



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

TITULO

Inhibición de la proteína de transferencia microsomal y su rol en la patogénesis de
la esteatohepatitis no alcohólica

UNIVERSIDAD
ACREDITADA
INTERNACIONALMENTE

AUTOR

Francisco Machiavello Román

ASESORES

MSc. Ana Colarossi Salinas

Dr. Martín Tagle Arróspide

Inhibición de la proteína de transferencia microsomal y su rol en la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica

Inhibition of Microsomal Transfer Protein and its Role in Non-alcoholic Steatohepatitis Pathogenesis

Machiavello Román Francisco¹, Colarossi Salinas Ana², Inga Ponce Rocío², Tagle Arróspide Martín³

¹Alumno, Facultad de Medicina Alberto Hurtado, Universidad Peruana Cayetano Heredia

²Magíster en Ciencias, Profesora Asociada de la Facultad de Ciencias Alberto Cazorla Talleri, Laboratorio de Micronutrientes – LID, Universidad Peruana Cayetano Heredia

³Médico gastroenterólogo, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina Alberto Hurtado, Universidad Peruana Cayetano Heredia

Resumen

Objetivo: determinar si la inhibición de la proteína de transferencia microsomal (MTP) induce esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un modelo animal de enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Materiales y métodos:* se distribuyeron 32 ratones en 4 grupos a los que se les realizaron 2 intervenciones – inducción de esteatosis con una dieta hipercalórica e inhibición farmacológica de MTP, comparándose luego de 12 semanas con controles la incidencia y severidad de NASH en cada grupo mediante análisis histológico. Se midió además la concentración hepática de malondialdeído (MDA) como marcador de estrés oxidativo y se evaluó su relación con la presencia de NASH. *Resultados:* los grupos con inhibición de MTP presentaron la mayor tasa de progresión a NASH, con o sin esteatosis previa (87,5% en cada caso), aunque la presencia de esta aumentó significativamente la severidad histológica de NASH. Se encontró una mayor concentración hepática de MDA en ratones con NASH, pero no se pudo establecer una correlación significativa entre esta y la severidad histológica de NASH. *Conclusiones:* la inhibición de MTP puede inducir NASH y su aparición podría estar mediada por estrés oxidativo.

Palabras clave: hígado graso, enfermedad del hígado graso no alcohólico, estrés oxidativo

Abstract

Objective: to determine if the inhibition of microsomal transfer protein (MTP) induces non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in an animal model of non-alcoholic fatty liver disease. *Materials and methods:* 32 mice were distributed into 4 groups, where 2 interventions were subsequently performed – induction of steatosis through nourishment with a hypercaloric diet, and pharmacological inhibition of MTP. After 12 weeks, the incidence and severity of NASH in each group were evaluated through histological analysis and compared to those of control groups. Hepatic malondialdehyde (MDA) concentration was also measured as a marker of oxidative stress and its relationship to NASH severity was assessed. *Results:* the groups under MTP inhibition presented the highest rate of NASH induction, with or without previous

steatosis (87.5% in each group), although its presence significantly increased the histological severity of NASH. A higher hepatic concentration of MDA was found in mice with NASH; however, it was not significantly correlated to NASH histological severity. *Conclusions:* MTP inhibition is capable of inducing NASH and its appearance could be mediated by oxidative stress.

Key words: fatty liver, non-alcoholic fatty liver disease, oxidative stress

Introducción

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD) constituye un espectro de enfermedad hepática asociada al síndrome metabólico e incluye la esteatosis simple, de curso generalmente benigno, y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), presente en 2-3% de la población general y 40% de obesos mórbidos, con un alto riesgo de progresión a cirrosis y carcinoma hepatocelular (1-4).

La progresión de esteatosis simple a NASH puede ser explicada por la hipótesis de los dos golpes (1, 4): el primer golpe es la esteatosis o acumulación intrahepática de triglicéridos, relacionada a la resistencia a la insulina. Este primer golpe vuelve al hígado susceptible a una segunda injuria, o segundo golpe, que induce la aparición de inflamación, necrosis y fibrosis características de NASH. Se desconoce la naturaleza del segundo golpe, pero se han postulado a citoquinas inflamatorias, estrés del retículo endoplasmático (RE) y estrés oxidativo como posibles mecanismos del mismo (1, 5-8).

Múltiples estudios describen anormalidades en el perfil lipídico de los pacientes con NAFLD. Los pacientes con NASH demuestran menor síntesis y exportación de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) en comparación a pacientes con esteatosis simple y sujetos normales; esto se atribuye a una menor síntesis de las proteínas que regulan el ensamblaje de VLDL (9-13). Esta diferencia es significativa, ya que una reducción en la producción de VLDL podría constituir un factor que determine la progresión de esteatosis simple a NASH.

