



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PARTICIPACIÓN DE GENES DE LA BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL EN  
LA PROGRESIÓN DE ESTEATOSIS A ESTEATOHEPATITIS NO  
ALCOHÓLICA EN SUJETOS CON OBESIDAD MÓRBIDA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGICO**

**PRESENTA:**

**ANTONIO SANJUAN SANTOS**



**MÉXICO, CD. MX.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Marisol López López**

**VOCAL:**               **Profesor: Ignacio Camacho Arroyo**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Hugo Antonio Hernández Pérez**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: Guillermo Celestino Cardoso Saldaña**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Miguel Ángel Peña Ortiz**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE GENÓMICA DE POBLACIONES  
APLICADAS A LA SALUD, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM-INMEGEN**

**ESTE TRABAJO CONTÓ CON EL APOYO DEL FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y  
SEGURIDAD SOCIAL SS/IMSS/ISSTE-CONACYT DEL PROYECTO CON NÚMERO DE REGISTRO  
SALUD-12-01-182801-01-074.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**(Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez y firma)**

### **SUSTENTANTE:**

**(Antonio Sanjuan Santos y firma )**

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	
A. Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico	
a. Definición	9
b. Epidemiología	10
c. Etiología	11
d. Histopatología	13
e. Fisiopatología	16
i. Teoría de dos agresiones	18
ii. Teoría de agresiones múltiples	18
iii. Hipótesis de lipotoxicidad	18
B. Colesterol	19
a. Homeostasis del colesterol	20
i. Biosíntesis del colesterol	22
3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVO	26
5. METODOLOGÍA	
A. Selección de pacientes y criterios	27
B. Determinaciones antropométricas y bioquímicas	27
C. Histología	28
D. Medición de colesterol y triglicéridos hepáticos	28
E. Extracción de RNA	29
F. PCR Tiempo Real	29
G. Extracción de proteínas	30
H. Análisis de proteínas por la técnica de Western Blot	30
I. Análisis estadístico	30

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
A. Características de los sujetos de estudio	31
B. En la EHGNA, genes de la biosíntesis del colesterol muestran tendencia a sobreexpresarse	33
C. Correlación entre la expresión genes de la biosíntesis del colesterol y parámetros bioquímicos y antropométricos	37
D. Proteínas de la biosíntesis del colesterol	39
E. Correlación entre la cantidad de proteína de los genes de la biosíntesis del colesterol y sus características	41
7. CONCLUSIONES	42
8. Material complementario Tabla	
Anexo1. Características clínicas y bioquímicas de la población de estudio con dos grupos	43
9. REFERENCIAS	44

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

AGL: Ácidos Grasos Libres

AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados

AGS: Ácidos Grasos Saturados

ApoC3: Apolipoproteína C3

ATGL: Lipasa de Acil Triglicéridos

B-ACT: Beta actina

ChREBP: Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a los Carbohidratos

EHGNA: Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico

EHNA: Esteatohepatitis No Alcohólica

FXR: Receptor X farnesoide

HMGCR: 3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A reductasa

HPRT: Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1

IR: Resistencia a la Insulina

LDLR: Receptor de lipoproteína de baja densidad

LXR: Receptor X del hígado

MTTP: Proteína de Transferencia de triglicéridos microsomales

nFκB: Factor Nuclear Kappa B

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PNPLA3: Fosfolipasa parecida a la papatina que tiene dominio de la proteína 3

RT-PCR: PCR en Tiempo Real

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

SNPs: Polimorfismos de un Solo Nucleótido

SREBP: Proteína Unida al Elemento Regulador de Esteroles

TG: Triglicéridos

TAV: Tejido Adiposo Visceral

TGF-β: Factor de crecimiento transformante

TNFα: Factor de Necrosis Tumoral Alfa

VLDL: Lipoproteínas de Muy Baja Densidad

## 1. INTRODUCCIÓN

El hígado graso no alcohólico (EHGNA) se caracteriza por un exceso de grasa hepática mayor al 5% del peso del hígado y representa la enfermedad hepática crónica más común en el mundo (Browning et al. 2004).

El diagnóstico de certeza de EHGNA sigue siendo la biopsia hepática, a través de la cual se observa un espectro amplio de alteraciones histológicas que van desde la acumulación de grasa (esteatosis) hasta un proceso inflamatorio (esteatohepatitis), el cual puede progresar a fibrosis, cirrosis y, en algunos casos, a carcinoma hepatocelular (Kleiner et al. 2005).

La incidencia de esteatosis y su progresión a esteatohepatitis varía entre distintos grupos étnicos, siendo la población latina (principalmente México-americana) la que presenta la mayor prevalencia de esteatosis (58% vs. 44% en caucásicos) así como la progresión a esteatohepatitis (19% vs. 9% en caucásicos) (Williams et al. 2011).

Day et al. (1998) propusieron la hipótesis de “dos agresiones” en la cual el establecimiento de la esteatosis hepática es debido a la acumulación de ácidos grasos y triglicéridos como consecuencia del incremento en la captación y/o síntesis de ácidos grasos, así como la disminución de la beta oxidación de los mismos. La progresión de esteatosis a esteatohepatitis se establece a través de una segunda agresión, la cual parte de un hígado esteatótico más vulnerable al daño hepatocelular e inflamación (Day and James 1998).

Sin embargo, aun cuando esta hipótesis es ampliamente aceptada estudios recientes sugieren que la progresión de esteatosis a esteatohepatitis ocurre en un proceso continuo, en donde los lípidos con capacidad tóxica y pro-inflamatoria (hipótesis de lipotoxicidad) como el colesterol serían clave para la progresión de esteatosis a esteatohepatitis (Neuschwander-Tetri 2010).

Diversos estudios muestran un aumento en la acumulación del colesterol hepático en sujetos con esteatohepatitis no alcohólica (Caballero et al. 2009; Puri et al. 2007). Éste incremento se debe en gran parte a una síntesis elevada o a una mayor captación del mismo (Min et al. 2012).

Por lo anterior este trabajo plantea evaluar la expresión hepática de algunos genes implicados en la biosíntesis del colesterol en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis no alcohólica, en sujetos mexicanos con obesidad mórbida.

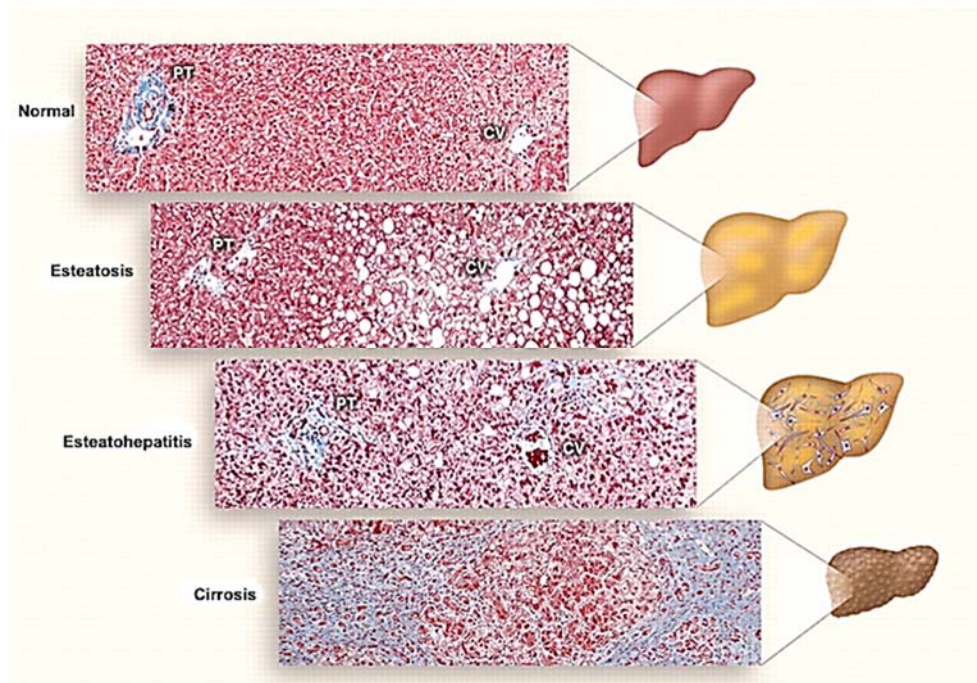


## 2. ANTECEDENTES

### A. ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

#### a. DEFINICIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) comprende un conjunto de alteraciones histológicas que van desde la esteatosis hasta la esteatohepatitis (EHNA). Ésta si presenta fibrosis puede progresar a cirrosis y sus complicaciones, incluyendo carcinoma hepatocelular **Fig 1** (Tiniakos, Vos, and Brunt 2010).



**Figura 1.** Representación esquemática de la progresión de la EHGNA. En comparación con un hígado normal, la esteatosis se caracteriza por la acumulación de grasa en forma de gotas. La esteatohepatitis no alcohólica por su parte no solo puede presentar esteatosis, sino también muerte celular y la acumulación de infiltrados de células inflamatorias. La fibrosis puede presentarse durante la evolución de la enfermedad evidenciándose con la tinción tricrómica de Masson. Está puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Modificado de (Cohen et al., 2011).

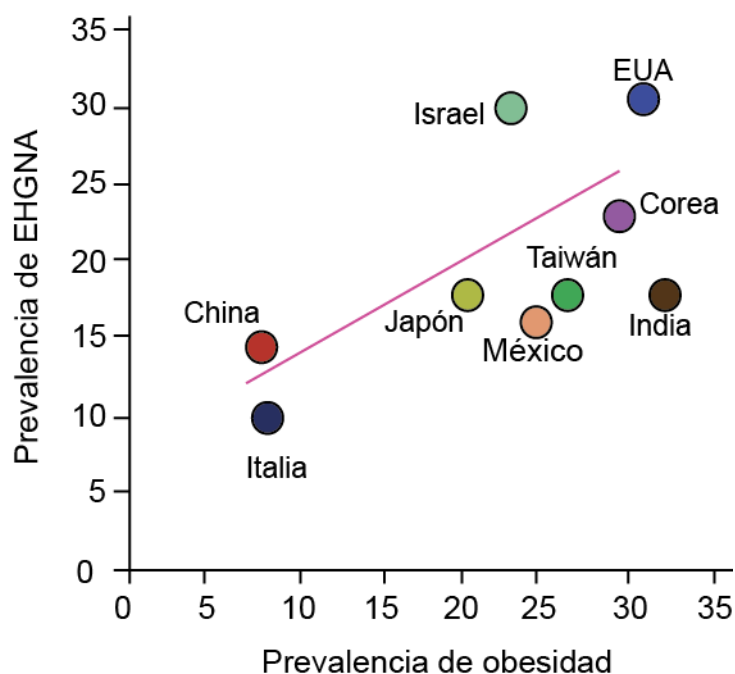
La esteatosis se caracteriza por un exceso de grasa hepática mayor al 5% del peso del hígado, esta grasa está constituida en mayor parte por triglicéridos (TG) (Puri et al. 2007).

La esteatohepatitis (EHNA) se caracteriza por un proceso inflamatorio que está acompañado por la acumulación de grasa y daño hepatocelular (balonamiento del hepatocito y muerte celular) (Cohen, Horton, and Hobbs 2011).

## b. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la EHGNA ha aumentado de forma acelerada en los últimos veinte años en paralelo con la obesidad **Fig 2**. La EHGNA es la condición hepática crónica más común en el mundo (Browning et al. 2004) y se ha estimado que para 2020 lo siga siendo (Lazo and Clark 2008; Levene and Goldin 2012; Lazo et al. 2013).

Existe una influencia étnica en la prevalencia de la EHGNA variando desde un 45% entre los hispanos, 25% asiáticos (Nomura et al. 1988), 24% en afroamericanos y 33% en los caucásicos (Browning et al. 2004).



**Figura 2.** Prevalencia de EHGNA contra prevalencia de obesidad en varios países, México se encuentra cerca de la media a nivel mundial siendo superado por países como Corea, Israel, India, Taiwán y Japón. Modificado de (Loomba and Sanyal 2013).

La frecuencia en los caucásicos americanos, suele ser casi el doble entre varones que en mujeres 42% y 24% respectivamente; y puede incrementarse en el estado posmenopáusico (Carulli et al. 2006).

El predominio de la EHGNA aumenta de forma paralela a la edad: menos del 20% en individuos por debajo de los 20 años y más del 40% en aquellos por arriba de los 60 años. No obstante, también se ha descrito la EHGNA en población infantil con una prevalencia del 2,6%, pero que puede ascender hasta un 80% en niños obesos (Papandreou, Rousso, and Mavromichalis 2007).

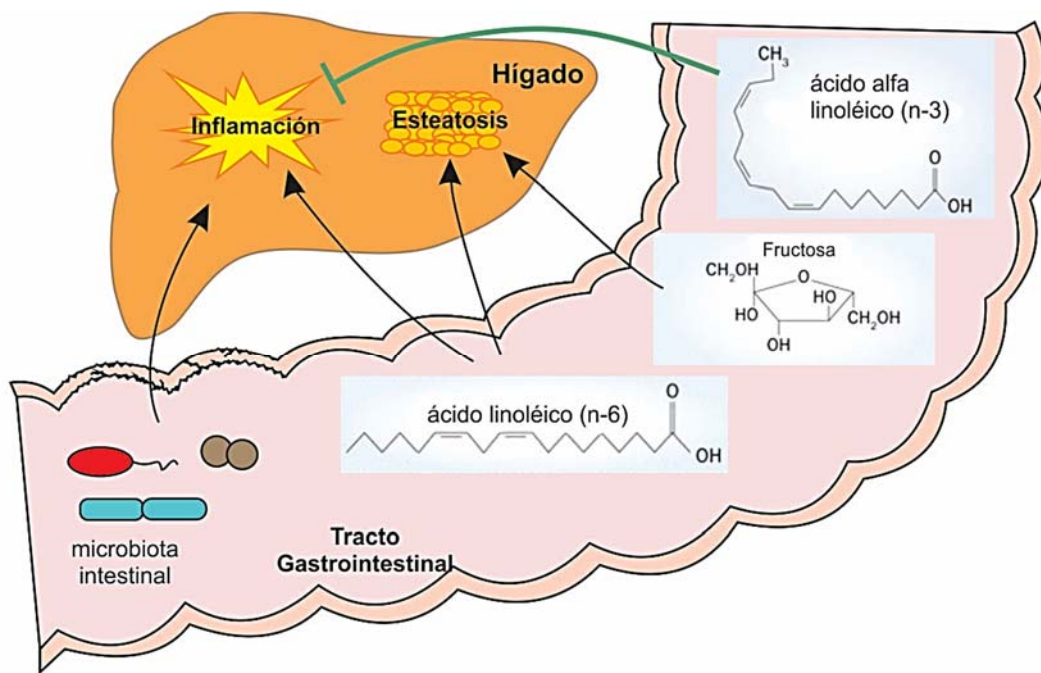
La EHGNA es más prevalente en pacientes que padecen de forma paralela diabetes mellitus tipo 2 (40–75%), u obesidad (33–76%) (Lazo and Clark 2008), se ha estimado una prevalencia de EHGNA en el 76% de las personas con sobrepeso (Bellentani and Marino 2009); mientras que en los pacientes con obesidad mórbida, la prevalencia es mucho mayor alcanzando casi el 100% (De Ridder et al. 2007). Se ha considerado a la EHGNA como la manifestación hepática del síndrome metabólico (Moore 2010).

