

MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO Y SÍNDROME METABÓLICO

Experimental animal models of fatty liver disease and metabolic syndrome

Ayala I. ^{1*}, Cámara P. ¹, Fernández-Pardo J. ², Flores I. ³, Cascales A. I. ³, Gutiérrez Panizo C. ¹, Valdés M. ³, Castells M. T. ⁴, García Pérez B. ³

¹Dpto. Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo s/n. España. ²Hospital Reina Sofía, Avda. Intendente Jorge Palacios, 1. Murcia, España. ³Hospital Virgen de la Arrixaca. Crtra. Madrid-Cartagena s/n. Murcia. España. ⁴Dpto. Biología Celular. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo s/n. España.

*Autor para correspondencia: Ignacio Ayala. Tel. 968-367070, Fax 968-364147, E-mail: iayape@um.es

RESUMEN

Los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a la enfermedad del hígado graso, sus características histológicas y ensayo de nuevas terapias. Una gran parte de los trabajos se desarrollan en roedores (ratones y ratas principalmente), dada su similitud biológica con el hombre y el gran conocimiento que se tiene a todos los niveles (genético, molecular, enzimático...) de estas especies. Por su facilidad de desarrollar los procesos de esteatosis hepática también destacan las aves. En este trabajo se describen los principales modelos de enfermedad del hígado graso en diversas especies animales, y las formas de inducción de enfermedad. Básicamente, el excesivo acúmulo de grasa en hígado puede ser consecuencia de aporte elevado de grasa, aumento de la síntesis grasa, oxidación reducida, y/o reducción de su salida en forma de VLDL. Así, se describen modelos basados en alteraciones genéticas (animales transgénicos o bien mutaciones naturales) que incrementan la lipogénesis, otros que dificultan la eliminación de grasa hepática (genes que regulan la oxidación de ácidos grasos), inducción mediante dietas que dan lugar a obesidad (ricas en fructosa, sacarosa, grasas, dietas aterogénicas) o bien sin producir obesidad (dietas deficientes en arginina o ricas en fructosa y grasas), tóxicos que incrementan la lipogénesis hepática, o factores que disminuyen la oxidación de ácidos grasos (como dietas deficientes en colina o metionina, administración de estrógenos, glucocorticoides o ciertos tóxicos). Se describen por último modelos aviares inducidos por la dieta.

Palabras clave: enfermedad hígado graso, modelos experimentales animales.

ABSTRACT

Animal models are important tools for the study of fatty liver disease, mainly related to physiopathology, pathology and therapeutical trials. Most studies have been developed in rodents (usually in mice and rats), because of biological similarities with humans, and also because of the deep knowledge (genetics, molecular, enzymatic...) of these species. Hepatic steatosis is also easily developed in avian species. We describe the most used animal models of fatty liver disease, and the several means of disease induction. Basically, excessive fat accumulation in the liver can occur as a result of increased fat delivery, increased fat synthesis, reduced fat oxidation, and/or reduced fat export in the form of VLDL. Several animal models of hepatic steatosis are described: genetically engineered animals or spontaneous mutations, which increase lipogenesis; others show reduced fatty acid oxidation, and therefore interfere fat elimination; induction by diets producing obesity: high content in fructose, sacarose, fat, and atherogenic diets; induction by diets which don't produce obesity (arginine deficient diets), toxic agents which increase hepatic lipogenesis, or factors inducing a decrease of fatty acid oxidation such as choline / methionine deficient diets, strogens and glucocorticoids administration, or toxic agents. Diet-induced avian models are also described.

Key words: fatty liver disease, experimental animal models.

INTRODUCCION

A medida que la obesidad aumenta su frecuencia en las sociedades industrializadas (se estima en un 15 % de la población en España), aumenta la incidencia de alteraciones metabólicas asociadas, como la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina, la hiperlipidemia y la hipertensión, todos ellos factores de riesgo de la arteriosclerosis. Al conjunto de todos estos trastornos se le denomina actualmente síndrome metabólico, y los individuos que lo padecen tienen mayores probabilidades de sufrir diabetes mellitus tipo 2, infartos, accidentes cerebrovasculares, y el doble de posibilidades de morir (Vázquez Carrera, 2007; Rector et al., 2008).

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se asocia comúnmente con obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Dicha enfermedad es un componente importante del síndrome metabólico. No existe actualmente ningún tratamiento aceptado para la EHGNA, solamente cambios en el estilo de vida (dieta, disminución de peso, y ejercicio). Se consideran prometedores los agentes terapéuticos que restauran la sensibilidad a la insulina, como el grupo de las tiazolidinedionas, antidiabéticos orales que mejoran la sensibilidad a la insulina al ser agonistas selectivos de

los PPAR γ nucleares (receptores activados por proliferadores peroxisómicos gamma, presentes principalmente en tejido adiposo).