Se ha identificado a la proteína de transferencia microsomal (MTP), responsable del último paso de la síntesis hepática de VLDL, como posible blanco del daño en el segundo golpe (14-17). Esta proteína transfiere lípidos neutros, en particular triglicéridos, hacia la apolipoproteína B100 en el lumen del RE. La inhibición de MTP lleva a disminución en la síntesis de VLDL y a

acumulación intrahepática de ácidos grasos, sustratos para la formación de especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, de estrés oxidativo (18).

Existe evidencia abundante que relaciona una menor actividad de MTP con NAFLD e incluye menor concentración de mRNA de MTP en pacientes con NASH en comparación a pacientes con esteatosis simple (11-13), polimorfismos en el gen *Mttp* que se asocian a mayor riesgo de NASH en pacientes diabéticos (10) y la aparición de esteatosis, resistencia a la insulina e inflamación hepática en ratones con un defecto heterocigoto en *Mttp* (16). Además, los inhibidores de MTP diseñados como hipolipemiantes se han asociado a esteatosis y elevación de enzimas hepáticas en ensayos clínicos (19, 20).

A pesar de esto, el rol de MTP en la patogénesis de NASH aún no es concluyente; todavía debe determinarse si la inhibición de MTP induce la progresión a NASH o si esta es una consecuencia de la enfermedad. Los estudios en pacientes son observacionales y modelos animales previos no han controlado la inhibición de MTP, lo han hecho utilizando dietas deficientes en nutrientes (que probablemente reflejan daño hepático secundario a desnutrición), o mediante inhibición monogénica, a pesar de que NASH probablemente sea una enfermedad poligénica (21). Más aún, se ha dedicado poca atención a determinar si una inhibición adquirida de la proteína, como sugiere la hipótesis de 2 golpes, en lugar de una deficiencia congénita, induciría la progresión a NASH (12).

Este estudio aborda estos problemas mediante un modelo animal de inducción de NASH cuyo objetivo principal es determinar si una inhibición adquirida y controlada de MTP induce la progresión de esteatosis simple a NASH; secundariamente, pretende determinar si la aparición de NASH mediante este método requiere de esteatosis previa como sugiere el modelo teórico y si dicha aparición es mediada por estrés oxidativo.

Materiales y métodos

i. Manejo de animales

La figura 1 muestra el diagrama de intervenciones realizadas a los animales de estudio. Se asignaron aleatoriamente 40 ratones machos de cepa C57BL/6J y 12 semanas de vida a uno de cuatro grupos de intervención (10 ratones por grupo): grupo 1, que recibió una dieta hipercalórica y un inhibidor de MTP; grupo 2, que recibió una dieta hipercalórica sin inhibidor de MTP; grupo 3, que recibió una dieta normocalórica y un inhibidor de MTP; y el grupo 4, que recibió una dieta normocalórica sin inhibidor de MTP. Todos los ratones se mantuvieron en un mismo ambiente y contaron con acceso a agua y al alimento asignado *ad libitum*. Al final de la intervención todos los ratones fueron sacrificados, realizando posteriormente extracción del hígado y escisión en un pedazo mayor para fijación en formol al 10% y un pedazo menor para congelamiento a -20°C. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del Comité de Ética de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

ii. Inducción de esteatosis

La dieta hipercalórica administrada a los grupos 1 y 2 ha demostrado inducir esteatosis hepática tras su consumo por 4 semanas (22) y estuvo constituida en 20% por proteínas, 20% por carbohidratos y 60% por grasas, con densidad calórica de 5.24kcal/g (código D12492, Research Diets, NJ, EUA). La dieta normocalórica administrada a los grupos 3 y 4 estuvo constituida en 20% por proteínas, 70% por carbohidratos y 10% por grasas, con densidad calórica de 3.85kcal/g (código D12450J, Research Diets, NJ, EUA). Al finalizar la cuarta semana de intervención se sacrificaron a 2 ratones de cada grupo y se comprobó la presencia de esteatosis hepática en los grupos con dieta hipercalórica mediante el análisis histológico de los hígados extraídos, fijados en formol al 10% y examinados bajo la tinción de hematoxilina y eosina. Tras

confirmar la presencia de esteatosis, se procedió a realizar la inhibición de MTP en los grupos respectivos.

iii. Inhibición de MTP

Se administró el fármaco CP-346086 (Pfizer), un inhibidor hepático e intestinal de MTP, a los ratones de los grupos 1 y 3 desde el inicio de la quinta semana de intervención durante 8 semanas, a una dosis diaria de 10mg/kg diluido en agua destilada mediante una sonda de alimentación transesofágica según el régimen descrito por Harwood et al (20) para inducir inhibición efectiva de la proteína.