De manera interesante, se ha observado que los perfiles de expresión génica asociados a la EHGNA son diferentes y específicos de acuerdo al origen étnico de la población de estudio, lo que podría explicar al menos en parte, las diferencias en la prevalencia y progresión de la enfermedad en los distintos grupos étnicos (Stepanova et al. 2010).

### c. ETIOLOGÍA

La genética del huésped y el factor ambiental no logran explicar completamente la causa de la EHGNA. Entre los factores ambientales se encuentra el consumo en exceso de grasa y carbohidratos que da como resultado el aumento de peso, así como la obesidad y factores de riesgo bien establecidos para el desarrollo de EHGNA. Las investigaciones sugieren que la composición de la dieta, en particular los tipos de lípidos y carbohidratos como la fructosa (Abdelmalek et al. 2010), también tienen un papel importante en la progresión de EHGNA y fibrosis (Lazic et al. 2014; Musso et al. 2003; Toshimitsu et al. 2007; Wree et al. 2013).

En los últimos años se le ha dado mayor importancia a la microbiota intestinal porque se ha visto que la alteración de ésta, es un reflejo de la dieta. La microbiota actúa como facilitador de la permeabilidad intestinal y del paso de endotoxinas hacia el hígado **Fig 3** (Miele et al. 2009).



**Figura 3.** La dieta y la microbiota intestinal, se han relacionado con la progresión de la EHGNA. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) como el ácido alfa-linoleico (n-3) tiene efectos anti-inflamatorios, mientras que el ácido linoleico (n-6) sirven para generar precursores eicosanoides que son agentes inflamatorios. El componente más común de los edulcorantes, como la fructosa, está relacionado con la presencia de esteatosis. La dieta puede alterar la integridad de la barrera intestinal y puede dar como resultado la endotoxemia metabólica por los productos derivados de bacterias (toxinas) que activan los receptores toll hepáticos, con una producción de agentes inflamatorios. Modificado de: (Wree et al., 2013).

Sin embargo, no todos los pacientes con EHGNA son obesos, tampoco todos los grupos étnicos exhiben la misma prevalencia de entidad, e incluso, en determinados individuos parece haber un componente familiar (Willner et al. 2001). Estos datos fundamentan la implicación de factores genéticos.

Hay evidencias que permiten desvincular la presencia de esteatosis de la obesidad y de la resistencia a la insulina (IR) en personas con la variante del gen que codifica a la fosfolipasa parecida a la papatina que tiene dominio de la proteína 3 conocida como PNPLA3 [Ile<sup>148</sup>→Met<sup>148</sup> (I148M)], (Kantartzis et al. 2009). *PNPLA3* es un miembro de la familia de PNPLA, del tipo Lipasa de Acil Triglicéridos (ATGL). La frecuencia de susceptibilidad de la variante PNPLA3-G148M en grupos étnicos refleja la prevalencia de EHGNA y representa el 70% de las diferencias en la frecuencia de la esteatosis hepática entre hispanos,

afroamericanos e individuos de descendencia europea (Larrieta-Carrasco et al. 2014; Romeo et al. 2008). Los homocigotos para el alelo de riesgo en PNPLA3 (MM) tienen el doble de contenido de TG hepáticos, aunque la magnitud del efecto está influenciada por la adiposidad y sensibilidad a la insulina. PNPLA3 se expresa más en el tejido adiposo y hepático y es regulado transcripcionalmente a través de la cascada de señalización que incluye a LXR y SREBP-1c (Proteína Unida al Elemento Regulador de Esteroles 1c) (Huang et al. 2010). Arriba del 90% de PNPLA3 se localiza en gotas de lípidos del hepatocito donde participan en la partición, tráfico y degradación de proteínas. Aunque no se sabe bien como pudiera actuar en la progresión de la EHGNA, pero la proteína en su forma pura tiene actividad de TG hidrolasa y transaciltransferasa (Cohen, Horton, and Hobbs 2011).

También se ha asociado a la EHGNA con determinados polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (SNPs) de algunos genes como MTTP que codifica para la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales (Bernard et al. 2000). MTTP juega un papel muy importante en la incorporación de triglicéridos hepáticos junto con APOB para la formación de VLDL, que es un vehículo muy importante en la exportación de lípidos del hígado. Se ha visto que la inhibición de MTTP incrementa los niveles de transaminasas plasmáticas y el desarrollo de esteatosis (Hooper, Adams, and Burnett 2011).

Variantes en el gen APOC3 que codifica a la apolipoproteína C3 se han asociado tanto con la esteatosis hepática y resistencia a la insulina en asiáticos delgados sin diabetes. Por lo tanto, esta evidencia no es compatible con la hipótesis en la cual la acumulación de TG en los hepatocitos causa resistencia a la insulina (Petersen et al. 2010).

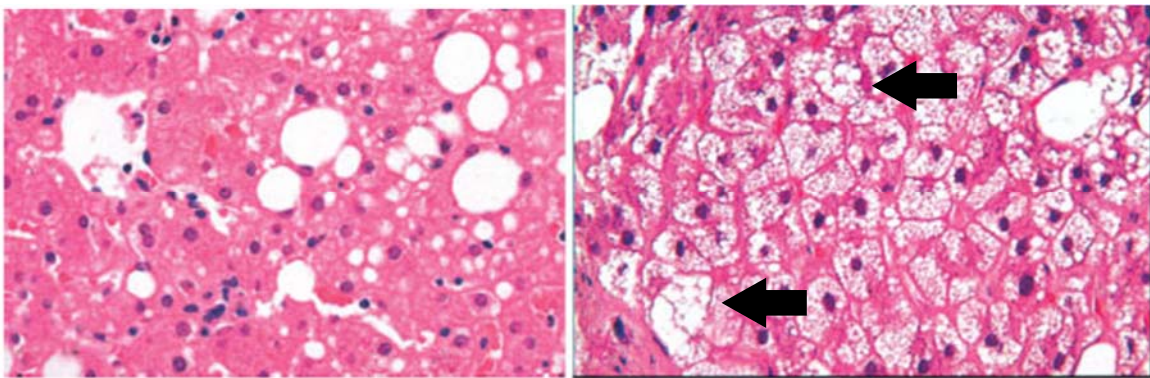
#### **d. HISTOPATOLOGÍA**

La valoración histológica es el estándar de oro para caracterizar la EHGNA, siendo la escala de Kleiner la más aceptada (Kleiner et al. 2005).



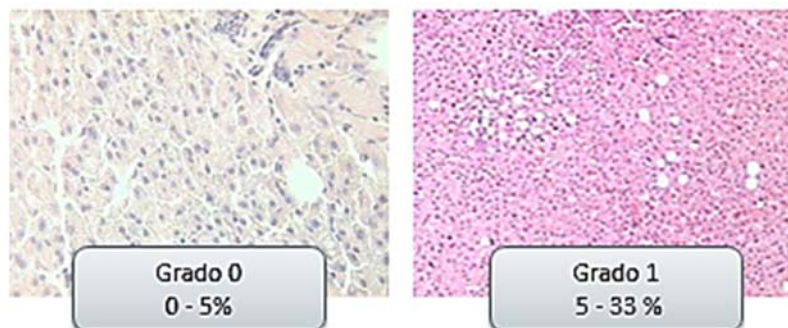
## Esteatosis (HGNA)

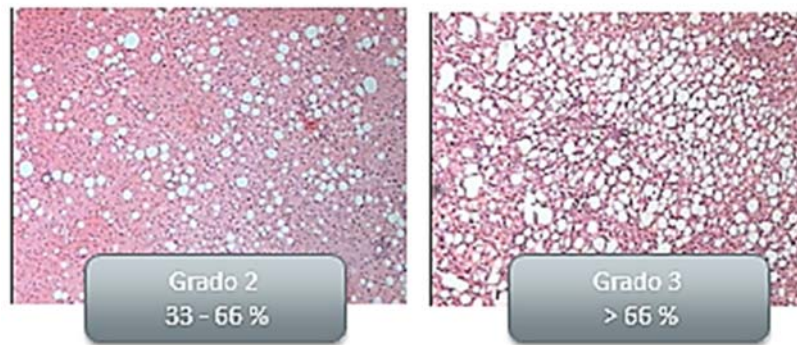
La característica histológica de EHGNA es la acumulación intracitoplasmática de lípidos en forma de gotas de TG en los hepatocitos y que se conocen como “gotas de grasa” (Puri et al. 2007). La grasa intracitoplasmática en la EHGNA puede tomar varias formas: a) grandes gotas de grasa macrovesicular que llenan el citoplasma, desplazando el resto del contenido de la célula y el núcleo periféricamente, b) mezclado de gotas grandes y pequeñas, c) rara vez, además de esteatosis macrovesicular, presenta esteatosis microvesicular **Fig 4** (Tiniakos, Vos, and Brunt 2010).



**Figura 4.** Esteatosis macrovesicular y esteatosis microvesicular. Del lado izquierdo se observan gotas grandes de grasa que representan la esteatosis macrovesicular. Mientras que de lado derecho, las flechas apuntan las pequeñas gotas de grasa que representan la esteatosis microvesicular. Modificado de (Kleiner et al. 2005).

Los métodos semicuantitativos para la evaluación histológica sigue siendo la arquitectura acinar y se refiere al porcentaje de tejido hepático ocupado por hepatocitos esteatóticos: 0–5% ,5–33%, 33–66% y >66% **Fig 5**.





**Figura 5.** El porcentaje de tejido hepático ocupado por hepatocitos esteatóticos se les asigna un grado de esteatosis. Dependiendo del grado de esteatosis tiene un puntaje: si es grado 0 = 0, grado 1 = 1, grado 2 = 2 y grado 3 =3 (Brunt et al. 1999)

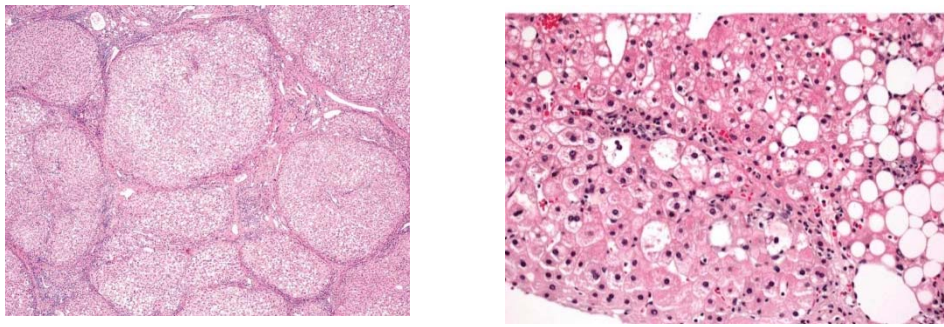
También se puede encontrar en menor cantidad inflamación crónica lobular o inflamación portal leve y balonamiento del hepatocito. La fibrosis se encuentra generalmente ausente.

### **Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)**

Los criterios histológicos mínimos para el diagnóstico de EHNA incluyen esteatosis, lesión hepatocelular (por lo general en forma de globo) y la inflamación lobular. Al igual que en otras formas de enfermedad hepática crónica, la fibrosis no es necesaria para el diagnóstico de la esteatohepatitis (Tiniakos, Vos, and Brunt 2010).

La lesión hepatocelular en la EHNA generalmente se presenta en forma de globo. El balonamiento hepatocelular se refiere a los hepatocitos agrandados, que pueden tener una apariencia reticulada o contener cuerpos de Mallory-Denk. Los hepatocitos balonados se encuentran predominantemente entre los hepatocitos esteatóticos y pueden estar asociados con la fibrosis (Kleiner et al. 2005).

La inflamación lobular, generalmente leve, se compone de pequeños focos de infiltrados de células inflamatorias compuestos por linfocitos, eosinófilos y leucocitos. Además, se pueden observar los agregados de células de Kupffer (microgranulomas) y lipogranulomas en los lóbulos **Fig 6** (Kleiner et al. 2005).



**Figura 6.** Balonamiento hepatocelular e inflamación lobular. De lado izquierdo se pueden observar hepatocitos agrandados que caracteriza al balonamiento hepatocelular. Mientras que de lado derecho se puede observar pequeños puntos que son infiltrados de células inflamatorias que caracteriza a la inflamación lobular (M. BRUNT and G. TINIAKOS 2009).

No se ha encontrado ningún biomarcador con las características necesarias que permita un diagnóstico preciso de la EHGNA y que diferencie los estadios leves de los más avanzados de esteatohepatitis y fibrosis (Wieckowska, McCullough, and Feldstein 2007); por lo que la valoración histológica es el estándar de oro para diferenciar la EHGNA.

