severity in lean patients with nonalcoholic fatty liver disease.

Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 47:16–25.

<http://doi.org/10.1111/apt.14401>

- Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2016). Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive diseases and sciences*, 61(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>
- Shepherd, P. R., & Kahn, B. B. (1999). Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*, 341(4), 248–257. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907223410406>
- Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2009). Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 50(4), 1094–1104. <https://doi.org/10.1002/hep.23122>
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature cell biology*, 16(6), 495–501. <https://doi.org/10.1038/ncb2979>
- Stratford, S., Hoehn, K. L., Liu, F., & Summers, S. A. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *The Journal of biological chemistry*, 279(35), 36608–36615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406499200>
- Sun, Y., Liu, S., Ferguson, S., Wang, L., Klepcyk, P., Yun, J. S., & Friedman, J. E. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 277(26), 23301–23307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200964200>
- Suzuki, Y., Katagiri, H., Wang, T., Kakisaka, K., Kume, K., Nishizuka S. & Takikawa Y.(2016). Ductular reactions in the liver regeneration process with local inflammation after physical partial hepatectomy. *Lab Invest* 96, 1211–1222 (2016). <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.97>

T

- Targher, G., Day, C., Bonora, E. (2010). Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*, 363:1341–1350. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0912063>
- Takahara, M., Shimomura, I. (2014). Metabolic syndrome and lifestyle modification. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 15(4), 317-327. <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9294-8>.
- Takahashi, S., Sakai, J., Fujino, T., Hattori, H., Zenimaru, Y., Suzuki, J., Miyamori, I., & Yamamoto, T. T. (2004). The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 11(4), 200–208. <https://doi.org/10.5551/jat.11.200>
- Tamura, S., & Shimomura, I. (2005). Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1139–1142. <https://doi.org/10.1172/JCI24930>
- Tandra, S., Yeh, M. M., Brunt, E. M., Vuppalanchi, R., Cummings, O. W., Ünalp-Arida, A., Wilson, L. A., & Chalasani, N. (2011). Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 55(3), 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.021>
- Tappy, L., & Lê, K. A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological reviews*, 90(1), 23–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2009>
- Tseng, Y. H., Cypess, A. M., & Kahn, C. R. (2010). Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(6), 465–482. <https://doi.org/10.1038/nrd3138>
- Than, N. N., & Newsome, P. N. (2015). A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, 239(1), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.001>
- Thompson, P. D., Rubino, J., Janik, M. J., MacDougall, D. E., McBride, S. J., Margulies, J. R., & Newton, R. S. (2015). Use of ETC-1002 to treat hypercholesterolemia in patients with statin intolerance. *Journal of clinical lipidology*, 9(3), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.03.003>

- Thompson, P. D., MacDougall, D. E., Newton, R. S., Margulies, J. R., Hanselman, J. C., Orloff, D. G., McKenney, J. M., & Ballantyne, C. M. (2016). Treatment with ETC-1002 alone and in combination with ezetimibe lowers LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients with or without statin intolerance. *Journal of clinical lipidology*, 10(3), 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.12.025>
- Thurnhofer, S & Vetter, W (2005). A Gas Chromatography/Electron Ionization–Mass Spectrometry–Selected Ion Monitoring Method for Determining the Fatty Acid Pattern in Food after Formation of Fatty Acid Methyl Esters *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005 53 (23), 8896-8903. <https://doi.org/10.1021/jf051468u>
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 52(5), 1836–1846. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
- Tiniakos, D. G., Vos, M. B., & Brunt, E. M. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annual review of pathology*, 5, 145–171. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102132>
- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., & Kaufman, R. J. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes & development*, 14(21), 2725–2736. <https://doi.org/10.1101/gad.839400>
- Todoric, J., Di Caro, G., Reibe, S., Henstridge, D., Green, C., Vrbanac, A., Ceteci, F., Conche, C., McNulty, R., Shalpour, S., Taniguchi, K., Meikle, P., Watrous, K., Moranchel, R., Najhawan, M., Jain, M., Liu, X., Kisseleva, T., Diaz-Meco, T., et al. (2020). Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation. *Nat Metab* 2, 1034–1045. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0261-2>
- Trépo, E., Romeo, S., Zucman-Rossi, J., & Nahon, P. (2016). PNPLA3 gene in liver diseases. *Journal of hepatology*, 65(2), 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.011>
- Turban, S., & Hajduch, E. (2011). Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS letters*, 585(2), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.022>

U

- Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* (New York, N.Y.), 338(6108), 818–822. <https://doi.org/10.1126/science.1226191>
- Urano, F, X Wang, A Bertolotti, Y Zhang, e P Chung. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science.” *Science*, 287, 664–666.

V

- Van der Vusse, G. (2009). Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, Volume 24, Issue 4, 2009, Pages 300-307, ISSN 1347-4367, <https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300>.
- Van den Berghe, G., Bronfman, M., Vanneste, R., Hers, HG. (1977). The mechanism of adenosine triphosphate depletion in the liver after a load of fructose. A kinetic study of liver adenylate deaminase. *Biochem Journal*. 162:601–609.
- Vartanian, L., Schwartz, M., & Brownell, K. (2007). Effects of Soft Drink Consumption on Nutrition and Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Public Health*, 97(4): 667–675. doi: 10.2105/AJPH.2005.083782.
- Veronese, N., Notarnicola, M., Cisternino, A. M., Reddavid, R., Inguaggiato, R., Guerra, V., Rotolo, O., Zinzi, I., Leandro, G., Correale, M., Tutino, V., Misciagna, G., Osella, A. R., Bonfiglio, C., Giannelli, G., Caruso, M. G., & MICOL Group (2018). Coffee Intake and Liver Steatosis: A Population Study in a Mediterranean Area. *Nutrients*, 10(1), 89. <https://doi.org/10.3390/nu10010089>.
- Vilà, L., Roglans, N., Perna, V., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2011). Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(8), 741–751.

- Vilà, L., Rebollo, A., Adalsteisson, G. S., Alegret, M., Merlos, M., Roglans, N., & Laguna, J. C. (2011). Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats after atorvastatin treatment. *Toxicology and applied pharmacology*, 251(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.11.011>
- Vitaglione, P., Morisco, F., Mazzone, G., Amoroso, D. C., Ribocco, M. T., Romano, A., Fogliano, V., Caporaso, N., & D'Argenio, G. (2010). Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(5), 1652–1661. <https://doi.org/10.1002/hep.23902>
- Vos, M. B., & Lavine, J. E. (2013). Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(6), 2525–2531. <https://doi.org/10.1002/hep.26299>

W

- Watanabe, M., Houten, S. M., Matak, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J. W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A. C., & Auwerx, J. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 439(7075), 484–489. <https://doi.org/10.1038/nature04330>
- White, J. S., Hobbs, L. J., & Fernandez, S. (2015). Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. *International journal of obesity*, 39(1), 176–182. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.73>
- White, P. J., McGarrah, R. W., Grimsrud, P. A., Tso, S. C., Yang, W. H., Haldeman, J. M., Grenier-Larouche, T., An, J., Lapworth, A. L., Astapova, I., Hannou, S. A., George, T., Arlotto, M., Olson, L. B., Lai, M., Zhang, G. F., Ilkayeva, O., Herman, M. A., Wynn, R. M., Chuang, D. T., ... Newgard, C. B. (2018). The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid Metabolism via Regulation of ATP-Citrate Lyase. *Cell metabolism*, 27(6), 1281–1293.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.015>

- Wang, S., Chen, Z., Lam, V., Han, J., Hassler, J., Finck, B.N., et al., 2012. IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis. *Cell Metabolism* 16(4): 473–86, <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.003>
- Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., Torres, D. M., Shaw, J., Contreras, M., Landt, C. L., & Harrison, S. A. (2000). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 140:124–131. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.038>
- Wolfe, B., Ahuja, S., & Marliss, E. (1975). Effects of intravenously administered fructose and glucose on splanchnic amino acid and carbohydrate metabolism in hypertriglyceridemic men. *Journal of Clinical Investigation*, 1975;56:970–977.
- Wong, R. H., & Sul, H. S. (2010). Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Current opinion in pharmacology*, 10(6), 684–691. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.08.004>
- Wood, I., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 89(1), 3-9. <http://doi.org/doi:10.1079/BJN2002763>

X

- Xu, M., Yang, L., Zhu, Y., Liao, M., Chu, L., Li, X., Lin, L., & Zheng, G. (2019). Collaborative effects of chlorogenic acid and caffeine on lipid metabolism via the AMPK α -LXR α /SREBP-1c pathway in high-fat diet-induced obese mice. *Food & function*, 10(11), 7489–7497. <https://doi.org/10.1039/c9fo00502a>
- Xu, X., So, J. S., Park, J. G., & Lee, A. H. (2013). Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Seminars in liver disease*, 33(4), 301–311. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1358523>

Y

- Yan, H., Gao, Y. Q., Zhang, Y., Wang, H., Liu, G. S., & Lei, J. Y. (2018). Chlorogenic acid alleviates autophagy and insulin resistance by suppressing JNK pathway in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of biosciences*, 43(2), 287–294.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X. X., Pandey, S. K., Bhanot, S., Monia, B. P., Li, Y. X., & Diehl, A. M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 45(6), 1366–1374. <https://doi.org/10.1002/hep.21655>
- Ye, Q., Zou, B., Yeo, Y. H., Li, J., Huang, D. Q., Wu, Y., Yang, H., Liu, C., Kam, L. Y., Tan, X., Chien, N., Trinh, S., Henry, L., Stave, C. D., Hosaka, T., Cheung, R. C., & Nguyen, M. H. (2020). Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 5(8), 739–752. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30077-7](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30077-7)
- Ye, J. M., Iglesias, M. A., Watson, D. G., Ellis, B., Wood, L., Jensen, P. B., Sørensen, R. V., Larsen, P. J., Cooney, G. J., Wassermann, K., & Kraegen, E. W. (2003). PPARAlpha/gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 284(3), E531–E540. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00299.2002>
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881–891. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00611-0)
- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Negro, F., Hallaji, S., Younossi, Y., Lam, B., & Srishord, M. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine*, 91(6), 319–327. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3182779d49>
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 64(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