Los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a la EHGNA, sus características histológicas y ensayar nuevas terapias. Una gran parte de los trabajos se desarrollan en roedores (ratones y ratas principalmente), dada su similitud biológica con el hombre y el gran conocimiento que se tiene a todos los niveles (genético, molecular, enzimático...) de estas especies. Por su facilidad de desarrollar los procesos de esteatosis hepática también destacan las aves. A continuación se exponen los principales modelos de esteatosis hepática en diversas especies animales, y las formas de inducción de enfermedad. Básicamente, el excesivo acúmulo de grasa en hígado puede ser consecuencia de aporte elevado de grasa, aumento de la síntesis grasa, oxidación reducida, y/o reducción de su salida en forma de VLDL (Postic y Girard, 2008). El excesivo acúmulo de triglicéridos en hígado se debe generalmente a un aporte aumentado de ácidos grasos no esterificados de tejido adiposo periférico o al aumento de la síntesis lipídica en el propio hígado (Lewis et al., 2002). El desarrollo (posterior o simultáneo) de esteatohe-

patitis parece requerir un daño adicional (como estrés oxidativo, o predisposición genética) lo que da lugar a una respuesta inflamatoria, y posible fibrosis (London y George, 2007). Es decir, la patogenia de la esteatohepatitis no alcohólica se explicaría por la “teoría del doble impacto” (Day y James, 1998), siendo el primero el acúmulo de triglicéridos en hígado, y el segundo un daño adicional como inflamación o estrés oxidativo, siendo la teoría más aceptada actualmente (Schreuder et al., 2008; Scott et al., 2008) (Fig. 1).

Simplificando, podemos distinguir dos grandes grupos de modelos animales: los inducidos por agentes externos (sea la dieta, fármacos o toxinas) o los que son resultado de modificaciones genéticas (espontáneas o artificiales). A veces se combinan ambos tipos.

ALTERACIONES GENÉTICAS QUE INCREMENTAN LA LIPOGÉNESIS

La capacidad de modificar genéticamente modelos animales, mediante la sobreexpresión o eliminación de genes específicos, o aprovechar mutaciones naturales, ofrece una vía más para descifrar los mecanismos asociados al desarrollo de la EHGA. Como desventaja, mencionar su obtención más dificultosa y los mayores costes económicos de adquisición y mantenimiento de colonias animales para estudios a largo plazo.

1. Sobre-expresión de genes que promueven la lipogénesis

Ratones PEPCK-NSREBP-1 α

El SREBP-1 (proteína de unión a elemento regulador de esterol) es un factor que activa la transcripción de varios genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol. Su expresión se lleva a cabo por un promotor, el PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxikinasa). Ratones transgénicos que sobreexpresan nSRE-

BP-1 α de manera específica en los hepatocitos desarrollan hígado graso, con un agrandamiento progresivo y masivo del hígado, debido al acúmulo en los hepatocitos de colesterol y triglicéridos (Shimano et al., 1996).

2. Mutaciones ocurridas naturalmente que producen lipogénesis hepática

Ratones OB/OB

Estos ratones presentan una mutación natural que impide la síntesis de leptina, una hormona saciante que inhibe la conducta alimentaria e incrementa el gasto energético. La leptina es sintetizada predominantemente por el tejido adiposo blanco y ejerce su mayor efecto anorexígeno actuando sobre las neuronas del núcleo ventral medial del hipotálamo. Debido a que los ratones ob/ob pierden la leptina, tienen hiperfagia y se hacen obesos (Pellemounter et al., 1995). Los ratones ob/ob obesos presentan además hiperinsulinemia, hiperglucemia (ejemplo de resistencia a la insulina) e hiperlipidemia. Desarrollan hígado graso espontáneamente cuando se alimentan con dieta normal. La inyección diaria intraperitoneal con la proteína recombinante OB baja el peso, el porcentaje de grasa, la ingesta y las concentraciones séricas de glucosa e insulina (Pellemounter et al., 1995).

CAUSAS GENÉTICAS QUE DIFICULTAN LA ELIMINACIÓN DE GRASA HEPÁTICA

1. Delección de genes que regulan la oxidación de ácidos grasos

Ratones PPAR α -/-

El PPAR α (receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa) es un factor hepático que regula la transcripción de genes implicados en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, por ello modula la producción de ATP en tejidos tales como el corazón y el hígado que se libera