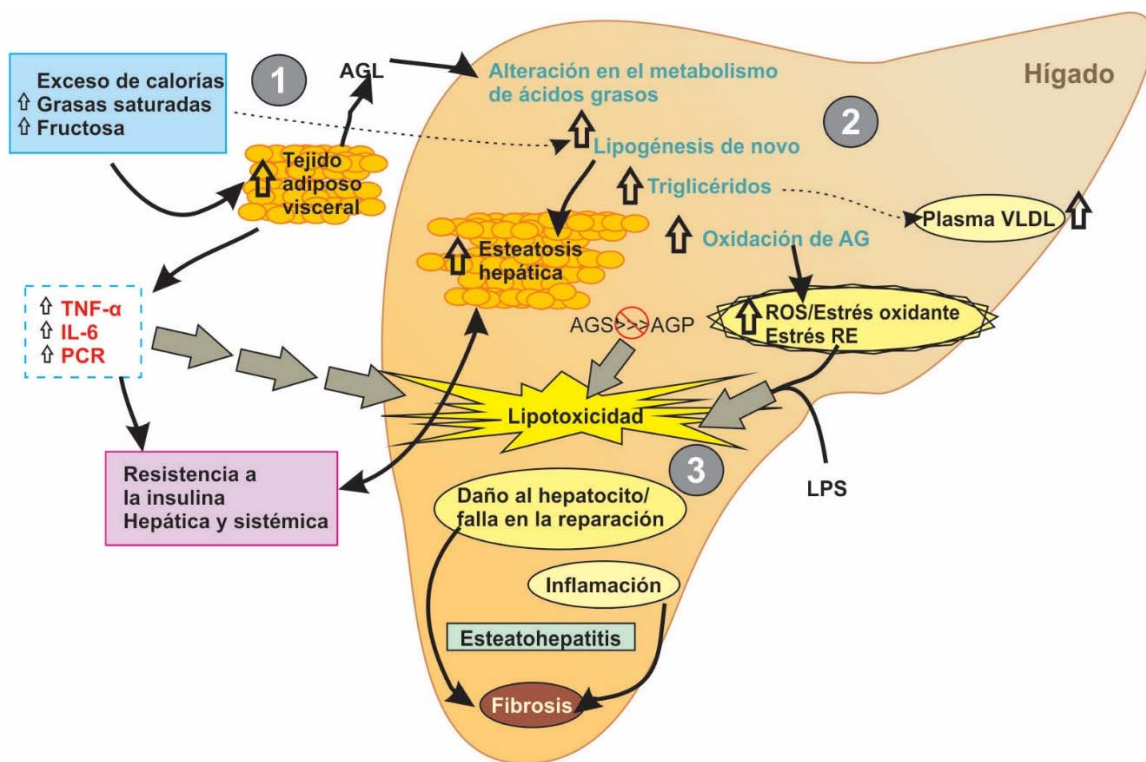
#### **e. FISIOPATOLOGIA**

El hígado desempeña un papel central en el metabolismo lipídico captando ácidos grasos libres (AGL) del plasma, que si no son aprovechados como fuente energética mediante beta oxidación son almacenados o exportados para la síntesis de lípidos y lipoproteínas

Una serie de alteraciones de factores locales y sistémicos, que controlan el equilibrio entre el eflujo, la oxidación y la exportación de lípidos conduce a la acumulación hepática de triglicéridos **Fig.7** (Tiniakos, Vos, and Brunt 2010).

El incremento en la ingesta calórica, en combinación con el incremento de ácidos grasos saturados (AGS) y el consumo de fructosa, conducen a un aumento de Tejido Adiposo Visceral (TAV); el consumo de fructosa estimula la lipogénesis *de novo* y no causa la señalización de saciedad que se produce con la glucosa.





**Figura 7.** Factores comunes en el desarrollo de esteatosis y esteatohepatitis. Existen tres componentes principales que se intersectan: (1) El incremento en el tejido adiposo visceral (TAV) y resistencia a la insulina; (2) alteración en la exportación, oxidación y desaturación de ácidos grasos hepáticos; (3) la iniciación y subsecuentes efectos de la lipotoxicidad. Las flechas negras intensas son las rutas que ya se conocen y que son importantes. Las flechas grises indican las áreas de investigación más reciente y muestran que la esteatosis y esteatohepatitis no son necesariamente procesos independientes. Modificado de : (Tiniakos, Vos, and Brunt 2010)

El TAV es un tejido metabólicamente activo que produce citocinas pro-inflamatorias [factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 6 (IL-6) y Proteína C Reactiva (PCR)]. El TAV y la esteatosis son causadas por la hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. El TAV aumenta la liberación AGL al hígado, lo que aumenta la carga del metabolismo en el hígado. La lipogénesis de *novo*, incrementa la re-esterificación de TG e incrementa la oxidación. En algunos pacientes los mecanismos compensatorios para evitar la lipotoxicidad son alterados por la falla en el metabolismo de triglicéridos y más recientemente del colesterol, lo que resulta en EHNA y fibrosis. La circulación de citocinas pro-inflamatorias del TVA, la falta de desaturación de AGS a ácidos grasos poliinsaturados (AGP), incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) por estrés oxidante del retículo endoplásmico, incremento de endotoxinas como

lipopolisacáridos (LPS), la falla en la reparación del hepatocito y la perpetuación de procesos de inflamación puede iniciar y promover la fibrosis (Tiniakos, Vos, and Brunt 2010).

#### **i. Hipótesis de dos agresiones**

Day et al. (Day and James 1998) propusieron la hipótesis de “dos agresiones”, en la cual el establecimiento de la esteatosis hepática es debido a la acumulación de ácidos grasos y triglicéridos como consecuencia del incremento en la captación y/o síntesis de ácidos grasos, así como la disminución de la beta oxidación de los mismos. La segunda agresión se establece a través de un hígado esteatótico más vulnerable al daño hepatocelular e inflamación.

#### **ii. Hipótesis de agresiones múltiples**

En el modelo de “múltiples agresiones”, la primera agresión es la resistencia a la insulina y sus trastornos metabólicos asociados como la hiperinsulinemia, causada por la resistencia a la insulina, aumento de la lipogénesis hepática y la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo al hígado.

Después de la infiltración hepática inicial, el hígado se vuelve extremadamente vulnerable a una serie de impactos, lo que lleva a una lesión del hepatocito y finalmente progresa de esteatosis a EHNA y fibrosis. Entre los múltiples factores patogénicos pueden incluir estrés oxidante, apoptosis de hepatocitos, la activación del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) que es profibrogénico y activación de las células estelares (Tilg and Moschen 2010).

#### **iii. Hipótesis de lipotoxicidad**

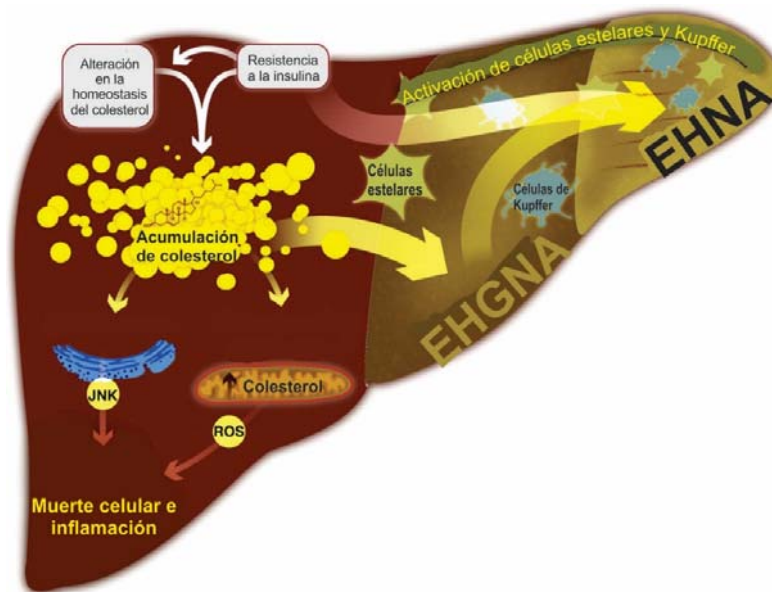
Estudios recientes sugieren que la progresión a esteatohepatitis ocurre en un proceso continuo, en donde los lípidos con capacidad tóxica y pro-inflamatoria (hipótesis de lipotoxicidad) serían clave para la progresión (Neuschwander-Tetri 2010). Estudios recientes han sugerido que la acumulación del colesterol como especie lipotóxica está asociada con la EHNA, ya que en pacientes obesos con EHNA muestran un incremento significativo de colesterol libre (Caballero et al. 2009; Araya et al. 2004; Puri et al. 2007).

## B. COLESTEROL

El colesterol está formado por una base policíclica llamada ciclopentanoperhidrofenantreno de la que se derivan los esteroides. Es un componente importante de la membrana plasmática en organismos eucariotes superiores, ayuda a generar una barrera semipermeable entre compartimentos celulares y para regular la fluidez de la membrana (Ikonen 2008).

Los metabolitos de colesterol (esteroides y ácidos biliares) tienen funciones biológicas importantes como transductores de señal y solubilizantes de otros lípidos. Además, el colesterol se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y recientemente con la EHGNA (Min et al. 2012).

La acumulación de colesterol en el hígado y en particular el incremento de colesterol libre (CL) parece ser de mucha importancia en la lesión hepática y en la fijación de la EHGNA. Sin embargo, aunque se ha encontrado que el CL causa directamente apoptosis y necrosis en los hepatocitos (Gan et al. 2014), los mecanismos precisos de la lipotoxicidad en la EHGNA no están claros **Fig 8**.



**Figura 8.** La alteración en la homeostasis del colesterol y la resistencia a la insulina contribuyen a la acumulación de CL. La acumulación de CL activa la ruta de cinasas JNK (cinasas c-Jun N-terminal) en el RE y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la disfunción mitocondrial, causando apoptosis e inflamación. El exceso de CL puede activar las CKs que inducen inflamación y las CEHs están relacionadas con el desarrollo de fibrosis en la EHNA. Modificado de (Arguello et al. 2015).

La inflamación y fibrosis se desarrollan en el hígado lo que implica la participación de células no parenquimatosas [células de Kupffer (CKs) y células estelares hepáticas (CEHs)] y el CL puede desempeñar un papel en el desencadenamiento de la lesión. Además, la acumulación de CL en sitios específicos dentro del hepatocito pueden ser relevantes para promover la disfunción mitocondrial y estrés en el retículo endoplásmico (RE) (Arguello et al. 2015).

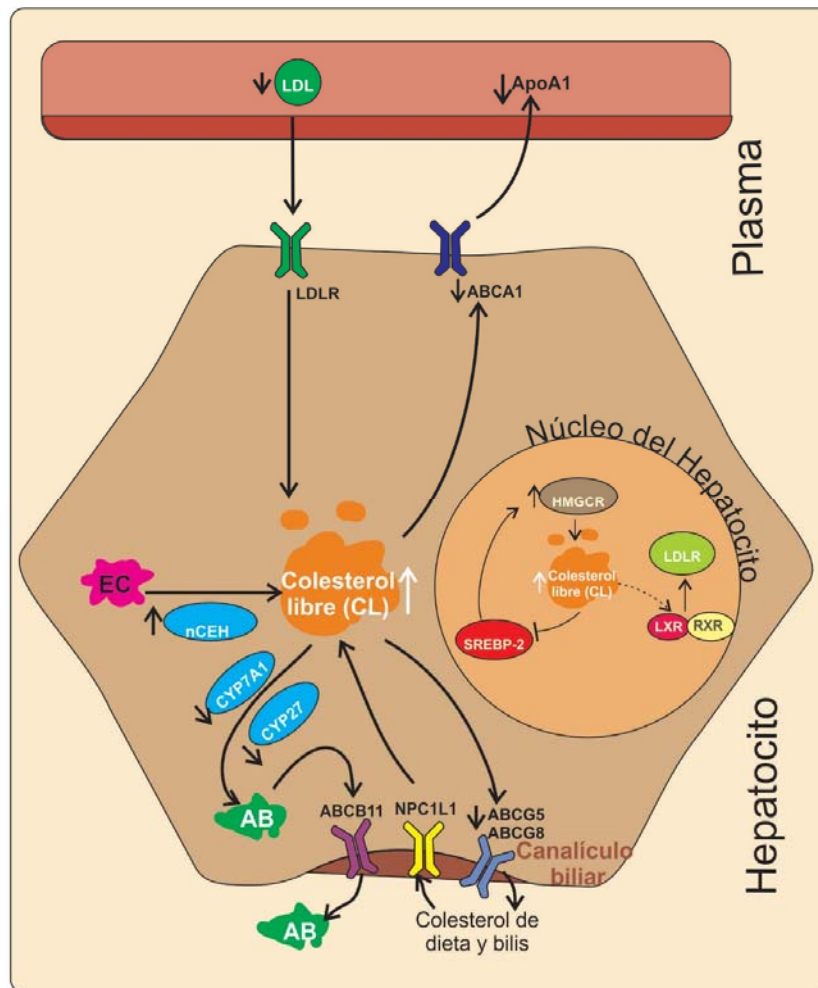
#### **a. HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL**

El hígado juega un papel central en la homeostasis del colesterol. La acumulación de colesterol se da a partir de la síntesis *de novo* y por las diferentes lipoproteínas del plasma (Arguello et al. 2015). La síntesis del colesterol ocurre en el retículo endoplásmico y desde los primeros estudios de esta ruta metabólica se ha identificado a la 3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR) como la enzima clave para la regulación. La captación del colesterol se da a partir de la internalización de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mediante su receptor de superficie (LDLR) (Ikonen 2008).

Independientemente de su origen, el colesterol hepático tiene varias rutas metabólicas alternativas:

- La excreción en la sangre en forma de VLDL
- El eflujo través de ABCA1 por lipoproteínas de alta densidad (HDL) nacientes (APOA1)
- Excreción y absorción a través de la bilis por ABCG5/G8 y por la proteína Niemann Pick C1-Like 1, respectivamente
- Almacenamiento de ésteres de colesterol por nCEH (Hidrolasa de ésteres de colesterol neutral 1)

En condiciones normales, estas vías interactúan entre sí para la homeostasis de colesterol. Estas vías metabólicas y de tráfico están reguladas por genes relacionados con el transporte y metabolismo cuya expresión está regulada por la actividad de varios factores de transcripción, incluyendo a SREBP-2, LXR (Receptor X del hígado) y FXR (Receptor X farnesoide) **Fig 9**.