Younossi, Z., Anstee, Q., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., *et al.* (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15, 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>

Z

Zammit, V.A., 2013. Hepatic triacylglycerol synthesis and secretion: DGAT2 as the link between glycaemia and triglyceridaemia. *Biochemical Journal* 451(1): 1–12, <https://doi.org/10.1042/BJ20121689>

Zarei, M., Barroso, E., Palomer, X., Dai, J., Rada, P., Quesada-López, T., Escolà-Gil, J. C., Cedó, L., Zali, M. R., Molaei, M., Dabiri, R., Vázquez, S., Pujol, E., Valverde, Á. M., Villarroya, F., Liu, Y., Wahli, W., & Vázquez-Carrera, M. (2018). Hepatic regulation of VLDL receptor by PPAR β/δ and FGF21 modulates non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular metabolism*, 8, 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.008>

Zhang, K., Wang, S., Malhotra, J., Hassler, J. R., Back, S. H., Wang, G., Chang, L., Xu, W., Miao, H., Leonardi, R., Chen, Y. E., Jackowski, S., & Kaufman, R. J. (2011). The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *Journal of European Molecular Biology Organization*, 30(7), 1357–1375. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.52>

Zhang, J; Liu, F. (2015). Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB life*, 66(7), 485–495. <https://doi.org/10.1002/iub.1293>

Zhang, P., Kumar, A., Katz, L. S., Li, L., Paulynice, M., Herman, M. A., & Scott, D. K. (2015). Induction of the ChREBP β Isoform Is Essential for Glucose-Stimulated β -Cell Proliferation. *Diabetes*, 64(12), 4158–4170. <https://doi.org/10.2337/db15-0239>

Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I. H., Zhang, J., Maniatis, P., Pacheco, J., Piepenhagen, P., Copeland, D., Arbeeny, C., Shayman, J. A., Aerts, J. M., Jiang, C., Cheng, S. H., & Yew, N. S. (2009). Inhibiting glycosphingolipid synthesis ameliorates hepatic

steatosis in obese mice. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 50(1), 85–93.
<https://doi.org/10.1002/hep.22970>

Zhao, Y., Yang, L., Huang, Z., Lin, L., & Zheng, G. (2017). Synergistic effects of caffeine and catechins on lipid metabolism in chronically fed mice via the AMP-activated protein kinase signaling pathway. *European journal of nutrition*, 56(7), 2309–2318.
<https://doi.org/10.1007/s00394-016-1271-4>.

Zivkovic, A. M., German, J. B., & Sanyal, A. J. (2007). Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *The American journal of clinical nutrition*, 86(2), 285–300. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.2.285>

ANEXOS



Article

Effects of a Low Dose of Caffeine Alone or as Part of a Green Coffee Extract, in a Rat Dietary Model of Lean Non-Alcoholic Fatty Liver Disease without Inflammation

Ana Magdalena Velázquez ^{1,†}, Núria Roglans ^{1,2,3,†}, Roger Bentanachs ¹ , Maria Gené ¹, Aleix Sala-Vila ^{4,5} , Iolanda Lázaro ⁴ , Jose Rodríguez-Morató ^{3,4,6} , Rosa María Sánchez ^{1,2,3}, Juan Carlos Laguna ^{1,2,3,*} and Marta Alegret ^{1,2,3,*}

¹ Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Avda Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain; avelazquezpy@gmail.com (A.M.V.); roglans@ub.edu (N.R.); bentanachs96@gmail.com (R.B.); mariagene_15@hotmail.com (M.G.); rmsanchez@ub.edu (R.M.S.)

² Institute of Biomedicine, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

³ Spanish Biomedical Research Centre in Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain; jose.rodriguez@upf.edu

⁴ IMIM-Hospital del Mar Medical Research Institute, 08003 Barcelona, Spain; asala@barcelonabeta.org (A.S.-V.); iolan.lazaro@gmail.com (I.L.)

⁵ Barcelonaβeta Brain Research Center, Pasqual Maragall Foundation, 08005 Barcelona, Spain

⁶ Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), 08003 Barcelona, Spain

* Correspondence: jclagunae@ub.edu (J.C.L.); alegret@ub.edu (M.A.); Tel.: +34-93-4024531 (M.A.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 21 September 2020; Accepted: 21 October 2020; Published: 23 October 2020



Abstract: Non-alcoholic fatty liver disease is a highly prevalent condition without specific pharmacological treatment, characterized in the initial stages by hepatic steatosis. It was suggested that lipid infiltration in the liver might be reduced by caffeine through anti-inflammatory, antioxidative, and fatty acid metabolism-related mechanisms. We investigated the effects of caffeine (CAF) and green coffee extract (GCE) on hepatic lipids in lean female rats with steatosis. For three months, female Sprague-Dawley rats were fed a standard diet or a cocoa butter-based high-fat diet plus 10% liquid fructose. In the last month, the high-fat diet was supplemented or not with CAF or a GCE, providing 5 mg/kg of CAF. Plasma lipid levels and the hepatic expression of molecules involved in lipid metabolism were determined. Lipidomic analysis was performed in liver samples. The diet caused hepatic steatosis without obesity, inflammation, endoplasmic reticulum stress, or hepatic insulin resistance. Neither CAF nor GCE alleviated hepatic steatosis, but GCE-treated rats showed lower hepatic triglyceride levels compared to the CAF group. The GCE effects could be related to reductions of hepatic (i) mTOR phosphorylation, leading to higher nuclear lipin-1 levels and limiting lipogenic gene expression; (ii) diacylglycerol levels; (iii) hexosylceramide/ceramide ratios; and (iv) very-low-density lipoprotein receptor expression. In conclusion, a low dose of CAF did not reduce hepatic steatosis in lean female rats, but the same dose provided as a green coffee extract led to lower liver triglyceride levels.

Keywords: caffeine; coffee; dietary supplements; hepatic steatosis; non-alcoholic fatty liver disease

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a spectrum of alterations ranging from simple hepatic steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Hepatic steatosis, defined as the accumulation of triglycerides (TGs) in lipid droplets in at least 5% of the hepatocytes, is the initial reversible phase of NAFLD, affecting around 33% of adults in the US [1]. Although NAFLD is usually associated with obesity, this condition might also be present in individuals with a body mass index in the normal range, which is referred to as lean or non-obese NAFLD [2]. Compared to obese NAFLD, lean individuals with NAFLD are more commonly female and exhibit a lower prevalence of insulin resistance [2,3].

Consumption of sweetened beverages with a high fructose content is one of the main dietary triggers of NAFLD [4]. Despite the implementation of public policies that aim to reduce their consumption, a recent study on diet population trends showed that 42% of energy intake in US adults still comes from low-quality carbohydrates, including fruit juices and added sugars in beverages [5]. Moreover, the consumption of saturated fats, another dietary factor associated with NAFLD, still remains above the recommended maximal intake of 10% of the energy intake [5].

Given the difficulty to avoid excessive consumption of simple sugars and fats in the population, one strategy to fight NAFLD is the inclusion in the usual diet of functional foods or dietary supplements that could be effective to prevent or reduce hepatic lipid accumulation. Several meta-analysis of randomized clinical trials showed that compounds such as resveratrol, silymarin, vitamin E or D, and curcumin, exert positive effects on NAFLD, which might be attributed to their antioxidant or anti-inflammatory properties [4]. However, not all evidences showed clinical efficacy, which could be related to the different doses, formulation issues, or duration of studies [6–8]. Coffee was reported to exert beneficial effects on liver-related disorders [9], including a reduced risk of NAFLD and of liver fibrosis in NAFLD patients, as revealed by a recent meta-analysis [10]. Effects of coffee on NAFLD development were mainly ascribed to its caffeine content. Several studies indicated that caffeine reduces intrahepatic fat accumulation in mice and rats, however, these studies did not specify the dose of caffeine based on animal weight or they used a dose close to the maximal one admitted in humans after interspecies conversion [11–13]. Moreover, coffee contains more than one hundred compounds besides caffeine, and it is especially rich in polyphenols such as chlorogenic acids [14], which might also be responsible for its beneficial effects.

In the present study, we investigated the effects of a moderate dose of caffeine (5 mg/kg/day, alone or as part of a green coffee extract) in a model of hepatic steatosis without obesity and without inflammation, induced in female rats by feeding a cocoa butter-rich, high-fat diet, together with liquid fructose. Female rats were used, as non-obese steatosis is more frequent in females than in males [3]. The aims of the study were to determine whether caffeine at this low dose reversed hepatic steatosis in this model, whether there were different effects when the same dose of caffeine was administered in the form of a coffee extract, and to explore the mechanisms involved.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Female Sprague Dawley rats were purchased from Envigo (Barcelona, Spain). Animals were maintained under conditions of constant humidity (40–60%) and temperature (20–24°C), with a light/dark cycle of 12 h (2 rats/cage). Studies were conducted in accordance with the principles and procedures outlined in the guidelines established by the Bioethics Committee of the University of Barcelona (Autonomous Government of Catalonia Act 5/21 July 1995). The Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona approved all experimental procedures involving animals (approval no. 10106).