iv. Evaluación histológica

Las muestras de tejido hepático obtenidas para estudio histológico fueron fijadas en solución de formol al 10%, deshidratadas, incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina, y la tinción tricrómica de Masson. Las láminas estuvieron codificadas y fueron evaluadas por un patólogo, quien reportó su diagnóstico utilizando el Nonalcoholic fatty liver disease Activity Score (NAS), descrito por Kleiner et al (23) y validado para el diagnóstico histológico de NASH. Este evalúa semi-cuantitativamente la presencia de esteatosis (puntaje 0-3), inflamación lobulillar (0-2), balonamiento hepatocelular (0-2) y fibrosis (0-4), considerándose un puntaje total mayor a 4 como diagnóstico de NASH y un puntaje menor a 3 como excluyente de NASH.

v. Medición de estrés oxidativo

Se determinó la concentración de malondialdehído (MDA), marcador de estrés oxidativo derivado de peroxidación lipídica, en tejido hepático mediante el método descrito por Ohkawa et al (24). Se preparó una mezcla constituida por 20µL de solución de hidroxitolueno butilado (2.2g/L), 20µL de solución homogeneizada de tejido hepático (0.1g/ml de solución buffer fosfato, pH 7.4), 20µL de solución de cloruro férrico (2.7g/L), 0.3cc de solución buffer acetato

(pH 3.5) y 0.3cc de solución de ácido tiobarbitúrico (5g/100cc de docedilsulfato sódico al 0.6%). Estas muestras fueron homogeneizadas mediante agitación en vórtex por 01 minuto, tras lo cual fueron sometidas a baño de María durante 01 hora, agregándose posteriormente 0.4cc de butanol y nuevamente homogeneizadas mediante agitación en vórtex por 01 minuto. Las muestras fueron centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos; se extrajo el sobrenadante y se determinó la concentración de MDA mediante la lectura en placa de las muestras en espectrofotómetro a 532nm.

vi. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como mediana con rango de intervalo, y los datos fueron analizados mediante las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis según correspondiera con el programa OpenStat[®], versión 2014. El tamaño de muestra se estimó para una significancia de 95% y una potencia de 80%, considerándose $p < 0.05$ como resultado significativo.

La tasa de progresión a NASH se calculó como el porcentaje de ratones en cada grupo con NAS >4 al final de la intervención, comparándose además la mediana de NAS entre los grupos mediante la prueba Kruskal-Wallis. Para determinar si la presencia de esteatosis es necesaria para la aparición de NASH al inhibir MTP se comparó la tasa de progresión a NASH entre los grupos 1 y 3 mediante la prueba U de Mann-Whitney. Para determinar si la aparición de NASH tras inhibición de MTP es mediada por estrés oxidativo, se comparó la concentración de MDA en tejido hepático entre los ratones que tuvieron un diagnóstico histológico de NASH y aquellos que no lo tuvieron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se estimó además el coeficiente de correlación de Pearson entre la concentración tisular de MDA y el puntaje NAS para explorar el grado de relación entre ambas variables.

Resultados

i. Inducción de esteatosis

Tras 4 semanas de alimentación con el régimen hipercalórico, se confirmó la presencia de esteatosis predominantemente microvesicular, sin cambios inflamatorios, en todos los ratones asignados a dicha dieta; no se encontraron hallazgos anormales en los ratones asignados al régimen normocalórico (Figura 2). Se observó adicionalmente que no hubo diferencia significativa en el peso de los ratones asignados a una u otra dieta (dieta normocalórica 23.2g, dieta hipercalórica 23.7g).

ii. Evaluación histológica de NASH

La evaluación histológica tras 12 semanas de intervención demostró que la proporción de ratones que alcanzaron criterios de NASH fue de 87.5% (7/8), 62.5% (5/8) y 87.5% en los grupos 1, 2 y 3, respectivamente; ningún ratón del grupo 4 presentó criterios de NASH. La figura 3 compara las medianas y rangos de NAS entre los 04 grupos de intervención, encontrándose valores significativamente mayores ($p = 0.005$) en el grupo 1 con respecto a los grupos 2 y 3. Al analizar por separado los componentes de la evaluación NAS, se observó que la extensión de esteatosis fue la máxima posible y similar entre los grupos 1, 2 y 3, y que el grado de inflamación lobulillar fue a la vez similar entre los grupos mencionados (valor de mediana = 1 en los 3 grupos). Solo se encontró fibrosis leve (puntaje 1) en los grupos expuestos al inhibidor de MTP (2/8 ratones en el grupo 1 y 1/8 en el grupo 3). Los mayores valores de NAS en el grupo 1 se debieron, por tanto, a mayor balonamiento hepatocelular (grupo 1 con valor de mediana = 3 y rango 0-3 vs valor de mediana = 1 con rango 0-1 en grupos 2 y 3; $p = 0.01$).

La figura 4 muestra el patrón histopatológico típico de cada grupo de intervención. Se halló esteatosis principalmente de tipo microvesicular al igual que en la fase previa de inducción de

esteatosis. En los grupos en los que se encontró infiltración de células inflamatorias, estas fueron principalmente macrófagos (figura 4a), y cuando se encontró fibrosis, esta tenía una ubicación principalmente periportal (figura 4b).