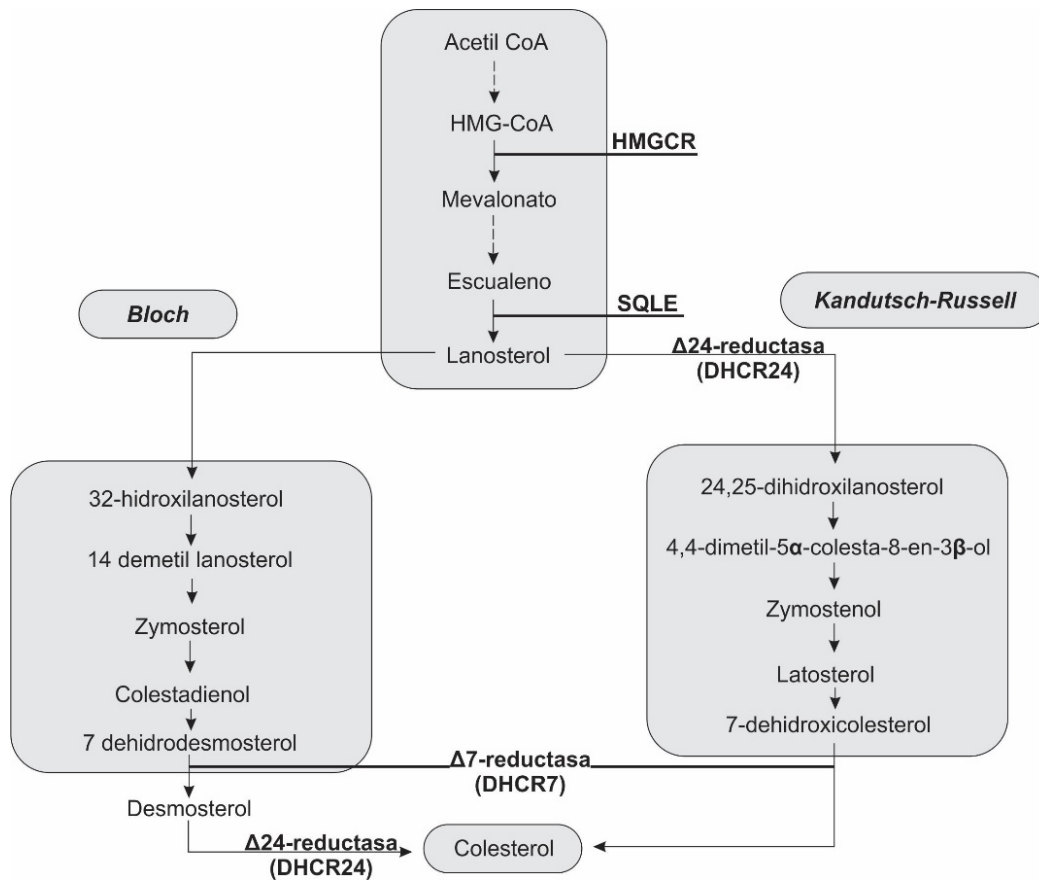


**Figura 9.** La disregulación en la homeostasis del colesterol contribuye a la acumulación de colesterol libre en la EHGA. En la síntesis se ha reconocido que HMGR es la primera enzima clave de la biosíntesis del colesterol y se encuentra sobreexpresada junto a su regulador SREBP-2. En la captación, el receptor de LDL (LDLR) se encarga de introducir colesterol del plasma y está regulada por LXR y RXR. En el catabolismo, la generación de ácidos biliares es importante para la absorción de colesterol a partir del intestino y es mediada por las enzimas CYP7A1 y CYP27. El receptor NPC1L1 se encarga de capturar colesterol de la dieta y posteriormente ingresarla al hepatocito. Estudios han relacionado una disminución de las proteínas ABCG5/ABCG8 con la acumulación de colesterol, al no poder excretar colesterol a través de la bilis. En el transporte, el eflujo por ABCA1 es importante para el transporte del colesterol por HDL nacientes (ApoA1). Por su parte nCEH se encarga de mantener niveles de colesterol libre a partir de ésteres de colesterol. Modificado de (Arguello et al. 2015)

## i. BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL

El colesterol se sintetiza a partir de dieciocho unidades de acetil-CoA que contiene 36 carbonos que se utilizan para sintetizar una molécula de colesterol. En la biosíntesis del colesterol participan más de 20 enzimas (Sharpe and Brown 2013).

Durante más de cuatro décadas (Tatu A. Miettinen 1969), los niveles circulantes de productos intermedios en la síntesis de colesterol se han utilizado como marcadores indirectos de su biosíntesis (Mackay and Jones 2012; T. A. Miettinen, Gylling, and Nissinen 2011) **Fig 10**.



**Figura 10.** La vía de la síntesis del colesterol simplificada. La vía del mevalonato conduce a lanosterol, que luego puede ser desviado a la vía Bloch, para la producción de colesterol a través de desmosterol, o la vía Kandutsch-Russell, a través de 7-dehidrocolesterol. Las flechas discontinuas representan múltiples pasos. Los genes en negritas se han relacionado con la EHGA. Modificado de: (Brown et al., 2014)

Los marcadores usados con mayor frecuencia para estudiar la biosíntesis del colesterol son el escualeno (isoprenoide pre-esterol), latosterol (intermediario de la

vía de Kandutsch-Russell) y desmosterol (precursor del colesterol por la vía de Bloch) (Brown, Ikonen, and Olkkonen 2014) (Zerenturk et al. 2013; Prabhu, Sharpe, and Brown 2014, 7; Gill et al. 2011). Los niveles de estos intermediarios pueden reflejar la síntesis del colesterol hepático; por ejemplo, los niveles de desmosterol en suero e hígado se correlacionan fuertemente, lo que sugiere una regulación compartida (P. Simonen et al. 2011).

El desmosterol es el precursor inmediato del colesterol por la vía de Bloch y la enzima que cataliza esta reacción se llama 24-dehidrocolesterol reductasa (DHCR24), el cual reduce el doble enlace en la posición 24 del desmosterol. Recientemente se ha sugerido que el desmosterol se encuentra implicada en la EHNA (M. Simonen et al. 2013). Otros metabolitos como el colesteno y latosterol también se han medido en la EHNA pero no se han encontrado diferencias significativas (M. Simonen et al. 2013).

Por otro lado, el latosterol es un precursor del colesterol por la vía de Kandutsch-Russell. La última enzima de esta vía se llama 7-dehidrocolesterol reductasa (DHCR7). Al igual que el desmosterol, el latosterol se ha sugerido que se encuentra implicada en la EHNA (Brindisi et al. 2012; P. Simonen et al. 2011)

En los últimos años la regulación de la síntesis de colesterol se ha centrado en la HMGCR. Esta enzima cataliza un punto importante "que limita la velocidad" o el control de la síntesis de colesterol, dando mevalonato. Además es el objetivo de las estatinas que son los fármacos de elección para el tratamiento de hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares (Sharpe and Brown 2013). Estudios previos han reducido el contenido de colesterol intrahepático en sujetos con EHNA utilizando estatinas y ezetimiba, estos fármacos se consideran seguros para el tratamiento de esta enfermedad (Musso, Cassader, and Gambino 2011; Tziomalos 2014). Estudios recientes han demostrado que HMGCR se encuentra sobreexpresado en pacientes con EHNA (Min et al. 2012; Caballero et al. 2009) y que está relacionado con el daño al hepatocito (balonamiento y puntaje NAS), debido a la acumulación de CL en el hígado (Min et al. 2012). La posible explicación bioquímica a la acumulación de CL en la EHNA, es que el aumento

en la producción combinado con la disminución del metabolismo y el transporte contribuyen en el progreso de la enfermedad.

Un estudio reciente concluyó que la escualeno monoxigenasa (SQLE) podría ser otra enzima que catalice un punto importante en la síntesis del colesterol, después de la HMGCR (Gill et al. 2011). La SQLE se regula de manera directa por la acumulación de colesterol, éste se une a una región N-terminal de la proteína (Reg N-100) y la manda a degradación por el proteosoma (Gill et al. 2011), mientras que la HMGCR se regula por la acumulación de lanosterol, 24,25 dihidrolanosterol y 25-hidroxicolesterol (oxisterol). Estos esteroides se unen a una proteína llamada Insig que se une a la reductasa para después ser marcados por ubiquitinación y posteriormente a su degradación por el proteosoma (DeBose-Boyd 2008; Ikonen 2008). Un estudio previo no encontró relación del precursor escualeno con la EHGA (P. Simonen et al. 2011), esto se puede deber a que SQLE se regula de forma diferente a las enzimas HMGCR, DHCR7 y DHCR24 que son regulados por SREBP-2 (Zerenturk et al. 2013; Prabhu, Sharpe, and Brown 2014, 7; Sharpe and Brown 2013). A nivel transcripcional la escualeno monoxigenasa se regula por SREBP-2.



### **3. JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años la EHGNA ha aumentado de manera considerable en el mundo y se ha documentado que la incidencia de esteatosis y su progresión a esteatohepatitis varía entre distintos grupos étnicos, siendo la población latina (principalmente México-americana) la que presenta la mayor prevalencia de esteatosis (58% vs. 44% en caucásicos) y progresión a esteatohepatitis (19% vs. 9% en caucásicos) (Williams et al. 2011). Por lo que un estudio de este tipo es importante en población mexicana.

Estudios recientes (Puri et al. 2007; Caballero et al. 2009; Min et al. 2012) han demostrado que la acumulación del colesterol está asociada al desarrollo de EHGNA. Esta acumulación se puede explicar en gran parte a una mayor síntesis de colesterol, ya que el gen *HMGCR* se encuentra sobreexpresado. La HMGCR es la primera enzima clave de la biosíntesis del colesterol, pero se desconoce si otros genes de la biosíntesis del colesterol están desregulados y si esto está relacionadas con el daño al hígado. Por lo que el estudio de otros genes de la biosíntesis del colesterol es importante.

### **HIPÓTESIS**

Las alteraciones en los niveles de expresión de los genes de la biosíntesis del colesterol estarán implicadas en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis en sujetos obesos.

#### **4. OBJETIVO**

- Evaluar la expresión hepática de genes implicados en la biosíntesis del colesterol en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis no alcohólica, en sujetos mexicanos con obesidad mórbida.

#### **PARTICULARES**

- Seleccionar genes relevantes en la biosíntesis del colesterol.
- Determinar los niveles de expresión hepática de genes implicados en la biosíntesis del colesterol, así como su asociación con parámetros bioquímicos y el grado de daño hepático.
- Determinar los niveles hepáticos de proteínas de los genes seleccionados, así como su asociación con la EHGNA.

## **5. METODOLOGÍA**

### **A. Selección de pacientes y criterios (estratificación)**

Se estudiaron 33 sujetos con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica en la Clínica de Obesidad y Enfermedades Metabólicas del Hospital General “Rubén Leñero”.

Los sujetos con una historia clínica de hepatitis viral, consentimiento no firmado, evidencia de enfermedad crónica de hígado concomitante, o el consumo mayor a 20 gramos de alcohol por día fueron excluidos del estudio.

El protocolo fue aprobado por el comité de ética del INMEGEN. Todos los participantes recibieron información oral y firmaron una carta de consentimiento informado.

### **B. Determinaciones antropométricas y bioquímicas**

A todos los participantes se les determinaron los datos clínicos y antropométricos. Los datos antropométricos se determinaron siguiendo los procedimientos recomendados por Lohman (T. J. Lohman 1992) que incluyen peso, estatura, circunferencia de cintura y cadera.

El IMC fue calculado como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros. Los participantes son obesos mórbidos ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) según los criterios de la OMS (2000).

Los parámetros bioquímicos se determinaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo del INCMNSZ. Este laboratorio está certificado por el Programa de Laboratorios del Colegio Americano de Patólogos.

Las muestras de los sujetos de estudio fueron tomadas después de 10 horas de ayuno. La glucosa se midió en suero usando el método de la glucosa oxidasa, el colesterol sérico total y los triglicéridos se midieron utilizando un método enzimático, los niveles de colesterol HDL se evaluaron utilizando ácido fosfotúngstico y  $Mg^{2+}$  y la insulina en plasma se determinó por radioinmunoensayo.

Las concentraciones séricas de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) se midieron con métodos normalizados disponibles en el mercado (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.).

La sensibilidad a la insulina se calculó mediante la valoración del modelo homeostático (HOMA-IR) (Matthews et al. 1985).

### **C. Histología**

Las biopsias de hígado se recuperaron en RNAlater (Ambion/Applied Biosystems) en el momento de la cirugía y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las mismas biopsias hepáticas fueron fijadas en formol al 10% embebidas en parafina y posteriormente teñidas con hematoxilina-eosina. Las biopsias fueron evaluadas por un patólogo experimentado.

Las características histológicas se determinaron según el sistema de puntuación de Kleiner (Kleiner et al. 2005). El grado de esteatosis se calificó con un valor de 0 a 3: inflamación de 0 a 3 y balonamiento celular de 0 a 2. La suma de estas características se utilizó para estimar la numeración de actividad de EHGNA (NAS).

Los participantes se clasificaron como controles (pacientes con histología normal del hígado), individuos con esteatosis simple (esteatosis con puntuación entre 1 y 2, sin la presencia de inflamación) e individuos con esteatohepatitis (NAS  $\geq 5$ ).

### **D. Medición de colesterol y triglicéridos hepáticos.**

El tejido hepático (50 mg) se homogeneizó en solución salina (0,9%) y los lípidos totales se extrajeron de acuerdo con el método de Folch et al. (1957). Los lípidos totales se extrajeron y se homogeneizaron en cloroformo / metanol (2: 1 vol / vol). La fase orgánica se secó bajo corriente de nitrógeno, los lípidos se resuspendieron en isopropanol y Triton X-100 10%. Los triglicéridos y las concentraciones de colesterol total se determinaron por espectrofotometría (Beckman DU 640, Beckman Instruments, Fullerton, CA), utilizando kits comerciales de ensayo colorimétricos (Diagnostic Systems, Holzheim, Alemania) y se normalizaron a la concentración de proteína total.

## E. Extracción de RNA

El RNA total se extrajeron de 20 mg de tejido hepático con RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) y fue almacenado en Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para cada participante. Se midió la tasa A260/280 para determinar la pureza del RNA el cual debía de estar en un valor de 1.8 a 2.0. Para observar la integridad del RNA se corrió en un gel de agarosa al 1.5%.

## F. PCR Tiempo Real

El cDNA se sintetizó con Taqman Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) a partir de 500 ng de RNA total.

Una vez seleccionados los genes, se procedió con el diseño de oligonucleótidos con la plataforma de Universal ProbeLibrary (UPL) de Roche que se encuentra disponible en línea **Tabla 1** (<http://lifescience.roche.com/shop/en/us/overviews/brand/universal-probe-library>).

GEN	OLIGONUCLEÓTIDO	OLIGONUCLEÓTIDO	SONDA
	5'→3'	3'→5'	
DHCR24	ttatgacaggggtcatgacaga	agtaattgccaatgctattcagc	13
DHCR7	gccatggtcaagggtac	ttgtaaagaaattgcctgtgaat	60
HMGCR	gttcggtggcctctagttag	tgcattcgaaaaagtcttgaca	65
SQLE	cctgaatcagaaaataaggagca	gctgtttctgaaatattggttcc	79

**Tabla 1.** Para los ensayos de PCR Tiempo real se usaron los oligonucleótidos presentados junto a la sonda Taqman que asigna la plataforma UPL de Roche. Disponible en línea <https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>.