2.2. Dosage Regimen

Forty-eight female rats aged 8 weeks were randomly assigned into 4 groups ($n = 12$ in each), which received: (1) standard rodent chow (control group, CT); (2) high-fat diet, and 10% w/v fructose in the drinking water (high-fat-high-fructose group, HF-HFr); (3) high-fat diet containing caffeine (from Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA, 0.18 g/kg of diet) and 10% w/v fructose in drinking water (caffeine group, CAF); or (4) high-fat diet containing a green coffee extract providing 0.18 g of caffeine/kg of diet, and 10% w/v fructose in the drinking water (green coffee extract group, GCE). Groups 1 and 2 received their respective diets for 3 months. Groups 3 and 4 received the HF-HFr diet for 2 months, with the caffeine or green coffee extract supplied to the rats incorporated in the high-fat diet pellets during the third month of the protocol. The green coffee extract (a generous gift from Applied Food Science Inc., Austin, TX, USA) was obtained by extraction with 70:30 ethanol: water mixture, and then the extract was filtered, evaporated, and spray dried. The compositions of the control diet (2018 Teklad Global 18% protein) and the high-fat diet (Teklad Custom Diet TD.180456) are detailed in Supplementary material Table S1. Diets containing caffeine and green coffee extract were prepared by Envigo (Madison, WI, USA), by mixing the compounds with the different ingredients of the high-fat diet and pelleting. Fructose solutions were changed every two days. Throughout the treatment, solid food and liquid consumption was controlled three times a week, and body weight was recorded once a week. Based on the amount of diet consumed and the body weight of each rat, the amount of caffeine ingested in both the CAF and GCE groups was 5.0 ± 0.8 mg/kg/day. The human equivalent dose based on body surface area (K_m value for humans = 37 and for rats weighing 250 g = 7) was 0.95 mg/kg/day [15].

2.3. Open Field Test

In the last week of the treatment, an open field test (OFT) was performed to study locomotor activity in the control and treated rats. Rats were placed in the middle of a black box ($40 \times 40 \times 40$ cm), under a low illumination of 12 lux. Rats underwent habituation sessions for two consecutive days. On the third day, the distance traveled by each rat was monitored during 60 min (SMART[®] version 3.0 software, Panlab SL, Barcelona, Spain). The OFT apparatus was cleaned with 10% ethanol solution, before using it with another rat.

2.4. Oral Glucose Tolerance Test

An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in the last week of the treatment, one day after the OFT test. Rats were fasted for 6 h, and a sample of blood was collected from the tail vein (time 0). A glucose solution of 2 g/kg of body weight was then administered by oral gavage, and blood samples were collected from the tail vein at 15, 30, 60, and 120 min after glucose administration. Glucose levels were determined in all blood samples using a hand-held glucometer (Accutrend[®] Plus System, Cobas, Roche Farma, Barcelona, Spain). Plasma was obtained from blood samples collected at 0, 15, and 120 min, and insulin levels were measured using a rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.5. Sample Preparation

At the end of the treatment, rats were fasted for 2 h and blood samples were obtained from the tail vein to measure TG, cholesterol, and glucose levels, using an Accutrend[®] Plus system glucometer (Cobas, Roche Farma, Barcelona, Spain). The rats were then immediately anesthetized with ketamine/xylazine (9 mg/40 μ g per 100 g of body weight, respectively) and blood was collected into micro-tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) through cardiac puncture and centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min, at room temperature. Rats were euthanized by exsanguination, and the liver and visceral white adipose tissue (vWAT) were collected and weighed. For the histological studies, samples of the liver of each animal were fixed in buffered formalin or were embedded in OCT,

frozen quickly in liquid nitrogen, and stored at -80°C . The remaining liver tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until needed for biomolecular assays.

2.6. Plasma Analysis

Plasma samples were assayed in duplicates. Insulin and adiponectin concentrations were determined using specific ELISA kits (Millipore, Billerica, MA, USA). Alanine aminotransferase (ALT) activity was determined using an ALT/GPT enzymatic assay kit (Spinreact, Girona, Spain). Insulin sensitivity index (ISI) was calculated as $2/[\text{plasma insulin (nM)} \times \text{blood glucose } (\mu\text{M}) + 1]$.

2.7. Histological Studies

Liver samples were dehydrated and paraffin embedded using a Leica TP1020 automatic tissue processor and a Leica EG1150 H Paraffin Embedding Module (Leica Microsistemas, Barcelona, Spain). Samples were cut to 5 microns and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Lipid accumulation was analyzed in OCT-embedded liver sections stained with Oil-Red O (ORO). Images were acquired with a Leica DMSL microscope equipped with a DP72 camera (Leica Microsistemas, Barcelona, Spain) and analyzed using Image J 1.49 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The area of positive ORO staining was calculated as the positively stained area per total area. All procedures were carried out in the Animal Histopathology Laboratory at the University of Barcelona.

2.8. Liver Assays

Liver TGs were extracted as described by Qu et al. [16] and determined using a TG colorimetric assay kit (Spinreact, Girona, Spain). Total hepatic fatty acid β -oxidation was determined in rat livers, as described by Lazarow [17], using 30 μg of postnuclear supernatant.

2.8.1. Measurement of Fatty Acid Methyl Esters in Liver TGs

Fatty acid methyl esters (FAMES) from liver TGs were determined by gas chromatography/electron ionization mass spectrometry as described in the Supplementary Methods and Table S3.

2.8.2. Lipidomic Analysis in Rat Liver Homogenates

Levels of diacylglycerols [DAG], ceramides [Cer], and hexosylceramides [HexCer] in rat livers were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system, as described in Supplementary Methods and Table S4.

2.9. RNA Preparation and Analysis

Total RNA was isolated from the liver samples using Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), cDNA was synthesized by reverse transcription and specific mRNAs were assessed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), as described previously [18]. TBP (TATA-box-binding protein) was used as an internal control. The primer sequences and PCR product lengths are listed in Supplementary Material (Table S2).

2.10. Preparation of Protein Extracts

Liver samples were homogenized with a Polytron PT 1200E in lysis buffer containing proteases, phosphatases, and deacetylase inhibitors, and incubated for 1.5 h at 4°C . Samples were then centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min at 4°C , and the supernatants were collected. To obtain hepatic nuclear extracts, samples were homogenized with a homogenization buffer, kept on ice for 10 min, and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4°C . Lysis buffer was added to the obtained pellet and samples were incubated for 1.5 h at 4°C , before being centrifuged at $25,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The resulting supernatants were then collected. Protein concentrations were determined by the Bradford method [19].

2.11. Western Blot Analysis

Western blots were performed using three samples per group, each sample was pooled from two animals. A total of 20–30 µg of protein extracts were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred onto Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Billerica, MA, USA), and blocked for 1 h at room temperature, with 5% non-fat milk solution in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween-20. Membranes were then incubated with specific primary antibodies. Detection was performed using the Immobilon Western HRP substrate Peroxide Solution® (Millipore, Billerica, MA, USA). To confirm the uniformity of protein loading, blots were incubated with anti-β-actin or anti-β-tubulin antibody (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a control for total protein extracts, and with anti-TBP antibody (AbCam, Cambridge, UK) for nuclear protein extracts.

2.12. Statistical Analysis

The results are expressed as mean ± standard deviation (SD). Significant differences between the groups were established by one-way ANOVA and Šidák's post-hoc test for selected comparisons (GraphPad Software version 8, San Diego, CA, USA). When the SD of the groups was different according to Bartlett's test, the data were transformed into their logarithms and ANOVA was rerun, or the corresponding non-parametric test was applied. The OGTT curves for glucose and insulin were analyzed by two-way ANOVA. The level of statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. The HF-HFr Diet Does Not Induce Obesity or Gluconeogenic Gene Expression

As shown in Table 1, although the HF-HFr diet induced a 1.8-fold increase in total caloric intake, the final body weight and vWAT weight were not significantly modified. Only the liver weight/body weight ratio showed a significant increase in response to the HF-HFr diet. Locomotor activity (measured as the total distance travelled in the open field test) was not significantly affected by the diet or treatments.

Table 1. Zoometric parameters, blood analytes, and open field test results.

	CT (n = 12)	HF-HFr (n = 10)	CAF (n = 12)	GCE (n = 12)
Final body weight (g)	270 ± 13	271 ± 13	280 ± 10	270 ± 12
Liver weight/body weight	2.9 ± 0.2	3.5 ± 0.4**	3.8 ± 0.4***	3.6 ± 0.3***
vWAT weight/body weight	2.5 ± 0.7	3.1 ± 0.8	3.0 ± 0.6	2.9 ± 0.7
AUC consumed diet (Kcal/90 days/rat)	3884 ± 122	2728 ± 511***	2821 ± 352***	2710 ± 438***
AUC ingested liquid (Kcal/90 days/rat)	0	4098 ± 1201***	4330 ± 565***	4093 ± 750***
Total calorie intake (kcal/animal/90 days)	3884 ± 122	6827 ± 744***	7151 ± 141***	6803 ± 401***
Blood insulin (ng/mL)	1.2 ± 1.1	2.3 ± 1.0	3.3 ± 1.0	2.9 ± 1.4
Blood glucose (mg/dL)	117.2 ± 19.1	111.9 ± 12.7	120.2 ± 11.9	121.4 ± 15.3
ISI	1.1 ± 0.4	0.5 ± 0.2*	0.5 ± 0.1***	0.6 ± 0.3**
ALT (U/L)	19.9 ± 5.2	23.4 ± 5.2	19.8 ± 6.0	22.1 ± 5.8
Distance travelled in the OFT (cm)	8537 ± 1523	8429 ± 2110	8429 ± 1454	8316 ± 1985

Values are expressed as mean ± SD (n = 10–12). ALT: alanine aminotransferase; AUC: area under the curve; CAF: caffeine; CT: control; GCE: green coffee extract; HF-HFr: high-fat-high-fructose; ISI: insulin sensitivity index, calculated as $2/(\text{plasma insulin (nM)} \times \text{blood glucose (µM)} + 1)$; OFT: open field test; vWAT: visceral white adipose tissue. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control.

Basal blood glucose and insulin levels were similar across the different groups (Table 1). After a glucose challenge in the OGTT, all groups on the HF-HFr diet exhibited higher glucose levels than the CT group at the shortest time points (Figure 1A). However, no differences were observed in the integrated glucose concentration, which was calculated as the area under the curve (AUC) (Figure 1B). Both the insulin levels (Figure 1C) and the corresponding AUC (Figure 1D) were significantly increased

by the HF-HFr diet, with neither CAF nor GCE attenuating this increase. Accordingly, the ISI was significantly reduced in the HF-HFr group and none of the treatments reversed this decrease (Table 1). The mRNA levels of the insulin-responsive gluconeogenic genes phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pepck*) and glucose-6 phosphatase (*G6Pase*) decreased in the rats fed the HF-HFr diet (Figure 1E–F).