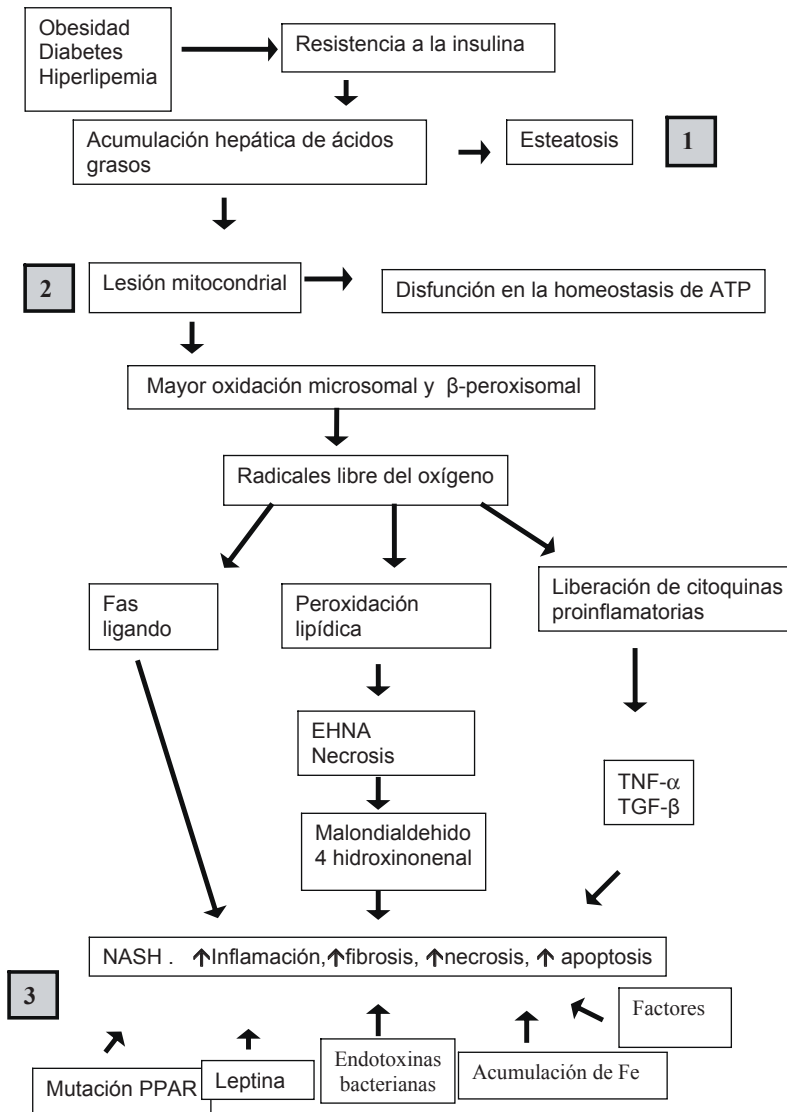


Figura 1. Esquema de la patogenia de la EGHNA.

Primer impacto (1): Como consecuencia de la resistencia a la insulina asociada a DM, obesidad e hiperlipemia se produce acúmulo de AG en el hígado e incremento de la β -oxidación, alteración en la homeostasis de ATP, lesión mitocondrial y aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO); todo ello da lugar al estrés oxidativo y con ello al *Segundo impacto (2)*: Las consecuencias del estrés oxidativo sobre las células son múltiples. Determinan la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, la degeneración y necrosis de las células, la muerte de estas por apoptosis, la expresión de citoquinas proinflamatorias y la activación de las células estrelladas del hígado que dan lugar a la fibrogénesis. *Otros factores (3)* entre los que se encuentran las endotoxinas bacterianas procedentes del intestino, la leptina, la mutación de los PPAR y factores genéticos también participan en la lesión hepática. PPAR (receptores del peroxisoma proliferante activado), TNF- α (factor de necrosis tumoral α), ATP (adenosín trifosfato).

en la oxidación de ácidos grasos en forma de energía. Se han generado ratones con disrupción genética del PPAR- α . Cuando estos animales se someten al estrés, como por ejemplo un ayuno de 24 horas o ingesta de una dieta rica en grasas varias semanas, que incrementa la liberación de ácidos grasos hacia el hígado, estos desarrollan esteatosis hepática masiva. Esto ocurre a pesar de la disminución de la entrada hepática de ácidos grasos y secreción de VLDL normal y es más frecuentemente resultado de una disminución en la oxidación de ácidos grasos hepática (Kersten et al., 1999). Si existe gran cantidad de tejido adiposo, se promueve el desarrollo del hígado graso, al igual que ocurre en la especie humana (Van Steenberg y Lanckmans, 1995). El peso de los hígados de los ratones PPAR α $-/-$ alimentados con una dieta grasa resultó un 22% más elevado que el de ratones normales alimentados con la misma dieta. Ello demuestra la alta sensibilidad de los ratones PPAR α $-/-$ a las dietas grasas y al desarrollo de esteatosis hepática (Kersten et al., 1999). Otros estudios demuestran que una terapia de 7 meses con agonistas PPAR, especialmente los alfa, mejora los parámetros bioquímicos e histológicos en ratas afectadas de enfermedad del hígado graso (Seo et al. 2008).