El PCR en tiempo real cuantitativo se realizó con sondas Taqman PCR Master Mix (Roche, Rotkreuz, Switzerland) en el equipo Light Cycler 480 II (Roche, USA).

Se utilizó el software Light Cycler 480 del mismo equipo para realizar cuantificación relativa por el método  $\Delta\Delta C_t$ , comparando la expresión de RNAm problema y el gen constitutivo que mejor se ajustaban. Los genes constitutivos

(normalizadores) que se utilizaron fueron la Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT) y la beta actina (B-ACT).

### **G. Extracción de proteínas**

Las proteínas se extrajeron de 70 mg de tejido hepático congelado en un área sanitizada. El tejido se depositó en un tubo con 5 mL de RIPA, se homogenizó con el Polytron 2500 E (Kaskus, Indonesia) por 1 minuto, se incubó en hielo por 30 minutos y durante este lapso se mezcló cada 10 minutos en vortex.

Los lisados celulares se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$  y se separó el sobrenadante para cuantificar la proteína por el método de Lowry y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **H. Análisis de proteínas por la técnica de Western Blot**

Los extractos proteicos se separaron en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron en una membrana de PVDF. Y se realizó la detección de la señal por métodos quimioluminiscentes.

La señal de las proteínas se analizó con el equipo Universal Hood III Gel Doc (Biorad). Fueron cuantificadas usando el programa Image Lab Software del mismo equipo. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se presentan como el índice HMGCR/  $\beta$ -actina, SQLE/  $\beta$ -actina, DHCR7/  $\beta$ -actina y DHCR24/  $\beta$ -actina.

### **I. Análisis Estadístico**

El RNAm de HMGCR, SQLE, DHCR7 y DHCR24 así como sus niveles de proteína, insulina en suero, AST, ALT, GGT, HOMA-IR y triglicéridos hepáticos fueron transformados a logaritmos para lograr una distribución normal, mientras que los demás resultados mostraban ésta distribución. Las diferencias entre los grupos se calcularon usando la prueba ANOVA o Kruskal-Wallis, dependiendo de la distribución de las variables. Las correlaciones se obtuvieron mediante la prueba Spearman. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos. El análisis se realizó con el programa SPSS v.14 (Chigago, E.U.A)

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. *Características de los sujetos de estudio*

En este estudio se incluyeron 33 sujetos con obesidad mórbida (24.2% mujeres). La media de la edad es de  $35.81 \pm 1.38$  años, y la media de IMC  $45.06 \pm 0.85$ . La población de estudio está conformada por 9 sujetos sin esteatosis (27.3%), 9 sujetos con esteatosis (27.3%) y 15 con EHNA (45.4%). La comparación de las características clínicas y bioquímicas entre los grupos se muestran en la **Tabla 2**.

La concentración de triglicéridos séricos y hepáticos es mayor en los sujetos con EHNA y esteatosis en comparación con los sujetos controles de forma significativa. Estudios previos han documentado que la acumulación de triglicéridos en la EHNA podría explicar en parte la transición de la enfermedad, ya que observaron que la concentración de TG hepáticos o plasmáticos era mayor en sujetos con EHNA y que los genes de la biosíntesis del colesterol se encontraban sobreexpresados (Puri et al. 2007; Caballero et al. 2009; Araya et al. 2004; Van Rooyen et al. 2011).

Un estudio de lipidómica reportó que no había diferencias significativas en los niveles de triglicéridos séricos entre los sujetos con obesidad sin esteatosis, con esteatosis y EHNA. Pero si se encontraron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos hepáticos entre los tres grupos y aumentando de acuerdo al grado de la enfermedad (obesos sin esteatosis < obesos con esteatosis < obesos con EHNA) (Puri et al. 2007).

En un estudio donde se incluyeron sujetos delgados (IMC < 25), sujetos sanos que presentan obesidad, esteatosis y EHNA. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos séricos entre todos los grupos y de acuerdo al grado de la enfermedad la concentración de TG aumenta (delgados < obesos sanos < obesos con esteatosis < obesos con EHNA) (Min et al. 2012). En nuestro estudio no se incluyen sujetos delgados, ya que en este estudio se enfoca en la transición de la EHNA en sujetos obesos, que por mera estadística podrían presentar este tipo de comorbilidades.

**Tabla 2.** Características clínicas y bioquímicas de la población de estudio.

	Control	Esteatosis	Esteatohepatitis
	n=9	n=9	n=15
Género M:F	1:8	2:7	5:10
DT2	2	3	6
Edad (años)	38.6 ± 9.8	34.2 ± 8.9	34.8 ± 5.4
Índice de Masa Corporal [IMC] (kg/m <sup>2</sup> )	45.1 ± 6.2	44.3 ± 5.1	45.4 ± 4.2
Glucosa (mg/dL)	102.7 ± 11.8	97.8 ± 12.8	109 ± 16.5
Triglicéridos (mg/dL) <sup>a b</sup>	101.0 (82.5-140.28)	164.0 (130.1-240.5)	136.0 (124.0-246.0)
Colesterol Total (mg/dL)	176.0 ± 28.8	185.4 ± 27.4	163.1 ± 36.3
HDL (mg/dL) <sup>b</sup>	41.4 ± 6.5	34.7 ± 7.5	31.7 ± 8.1
Alanín aminotransferasa [ALT] (UI/L) <sup>b c</sup>	27.0 (13.0-56.0)	21.5 (17.0-23.0)	40 (29.2-56.5)
Aspartato aminotransferasa [AST] (UI/L) <sup>c</sup>	24.0 (19.5-44.5)	22.5 (17.0-27.2)	31.0 (26.5-69.2)
Gamma Glutamil Transferasa [GGT] (UI/L)	23.0 (12.0-38.4)	21.0 (13.2-42.0)	29.0 (20.5-34.2)
Insulina (mg/dL) <sup>a b</sup>	7.4 (3.7-12.9)	15.2 (10.9-24.6)	20.9 (9.5-31.2)
HOMA-IR	1.8 (0.9-3.4)	3.4 (2.5-5.7)	5.0 (2.5-9.6)
Triglicéridos hepáticos (mg triglicéridos/mg proteínas) <sup>a b</sup>	0.95 ± 0.56	1.37 ± 0.91	3.92 ± 2.41
Colesterol total hepático (mg colesterol/mg proteínas)	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.05	0.17 ± 0.11
Colesterol libre hepático (mg colesterol/mg proteínas)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.07
Fosfolípidos hepáticos (mg fosfolípidos/mg proteínas)	0.51 ± 0.06	0.51 ± 0.05	0.56 ± 0.30

Datos presentados con Media ± Desviación estándar o mediana (rango intercuartil). IMC, Glucosa, Colesterol total, Colesterol HDL cumplen una distribución normal por lo que se aplicó prueba de ANOVA, para los demás datos se aplicó prueba no paramétrica de Kruskal Wallis de muestras independientes. <sup>a</sup> Contraste esteatosis Vs Controles con p significativa <0.05; <sup>b</sup> Contraste EHNA Vs Controles con p significativa <0.05; <sup>c</sup> Contraste Esteatosis Vs EHNA con p significativa <0.05.

Sujetos con EHNA presentan un aumento significativo de ALT en comparación con los sujetos control. También existe una diferencia significativa de niveles de ALT entre sujetos con EHNA y esteatosis. La elevación de las transaminasas (ALT y



AST) son marcadores de daño hepático y es la anomalía más observada en la EHGNA estando presente entre el 50 y 90% de los casos en obesos (Matteoni et al. 1999; Mofrad et al. 2003). Si bien cualquier estadio de la EHGNA puede cursar con transaminasas normales, estudios previos han documentado que estas suelen estar más elevadas en la EHNA. (Dixon, Bhathal, and O'Brien 2001; Ong et al. 2005). Las transaminasas se encuentran en abundancia en el citoplasma del hepatocito por lo que al presentarse daño o inflamación las enzimas se liberan a la circulación y se encuentran elevadas en suero (Wong et al. 2009). La naturaleza precisa de las fracciones GGT aún no se ha establecido, y en la actualidad no es posible especular sobre las posibles razones que conducen a diferentes patrones de fracciones GGT en hígado graso no alcohólico (Franzini et al. 2012).

La concentración de HDL es menor significativamente en sujetos con EHNA contra sujetos controles. La disminución en los niveles de HDL se ha relacionado con un incremento de riesgo cardiovascular y más recientemente con la EHGNA (Trojak et al. 2013; Brea Hernando and Puzo Foncillas 2010). Está bien documentado que el metabolismo de lipoproteínas se encuentra desregulado en la EHGNA (Fon Tacer and Rozman 2011). Las lipoproteínas más importantes en el eflujo del colesterol son las HDL's y éstas se encargan de transportar colesterol mediante ABCA1. Se sabe bien que en la EHGNA el transportador ABCA1 se encuentra alterado lo que no permite la salida de colesterol y por lo tanto se acumula de colesterol en el hígado.

Se observa un aumento significativo en los niveles de insulina en sujetos con EHNA a comparación de los sujetos controles. El incremento en los niveles de insulina se podría explicar en parte por la resistencia a la insulina, como primer factor en la teoría de múltiples impactos (Tilg and Moschen 2010).

El colesterol total y el colesterol libre hepático no presentaron cambios significativos durante nuestro estudio. Diferentes estudios han observado que existe aumento significativo en los niveles de colesterol libre (Puri et al. 2007; Caballero et al. 2009), que es un compuesto altamente citotóxico (Yao and Tabas 2000).

Cuando se hace una comparación entre sujetos con EHNA y sujetos sin EHNA (NAS Score<5) hay una tendencia en los niveles de colesterol libre ( $p=0.060$ ) el cual se ha relacionado fuertemente con la EHGNA **Tabla Anexo 1**. Esto sugiere que la acumulación de colesterol libre podría estar implicado en el desarrollo de EHNA pero no explicaría la progresión de la EHGNA, ya que no se observan diferencia entre los grupos controles vs esteatosis y esteatosis vs EHNA. Aunque es probable que si se aumenta el número de pacientes se pueda observar una diferencia significativa. Un estudio reciente muestra que existe un aumento significativo de colesterol total hepático ( $p=0.010$ ) entre sujetos que presentan EHNA en comparación de los sujetos no EHNA, sin observar diferencia en niveles de colesterol libre (León-Mimila et al. 2015).

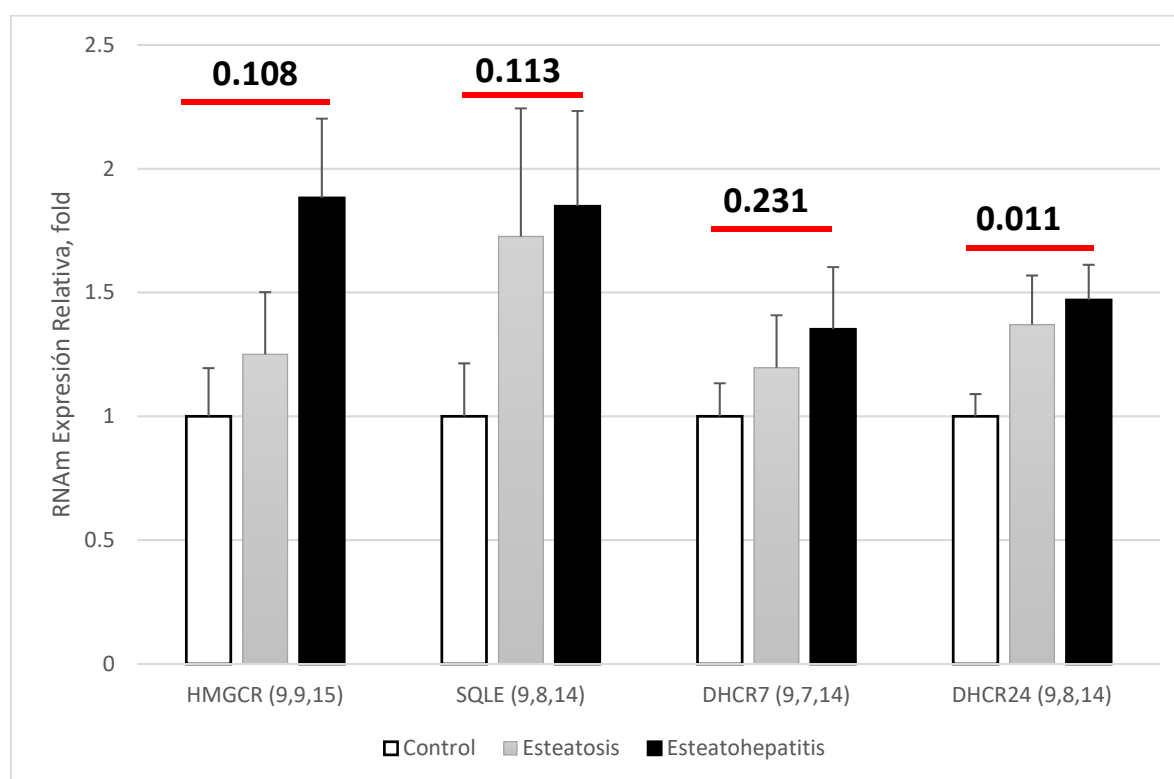
Los datos existentes apoyan el concepto de que la homeostasis del colesterol se desregula ampliamente en la EHGNA y que las alteraciones de las vías de colesterol hepático en diferentes niveles promueven la acumulación de CL en las células del hígado. Un estudio con marcadores de la síntesis del colesterol donde se incluían colesteno (precursor del latosterol) ( $p= 0.001$ ), latosterol (precursor de colesterol por la vía de Kandutsch-Russell) ( $p<0.001$ ) y desmosterol (precursor del colesterol por la vía de Bloch) ( $p< 0.001$ ) presentaron diferencia significativa entre sujetos obesos ( $n=128$ ) vs sujetos obesos con EHGNA ( $n=114$ ), mientras que el escualeno no presentó cambios. Este estudio demostró que la síntesis hepática del colesterol se encuentra alterada en la EHGNA, pero el estudio no incluyó sujetos con EHNA (P. Simonen et al. 2011).. En un estudio más reciente se observó que no había diferencia significativa con los intermediarios colesteno y latosterol entre sujetos con obesidad mórbida sanos, con esteatosis y EHNA, pero si con desmosterol y también se observó el mismo comportamiento con desmosterol y colesterol hepático, por lo que se concluyó que el desmosterol también está implicado en la EHNA (M. Simonen et al. 2013). Al estar alterados la concentración de desmosterol y colesterol y puesto que el desmosterol es precursor del colesterol se sugiere que la vía de Bloch es la que se encuentre alterada en la EHNA.