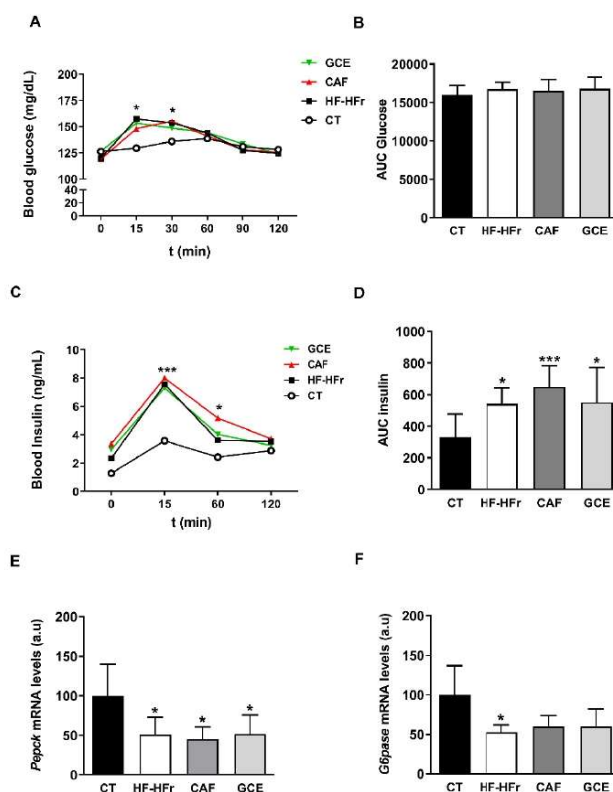


Figure 1. Blood glucose (A), area under the curve (AUC) for glucose (B), plasma insulin (C), and AUC for insulin (D) at different times after oral administration of a glucose solution (2 g/kg body weight). Results are the mean \pm SD of values from 10–12 animals/group. Bar plots representing the mean \pm SD mRNA levels corresponding to liver *Pepck* (E) and *G6Pase* (F) genes from CT ($n = 5$), HF-HFr ($n = 6$), CAF ($n = 6$) and GCE ($n = 6$) experimental groups. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. control.

3.2. GCE Exerts Different Effects Compared to CAF on Hepatic TG Amount and Composition

Blood cholesterol was unaffected by the diet or treatments, whereas blood TG levels were similarly increased in the HF-HFr, CAF, and GCE groups, compared to the control rats (Figure 2A,B).

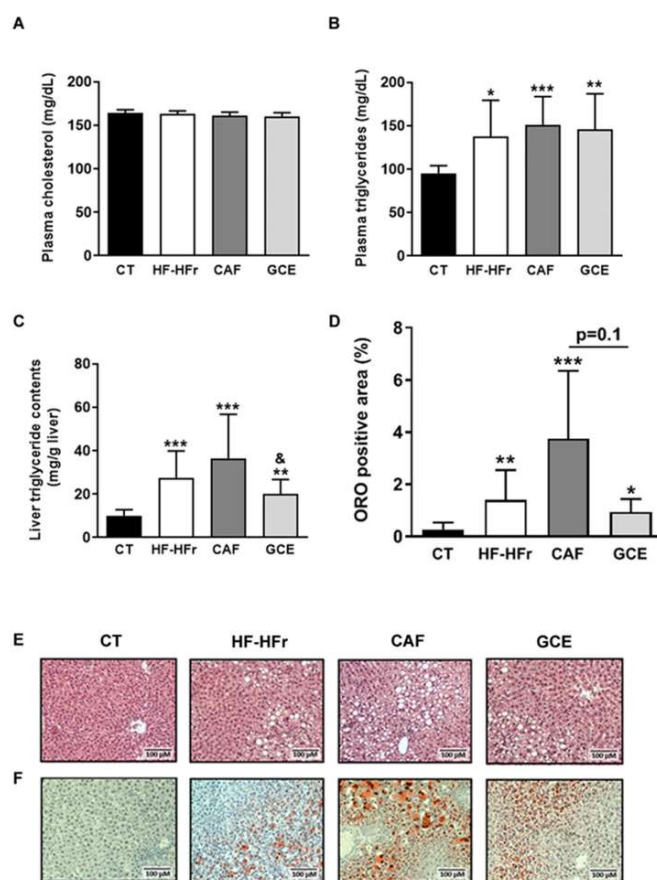


Figure 2. Blood cholesterol (A), blood triglyceride (B), and liver triglyceride (C) levels. Results are the mean \pm SD of values from 10–12 animals/group. (D) Bar plot representing the mean \pm SD percentage of area of positive Oil Red O staining calculated as positive stained area per total area section in CT, HF-HFr, CAF, and GCE experimental groups ($n = 10$ –12/group). Representative hematoxylin and eosin (E) and Oil Red O (F) stained liver sections from the four experimental groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ vs. control. & $p < 0.05$ vs. CAF group.

The hepatic TG concentration was also increased in the HF-HFr group versus the CT group, and neither CAF or GCE attenuated this increase. Interestingly, hepatic TG levels were significantly lower in the GCE group than in the CAF group (Figure 2C). The same trend was observed in the liver sections stained with H&E and ORO, although the difference between the GCE and CAF groups was only marginally significant ($p = 0.1$) (Figure 2D–F).

We also aimed to determine the fatty acid profile of the hepatic TGs. As shown in Figure 3A, the amount of SFAs [palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0)] and MUFAs [palmitoleic acid (16:1 n-7) and oleic acid (18:1 n-9)] in the hepatic TG fraction was strikingly increased by the HF-HFr diet. The addition of CAF or GCE did not significantly affect the levels of these SFAs compared to the

HF-HFr group. Interestingly, the levels of both MUFAs were lower in the GCE group than in the CAF group, although the difference was significant only for palmitoleic acid. We also analyzed the levels of a less abundant MUFA in the TG fraction, 20:1 n-9, which showed also a significant increase in response to the HF-HFr diet and a decrease in the GCE group, compared to the CAF group (Figure 3A). Regarding PUFAs 20:4 n-6, 20:5 n-3, and 22:6 n-3, all showed lower levels in the GCE group than in the HF-HFr and the CT groups. The amount of linoleic acid (18:2 n-6) was not significantly altered by the diet or treatments (Figure 3B).

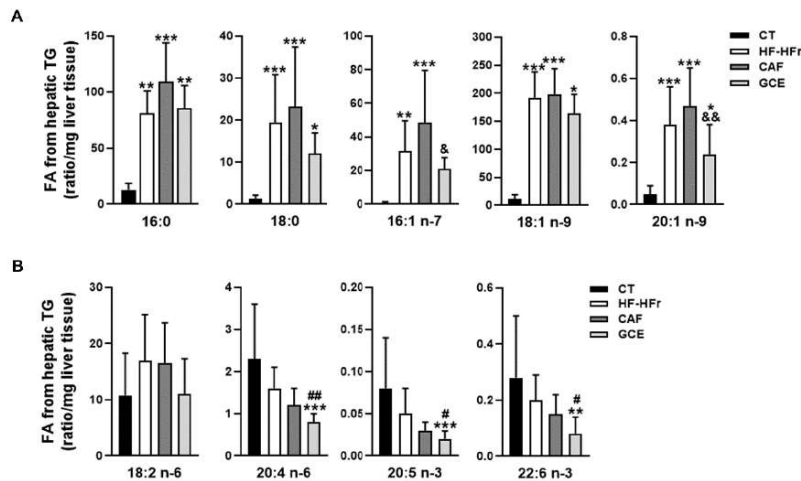


Figure 3. Fatty acid composition of hepatic triglycerides. (A) Saturated and monounsaturated fatty acids and (B) polyunsaturated fatty acids in the hepatic triglyceride fraction from CT, HF-HFr, CAF, and GCE experimental groups. Results are the mean \pm SD of values from 9–10 animals/group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ vs. HF-HFr group. & $p < 0.05$; && $p < 0.01$ vs. CAF group.

3.3. Liver Lipidomic Signatures Induced by the HF-HFr Diet and Effects of CAF and GCE

Analysis of hepatic DAGs showed a striking effect of the HF-HFr diet, which increased the amount of SFA-, and MUFA-containing DAGs (Figure 4A). The addition of GCE to the HF-HFr diet significantly attenuated the increase in DAG 18:0/18:0 whereas CAF supplementation had no effect on this species. By contrast, the HF-HFr diet did not significantly increase the levels of PUFA-containing DAG (Figure 4B) and caused a large reduction in DAG 18:2/18:2. GCE treatment reduced the amount of DAG 16:0/18:2 and DAG 18:0/20:4.

We also analyzed the effect of diet and treatments on the amount of hepatic Cer and HexCer (Figure 4C,D). The HF-HFr diet significantly reduced the levels of Cer 14:0 and Cer 16:0. By contrast, the amount of Cer 18:1 was increased by the HF-HFr diet, with CAF significantly attenuating this increase. Similarly, HexCer 18:0 and HexCer 20:0 levels were increased in the HF-HFr group, with GCE attenuating the increases. Moreover, GCE exerted specific effects on several species that were not modified by the HF-HFr diet, such as the reduction of Cer 20:0 and HexCer 16:0, 22:0, and 24:1 levels.