Ratones Acil- CoA oxidasa $-/-$

La acil-CoA oxidasa es la primera enzima que participa en la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos. Se han producido ratones con la delección genética de esta enzima, que desarrollan esteatosis hepática masiva y hepatomegalia a los dos meses del nacimiento (Fan et al., 1996).

Ratones con déficit de aromatasa

Aunque la aromatasa no está directamente implicada en la oxidación de los ácidos grasos, una delección en el gen de la aromatasa (cyp19) por recombinación homóloga en rato-

nes hembra C57BL/6J da lugar a un fenotipo que incluye la esteatosis hepática (Nemoto et al., 2000). La aromatasa es una enzima clave en la síntesis de estrógenos, por ello los ratones hembra aromatasa $-/-$ tienen una pérdida intrínseca de la producción de estrógenos. Los ratones crecen normalmente durante los primeros dos meses y entonces aparece una acumulación gradual de grasa abdominal y esteatosis hepática microvesicular en las zonas 2 y 3, aunque los hepatocitos de la zona periportal suelen estar preservados. El mecanismo de la esteatosis hepática en ratones hembra aromatasa $-/-$ implica una alteración en la β -oxidación hepática de los ácidos grasos. De hecho, la esteatosis hepática disminuye en estos animales si se tratan con 17β -estradiol. Ello demuestra el importante papel de los estrógenos en la expresión de genes relacionados con la β -oxidación y en el mantenimiento de la homeostasis lipídica en el hígado (Nemoto et al., 2000).

Ratones con déficit de PTEN

Watanabe et al. (2007) han desarrollado ratones deficientes en fosfatasa hepato-específica y homólogo de la tensina (PTEN), los cuales desarrollan hepatomegalia masiva y esteatohepatitis (a las 10 semanas) con acúmulo de triglicéridos, seguidos de fibrosis hepática (no se observa hasta las 35-40 semanas de edad) y carcinoma hepatocelular (a las 74-78 semanas), es decir, con un fenotipo similar a la esteatohepatitis no alcohólica de los humanos. Dicho modelo podría ser válido para estudios no solo referentes a la patogenia del proceso, sino a su desarrollo y uso de posibles terapias.

2. Ratones ApoE $-/-$ y LDLr $-/-$ usados como modelos de arteriosclerosis

La arteriosclerosis se desarrolla por el acúmulo de lípidos y fenómenos inflamatorios. Los modelos experimentales más usados son los ratones deficientes en apoE (apolipoproteína E)

y LDL, que desarrollan espontáneamente arteriosclerosis, ya que carecen de estos factores, esenciales en el transporte y metabolismo de los lípidos. Como consecuencia, desarrollan un perfil lipídico anormal que al poco tiempo da lugar a arteriosclerosis. Las dietas ricas en colesterol aceleran el proceso, y a la vez, inducen alteraciones hepáticas, como inflamación y esteatosis, que resultan máximas a las 16 semanas en ambos tipos de ratones, si bien en los LDL^{-/-} las lesiones cobraban más entidad, además de ser más obesos y presentar mayor resistencia a la insulina (Joven et al., 2007).

3. Mutaciones ocurridas naturalmente que inhiben la β -oxidación de ácidos grasos

Este proceso ocurre en la esteatosis visceral juvenil en ratones (SVJ). La carnitina es requerida para el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria para la β -oxidación mitocondrial. Los ratones con SVJ son un modelo de déficit sistémico de carnitina que desarrollan esteatosis hepática (Miyagawa et al., 1995).

FACTORES AMBIENTALES QUE CAUSAN INCREMENTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

1. Dietas que inducen obesidad

Dietas ricas en fructosa y sacarosa

Diversos estudios en humanos muestran que las dietas que contienen alta cantidad de sacarosa y fructosa, pueden, en ciertas condiciones, conducir a hipertrigliceridemia (Frayn y Kingman, 1995). El efecto de la sacarosa se atribuye a su contenido en fructosa. La fructosa promueve la síntesis hepática de triacilglicerol y su liberación en plasma en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las ratas macho Wistar son muy vulnerables al hígado graso inducido por la fructosa, y se las considera un modelo aceptado de síndrome metabólico. Cuando se alimentan con fructosa 10% la síntesis

hepática de ácidos grasos y la esterificación se incrementan significativamente (Kok et al., 1996). Otras manipulaciones dietéticas, tales como la reducción en colina, cobre o selenio potencian la severidad del hígado graso inducido con fructosa. Por ejemplo con la alimentación de dietas ricas en sacarosa (54%) que sean además deficitarias en colina (0,05%) durante seis meses aparecen en la mayor parte de las ratas adultas degeneración grasa perivenosa y fibrosis hepática. Los suplementos de colina no revierten estos cambios completamente pero parecen mejorar la lesión perivenosa (Poulsom, 1986).