Los precursores escualeno, latosterol y desmosterol están relacionados con los genes *SQLE*, *DHCR7* y *DHCR24* respectivamente, ya que el escualeno es

sustrato de la proteína escualeno monooxigenasa que es codificada por el gen *SQLE*. Por su parte el latosterol y el desmosterol son sustratos de las proteínas 7-dehidrocolesterol reductasa y 24-dehidrocolesterol reductasa codificadas por los genes *DHCR7* y *DHCR24* respectivamente.

## B. En la EHGNA, genes de la biosíntesis del colesterol muestran tendencia a sobreexpresarse

En este estudio se incluyeron 32 sujetos con obesidad mórbida. La muestra de uno de los sujetos de estudio con EHNA no se realizó por la falta de tejido hepático para la posterior extracción de RNA. La población de estudio está conformada por 9 sujetos sin esteatosis, 9 sujetos con esteatosis y 14 con EHNA (15 para el caso de la *HMGCR*). La comparación de niveles de RNAm entre los grupos se muestra en el **Gráfico 1**.



**Gráfico 1.** Expresión relativa de RNAm de genes clave de la biosíntesis del colesterol. Se puede observar que la expresión de estos cuatro genes presenta una tendencia a aumentar en cada estadio de la EHGNA. Para el caso de *DHCR24* se observa que hay diferencia significativa entre el grupo control y EHNA (\* $p < 0.05$ ). Mientras que para el caso de *HMGCR* se observa que solo hay una tendencia ( $p = 0.108$ ). Para el caso de *SQLE* y *DHCR7* se mantienen inalterados.

En un estudio con sujetos delgados (n=32), sujetos obesos con esteatosis (n=17) y obesos con EHNA (n=23) se observaron diferencias significativas entre los grupos de sujetos obesos vs sujetos delgados, pero entre los grupos de sujetos obesos con esteatosis y EHNA no se observaron diferencias significativas (Caballero et al. 2009). Pero no es muy claro si el aumento de expresión de *HMGCR* es por efecto de la obesidad o por la EHNA.

Un estudio más claro en el que se incluyen sujetos obesos sanos (sin presentar esteatosis) (n=20), sujetos delgados (n=6), sujetos obesos con esteatosis (n=20) y obesos con EHNA (n=20), se observaron diferencias significativas en la expresión de *HMGCR* entre sujetos delgados y sujetos obesos sanos vs sujetos obesos con esteatosis y EHNA (Min et al. 2012). Sin embargo, no se observaron diferencias entre sujetos delgados y sujetos obesos sanos, entonces el no incluir sujetos delgados en nuestro estudio no afecta ya que el comportamiento en la expresión de *HMGCR* es muy similar entre estos grupos.

Por su parte el marcador escualeno, sustrato de *SQLE* para producir lanosterol permanece inalterada por lo que no se relacionó con la EHNA (P. Simonen et al. 2011). En nuestro estudio se observa una tendencia en la expresión de *SQLE*. El estudio de este gen es relevante ya que se ha sugerido como segundo punto de control de la síntesis del colesterol, probablemente ampliando la población de estudio se observen diferencias significativas en la EHNA.

Dos estudios previos en el que se han medido precursores del colesterol han mostrado que la cantidad de desmosterol sérico aumenta de manera significativa en la EHNA (P. Simonen et al. 2011) y desmosterol hepático en la EHNA (M. Simonen et al. 2013). En nuestro estudio la expresión de *DHCR24* se encuentra sobreexpresado en los sujetos con EHNA en comparación de los sujetos controles (obesos mórbidos) y presenta diferencia significativa. La sobreexpresión puede deberse a que como muestran los estudios anteriores, el aumento de desmosterol exige una mayor cantidad de la proteína que catalice su reducción a colesterol por lo que se requiere una mayor expresión del gen *DHCR24*.

Estudios previos muestran que el latosterol, intermediario en la ruta de DHCR7 (Kandutsch-Russell) para producir colesterol se encuentra incrementado en sujetos con EHGNA (P. Simonen et al. 2011), pero no en sujetos con EHNA (M. Simonen et al. 2013). Lo que también podría sugerir un aumento en la expresión de DHCR7.

Este estudio muestra que los niveles de *DHCR7* que participan en la ruta de Kandutsch-Russell se encuentra inalterado en la EHGNA.

En su conjunto los datos muestran que los genes *HMGCR* y *DHCR24* localizados en puntos clave de la biosíntesis del colesterol muestran que esta ruta metabólica se encuentra desregulada en individuos con EHNA.

La comparación entre grupos no EHNA y EHNA ya que no se observaron diferencias significativas.

### **C. Correlación entre la expresión de genes de la biosíntesis del colesterol y parámetros bioquímicos y antropométricos.**

En este estudio se incluyeron los 32 sujetos con obesidad mórbida. La población de estudio está conformada por 9 sujetos sin esteatosis, 9 sujetos con esteatosis y 14 con EHNA (15 para el caso de la *HMGCR*). La correlación entre la expresión de genes de la biosíntesis del colesterol y las características clínica, bioquímicas e histológicas se muestra en el **Tabla 3**.

En nuestro estudio se encontró que la expresión de *HMGCR* tiene una correlación positiva y significativa con triglicéridos séricos ( $r=0.472$ ,  $p=0.006$ ) y hepáticos ( $r=0.472$ ,  $p=.0.030$ ), mientras que colesterol HDL tiene una correlación negativa y significativa ( $r=-0.345$ ,  $p=0.049$ ). Estos datos demuestran que la sobreexpresión de *HMGCR* está asociada con el incremento de TG séricos y hepáticos que se sabe bien que están relacionados con la progresión de la EHGNA por la teoría de la doble agresión de Day (Day and James 1998). Por otro lado, el aumento de la expresión de *HMGCR* aumenta la concentración de colesterol y esto afecta el eflujo del colesterol por ABCA1 lo que podría explicar la disminución de colesterol HDL (Arguello et al. 2015; Min et al. 2012).

**Tabla 3.** Correlación entre la expresión genes de la biosíntesis del colesterol y características bioquímicas e histológicas.

	<b>RNA<sub>m</sub> HMGCR</b>	<b>RNA<sub>m</sub> SQLE</b>	<b>RNA<sub>m</sub> DHCR7</b>	<b>RNA<sub>m</sub> DHCR24</b>
Insulina (mg/dL)	0.219	.432*	0.024	0.340
HOMA-IR	0.297	.465*	0.017	0.343
Triglicéridos (mg/dL)	0.472**	.433*	0.113	0.211
Colesterol Total (mg/dL)	0.067	0.063	-0.083	0.082
HDL (mg/dL)	-0.345*	-0.350	-0.182	-0.232
Triglicéridos hepáticos (mg triglicéridos/mg proteínas)	.379*	0.154	-0.072	0.292
Colesterol total hepático (mg colesterol/mg proteínas)	0.144	0.096	-0.037	0.192
Colesterol libre hepático (mg colesterol/mg proteínas)	-0.024	-0.102	-0.083	0.133
Esteatosis	0.328	0.283	0.020	0.330
Balonamiento	0.293	0.187	0.033	0.225
Inflamación	0.167	0.186	0.330	0.172
Puntaje NAS	0.305	0.281	0.187	0.301

HDL: Colesterol HDL. \*Valor de  $P < 0.05$  y \*\* Valor de  $P < 0.01$ .

En otro trabajo se ha encontrado que la expresión relativa de *HMGCR* se correlacionaba de manera significativa con el balonamiento, Puntaje NAS y colesterol libre hepático en 8 sujetos obesos (Min et al. 2012). Pero en nuestro estudio solo se observa una tendencia con el balonamiento ( $r=0.293$ ,  $p= 0.098$ ) y el puntaje NAS ( $r=0.305$ ,  $p=0.085$ ). La variación en los resultados se puede deber a que en el estudio anterior solo se incluyeron 16 sujetos (8 con EHGNA y 8 con control). Mientras que en nuestro estudio se incluyeron 32 sujetos obesos mórbidos donde el efecto no es muy perceptible y aun se observa una tendencia en el balonamiento y puntaje NAS. A Esto significa que el aumento de la expresión de *HMGCR* aumenta el puntaje NAS que es un marcador de daño al hígado, al igual que el balonamiento que es la pérdida de la integridad del hepatocito.

Por otro lado, *SQLE* tiene correlación significativa con el marcador de la resistencia a la insulina HOMA-IR ( $r=0.0465$ ,  $p= 0.014$ ) e insulina ( $r=0.432$ ,  $p= 0.022$ ) por lo que a mayor sobreexpresión de *SQLE* mayor resistencia a la insulina y mayor cantidad de insulina en suero. También presenta una correlación significativa con la concentración de TGs séricos ( $r=0.465$ ,  $p=0.015$ ). Para el caso de esteatosis ( $r=0.283$ ,  $p=0.126$ ) y puntaje NAS ( $r=0.281$ ,  $p = 0.126$ ) solo se

observa una tendencia. Esto significa que *SQLE* también está relacionado con el daño al hígado por el puntaje NAS y que probablemente la expresión de *SQLE* está más relacionada a la esteatosis. La ampliación de la muestra de los sujetos de estudio podría fortalecer esta idea.

*DHCR7* solo muestra una correlación con tendencia positiva con la inflamación ( $r=0.330$ ,  $p=0.075$ ). Esto quiere decir que a mayor expresión de *DHCR7* mayor inflamación del hepatocito. La ampliación de los sujetos de estudio podría mostrar un efecto contundente.

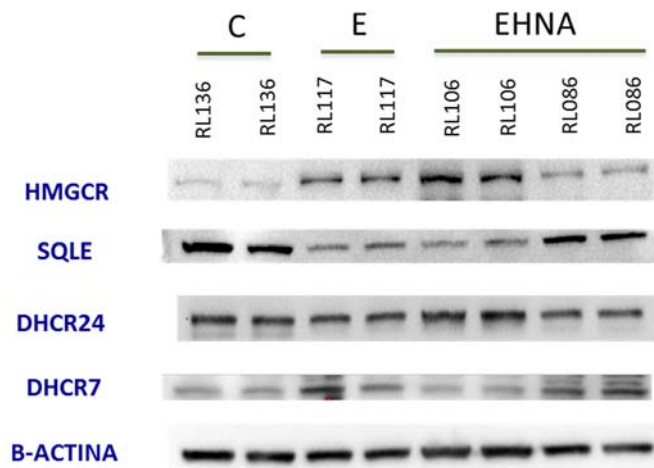
*DHCR24* muestra una tendencia positiva con la esteatosis ( $r=0.330$ ,  $p=0.070$ ) y puntaje NAS ( $r=0.301$ ,  $p=0.100$ ), por lo que se sugiere que a mayor expresión de *DHCR24* mayor daño del hepatocito y mayor esteatosis.

No se encontró correlación entre el colesterol sérico, el colesterol libre y el total hepático lo con ningún gen de la biosíntesis, pero no se descarta que el aumento de los sujetos de estudio podría generar una correlación significativa.

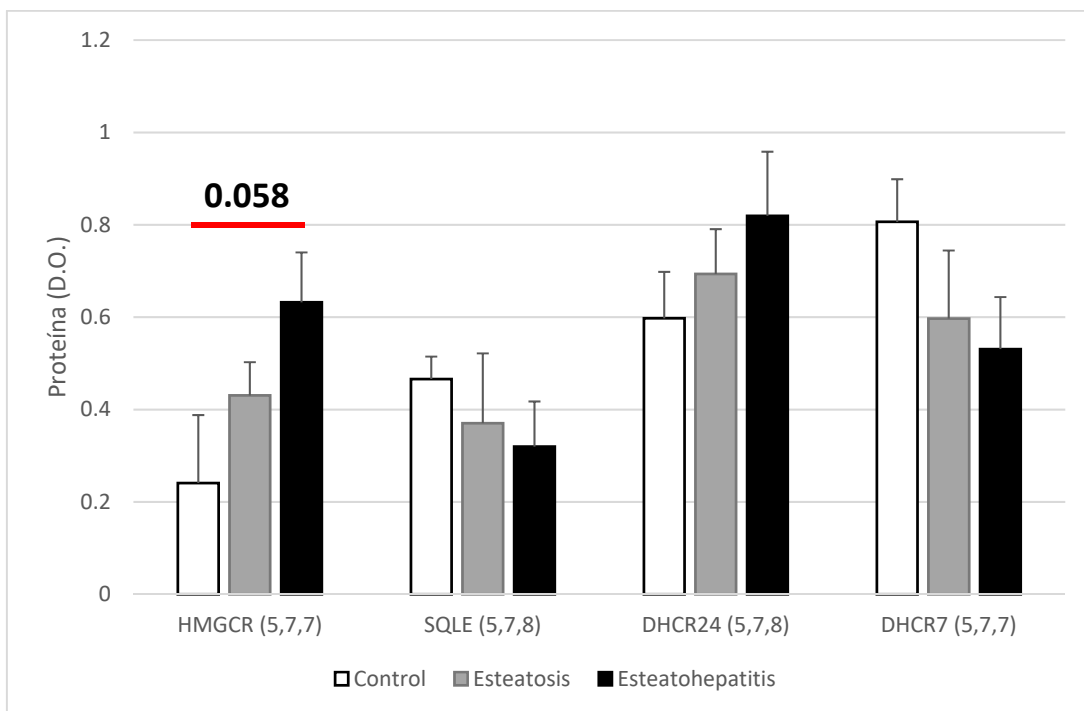
#### **D. Proteínas de la biosíntesis del colesterol**

En este estudio se incluyeron 20 sujetos con obesidad mórbida. Los sujetos se redujeron debido a que se hizo un estudio preliminar para determinar si se ampliaba la población de estudio. La población está conformada por 5 sujetos sin esteatosis, 7 sujetos con esteatosis y 8 con EHNA (7 para el caso de la *DHCR7* y *HMGCR*). La **Figura 11** muestra el análisis tipo Western Blot de algunos de los sujetos de estudio. En el **Gráfico 2** se muestran los resultados del análisis tipo Western Blot.

En su conjunto tanto el aumento de los niveles de expresión como en la cantidad de proteína hepática indican que el aumento tanto de RNAm de *HMGCR* y los niveles de proteína en la *EHNA* se activan transcripcionalmente. Esto es relevante ya que entonces la expresión de *HMGCR* tiene un papel muy importante en el desarrollo de la *EHNA*.