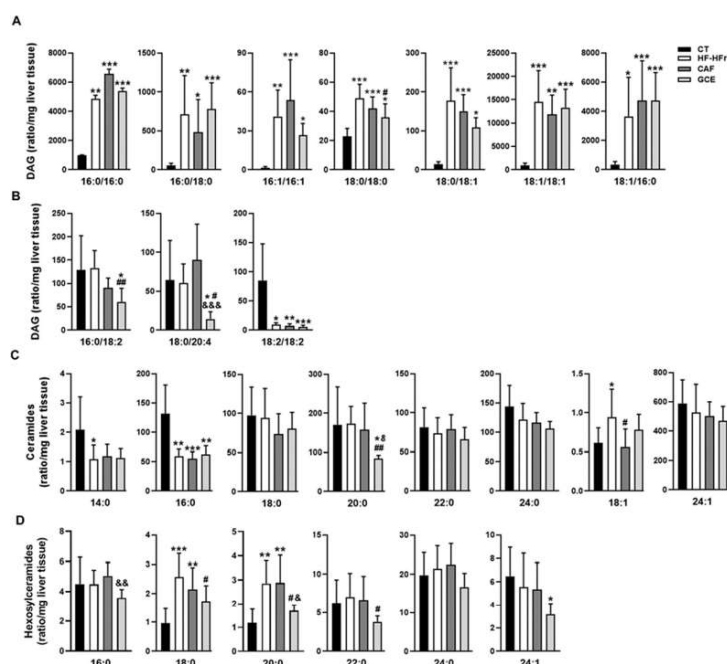


Figure 4. Lipidomic analysis in rat liver homogenates. Levels of diacylglycerols (DAG) (A,B), ceramides (Cer) (C), and hexosylceramides (HexCer) (D) in CT, HF-HFr, CAF, and GCE experimental groups. Results are the mean \pm SD of values from 9–10 animals/group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ vs. HF-HFr group. & $p < 0.05$; && $p < 0.01$; &&& $p < 0.001$ vs. CAF group.

As shown in Table 2, the ratio of HexCer 16:0, 18:0, 20:0, and 24:0 to the corresponding Cer was very low in the CT group and was increased by the HF-HFr diet. Again, we observed a differential effect of GCE, as this group showed lower HexCer/Cer ratios for 16:0 and 18:0 than the HF-HFr group, whereas CAF did not cause this effect.

Table 2. Ratio hexosylceramide/ceramide.

	CT	HF-HFr	CAF	GCE
16_0	0.038 \pm 0.017	0.076 \pm 0.009 ***	0.093 \pm 0.022 ***	0.059 \pm 0.014 *** #
18_0	0.010 \pm 0.004	0.028 \pm 0.004 ***	0.030 \pm 0.007 ***	0.021 \pm 0.003 *** # &&
20_0	0.007 \pm 0.002	0.016 \pm 0.004 ***	0.019 \pm 0.004 ***	0.019 \pm 0.003 ***
22_0	0.076 \pm 0.026	0.104 \pm 0.049	0.082 \pm 0.025	0.060 \pm 0.015
24_0	0.139 \pm 0.033	0.178 \pm 0.040 *	0.191 \pm 0.025 **	0.157 \pm 0.024

Values are expressed as mean \pm SD ($n = 9-10$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. CT. # $p < 0.05$ vs. HF-HFr; && $p < 0.01$ vs. CAF.

3.4. Effects of the Diet and Treatments on the Fatty Acid Biosynthetic Pathway

We determined the hepatic expression of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), a transcription factor that controls the expression of enzymes involved in fatty acid synthesis. Both the precursor (125 kD) and the active form of SREBP-1c (68 kD) remained unaltered in the hepatic protein

samples of all groups (Figure 5A). By contrast, the hepatic protein level of fatty acid synthase (FAS), a lipogenic enzyme controlled by this transcription factor, was increased significantly by the HF-HFr diet, with GCE partially preventing this increase (Figure 5B). The mRNA levels of another lipogenic enzyme controlled by SREBP-1c, stearoyl-CoA desaturase (*Scd1*), followed the same pattern of an increase in the HF-HFr group (Figure 5C). Interestingly, CAF increased *Scd1* expression even more than the HF-HFr diet, whereas GCE did not.

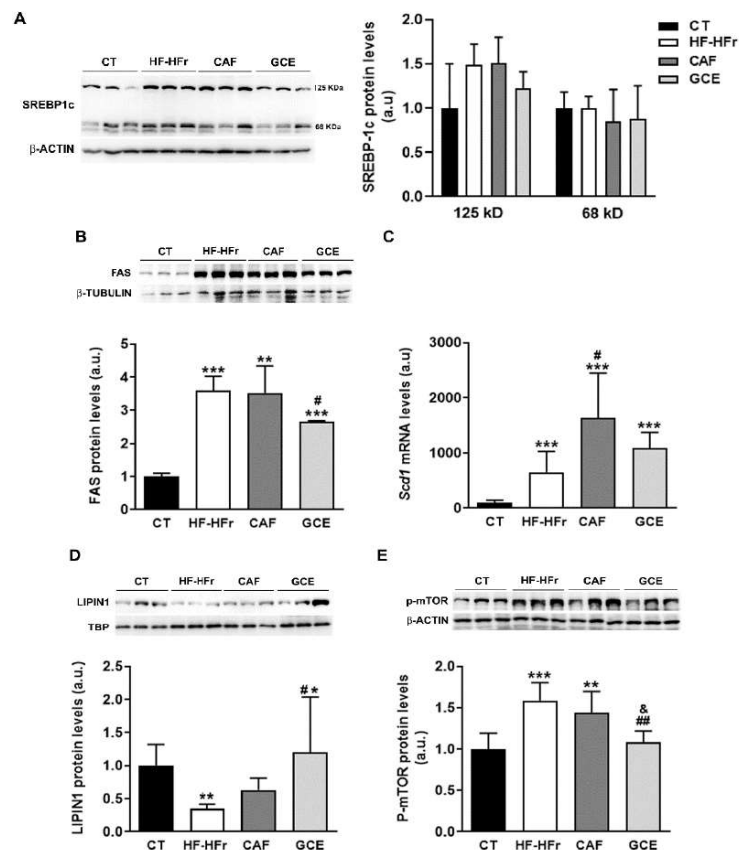


Figure 5. Western Blot of precursor (125 kD) and mature (68 kD) SREBP-1c (A) FAS: fatty acid synthase (B) lipin-1 (D) and phospho-mTOR proteins (E) in liver samples. Bar plots represent the mean ± SD band intensity of the proteins obtained from three samples per group, each one pooled from two animals. Bands are shown in the upper part of the figures. (C) Bar plot representing the mean ± SD mRNA levels corresponding to liver *Scd1* from CT (n = 5), HF-HFr (n = 6), CAF (n = 6), and GCE (n = 6) experimental groups. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. CT. # p < 0.05; ## p < 0.01 vs. HF-HFr. & p < 0.05 vs. CAF.

The observed effects of the diet on FAS and SCD1 expression suggested increased SREBP-1c transcriptional activity despite no changes in the amount of the active form of the protein. As shown in Figure 5D, the HF-HFr group showed a significant decrease in hepatic nuclear levels of lipin-1,

which could modulate the transcriptional activity of SREBP-1c. Accordingly, the expression of phosphorylated mammalian target of rapamycin (P-mTOR), which phosphorylates lipin-1 and causes its nuclear exclusion, was increased in the livers of the rats from the HF-HFr group (Figure 5E). Interestingly, GCE relieved the reduction in lipin-1 levels caused by the diet, increasing the amount of this protein in nuclear extracts above CT levels (Figure 5D). Moreover, the GCE group returned P-mTOR levels to the control values, showing a significant reduction compared to the HF-HFr and CAF groups, which was in accordance with the increase in nuclear lipin-1 levels (Figure 5E).

3.5. CAF or GCE Does Not Affect Lipid Catabolic Pathways

To explore other mechanisms potentially involved in the observed effects on hepatic TGs, we determined the β -oxidation activity in liver samples. The results showed a significant decrease in response to the HF-HFr diet, with CAF or GCE addition having no effect on this decrease (Figure 6A). The mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptor α (*Ppara*), and the PPAR α target genes acyl-CoA oxidase (*Aco*) and very-low density lipoprotein receptor (*Vldlr*) were not modified by the diet or treatments (Figure 6B–D). However, the protein levels of VLDLR despite not being increased by the HF-HFr diet were significantly lower in the CAF and GCE groups, and GCE even lowered the amount of this protein compared to the CAF group (Figure 6E).

The autophagy of lipid droplets was described as another form of lipid catabolism. As shown in Figure 6F, the ratio of the microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) B-II/I was significantly reduced in the HF-HFr group, with CAF or GCE treatment not reversing this decrease. However, neither diet nor treatments reduced the levels of the autophagy substrate p62 (Figure 6G), while beclin-1 levels showed a small but significant increase in the CAF group (Figure 6H).

3.6. Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress Markers

We also explored other cell signaling pathways that could modulate hepatic lipid levels, such as endoplasmic reticulum (ER) stress. The HF-HFr diet significantly increased inositol-requiring enzyme-1 α (IRE1 α) phosphorylation, with neither CAF nor GCE reversing this increase (Figure 7A). However, levels of the active/spliced form of X-box-binding protein 1 (XBP-1s) protein in nuclear extracts were not significantly modified by any treatment, and mRNA levels of the XBP-1s target gene ER degradation-enhancing α -mannosidase-like 1 (*Edem1*) were not altered by HF-HFr diet and showed reduced expression in the CAF group (Figure 7B,C). Levels of the precursor (90 kD) and mature form (50 kD) of activating transcription factor 6 (ATF6) and phosphorylation of protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) were not altered in any group (Figure 7D,E).

Finally, we assessed the expression of several inflammation and oxidative stress markers. The experimental diet used did not induce an inflammatory response in the liver. In fact, the mRNA expression of several inflammation-related genes was reduced, with the treatments showing negligible effect (Figure 8A). In line with these results, the plasma levels of the inflammation marker ALT were not increased by the diet or treatments (Table 1). Similarly, the HF-HFr diet did not induce hepatic oxidative stress, and even reduced glutathione peroxidase 1 (*Gpx1*) expression. The GCE group showed lower mRNA levels of superoxide dismutase 2 (*Sod2*) compared to the CAF group (Figure 8B).