Otros hallazgos no considerados en la evaluación NAS incluyeron conservación de la arquitectura lobulillar con más de 50% de los conductos biliares identificables, aumento en el número de inclusiones de glucógeno (principalmente en el grupo 1), metaplasia de la placa ductal y zonas de apoptosis.

La comparación de los grupos 1 y 3 para determinar si la aparición de NASH debía ser precedida por esteatosis demostró que la proporción de ratones que alcanzó un $NAS \geq 5$ fue la misma (87.5%), lo que tentativamente sugeriría que, aun en ausencia de esteatosis previa, la inhibición de MTP es capaz de inducir la aparición de NASH. Sin embargo, sí se encontró mayor severidad histológica ante la presencia de esteatosis previa, como lo demuestra una mayor mediana de NAS en el grupo 1 comparada con la del grupo 3 (7 vs 5; $p = 0.02$).

iii. Determinación del nivel de estrés oxidativo

La figura 5 muestra la concentración de MDA tisular en relación a la presencia de NASH y establece la correlación entre nivel hepático de MDA y NAS. Aquellos ratones que alcanzaron criterios histológicos de NASH tuvieron una mayor concentración así como un mayor rango de valores de MDA tisular (valor de mediana $4.79\mu\text{mol}/100\text{g}$ con rango $2.57\text{-}17.82\mu\text{mol}/100\text{g}$ en ratones con NASH vs mediana $2.25\mu\text{mol}/100\text{g}$ con rango $1.25\text{-}11.53\mu\text{mol}/100\text{g}$ en ratones sin NASH; $p = 0.02$). No obstante, no se encontró una correlación significativa entre la concentración tisular de MDA y el NAS ($r = 0.15$; figura 5b).

Discusión

Los resultados del presente estudio demuestran que la inhibición de MTP puede, en efecto, inducir NASH, sin aparente necesidad de esteatosis previa, y que estos cambios podrían ser mediados por estrés oxidativo derivado de peroxidación lipídica; deben, sin embargo, realizarse algunas observaciones a esta afirmación.

El fenotipo histológico de esteatosis microvesicular que se obtuvo en nuestro modelo animal se diferencia del fenotipo macrovesicular usualmente descrito en pacientes con NASH, lo que podría limitar la aplicabilidad de nuestros resultados para el estudio de NALFD. Si bien cambios inflamatorios compatibles con esteatohepatitis pueden aparecer en hígados con microvesículas lipídicas, estos casos suelen describirse más frecuentemente en hígado graso del embarazo, síndrome de Reye y esteatosis inducida por drogas, patologías en las cuales se encuentran defectos severos de β -oxidación mitocondrial, la cual no fue evaluada en este modelo. Un estudio realizado por Tandra et al (25) demostró que solo 10% de biopsias de pacientes con NAFLD presentaba zonas de esteatosis microvesicular, aunque esta se relacionaba con mayor severidad histológica y presencia de fibrosis. Sus resultados apoyaban la hipótesis de que las macrovesículas lipídicas se forman tras la fusión de microvesículas en la superficie del retículo endoplasmático, pero esta no pudo ser confirmada por el diseño experimental empleado. Prolongar la duración de la intervención en nuestro modelo podría confirmar si, efectivamente, la esteatosis microvesicular precede a la macrovesicular, lo que explicaría las diferencias halladas en este estudio con respecto a los pacientes con NASH.

Los resultados descritos en el grupo 3 demuestran que la inhibición de MTP podría ser suficiente para inducir la aparición de NASH en hígados sanos, aunque debe notarse que, como fue descrito en ensayos clínicos previos (20), la inhibición farmacológica de MTP genera *per se* esteatosis

antes de la aparición de esteatohepatitis. Con respecto a la hipótesis de los 2 golpes, estas observaciones sugieren que debe existir esteatosis previa para la aparición de esteatohepatitis, pero que una misma injuria, entre ellas, la inhibición de MTP, podría ser responsable tanto de la aparición de esteatosis como de los cambios inflamatorios propios de NASH. Ante esta evidencia, deben investigarse los posibles usos diagnósticos y/o terapéuticos de la actividad de MTP en pacientes con NASH. Algunos avances al respecto incluyen la reversión parcial de cambios histológicos tras la inducción de la expresión hepática de MTP en un modelo animal presentado por Shindo et al (21) y la mayor expresión de MTP demostrada en la terapia de NAFLD con ezetimibe (26), por lo que la actividad de MTP podría medirse para evaluar respuesta terapéutica en la terapia hipolipemiante de NAFLD.