Dietas ricas en grasas

Cuando los ratones C57BL/6J son alimentados con una dieta que contiene un 45 % de grasa durante 4-15 semanas se hacen obesos, al ser comparados con ratones alimentados con dieta normal en grasas; presentan un incremento de además de la masa grasa total, de siete veces los niveles circulantes de leptina, dos veces la insulina y un 40% de los niveles de triglicéridos. Los niveles hepáticos de triglicéridos se incrementan cerca del doble y la expresión hepática de SREBP-1c (proteína de unión a elemento regulador del estero) se incrementa unas tres veces con inducción de las enzimas lipogénicas. Así pues, la hiperleptinemia y secundariamente la leptina-resistencia y la hiperinsulinemia parecen contribuir al hígado graso que se desarrolla durante el uso de dietas que inducen obesidad. La resistencia a la leptina, fenómeno también presente en humanos obesos, parece venir dada por el defecto en el acceso a los sitios de acción en el hipotálamo y por la alteración en las señales intracelulares que se desarrollan en respuesta a la leptina en neuronas del hipotálamo (El-Haschimi et al., 2000).

También el uso de nutrición enteral total (infusión intragástrica) durante 65 días en ratas Sprague-Dawley sobrealimentadas con dietas grasas poliinsaturadas al 70 % da lugar a es-

teatosis, infiltración de macrófagos, apoptosis y necrosis focal, además de cambios bioquímicos, que reproducen los procesos clínicos de esteatohepatitis no alcohólica (Baumgardner et al., 2008). Utilizando el mismo tipo de ratas, y dietas con alto contenido en grasa, Zou et al. (2006) demostraron no sólo obesidad y altos niveles de transaminasas, sino además hiperinsulinemia, hiperglucemia y resistencia a la insulina.

2. Dietas aterogénicas

Puesto que la esteatohepatitis no alcohólica se ha correlacionado con enfermedades cardiovasculares, diversos autores han investigado el uso de dietas aterogénicas para reproducir la patología de la esteatohepatitis. Así Matsuzawa et al. (2007) demostraron lesiones precirróticas de esteatohepatitis tras 24 semanas de suministro de una dieta aterogénica a ratones. Si se le añadía un componente rico en grasa a la dieta se presentaba resistencia a la insulina y se aceleraba el proceso de esteatohepatitis.

3. Dietas que inducen lipogénesis hepática sin obesidad

Dietas deficitarias en arginina

Las ratas macho Sprague-Dawley alimentadas con una dieta deficitaria en arginina durante 21 días tienen significativamente disminuida la ganancia de masa corporal pero aumentado el índice de biosíntesis lipídica hepática y la excreción urinaria de ácido orótico y desarrollan marcadamente hígado graso independientemente de su edad (Milner y Hassan, 1981). Las dietas deficitarias en arginina producen una gran reducción del contenido hepático de ATP en las ratas (52%), hamsters (38%) o conejos (27%). Al parecer, el mecanismo por el cual el déficit de arginina conduce a esteatosis hepática en los ratones sería un anormal metabolismo del ácido orótico.

Dietas ricas en sacarosa/grasas.

Ratones adultos macho CD1 alimentados con una dieta aterogénica e hipercolesterolémica (20% de grasas de origen animal, 53% de sacarosa y 2% de colesterol) ganan menos peso que el control pero desarrollan ampliamente hígado graso (Loria et al., 1976).

4. Toxinas que inducen lipogénesis hepática

La ingesta crónica de etanol causa esteatosis hepática en ratones, ratas, babuinos y humanos. El mecanismo por el cual el etanol induce hígado graso se debe a la disminución hepática del índice redox $NAD^+ / NADH$, resultado del metabolismo del etanol. La relativa acumulación de $NADH$ estimula la actividad de las enzimas lipogénicas favoreciendo la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. Además la exposición crónica al etanol inhibe la liberación de triglicéridos VLDL desde el hígado. La edad y el sexo influyen en los índices de eliminación del etanol. En ratones F344 machos, pero no en hembras, los índices de eliminación de etanol disminuyen significativamente con la edad. La edad se relaciona con la disminución hepática citoplasmática (pero no mitocondrial) del índice $NAD^+ / NADH$ que limita la disponibilidad de NAD^+ , un cofactor para la alcohol deshidrogenasa (Seitz et al., 1992).

Se ha empleado el valproato sódico como agente inductor de esteatosis hepática microvesicular en ratas, a consecuencia de las alteraciones por estrés oxidativo (Natarajan et al., 2006).

CAUSAS AMBIENTALES QUE DISMINUYEN LA ELIMINACIÓN DE GRASA HEPÁTICA

1. Dietas que inhiben la oxidación de ácidos grasos

Las dietas deficitarias en colina y metionina alteran la betaoxidación mitocondrial en ratones

normales y sobreexpresan la expresión del citocromo 2E1 (Leclercq et al., 2000).