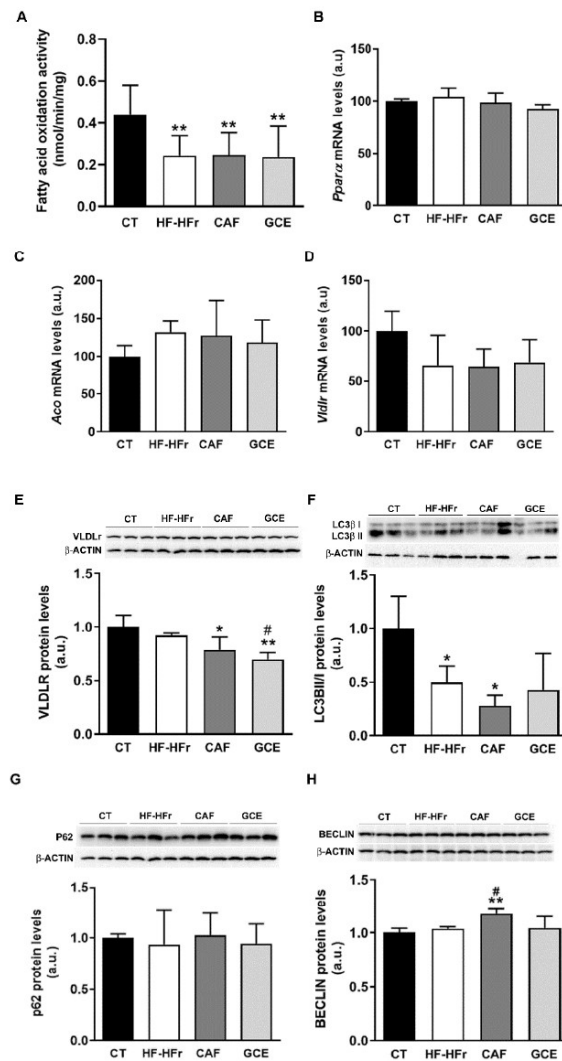


Figure 6. (A) β -oxidation activity in liver samples. Bars represent the mean \pm SD of 10–12 samples per group. Bar plots representing the mean \pm SD mRNA levels corresponding to liver *Ppara* (B), *Aco* (C), and *Vldlr* (D) genes from CT ($n = 5$), HF-HFr ($n = 6$), CAF ($n = 6$), and GCE ($n = 6$) experimental groups. Western Blot of VLDLR (E), LCII/I ratio (F), p62 (G), and beclin-1 (H) proteins, in liver samples obtained from CT, HF-HFr, CAF, and GCE experimental groups. Bar plots represent the mean \pm SD band intensity of the proteins obtained from three samples per group, each one pooled from two animals. Bands are shown in the upper part of the figures. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. CT. # $p < 0.05$ vs. HF-HFr group.

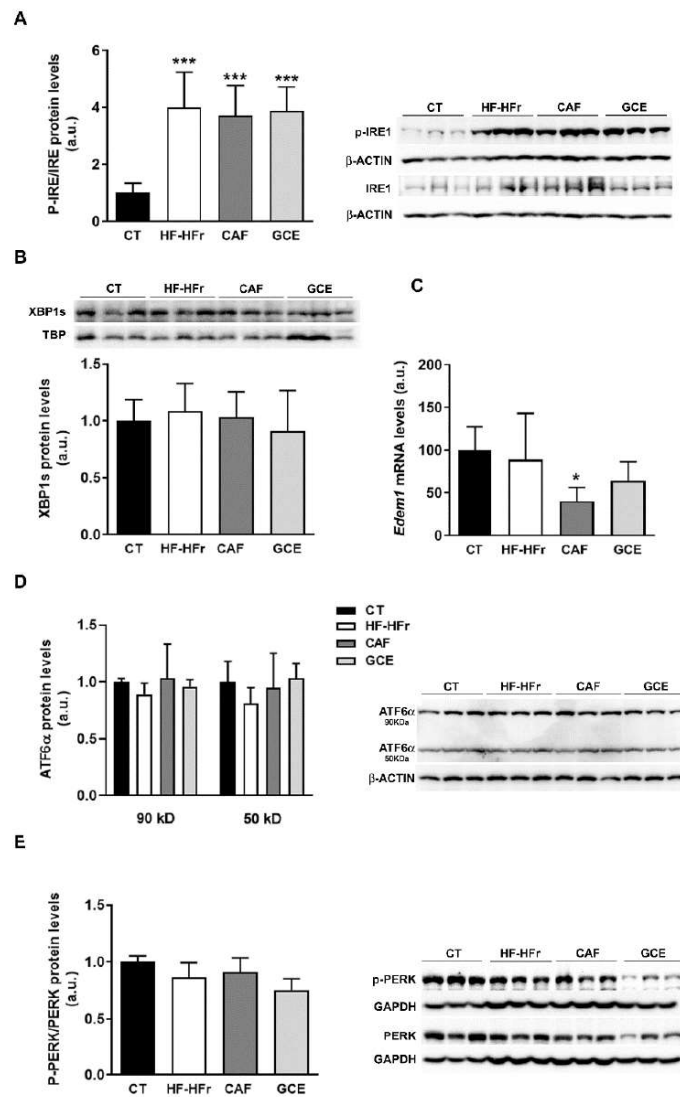


Figure 7. Western Blot of phosphorylated and total IRE1 (A), nuclear XBP1S (B), precursor (90 kD) and mature (50 kD) ATF6 (D), and phosphorylated and total PERK (E) in liver samples. Bar plots represent the mean ± SD band intensity of the proteins obtained from three samples per group, each one pooled from two animals. Bands are shown in the upper part of the figures. (C) mRNA levels of *Edem1* in the livers from CT (*n* = 5), HF-HFr (*n* = 6), CAF (*n* = 6), and GCE (*n* = 6) experimental groups. * *p* < 0.05; *** *p* < 0.001 vs. CT.

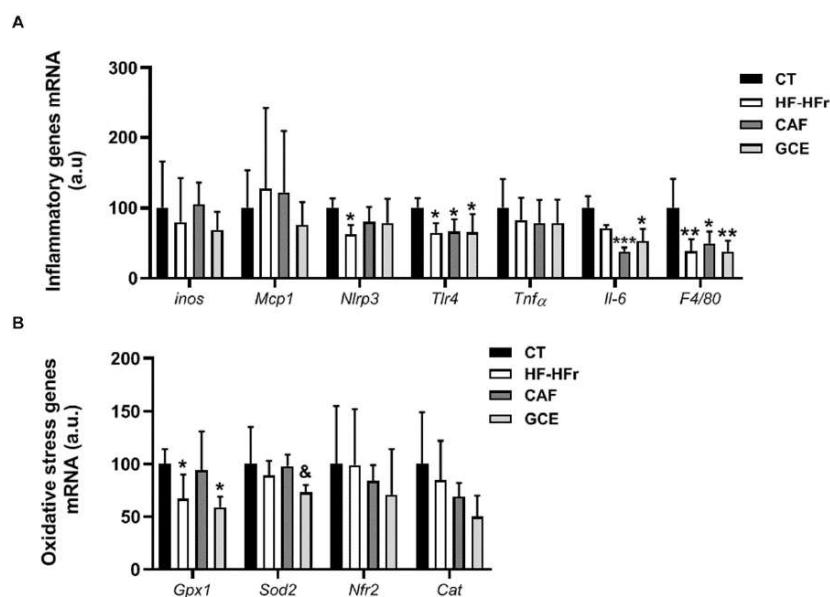


Figure 8. Bar plots showing the mean \pm SD of specific mRNAs of pro-inflammatory molecules *iNos*, *Mcp1*, *Nlrp3*, *Tlr4*, *Tnf α* , *Il-6*, and *F4/80* (A) and oxidative stress genes *Gpx1*, *Sod2*, *Nrf2*, and *Cat* (B) in the livers from CT ($n = 5$), HF-HFr ($n = 6$), CAF ($n = 6$), and GCE ($n = 6$) experimental groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control. & $p < 0.05$ vs. CAF group.

4. Discussion

Although nearly all rodent models on a high-fat diet rich in saturated fatty acids are characterized by obesity and insulin resistance [20], it is increasingly being recognized that a substantial proportion of individuals present NAFLD without obesity [2]. To obtain a model of NAFLD in its initial phase of simple hepatic steatosis, we fed female Sprague-Dawley rats a high-fat diet, which provides an exogenous source of fatty acids, and added liquid fructose (10% w/v) to their drinking water to promote de novo lipogenesis (DNL) [21]. To avoid the dietary intake of cholesterol, which is thought to activate Kupffer cells and stellate cells, and induce inflammation and fibrosis characteristic of NASH [22], we used cocoa butter instead of milk, as the source of saturated fatty acids in the high-fat diet.

Administration of the HF-HFr diet for three months caused hypertriglyceridemia and hepatic lipid deposition in the female Sprague-Dawley rats, but not inflammation, ER stress, or oxidative stress. Moreover, the rats fed the HF-HFr diet did not show an increase in body weight and adiposity, despite receiving around 1.8-times more calories than the control rats, which could not be ascribed to increased energy expenditure through spontaneous locomotor activity. Furthermore, although the rats on the HF-HFr diet responded to a glucose challenge with a higher insulin secretion, the increased insulin levels successfully controlled blood glucose levels and reduced the expression of hepatic gluconeogenic genes. This suggests that despite a decrease in the ISI, the hepatic glucose output was reduced, whereas in a typical situation of hepatic insulin resistance it would be increased [23].

The lipidomic analysis of liver samples from the rats offered some clues to explain these features of the HF-HFr diet. One of the most important bioactive lipids are ceramides, a class of sphingolipids involved in insulin resistance, inflammation, oxidative stress, and NAFLD development [24]. It was suggested that saturated fat derived from DNL or from the diet induces ceramide synthesis and insulin

resistance [25]. However, we found that the hepatic levels of most ceramide species were not increased by the diet, which could be attributed to the absence of inflammation, as liver ceramides were reported to be increased in NASH, but not in simple steatosis in humans [26]. Remarkably, mice deficient in ceramide synthase 5 (CerS5), which exhibit lower hepatic levels of Cer 16:0, were protected from developing obesity and insulin resistance when fed a high-fat diet [27]. Therefore, the 50% reduction in hepatic Cer 16:0 levels in the HF-HFr group might help explain the absence of liver insulin resistance and obesity in rats fed this diet.