La proporción de ratones del grupo 2 que alcanzó lesiones compatibles con NASH es llamativa puesto que este grupo solo estuvo expuesto a la inducción de esteatosis sin una segunda injuria identificable que justifique la progresión a NASH. Si bien el tiempo de intervención fue corto, es posible que la acumulación de lípidos haya derivado en lipotoxicidad, no necesariamente mediada por inhibición de MTP, con subsecuente aparición de cambios propios de NASH. Otra posibilidad a tomar en cuenta es que la evaluación histológica NAS podría no ser la más apropiada para el modelo que presentamos y tenga falsos positivos que justifiquen la proporción tan alta de ratones que alcanzaron NASH.

La aparición de NASH en este modelo parece ser mediada por estrés oxidativo derivado de lipotoxicidad, como sugiere la mayor concentración de MDA tisular en ratones que presentaron criterios histológicos de NASH. Esta diferencia podría ser de interés clínico, puesto que la determinación de MDA podría distinguir a aquellos pacientes con NASH de aquellos con esteatosis simple. Esta prueba no podría; sin embargo, determinar la severidad histológica de

NASH debido a la falta de correlación entre concentración tisular de MDA y NAS demostrada en este estudio, y tendría como limitante principal requerir una prueba invasiva como una biopsia hepática para su medición.

Logramos presentar, en conclusión, un nuevo modelo animal de enfermedad por hígado graso no alcohólico que demuestra el rol de MTP en la patogénesis de NASH. La aplicabilidad del mismo está limitada por demostrar una forma infrecuente de la enfermedad en humanos, aunque estudios posteriores podrían aclarar si esta diferencia podrá corregirse alterando algunas de las variables estudiadas. Los resultados experimentales de este modelo avalan la posibilidad de que MTP esté implicado en la aparición de NASH, por lo que se sugiere seguir investigando el rol diagnóstico o terapéutico que pueda tener dicha proteína.

Referencias bibliográficas

1. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med* 2010;103:71-83
2. Adams L, Angulo P, Lindor K. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005;172 (7):899-905
3. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34: 274-285
4. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009 1:9-19
5. Koruk M, Taysi S, Savas C, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative Strees and Enzymatic Antioxidant Status in Patients with Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34(1):57-62
6. Goel R, Boylan B, Gruman L, Newman P, North P, Newma D. The proinflammatory phenotype of PECAM—deficient mice results in atherogenic diet-induced steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1205-G1214
7. Yachi R, Muto C, Ohtaka N, Aoki Y, Koike T, Igarashi O et al. Effects of tocotrienol on tumor necrosis factor- α /D-galactosamine-induced steatohepatitis in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr* 2013;52(2): 146-153
8. Wei Y, Rector R, Thyfault J, Ibdah J. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008;14(2): 193-199
9. Hee Choi S, Ginsberg H. Increased Very Low Density Lipoprotein Secretion, Hepatic Steatosis, and Insulin Resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(9): 353–363
10. Jiang Z, Robson S, Yao Z. Lipoprotein metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *J Biomed Res* 2013;27(1):1-13
11. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M. Dysfunctional Very-Low-Density Lipoprotein Synthesis and Release is a Key Factor in Nonalcoholic Steatohepatitis Pathogenesis. *Hepatology* 2009;50:772-780
12. Fujita K, Imajo K, Shinohara Y, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M. Liver Microsomal Triglyceride Transfer Protein Activator May Be a Possible Therapeutic Agent in Non-alcoholic steatohepatitis. *J Pharmacol Sci* 2011;115:270-273
13. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair S. Apolipoprotein Synthesis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 2002;35:898-904

14. Musso G, Gambino R, Cassader M. Lipoprotein metabolism mediates the association of MTP polymorphism with β -cell dysfunction in healthy subjects and in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem* 2010;21(9):834-840
15. Oliveira C. Microsomal triglyceride transfer protein and nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;5(2): 245-251
16. Ibdah J, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan M et al. Mice Heterozygous for a Defect in Mitochondrial Trifunctional Protein Develop Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Gastroenterology* 2005;128(5):1381-1390
17. Higuchi N, Kato M, Tanaka M, Miyazaki M, Takao S, Kohima M et al. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med* 2001;2:1077-1081
18. Mahmood M, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)* 2012;9:14
19. Joy T, Hegele R. Microsomal triglyceride transfer protein inhibition – friend or foe? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(8):506-8
20. Chandler C, Wilder D, Pettini J, Savoy Y, Petras S, Chang G et al. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. *J. Lipid Res*. 2003;44:1887–1901.
21. Shindo N, Fujisawa T, Sugimoto K, Nojima K, Oze-Fukai A, Yoshikawa Y et al. Involvement of microsomal triglyceride transfer protein in nonalcoholic steatohepatitis in novel spontaneous mouse model. *J Hepatol* 2010;52: 903-12
22. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006;147(2): 943-51
23. Kleiner D, Brunt E, Van Natta M, Behling C, Contos M, Cummings O et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21
24. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351–358
25. Tandra S, Yeh M, Brunt E, Vuppalanchi R, Cummings O, Ünalp-Arida A et al. Presence and Significance of Microvesicular Steatosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol* 2011;55(3): 654-659
26. Averna M. The effect of ezetimibe on NAFLD. *Atheroscler Suppl* 2015;17:27-34