Se han empleado también ratas Sprague-Dawley a las que se sometía a una dieta deficitaria en colina durante 12 semanas, que daba lugar a infiltración grasa del hígado en forma severa, con ligera inflamación y fibrosis, además de una marcada elevación de las aminotransferasas (Ibáñez et al., 2007). Otra variante experimental son las dietas deficitarias en metionina y colina, y ricas en grasa, que aplicadas durante 8 semanas, inducen también hígado graso en ratas (Ustundag et al., 2007). Oz et al. (2006) consiguieron desarrollar lesiones hepáticas severas, incluso necrosis, en ratas sometidas a una dieta deficitaria en colina y metionina. Este tipo de dietas también inducen esteatohepatitis en ratones (Rangnekar et al., 2006).

Un problema asociado a las dietas deficientes en metionina y colina, tanto en ratas como en ratones, es la pérdida significativa de peso que pueden perder los animales (hasta el 40 % en 10 semanas), algo que no se observa en la enfermedad humana (London y George, 2007).

2. Inhibición hormonal de la oxidación de ácidos grasos

Estrógenos

Los estrógenos y la progesterona inhiben la β -oxidación mitocondrial en ratones Swiss CD-1 BR (Grimbert et al., 1995). De hecho, una semana de tratamiento con estradiol y progesterona condujo a lesiones ultraestructurales de la mitocondria. Los autores sugirieron que estos cambios podrían ser similares a los que se producen en la gestación de algunas mujeres, y que inducen de forma aguda hígado graso (Grimbert et al., 1995).

Glucocorticoides

La administración de glucocorticoides a ratones BR Swiss inhibe en la matriz mitocon-

drial la acetil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, media y larga causando esteatosis microvesicular, lesiones mitocondriales ultraestructurales, inhibición de la β -oxidación mitocondrial y supresión de la secreción de triglicéridos hepáticos (Letteron et al., 1997).

3. Toxinas que inducen inhibición de la oxidación de ácidos grasos

El Etoxomir produce inhibición irreversible de la carnitina palmitil transferasa (CPT-1) que transporta ácidos grasos hacia la mitocondria para la β -oxidación (Koteish y Diehl, 2001). Se inhibe pues la oxidación de ácidos grasos hepáticos, lo que conduce a esteatosis hepática.

LAS AVES COMO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATOSIS HEPÁTICA

A diferencia de los mamíferos, el hígado es de forma exclusiva, el sitio primario para la síntesis de ácidos grasos *de novo* en las aves, y por tanto el sitio primario de lipogénesis. Debido a que el sistema linfático del pollo es rudimentario, la principal ruta de absorción de grasas es mediante la formación de micelas mixtas; los quilomicrones son absorbidos directamente hacia la sangre portal para ser transportados al hígado, lugar para la síntesis y posterior depósito en los tejidos. Por tanto, el hígado es el primer tejido expuesto a una dieta grasa. Esta es una característica que predispone a las aves a una condición patológica denominada síndrome del hígado graso (FLS) (Cherian y Goeger, 2004).

Entre las distintas estrategias para aumentar el valor nutricional de los alimentos se ha estudiado el efecto de la alimentación de las aves de corral mediante una dieta rica en ácido linoleico y ácidos grasos polinsaturados sobre la histopatología hepática, nivel de lípidos en plasma, en el tejido muscular y en la yema de huevo, observándose un aumento de la lipodosis hepática asociada a esta dieta por un mecanismo no conocido en relación con un aumento

de la actividad metabólica del hígado o estrés crónico (Cherian y Goeger, 2004).

En base a estos factores predisponentes, utilizamos el pollo como modelo de hígado graso. En experimentos previos hemos podido comprobar que el uso de dietas aterogénicas para inducir arteriosclerosis, conlleva el desarrollo de hígado graso, lo que permite usar este biomodelo experimental para ensayos terapéuticos de ambas enfermedades (Ayala et al., 2005; García Pérez et al., 2003, 2005; Hernández-Espinosa et al., 2006). En concreto, tras un periodo de inducción de 3-6 meses observamos importante esteatosis macrovesicular e inflamación moderada que predomina en el parénquima.

CONCLUSIONES

En definitiva, los diferentes modelos experimentales animales de esteatohepatitis no alcohólica reproducen de una forma u otra los mecanismos patogénicos de la enfermedad humana. Para ello, un primer paso es el desarrollo de esteatosis hepática, o acúmulo de grasa en el hígado como resultado de un desequilibrio entre el suministro, formación, consumo y oxidación hepática de ácidos grasos. El consumo incluye la β -oxidación mitocondrial, producción de cuerpos cetónicos o secreción de triglicéridos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Además, muchos modelos animales y estudios en humanos señalan la relación entre obesidad y resistencia a la insulina, un factor patogénico clave en el desarrollo de esteatosis hepática y síndrome metabólico. Un segundo paso para el progreso de esteatosis a esteatohepatitis vendría explicado por la teoría de Day y James del "doble impacto", según la cual diversos procesos como la peroxidación lipídica, estrés oxidativo, alteración mitocondrial, etc., entrarían en funcionamiento. Las modificaciones genéticas y/o los cambios de ciertos factores (hormonales, dietéticos, etc) constituyen herramientas básicas para el desarrollo de modelos animales, que permiten avanzar en los

procesos fisiopatológicos involucrados en esta enfermedad y en posibles terapias.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es resultado del proyecto de investigación 05671/PI/07 financiado con cargo al Programa de Generación de Conocimiento Científico de Excelencia de la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, Plan Regional de Ciencia y Tecnología 2007/2010, España.