Having obtained a model of lean NAFLD with simple hepatic steatosis, we aimed to determine whether a moderate dose of caffeine, or a green coffee extract providing the same dose of caffeine, was effective in reducing the liver lipid burden. One of the major sources of caffeine in the human diet is coffee, which was reported to have beneficial effects on liver health [9]. However, a positive effect of coffee on NAFLD was not clearly established in human studies. Thus, a lower prevalence of NAFLD was associated with higher coffee intake in the NHANES study [28] and in some meta-analyses [10], but this association was not confirmed in other studies [29,30]. However, studies in animal models of diet-induced steatosis showed that several components of coffee, including caffeine, might be effective in reducing liver fat deposition [31]. The different outcomes from the human and animal studies might be due to the high doses of caffeine administered to laboratory animals, which in some studies were equivalent to 6 cups of coffee a day, much higher than the usual consumption in humans [32]. To provide a more realistic scenario, we treated rats with a low dose of caffeine (5 mg/kg/day), which after conversion based on body surface area was equivalent to 66 mg of caffeine for a 70-kg human being [15]. This amount roughly corresponded to 1 cup (20–25 mL) of espresso coffee per day, which was reported to contain 2.4 to 4.5 mg/mL of caffeine [33].

We observed that neither CAF nor GCE alleviated the hypertriglyceridemia and hepatic steatosis caused by the HF-HFr diet. However, rats treated with GCE exhibited lower levels of hepatic TG than those treated with CAF. When we analyzed the fatty acid composition of these TGs, we found that the amounts of palmitoleic acid and 20:1 *n*-9 were increased by the HF-HFr diet but were lower in the GCE group than in the CAF group. Palmitoleic acid is generated from palmitic acid through SCD1, which, together with FAS, are lipogenic enzymes regulated by SREBP-1c. The HF-HFr diet, despite not affecting the SREBP-1c levels, increased mTOR phosphorylation, which is known to phosphorylate and exclude lipin-1 from the nucleus [34]. This might lead to increased SREBP-1 transcriptional activity and, consequently, to FAS and SCD1 induction. Interestingly, the livers of the HF-HFr rats showed reduced nuclear levels of lipin-1 together with increased FAS and *Scd1* expression. These changes were not reversed neither by CAF nor by GCE. In fact, the expression of *Scd1* was higher in the CAF group than in the HF-HFr group, suggesting that CAF could further increase hepatic lipogenesis and worsen hepatic lipid deposition. However, neither the amount of hepatic TG nor lipin-1 or p-mTOR protein levels were different between the CAF and HF-HFr groups. In contrast, the GCE-treated rats showed lower mTOR phosphorylation and higher nuclear levels of lipin-1 than those of the rats from the HF-HFr group, suggesting lower SREBP-1 transcriptional activity. This might explain why FAS and SCD1 expression were induced to a lesser extent by GCE than CAF, and was in accordance with the lower levels of palmitoleic acid and total TGs observed in the livers of the GCE-treated rats.

The different effects of GCE compared to CAF were also observed with several DAG species, namely 18:0/18:0, 16:0/18:2, and 18:0/20:4, whose levels were reduced by GCE treatment compared to the HF-HFr group, but not by CAF treatment. Although there is a paucity of information about the effects of specific DAG species, it is generally assumed that DAGs play a role not only in insulin resistance but also in hepatic steatosis [35]. Therefore, the reduction of at least some of the DAGs accumulated in the liver might be regarded as a positive effect of other compounds contained in the GCE, given that caffeine alone did not cause such a reduction.

The hepatic levels of HexCer, which are formed from Cer by the enzyme glucosylceramide synthase (GCS), were reduced in the GCE group, as well as the 16_0 and 18_0 HexCer/Cer ratio. The HexCer/Cer ratio was considered to be an indicator of GCS activity. Interestingly, treatment of

ob/ob mice with an inhibitor of GCS was reported to reduce TG accumulation in the liver [36]. Thus, the lower HexCer/Cer ratios observed in the GCE group might also be associated with reduced GCS activity and lower levels of liver triglycerides in this group, suggesting beneficial effects of GCE on hepatic steatosis.

To gain more insight into the mechanisms involved in the regulation of hepatic TG accumulation, we also examined several pathways linked to fatty acid catabolism. The reduced hepatic activity of β -oxidation could contribute to increased liver TG accumulation in the HF-HFr group. However, none of the treatments reversed this decrease, suggesting that reduced catabolism of fatty acids also occurred in the CAF and GCE groups. By contrast, the hepatic protein levels of VLDLR, which were reported to increase in animal models and humans with hepatic steatosis [37], were significantly reduced by GCE, compared to the CAF group, although they were not significantly modified by the HF-HFr diet. Reduced VLDLR levels could contribute, at least partly, to the lower hepatic TG accumulation observed in the GCE group.

Due to its role in lipid droplet degradation, autophagy is another mechanism that can lead to liver fat removal [38]. Our group previously showed that liquid fructose supplementation in female rats inhibit liver autophagy, as shown by the lower LC3II/I ratio, which leads to increased liver TG levels [39]. In the current study, we also observed a reduced LC3II/I ratio and TG accumulation in the livers of rats receiving the HF-HFr diet, suggesting inhibition of hepatic autophagy. CAF-treated rats showed the lowest LC3II/I ratio and the highest TG levels in the liver, which despite a slight increase in the beclin-1 protein levels indicated that CAF did not activate autophagy in our model. Other studies suggest that CAF induced autophagy in the liver [11], but they used higher doses of CAF (30 mg/kg/day compared to 5 mg/kg/day in our study).

In conclusion, a moderate dose of caffeine, equivalent to 1 cup of coffee a day in humans, did not alleviate liver lipid deposition in a model of diet-induced hepatic steatosis, without obesity and inflammation. One limitation of our study was that we did not treat rats fed a control diet, so we cannot rule out that caffeine could have exerted some effects in rats not exposed to HF-HFr. However, our goal was to investigate whether caffeine could reverse the hepatic steatosis induced by the HF-HFr diet. The lack of effect of caffeine in our study could be attributed to the duration of treatment, to the fact that treatment was initiated two months after the introduction of the HF-HFr diet or to the low dose used. However, when the same dose of caffeine was administered through a coffee extract, despite not normalizing the hepatic TG levels, these were lower than when the caffeine was administered alone. The coffee extract was rich in other compounds such as polyphenols, which might be responsible for the different effects observed. Vitaglione et al. showed that decaffeinated coffee reduced lipid droplet accumulation in hepatocytes, in a model of NASH, suggesting that caffeine was not essential for the anti-steatotic effect of coffee [40]. However, few studies compared the effects of caffeine with other coffee compounds on hepatic steatosis. A study conducted in mice concluded that only treatment with chlorogenic acid significantly reduced hepatic TG levels, whereas administration of pure caffeine did not [41]. Similarly, female mice treated with catechines or with catechines combined with caffeine, reduced liver TG levels, whereas caffeine alone did not [42]. In mice fed an HFD, administration of chlorogenic acid or caffeine alone did not reduce hepatic TG, but a combination of both compounds was effective [43]. Although the molecular mechanisms involved are not clearly established, this study suggest a synergistic effect on several pathways controlling fatty acid metabolism, including SREBP1c and lipogenic enzymes, such as SCD1 and FAS. Along the same lines, our results suggest that GCE components, either independently or in combination with CAF, might lead to: (i) less lipogenesis due to lower mTOR phosphorylation and higher nuclear levels of lipin-1, affecting FAS and SCD1 expression; (ii) a reduced amount of several DAG species; (iii) a lower HexCer/Cer ratio, which is a marker of GCS activity; and (iv) reduced expression of hepatic VLDLR. Although these changes are subtle, their combination might contribute to the different effects of the extract when compared to caffeine alone.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/12/11/3240/s1>, Supplemental Methods: Measurement of fatty acid methyl esters in liver TGs, Lipidomic analysis in rat liver homogenates. Table S1: Composition of the diets used in the study. Table S2: Primers used for RT-PCR. Table S3: GC-MS parameters for detection of fatty acid methyl esters using single ion monitoring. Table S4: Retention times and transitions for detection of lipids using LC-MS/MS.