Tablas, gráficos y figuras

Figura 1. Diagrama de intervenciones realizadas

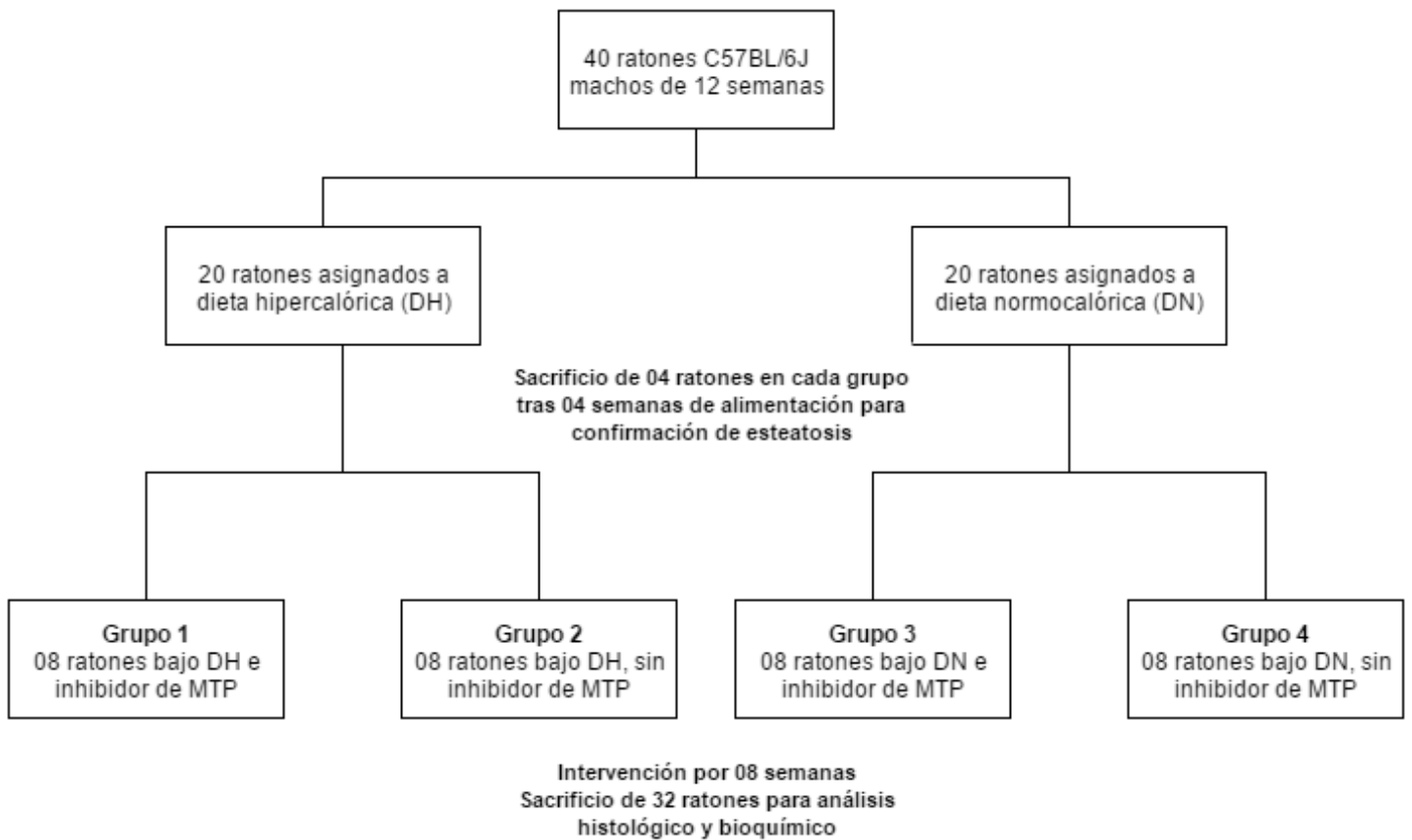


Figura 2. Hallazgos histológicos tras 4 semanas de alimentación con dieta normocalórica (A) e hipercalórica (B). Tejido hepático en hematoxilina y eosina, 400x. Las cabezas de flecha indican las vesículas de esteatosis.