BIBLIOGRAFÍA

- AYALA I., GARCÍA PÉREZ B., DOMÉNECH G., CASTELLS M.T., VALDÉS M. 2005. Use of the chicken as experimental animal model in atherosclerosis. *Avian Poultry Biol. Rev.* 16(3): 151-159.
- BAUMGARDNER J.N., SHANKAR K., HENNINGS L., BADGER T.M., RONIS M.J. 2008. A new model for non-alcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet. *Am. J. Gastroenterol. Liver Physiol.* 294(1): G27-38.
- CHERIAN G., GOEGER M.P. 2004. Hepatic lipid characteristics and histopathology of laying hens fed CLA or n-3 fatty acids. *Lipids* 39(1): 31-36.
- DAY C.P., JAMES O.F. 1998. Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology* 114: 842-845.
- EL-HASCHIMI K., PIERROZ D.D., HILEMAN S.M., CHRISTIAN B., FLIER J.S. 2000. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 105(12):1827-1832.
- FAN C.Y., PAN J., CHU R., LEE D., KLUCKMAN K.D., USUDA N., SINGH I., YELDANDI A.V., RAO M.S., MAEDA N., REDDY J.K. 1996. Targeted disruption of the peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase

- gene: generation of a mouse model of pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 530-541.
- FRAYN K.N., KINGMAN S.M. 1995. Dietary sugars and lipid metabolism in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 250S-263S.
- GARCÍA PÉREZ B., AYALA I., CASTELLS M.T., MADRID J.F., ORTEGA M.R., ORTEGA J.V., BALLESTA J., FERNÁNDEZ PARDO J., VALDÉS M. 2003. Planimetric and histological study of the aortae in atherosclerotic chickens treated with nifedipine, verapamil and diltiazem. *Histol. Histopathol.* (18): 1027-1033.
- GARCÍA PÉREZ B., AYALA I., CASTELLS M.T., SÁNCHEZ POLO M.T., GARCÍA PARTIDA P., VALDÉS M. 2005. Effects of nifedipine, verapamil and diltiazem on serum biochemical parameters and aortic composition of atherosclerotic chickens. *Biomed. Pharmacother.* 59: 1-7.
- GRIMBERT S., FISCH C., DESCHAMPS D., BERSON A., FROMENTY B., FELDMANN G., PESSAYRE D. 1995. Effects of female sex hormones on mitochondria: possible role in acute fatty liver of pregnancy. *Am. J. Physiol.* 268: G107-G115.
- HERNÁNDEZ-ESPINOSA D, AYALA I, CASTELLS MT, GARCÍA-PÉREZ B, MARTÍN-CASTILLO A, MIÑANO A, ARCAS I, VICENTE V, CORRAL J. Intracellular retention of hepatic serpins caused by severe hyperlipidemia. *Liver International* 2006 26(6): 708-715.
- JOVEN J., RULLA., FERRÉ N., ESCOLÁ-GIL J.C., MARSILLACH J., COLL B., ALONSO-VILLAVARDE C.A., ARAGONES G., CLARIA J., CAMPS J. 2007. The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable. The influence of diet and strain. *Atherosclerosis* 195:e85-e92.
- IBAÑEZ P., SOLIS N., PIZARRO M., AGUAYO G., DUARTE I., MIQUEL J.F., ACCATINO L., ARRESE M. 2007. Effect of losartan on early liver fibrosis development in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22(6): 846-851.
- KERSTEN S., SEYDOUX J., PETERS J.M., GONZALEZ F.J., DESVERGNE B., WAHLI W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103(11): 1489-1498.
- KOK N., ROBERFROID M., DELZENNE N. 1996. Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism* 45: 1547-1550.
- KOTEISH A., DIEHL A. 2001. Animal models of steatosis. *Seminars Liver Dis.* 21(1): 89-104.
- LECLERCQ I., FARRELL G., FIELD J., BELL D., GONZALEZ F., ROBERTSON G. 2000. Cyp2E1 and Cyp4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Invest.* 105: 1067-1075.
- LETTERON P., BRAHIMI-BOUROUINA N., ROBIN M.A., MOREAU A., FELDMANN G., PESSAYRE D. 1997. Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid beta oxidation. *Am. J. Physiol.* 272: G1141-G1150.
- LEWIS G.F., CARPENTIER A., ADELI K., GIACCA A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrinol. Rev.* 23: 201-229.
- LONDON R.M., GEORGE J. 2007. Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clin. Liver Dis.* 11: 55-74.
- LORIA R.M., KIBRICK S., MADGE G.E. 1976. Infection of hypercholesterolemic mice with Coxsackie virus B. *J. Infectious Dis.* 133: 655-662.
- MATSUZAWA N., TAKAMURA T., KURITA S., MISU H., OTA T., ANDO H., YOKOYAMA M., HONDA M., ZEN Y., NAKANUMA Y., MIYAMOTO K., KANEKO S. 2007. Lipid-induced oxidative stress causes

- steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46(5): 1392-1403.
- MILNER J.A., HASSAN A.S. 1981. Species specificity of arginine deficiency-induced hepatic steatosis. *J. Nutr.* 111: 1067-1073.
- MIYAGAWA J., KUWAJIMA M., HANAFUSA T., OZAKI K., FUJIMURA H., ONO A., UENAKA R., NARAMA I., OUE T., YAMAMOTO K. 1995. Mitochondrial abnormalities of muscle tissue in mice with juvenile visceral steatosis associated with systemic carnitine deficiency. *Virchows Arch.* 426(3): 271-279.
- NATARAJAN S.K., EAPEN C.E., PULLIMOD A.B., BALASUBRAMANIAN K.A. 2006. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21(8): 1240-1249.
- NEMOTO Y., TODA K., ONO M., ADACHI K.F., SAIBARA T., ONISHI S., ENZAN H., OKADA T., SHIZUTA Y. 2000. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient (ArKO) mice. *J. Clin. Invest.* 105: 1819-1825.
- OZ H.S., IM H.J., CHEN T.S., DE VILLIERS W.J., MCCLAIN C.J. 2006. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20(1): 39-47.
- PELLEYMOUNTER M.A., CULLEN M.F., BAKER M.B., HECHT R., WINTERS D., BOONE T., COLLINS F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543.
- POSTIC C., GIRARD J. 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* 118: 829-838.
- POULSOM R. 1986. Morphological changes of organs after sucrose or fructose feeding. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 21: 104-134.
- RANGNEKAR A.S., LAMMERT F., IGOLNIKOV A., GREEN R.M. 2006. Quantitative trait loci analysis of mice administered the methionine-choline deficient dietary model of experimental steatohepatitis. *Liver Int.* 26(8): 1000-1005.
- RECTOR R.S., THYFAULT J.P., WEI Y., IBDAH J.A. 2008. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J. Gastroenterol.* 14(2): 185-192.
- SCHREUDER T.C.M.A., VERWER B.J., VAN NIEUKERK C.M.J., MULDER C.J.J. 2008. Nonalcoholic fatty liver disease: An overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J. Gastroenterol.* 14(16): 2474-2486.
- SEITZ H.K., XU Y., SIMANOWSKI U.A., OSSWALD B. 1992. Effect of age and gender on in vivo ethanol elimination, hepatic alcohol dehydrogenase activity, and NAD⁺ availability in F344 rats. *Res. Exp. Med.* 192(3): 205-212.
- SEO Y.S., KIM J.H., JO N.Y., CHOI K.M., BAIK S.H., PARK J.J., KIM J.S., BYUN K.S., BAK Y.T., LEE C.H., KIM A., YEON J.E. 2008. PPAR agonists treatment is effective in a non-alcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23(1): 102-109.
- SHIMANO H., HORTON J.D., HAMMER R.E., SHIMOMURA I., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. 1996. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.* 98(7): 1575-1584.
- USTUNDAG B., BAHCECIOGLU I.H., SAHIN K., DUZGUN S., KOCA S., GULCU F., OZERCAN I.H. 2007. Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model. *Digest. Dis. Sci.* 52(8): 2006-14.

- VAN STEENBERGEN W., LANCKMANS S. 1995. Liver disturbances in obesity and diabetes mellitus. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 19: S27-S36.
- VÁZQUEZ-CARRERA M. 2007. PPAR α y síndrome metabólico. *Clin. Invest. Arterioscl.* 19(1): 37-38.
- WATANABE S., HORIE Y., KATAOKA E., SATO W., DOHMEN T., OHSIMA S., GOTO T., SUZUKI A. 2007. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22: S96-S100.
- YALNIZ M., BAHCECIOGLU I.H., KUZU N., POYRAZOGLU O.K., BULMUS O., CELEBI S., USTUNDAQ B., OZERCAN I.H., SAHIN K. 2007. Preventive role of genistein in an experimental non-alcoholic steatohepatitis model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22(11): 2009-2014.
- ZOU Y., LI J., LU C., WANG J., GE J., HUANG Y., ZHANG L., WANG Y. 2006. High-fat emulsion-induced rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 79(11): 1100-1107.