Author Contributions: A.M.V. and N.R. were in charge of all experiments and prepared the figures; R.B. and M.G. contributed to the PCR/Western blot experiments; A.S.-V. and I.L. performed FAME analysis; J.R.-M. Performed lipidomic analysis; R.M.S. helped in data interpretation and reviewed the manuscript; J.C.L. and M.A. designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (SAF2017-82369-R), Generalitat de Catalunya (2017 SGR 38), and European Commission FEDER funds. A.M.V. is a predoctoral fellow, BECAL grant program BCAL04-327, from the Government of Paraguay. A.S.-V. is recipient of the Instituto de Salud Carlos III Miguel Servet fellowship (grant CP II 17/00029).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Than, N.N.; Newsome, P.N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* **2015**, *239*, 192–202. [CrossRef] [PubMed]
2. Ye, Q.; Zou, B.; Yeo, Y.H.; Li, J.; Huang, D.Q.; Wu, Y.; Yang, H.; Liu, C.; Kam, L.Y.; Tan, X.X.E.; et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *1253*, 1–14. [CrossRef]
3. Younossi, Z.M.; Stepanova, M.; Negro, F.; Hallaji, S.; Younossi, Y.; Lam, B.; Srishord, M. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine* **2012**, *91*, 319–327. [CrossRef]
4. Cicero, A.F.G.; Colletti, A.; Bellentani, S. Nutraceutical approach to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): The available clinical evidence. *Nutrients* **2018**, *10*, 1153. [CrossRef]
5. Shan, Z.; Rehm, C.D.; Rogers, G.; Ruan, M.; Wang, D.D.; Hu, F.B.; Mozaffarian, D.; Zhang, F.F.; Bhupathiraju, S.N. Trends in dietary carbohydrate, protein, and fat intake and diet quality among US adults, 1999–2016. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2019**, *322*, 1178–1187. [CrossRef]
6. Jafarirad, S.; Mansoori, A.; Adineh, A.; Panahi, Y.; Hadi, A.; Goodarzi, R. Does Turmeric/curcumin Supplementation Change Anthropometric Indices in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease? A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin. Nutr. Res.* **2019**, *8*, 196–208. [CrossRef]
7. Jalali, M.; Mahmoodi, M.; Mosallanezhad, Z.; Jalali, R.; Imanieh, M.H.; Moosavian, S.P. The effects of curcumin supplementation on liver function, metabolic profile and body composition in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement. Ther. Med.* **2020**, *48*, 102283. [CrossRef]
8. Baziar, N.; Parohan, M. The effects of curcumin supplementation on body mass index, body weight, and waist circumference in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother. Res.* **2020**, *34*, 464–474. [CrossRef]
9. Poole, R.; Kennedy, O.J.; Roderick, P.; Fallowfield, J.A.; Hayes, P.C.; Parkes, J. Coffee consumption and health: Umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ* **2017**, *359*, j5024. [CrossRef]
10. Hayat, U.; Siddiqui, A.A.; Okut, H.; Afroz, S.; Tasleem, S.; Haris, A. The effect of coffee consumption on the non-alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis: A meta-analysis of 11 epidemiological studies. *Ann. Hepatol.* **2020**. [CrossRef]
11. Sinha, R.A.; Farah, B.L.; Singh, B.K.; Siddique, M.M.; Li, Y.; Wu, Y.; Ilkayeva, O.R.; Gooding, J.; Ching, J.; Zhou, J.; et al. Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology* **2014**, *59*, 1366–1380. [CrossRef] [PubMed]
12. Helal, M.G.; Ayoub, S.E.; Elkashefand, W.F.; Ibrahim, T.M. Caffeine affects HFD-induced hepatic steatosis by multifactorial intervention. *Hum. Exp. Toxicol.* **2018**, *37*, 983–990. [CrossRef] [PubMed]
13. Fang, C.; Cai, X.; Hayashi, S.; Hao, S.; Sakiyama, H.; Wang, X.; Yang, Q.; Akira, S.; Nishiguchi, S.; Fujiwara, N.; et al. Caffeine-stimulated muscle IL-6 mediates alleviation of non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Biol. Lipids* **2019**, *1864*, 271–280. [CrossRef] [PubMed]

14. Gressner, O.A. Less Smad2 is good for you! A scientific update on coffee's liver benefits. *Hepatology* **2009**, *50*, 970–978. [[CrossRef](#)]
15. Nair, A.; Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* **2016**, *7*, 27. [[CrossRef](#)]
16. Qu, S.; Su, D.; Altomonte, J.; Kamagate, A.; He, J.; Perdomo, G.; Tse, T.; Jiang, Y.; Dong, H.H. PPAR{alpha} mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *292*, E421–E434. [[CrossRef](#)]
17. Lazarow, P.B. Assay of peroxisomal β -oxidation of fatty acids. *Methods Enzymol.* **1981**, *72*, 315–319.
18. Sangüesa, G.; Roglans, N.; Montañés, J.C.; Baena, M.; Velázquez, A.M.; Sánchez, R.M.; Alegret, M.; Laguna, J.C. Chronic Liquid Fructose, but not Glucose, Supplementation Selectively Induces Visceral Adipose Tissue Leptin Resistance and Hypertrophy in Female Sprague-Dawley Rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1800777. [[CrossRef](#)]
19. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
20. Small, L.; Brandon, A.E.; Turner, N.; Cooney, G.J. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: What have high-fat and high-calorie diets revealed? *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2018**, *314*, E251–E265. [[CrossRef](#)]
21. Rebollo, A.; Roglans, N.; Alegret, M.; Laguna, J.C.C. Way back for fructose and liver metabolism: Bench side to molecular insights. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 6552–6559. [[CrossRef](#)]
22. Arguello, G.; Balboa, E.; Arrese, M.; Zanlungo, S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Basis Dis.* **2015**, *1852*, 1765–1778. [[CrossRef](#)]
23. Biddinger, S.B.; Kahn, C.R. From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 123–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kasumov, T.; Li, L.; Li, M.; Gulshan, K.; Kirwan, J.P.; Liu, X.; Previs, S.; Willard, B.; Smith, J.D.; McCullough, A. Ceramide as a mediator of non-alcoholic fatty liver disease and associated atherosclerosis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–26. [[CrossRef](#)]
25. Chavez, J.A.; Summers, S.A. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 585–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Apostolopoulou, M.; Gordillo, R.; Koliaki, C.; Gancheva, S.; Jelenik, T.; De Filippo, E.; Herder, C.; Markgraf, D.; Jankowiak, F.; Esposito, I.; et al. Specific hepatic sphingolipids relate to insulin resistance, oxidative stress, and inflammation in nonalcoholic steato hepatitis. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 1235–1243. [[CrossRef](#)]
27. Gosejacob, D.; Jäger, P.S.; Dorp, K.V.; Frejno, M.; Carstensen, A.C.; Köhnke, M.; Degen, J.; Dörmann, P.; Hoch, M. Ceramide synthase 5 is essential to maintain C16:0-Ceramide pools and contributes to the development of diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 6989–7003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Biredinc, A.; Stepanova, M.; Pawloski, L.; Younossi, Z.M. Caffeine is protective in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *35*, 76–82. [[CrossRef](#)]
29. Veronese, N.; Notarnicola, M.; Cisternino, A.M.; Reddavid, R.; Inguaggiato, R.; Guerra, V.; Rotolo, O.; Zinzi, I.; Leandro, G.; Correale, M.; et al. Coffee intake and liver steatosis: A population study in a mediterranean area. *Nutrients* **2018**, *10*, 89. [[CrossRef](#)]
30. Shen, H.; Rodriguez, A.C.; Shiani, A.; Lipka, S.; Shahzad, G.; Mustacchia, P.; Kumar, A. Association between caffeine consumption and nonalcoholic fatty liver disease: A systemic review and meta-analysis. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2016**, *9*, 113–120. [[CrossRef](#)]
31. Alferink, L.J.M.; Kieft-De Jong, J.C.; Darwish Murad, S. Potential Mechanisms Underlying the Role of Coffee in Liver Health. *Semin. Liver Dis.* **2018**, *38*, 193–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chen, S.; Teoh, N.C.; Chitturi, S.; Farrell, G.C. Coffee and non-alcoholic fatty liver disease: Brewing evidence for hepatoprotection? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *29*, 435–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Angeloni, G.; Guerrini, L.; Masella, P.; Bellumori, M.; Daluiso, S.; Parenti, A.; Innocenti, M. What kind of coffee do you drink? An investigation on effects of eight different extraction methods. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 1327–1335. [[CrossRef](#)]
34. Peterson, T.R.; Sengupta, S.S.; Harris, T.E.; Carmack, A.E.; Kang, S.A.; Balderas, E.; Guertin, D.A.; Madden, K.L.; Carpenter, A.E.; Finck, B.N.; et al. MTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the srebp pathway. *Cell* **2011**, *146*, 408–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Gorden, D.L.; Ivanova, P.T.; Myers, D.S.; McIntyre, J.O.; VanSaun, M.N.; Wright, J.K.; Matrisian, L.M.; Brown, H.A. Increased diacylglycerols characterize hepatic lipid changes in progression of human nonalcoholic fatty liver disease; comparison to a murine model. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22775. [[CrossRef](#)]
36. Zhao, H.; Przybylska, M.; Wu, I.H.; Zhang, J.; Maniatis, P.; Pacheco, J.; Piepenhagen, P.; Copeland, D.; Arbeeny, C.; Shayman, J.A.; et al. Inhibiting glycosphingolipid synthesis ameliorates hepatic steatosis in obese mice. *Hepatology* **2009**, *50*, 85–93. [[CrossRef](#)]
37. Zarei, M.; Barroso, E.; Palomer, X.; Dai, J.; Rada, P.; Quesada-López, T.; Escolà-Gil, J.C.; Cedó, L.; Zali, M.R.; Molaie, M.; et al. Hepatic regulation of VLDL receptor by PPAR β/δ and FGF21 modulates non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Metab.* **2018**, *8*, 117–131. [[CrossRef](#)]
38. Schulze, R.J.; Drižytė, K.; Casey, C.A.; McNiven, M.A. Hepatic lipophagy: New insights into autophagic catabolism of lipid droplets in the liver. *Hepatol. Commun.* **2017**, *1*, 359–369. [[CrossRef](#)]
39. Baena, M.; Sanguesa, G.; Hutter, N.; Sanchez, R.M.; Roglans, N.; Laguna, J.C.; Alegret, M. Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 107–116. [[CrossRef](#)]
40. Vitaglione, P.; Morisco, F.; Mazzone, G.; Amoruso, D.C.; Ribocco, M.T.; Romano, A.; Fogliano, V.; Caporaso, N.; D'Argenio, G. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: The underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology* **2010**, *52*, 1652–1661. [[CrossRef](#)]
41. Shimoda, H.; Seki, E.; Aitani, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **2006**, *6*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhao, Y.; Yang, L.; Huang, Z.; Lin, L.; Zheng, G. Synergistic effects of caffeine and catechins on lipid metabolism in chronically fed mice via the AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 2309–2318. [[CrossRef](#)]
43. Xu, M.; Yang, L.; Zhu, Y.; Liao, M.; Chu, L.; Li, X.; Lin, L.; Zheng, G. Collaborative effects of chlorogenic acid and caffeine on lipid metabolism via the AMPK α -LXR α /SREBP-1c pathway in high-fat diet-induced obese mice. *Food Funct.* **2019**, *10*, 7489–7497. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).