**Fig 11.** Análisis de Western Blot. Muestra de una membrana y como fueron cargados en los geles de poliacrilamida. Las muestras se cargaron por duplicado y se usó  $\beta$ -actina como control constitutivo. Abreviaturas: C=Control, E= Esteatosis y EHNA= Esteatohepatitis no alcohólica.



**Gráfico 2.** Expresión de proteínas de la biosíntesis del colesterol. Se observa una tendencia al incremento de la HMGCR en sujetos control vs EHNA ( $p=0.058$ ). No se observan cambios significativos en los demás genes.



El aumento en la expresión de HMGCR se ha relacionado con un aumento en la actividad de SREBP-2, el principal activador transcripcional de HMGCR, en nuestro estudio solo se observa una tendencia. SREBP2 se encuentra unido a la membrana del retículo endoplásmico, cuando el colesterol es abundante permanece almacenado. Cuando hay niveles bajos de colesterol intracelular SREBP-2 es procesada por proteasas y viaja al núcleo para activar *HMGCR* (Anderson 2003).

Por otro lado, la cantidad de proteína hepática de SQLE parece disminuir, aunque no es significativo.

Una explicación probable se ha encontrado en el trabajo de Gill en donde demuestran que el colesterol se une a la región N-terminal de la SQLE y la manda a degradación por proteosoma debido a que este es marcado por ubiquitinación. (Gill et al. 2011). Este trabajo mostró que las concentraciones de colesterol están elevadas en pacientes con EHNA, el mecanismo parece operar por la unión directa del colesterol a SQLE.

No se observan cambios en la expresión proteica de DHCR24 y DHCR7. Aunque probablemente al ampliar los sujetos de estudio se encuentren diferencias significativas.

Por otro lado, DHCR7 muestra una cantidad de proteína menor posiblemente a que se esté regulando post-transcripcionalmente, ya que un estudio previo muestra que la sobreexpresión de DHCR7 y DHCR24 se lleva de forma paralela (Luu et al. 2015).

#### **E. Correlación entre la cantidad de proteína de los genes de la biosíntesis del colesterol y sus características.**

Para este estudio se redujó a 20 sujetos con obesidad mórbida. La población de estudio está conformada por 5 sujetos sin esteatosis, 7 sujetos con esteatosis y 8 con EHNA (7 para el caso de la DHCR7 y HMGCR). La correlación entre la expresión proteica de la biosíntesis del colesterol y las características de los sujetos de estudio se resumen a continuación.

En nuestro estudio se encontró que la expresión proteica de HMGCR tiene una correlación positiva y significativa con esteatosis ( $r= 0.521$ ,  $p= 0.022$ ), balonamiento ( $r= 0.458$ ,  $p= 0.049$ ) y Puntaje NAS ( $r= 0.500$ ,  $p= 0.029$ ). Esto muestra que a mayor expresión de proteína mayor daño al hígado que es reflajado por el puntaje NAS. Los resultados muestran que a mayor expresión de proteína HMGCR mayor esteatosis y balonamiento. Pero solo se observa una tendencia entre los niveles de expresión de HMGCR con la expresión del mensajero ( $r= 0.261$ ,  $p= 0.280$ ) y la concentración de TG hepáticos ( $r=0.391$ ,  $p= 0.098$ ). Ampliando la población de estudio es probable que se observe diferencia significativa y esto supondría que a mayor expresión de HMCR mayor cantidad de TG hepáticos y que la expresión génica de HMGCR aumenta la expresión ya que es su gen.

En un estudio previo se encontró que la expresión proteica de HMGCR se correlacionaba con mayor daño al hígado (Min et al. 2012), y en nuestro estudio se observa el mismo comportamiento. El cual muestra que a mayor expresión proteica de HMGCR mayor puntaje NAS, que es el marcador de daño al hígado; por lo que se sugiere que la sobreexpresión proteica de HMGCR está relacionada con el daño al hígado.

## **7. CONCLUSIONES**

Los datos presentados muestran de manera general que la biosíntesis del colesterol se encuentra ligeramente desregulada en la EHGNA, ya que genes analizados como *HGMCR* (primer paso de la regulación) y *DHCR24* muestran cierta tendencia a sobreexpresarse.

Los niveles de proteína de *HMGCR* se encuentra ligeramente desregulado en este padecimiento y ambos parámetros tanto expresión de RNAm como algunas proteínas correlacionan de manera positiva con el daño hepático, por lo que la biosíntesis del colesterol podría tener un papel fundamental en la EHGNA.

## 8. Material complementario

Tabla Anexo 1. Características clínicas y bioquímicas de la población de estudio con dos grupos.

	No EHNA (NAS<5)	Esteatohepatitis (NAS>5)	p
	n=18	n=15	-
<b>Género M:F</b>	3:15	5:10	-
<b>DT2</b>	5	6	-
<b>Edad (años)</b>	36.4 ± 9.4	34.8 ± 5.4	n.s.
<b>IMC ( kg/m2)</b>	44.7 ± 5.5	45.4 ± 4.2	n.s.
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	100.2 ± 12.2	109 ± 16.5	n.s.
<b>Triglicéridos ( mg/dL)</b>	131.8 (91.5-175.7)	136.0 (124.0-246.0)	n.s.
<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	180.7 ± 27.7	163.1 ± 36.3	n.s.
<b>HDL (mg/dL)</b>	38.0 ± 7.6	31.7 ± 8.1	0.029*
<b>Alanín aminotransferasa [ALT] (UI/L)</b>	22.0 (16.0-29.5)	40.0 (29.2-56.5)	0.005 *
<b>Aspartato aminotransferasa [AST] (UI/L)</b>	23.0 (18.5-43.0)	31.0 (26.5-69.2)	0.019*
<b>Gamma Glutamil Transferasa [GGT] (UI/L)</b>	21.0 (13.0-40.0)	29.0 (20.5-35.2)	n.s.
<b>Insulina (mg/dL)</b>	12.9 (7.7-16.0)	20.9 (9.5-31.2)	0.038*
<b>HOMA-IR</b>	3.0 (1.9-3.9)	5.0 (2.5-9.6)	0.056
<b>Triglicéridos hepáticos (mg triglicéridos/mg proteínas)</b>	1.16 ± 0.76	3.92 ± 2.41	0.0004*
<b>Colesterol total hepático (mg colesterol/mg proteínas)</b>	0.11 ± 0.05	0.17 ± 0.11	0.108*
<b>Colesterol libre hepático (mg colesterol/mg proteínas)</b>	0.08 ± 0.03	0.12 ± 0.07	0.060
<b>Fosfolípidos hepáticos (mg fosfolípidos/mg proteínas)</b>	0.47 ± 0.19	0.56 ± 0.30	n.s.

Datos presentados con Media ± Desviación estándar o Mediana (rango intercuartílico). Se aplicó prueba U de Mann-Whitney. \* Contraste con una p<0.05 y \*\* Contraste con p<0.001. Para n.s. significa no significativo.

## 9. REFERENCIAS

- Abdelmalek, Manal F., Ayako Suzuki, Cynthia Guy, Aynur Unalp-Arida, Ryan Colvin, Richard J. Johnson, Anna Mae Diehl, and for the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. 2010. "Increased Fructose Consumption Is Associated with Fibrosis Severity in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 51 (6): 1961–71. doi:10.1002/hep.23535.
- Anderson, Richard G. W. 2003. "Joe Goldstein and Mike Brown: From Cholesterol Homeostasis to New Paradigms in Membrane Biology." *Trends in Cell Biology* 13 (10): 534–39. doi:10.1016/j.tcb.2003.08.007.
- Araya, Julia, Ramón Rodrigo, Luis A. Videla, Lilian Thielemann, Myriam Orellana, Paulina Pettinelli, and Jaime Poniachik. 2004. "Increase in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid N-6/n-3 Ratio in Relation to Hepatic Steatosis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Clinical Science* 106 (6): 635–43.
- Arguello, Graciela, Elisa Balboa, Marco Arrese, and Silvana Zanlungo. 2015. "Recent Insights on the Role of Cholesterol in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852 (9): 1765–78. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.015.
- Bellentani, Stefano, and Mariano Marino. 2009. "Epidemiology and Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)." *Annals of Hepatology* 8 Suppl 1: S4–8.
- Bernard, S., S. Touzet, I. Personne, V. Lapras, P. J. Bondon, F. Berthezène, and P. Moulin. 2000. "Association between Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene Polymorphism and the Biological Features of Liver Steatosis in Patients with Type II Diabetes." *Diabetologia* 43 (8): 995–99. doi:10.1007/s001250051481.
- Brea Hernando, Angel, and José Puzo Foncillas. 2010. "Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular." *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 22 (6): 259–71. doi:10.1016/j.arteri.2010.10.004.
- Brindisi, Marie-Claude, Boris Guiu, Laurence Duvillard, Anne Athias, Fabien Rollot, Benjamin Bouillet, Maud Beacco, et al. 2012. "Liver Fat Content Is Associated with an Increase in Cholesterol Synthesis Independent of Statin Therapy Use in Patients with Type 2 Diabetes." *Atherosclerosis* 224 (2): 465–68. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.016.
- Brown, Andrew J., Elina Ikonen, and Vesa M. Olkkonen. 2014. "Cholesterol Precursors: More than Mere Markers of Biosynthesis." *Current Opinion in Lipidology* 25 (2): 133–39. doi:10.1097/MOL.0000000000000038.
- Browning, Jeffrey D., Lidia S. Szczepaniak, Robert Dobbins, Pamela Nuremberg, Jay D. Horton, Jonathan C. Cohen, Scott M. Grundy, and Helen H. Hobbs. 2004. "Prevalence of Hepatic Steatosis in an Urban Population in the United States: Impact of Ethnicity." *Hepatology* 40 (6): 1387–95. doi:10.1002/hep.20466.
- Brunt, Elizabeth M., Christine G. Janney, Adrian M. Di Bisceglie, Brent A. Neuschwander-Tetri, and Bruce R. Bacon. 1999. "Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions." *The American Journal of Gastroenterology* 94 (9): 2467–74. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.
- Caballero, Francisco, Anna Fernández, Antonio M. De Lacy, Jose C. Fernández-Checa, Juan Caballería, and Carmen García-Ruiz. 2009. "Enhanced Free Cholesterol, SREBP-2 and StAR Expression in Human NASH." *Journal of Hepatology* 50 (4): 789–96. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.016.
- Carulli, Lucia, Amedeo Lonardo, Silvia Lombardini, Giulio Marchesini, and Paola Loria. 2006. "Gender, Fatty Liver and GGT." *Hepatology* 44 (1): 278–79. doi:10.1002/hep.21218.
- Cohen, Jonathan C., Jay D. Horton, and Helen H. Hobbs. 2011. "Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights." *Science* 332 (6037): 1519–23. doi:10.1126/science.1204265.

- Day, Christopher P., and Oliver F. W. James. 1998. "Steatohepatitis: A Tale of Two 'hits'?" *Gastroenterology* 114 (4): 842–45. doi:10.1016/S0016-5085(98)70599-2.
- DeBose-Boyd, Russell A. 2008. "Feedback Regulation of Cholesterol Synthesis: Sterol-Accelerated Ubiquitination and Degradation of HMG CoA Reductase." *Cell Research* 18 (6): 609–21. doi:10.1038/cr.2008.61.
- De Ridder, R. J. J., E. J. Schoon, J. F. Smulders, G. C. M. Van Hout, R. W. Stockbrügger, and G. H. Koek. 2007. "Review Article: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Morbidly Obese Patients and the Effect of Bariatric Surgery." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 26 (December): 195–201. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03483.x.
- Dixon, John B., Prithi S. Bhathal, and Paul E. O'Brien. 2001. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese." *Gastroenterology* 121 (1): 91–100. doi:10.1053/gast.2001.25540.
- Fon Tacer, Klementina, and Damjana Rozman. 2011. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on Lipoprotein and Lipid Deregulation." *Journal of Lipids* 2011. doi:10.1155/2011/783976.
- Franzini, Maria, Irene Fornaciari, Vanna Fierabracci, Hassan Aziz Elawadi, Valeria Bolognesi, Simona Maltinti, Angelo Ricchiuti, et al. 2012. "Accuracy of B-GGT Fraction for the Diagnosis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Liver International* 32 (4): 629–34. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02673.x.
- Gan, Lay T., Derrick M. Van Rooyen, Mark E. Koina, Robert S. McCuskey, Narcissus C. Teoh, and Geoffrey C. Farrell. 2014. "Hepatocyte Free Cholesterol Lipotoxicity Results from JNK1-Mediated Mitochondrial Injury and Is HMGB1 and TLR4-Dependent." *Journal of Hepatology* 61 (6): 1376–84. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.024.
- Gill, Saloni, Julian Stevenson, Ika Kristiana, and Andrew J. Brown. 2011. "Cholesterol-Dependent Degradation of Squalene Monooxygenase, a Control Point in Cholesterol Synthesis beyond HMG-CoA Reductase." *Cell Metabolism* 13 (3): 260–73. doi:10.1016/j.cmet.2011.01.015.
- Hooper, Amanda J., Leon A. Adams, and John R. Burnett. 2011. "Genetic Determinants of Hepatic Steatosis in Man." *Journal of Lipid Research* 52 (4): 593–617. doi:10.1194/jlr.R008896.
- Huang, Yongcheng, Shaoqing He, John Zhong Li, Young-Kyo Seo, Timothy F. Osborne, Jonathan C. Cohen, and Helen H. Hobbs. 2010. "A Feed-Forward Loop Amplifies Nutritional Regulation of PNPLA3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17): 7892–97. doi:10.1073/pnas.1003585107.
- Ikonen, Elina. 2008. "Cellular Cholesterol Trafficking and Compartmentalization." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2): 125–38. doi:10.1038/nrm2336.
- Kantartzis, Konstantinos, Andreas Peter, Fausto Machicao, Jürgen Machann, Silvia Wagner, Ingmar Königsrainer, Alfred Königsrainer, et al. 2009. "Dissociation Between Fatty Liver and Insulin Resistance in Humans Carrying a Variant of the Patatin-Like Phospholipase 3 Gene." *Diabetes* 58 (11): 2616–23. doi:10.2337/db09-0279.
- Kleiner, David E., Elizabeth M. Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J. Contos, Oscar W. Cummings, Linda D. Ferrell, et al. 2005. "Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 41 (6): 1313–21. doi:10.1002/hep.20701.
- Larrieta-Carrasco, Elena, Victor Acuña-Alonzo, Rafael Velázquez-Cruz, Rodrigo Barquera-Lozano, Paola León-Mimila, Hugo Villamil-Ramírez, Marta Menjivar, et al. 2014. "PNPLA3 I148M Polymorphism Is Associated with Elevated Alanine Transaminase Levels in Mexican Indigenous and Mestizo Populations." *Molecular Biology Reports* 41 (7): 4705–11. doi:10.1007/s11033-014-3341-0.
- Lazic, Milos, Maria Eugenia Inzaugarat, Davide Povero, Iris C. Zhao, Mark Chen, Madlena Nalbandian, Yury I. Miller, Alejandra C. Cherňavsky, Ariel E. Feldstein, and Dorothy D. Sears. 2014. "Reduced Dietary Omega-6 to Omega-3 Fatty Acid Ratio and 12/15-