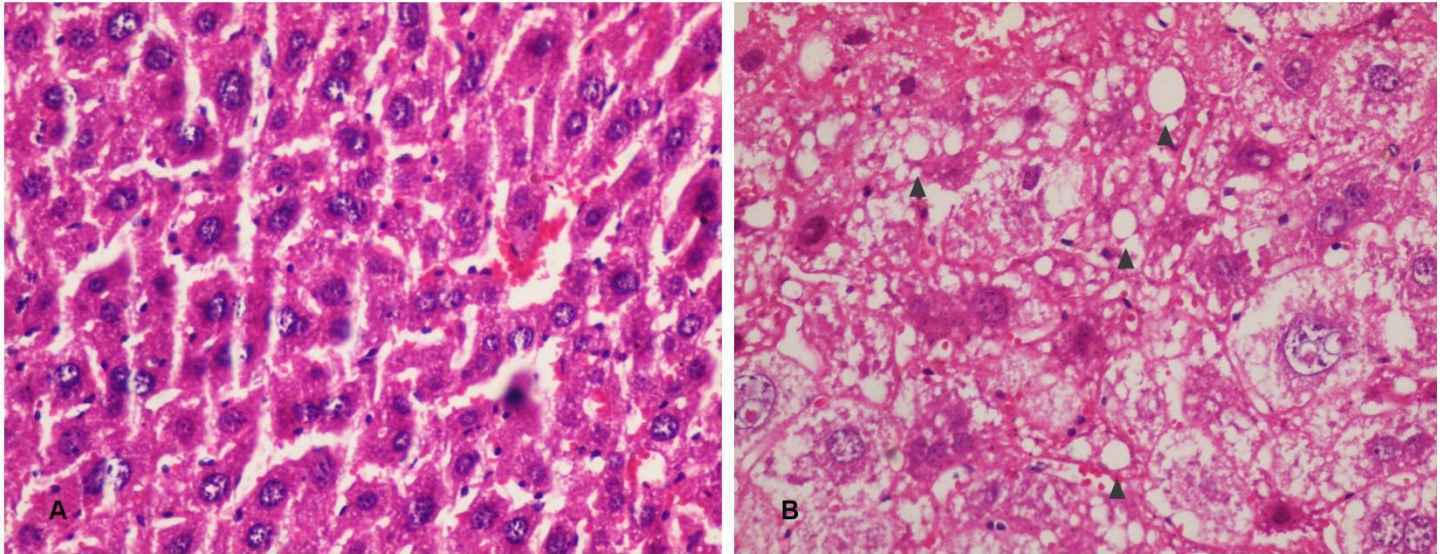


Figura 3. Medianas y dispersión del puntaje NAS comparada entre los 04 grupos de intervención.