- Lipoxygenase Deficiency Are Protective against Chronic High Fat Diet-Induced Steatohepatitis." *PLoS ONE* 9 (9): e107658. doi:10.1371/journal.pone.0107658.
- Lazo, Mariana, and Jeanne Clark. 2008. "The Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Global Perspective." *Seminars in Liver Disease* 28 (04): 339–50. doi:10.1055/s-0028-1091978.
- Lazo, Mariana, Ruben Hernaez, Mark S. Eberhardt, Susanne Bonekamp, Ihab Kamel, Eliseo Guallar, Ayman Koteish, Frederick L. Brancati, and Jeanne M. Clark. 2013. "Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States: The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994." *American Journal of Epidemiology* 178 (1): 38–45. doi:10.1093/aje/kws448.
- León-Mimila, Paola, Joel Vega-Badillo, Roxana Gutiérrez-Vidal, Hugo Villamil-Ramírez, Teresa Villareal-Molina, Elena Larrieta-Carrasco, Blanca E. López-Contreras, et al. 2015. "A Genetic Risk Score Is Associated with Hepatic Triglyceride Content and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mexicans with Morbid Obesity." *Experimental and Molecular Pathology* 98 (2): 178–83. doi:10.1016/j.yexmp.2015.01.012.
- Levene, Adam P, and Robert D Goldin. 2012. "The Epidemiology, Pathogenesis and Histopathology of Fatty Liver Disease." *Histopathology* 61 (2): 141–52. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04145.x.
- Loomba, Rohit, and Arun J. Sanyal. 2013. "The Global NAFLD Epidemic." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 10 (11): 686–90. doi:10.1038/nrgastro.2013.171.
- Luu, Winnie, Gene Hart-Smith, Laura J. Sharpe, and Andrew J. Brown. 2015. "The Terminal Enzymes of Cholesterol Synthesis, DHCR24 and DHCR7, Interact Physically and Functionally." *Journal of Lipid Research* 56 (4): 888–97. doi:10.1194/jlr.M056986.
- Mackay, Dylan S., and Peter J. H. Jones. 2012. "Plasma Noncholesterol Sterols: Current Uses, Potential and Need for Standardization." *Current Opinion in Lipidology* 23 (3): 241–47. doi:10.1097/MOL.0b013e328353292e.
- Marchesini, Giulio, Mara Brizi, Giampaolo Bianchi, Sara Tomassetti, Elisabetta Bugianesi, Marco Lenzi, Arthur J. McCullough, Stefania Natale, Gabriele Forlani, and Nazario Melchionda. 2001. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease A Feature of the Metabolic Syndrome." *Diabetes* 50 (8): 1844–50. doi:10.2337/diabetes.50.8.1844.
- Matteoni, Christi A., Zobair M. Younossi, Terry Gramlich, Navdeep Boparai, Yao Chang Liu, and Arthur J. McCullough. 1999. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Spectrum of Clinical and Pathological Severity." *Gastroenterology* 116 (6): 1413–19. doi:10.1016/S0016-5085(99)70506-8.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner. 1985. "Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man." *Diabetologia* 28 (7): 412–19. doi:10.1007/BF00280883.
- M. BRUNT, ELIZABETH, and DINA G. TINIAKOS. 2009. "CHAPTER 41 - Fatty Liver Disease." In *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas (Second Edition)*, edited by ROBERT D. ODZEJOHN R. GOLDBLUM, 1087–1114. Philadelphia: W.B. Saunders. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416040590500448>.
- Miettinen, T. A., H. Gylling, and M. J. Nissinen. 2011. "The Role of Serum Non-Cholesterol Sterols as Surrogate Markers of Absolute Cholesterol Synthesis and Absorption." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 21 (10): 765–69. doi:10.1016/j.numecd.2011.05.005.
- Miettinen, Tatu A. 1969. "Serum Squalene and Methyl Sterols as Indicators of Cholesterol Synthesis in Vivo." *Life Sciences* 8 (14, Part 2): 713–21. doi:10.1016/0024-3205(69)90007-1.

- Min, Hae-Ki, Ashwani Kapoor, Michael Fuchs, Faridoddin Mirshahi, Huiping Zhou, James Maher, John Kellum, Russell Warnick, Melissa J Contos, and Arun J. Sanyal. 2012. "INCREASED HEPATIC SYNTHESIS AND DYSREGULATION OF CHOLESTEROL METABOLISM IS ASSOCIATED WITH THE SEVERITY OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE." *Cell Metabolism* 15 (5): 665–74. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.004.
- Mofrad, Pouneh, Melissa J. Contos, Mahmudul Haque, Carol Sargeant, Robert A. Fisher, Velimir A. Luketic, Richard K. Sterling, Mitchell L. Shiffman, Richard T. Stravitz, and Arun J. Sanyal. 2003. "Clinical and Histologic Spectrum of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Normal ALT Values." *Hepatology* 37 (6): 1286–92. doi:10.1053/jhep.2003.50229.
- Moore, J. Bernadette. 2010. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Hepatic Consequence of Obesity and the Metabolic Syndrome." *Proceedings of the Nutrition Society* 69 (02): 211–20. doi:10.1017/S0029665110000030.
- Musso, Giovanni, Maurizio Cassader, and Roberto Gambino. 2011. "Cholesterol-Lowering Therapy for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Update." *Current Opinion in Lipidology* 22 (6): 489–96. doi:10.1097/MOL.0b013e32834c37ee.
- Musso, Giovanni, Roberto Gambino, Franco De Michieli, Maurizio Cassader, Mario Rizzetto, Marilena Durazzo, Emanuela Fagà, Barbara Silli, and Gianfranco Pagano. 2003. "Dietary Habits and Their Relations to Insulin Resistance and Postprandial Lipemia in Nonalcoholic Steatohepatitis." *Hepatology* 37 (4): 909–16. doi:10.1053/jhep.2003.50132.
- Neuschwander-Tetri, Brent A. 2010. "Hepatic Lipotoxicity and the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: The Central Role of Nontriglyceride Fatty Acid Metabolites." *Hepatology* 52 (2): 774–88. doi:10.1002/hep.23719.
- Nomura, Hideyuki, Seizaburo Kashiwagi, Jun Hayashi, Wataru Kajiyama, Shunichi Tani, and Masashi Goto. 1988. "Prevalence of Fatty Liver in a General Population of Okinawa, Japan." *Japanese Journal of Medicine* 27 (2): 142–49. doi:10.2169/internalmedicine1962.27.142.
- Ong, Janus P., Hazem Elariny, Rochelle Collantes, Abraham Younoszai, Vikas Chandhoke, H. David Reines, Zachary Goodman, and Zobair M. Younossi. 2005. "Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Advanced Fibrosis in Morbidly Obese Patients." *Obesity Surgery* 15 (3): 310–15. doi:10.1381/0960892053576820.
- Papandreou, Dimitrios, Israel Rousso, and Ioannis Mavromichalis. 2007. "Update on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children." *Clinical Nutrition* 26 (4): 409–15. doi:10.1016/j.clnu.2007.02.002.
- Petersen, Kitt Falk, Sylvie Dufour, Ali Hariri, Carol Nelson-Williams, Jia Nee Foo, Xian-Man Zhang, James Dziura, Richard P. Lifton, and Gerald I. Shulman. 2010. "Apolipoprotein C3 Gene Variants in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *New England Journal of Medicine* 362 (12): 1082–89. doi:10.1056/NEJMoa0907295.
- Prabhu, Anika V., Laura J. Sharpe, and Andrew J. Brown. 2014. "The Sterol-Based Transcriptional Control of Human 7-Dehydrocholesterol Reductase (DHCR7): Evidence of a Cooperative Regulatory Program in Cholesterol Synthesis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (10): 1431–39. doi:10.1016/j.bbailip.2014.07.006.
- Puri, Puneet, Rebecca A. Baillie, Michelle M. Wiest, Faridoddin Mirshahi, Jayanta Choudhury, Onpan Cheung, Carol Sargeant, Melissa J. Contos, and Arun J. Sanyal. 2007. "A Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 46 (4): 1081–90. doi:10.1002/hep.21763.
- Romeo, Stefano, Julia Kozlitina, Chao Xing, Alexander Pertsemlidis, David Cox, Len A. Pennacchio, Eric Boerwinkle, Jonathan C. Cohen, and Helen H. Hobbs. 2008. "Genetic Variation in PNPLA3 Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Nature Genetics* 40 (12): 1461–65. doi:10.1038/ng.257.

- Sharpe, Laura J., and Andrew J. Brown. 2013. "Controlling Cholesterol Synthesis beyond 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR)." *Journal of Biological Chemistry* 288 (26): 18707–15. doi:10.1074/jbc.R113.479808.
- Simonen, Marko, Ville Männistö, Joel Leppänen, Dorota Kaminska, Vesa Kärjä, Sari Venesmaa, Pirjo Käkelä, et al. 2013. "Desmosterol in Human Nonalcoholic Steatohepatitis." *Hepatology* 58 (3): 976–82. doi:10.1002/hep.26342.
- Simonen, Piia, Anna Kotronen, Maarit Hallikainen, Ksenia Sevastianova, Janne Makkonen, Antti Hakkarainen, Nina Lundbom, Tatu A. Miettinen, Helena Gylling, and Hannele Yki-Järvinen. 2011. "Cholesterol Synthesis Is Increased and Absorption Decreased in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Independent of Obesity." *Journal of Hepatology* 54 (1): 153–59. doi:10.1016/j.jhep.2010.05.037.
- Stepanova, Maria, Noreen Hossain, Arian Afendy, Kellie Perry, Zachary D. Goodman, Ancha Baranova, and Zobair Younossi. 2010. "Hepatic Gene Expression of Caucasian and African-American Patients with Obesity-Related Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Obesity Surgery* 20 (5): 640–50. doi:10.1007/s11695-010-0078-2.
- Tilg, Herbert, and Alexander R. Moschen. 2010. "Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis." *Hepatology* 52 (5): 1836–46. doi:10.1002/hep.24001.
- Tiniakos, Dina G., Miriam B. Vos, and Elizabeth M. Brunt. 2010. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5 (1): 145–71. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102132.
- T. J. Lohman, A. F. Roache. 1992. "Anthropometric Standardization Reference Manual." *Medicine and Science in Sports and Exercise - MED SCI SPORT EXERCISE* 24 (8). doi:10.1249/00005768-199208000-00020.
- Toshimitsu, Kumiko, Bunzo Matsuura, Ikuko Ohkubo, Tetsuji Niiya, Shinya Furukawa, Yoichi Hiasa, Mieko Kawamura, Kiyoshi Ebihara, and Morikazu Onji. 2007. "Dietary Habits and Nutrient Intake in Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Nutrition* 23 (1): 46–52. doi:10.1016/j.nut.2006.09.004.
- Trojak, Aleksandra, Malgorzata Walus-Miarka, Ewa WoYniakiewicz, Maciej T. Malecki, and Barbara Idzior-Walus. 2013. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with Low HDL Cholesterol and Coronary Angioplasty in Patients with Type 2 Diabetes." *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 19 (December): 1167–72. doi:10.12659/MSM.889649.
- Tziomalos, Konstantinos. 2014. "Lipid-Lowering Agents in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *World Journal of Hepatology* 6 (10): 738. doi:10.4254/wjh.v6.i10.738.
- Van Rooyen, Derrick M, Claire Z Larter, W Geoffrey Haigh, Matthew M Yeh, George Ioannou, Rahul Kuver, Sum P Lee, Narci C Teoh, and Geoffrey C Farrell. 2011. "Hepatic Free Cholesterol Accumulates in Obese, Diabetic Mice and Causes Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Gastroenterology* 141 (4): 1393–1403.e5. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.040.
- Wieckowska, Anna, Arthur J. McCullough, and Ariel E. Feldstein. 2007. "Noninvasive Diagnosis and Monitoring of Nonalcoholic Steatohepatitis: Present and Future." *Hepatology* 46 (2): 582–89. doi:10.1002/hep.21768.
- Williams, Christopher D., Joel Stengel, Michael I. Asike, Dawn M. Torres, Janet Shaw, Maricela Contreras, Cristy L. Landt, and Stephen A. Harrison. 2011. "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 (1): 124–31. doi:10.1053/j.gastro.2010.09.038.
- Willner, Ira R., Bradford Waters, S. Raj Patil, Adrian Reuben, Joseph Morelli, and Caroline A. Riely. 2001. "Ninety Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis: Insulin Resistance, Familial



- Tendency, and Severity of Disease." *The American Journal of Gastroenterology* 96 (10): 2957–61. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.04667.x.
- Wong, V. W.-S., G. L.-H. Wong, S. W.-C. Tsang, A. Y. Hui, A. W.-H. Chan, P. C.-L. Choi, A. M.-L. Chim, et al. 2009. "Metabolic and Histological Features of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients with Different Serum Alanine Aminotransferase Levels." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 29 (4): 387–96. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03896.x.
- Wree, Alexander, Lori Broderick, Ali Canbay, Hal M. Hoffman, and Ariel E. Feldstein. 2013. "From NAFLD to NASH to Cirrhosis—new Insights into Disease Mechanisms." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 10 (11): 627–36. doi:10.1038/nrgastro.2013.149.
- Yao, Pin Mei, and Ira Tabas. 2000. "Free Cholesterol Loading of Macrophages Induces Apoptosis Involving the Fas Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 275 (31): 23807–13. doi:10.1074/jbc.M002087200.
- Zerenturk, Eser J., Laura J. Sharpe, Elina Ikonen, and Andrew J. Brown. 2013. "Desmosterol and DHCR24: Unexpected New Directions for a Terminal Step in Cholesterol Synthesis." *Progress in Lipid Research* 52 (4): 666–80. doi:10.1016/j.plipres.2013.09.002.