Evaluación histológica NAS

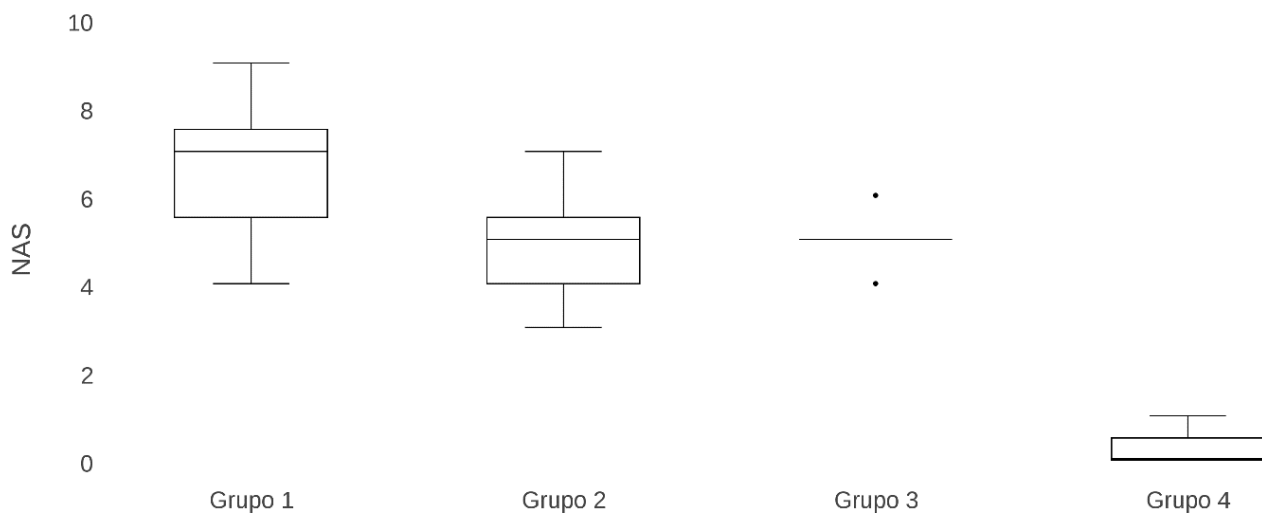
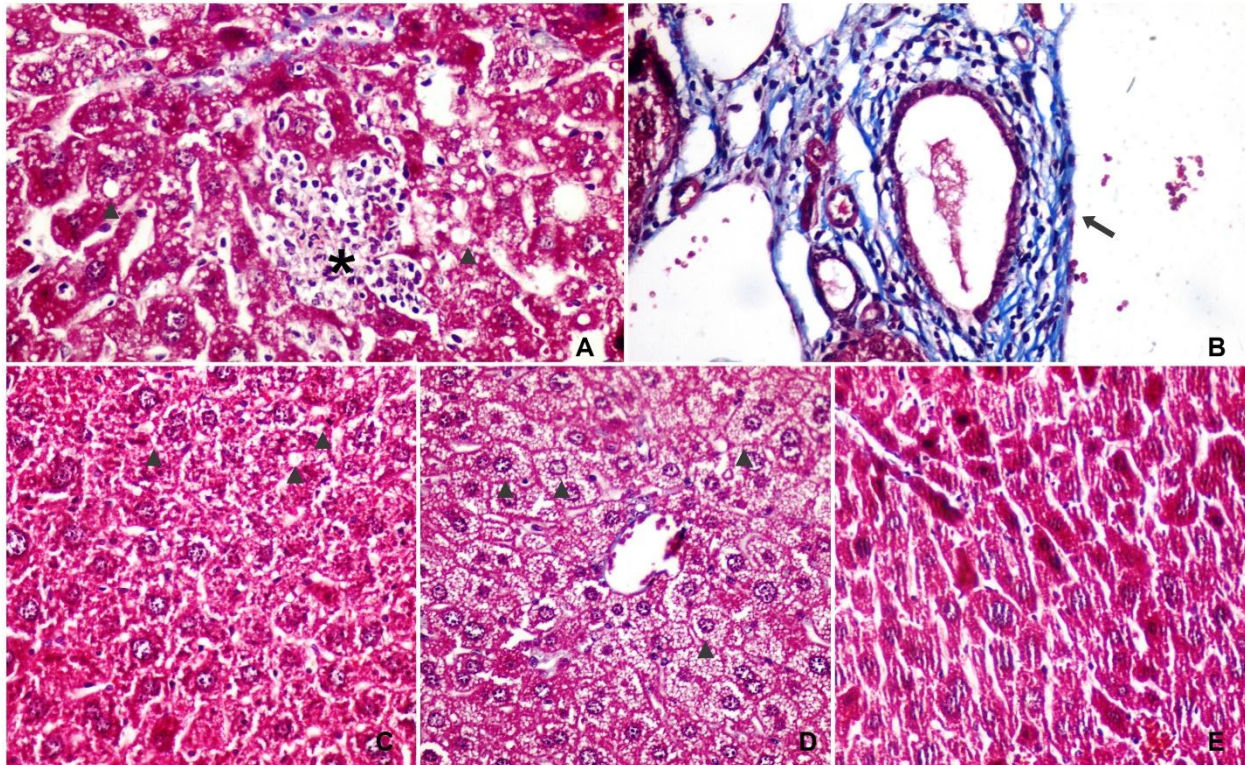
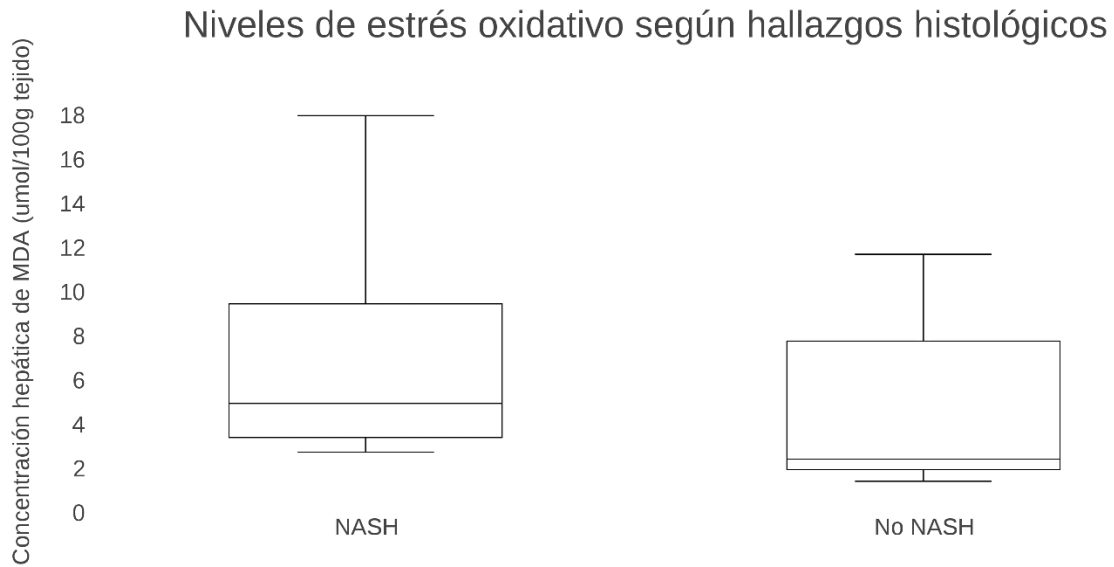


Figura 4. Hallazgos histopatológicos característicos de cada grupo de intervención. Tejido hepático en tinción tricrómica de Masson, 400x

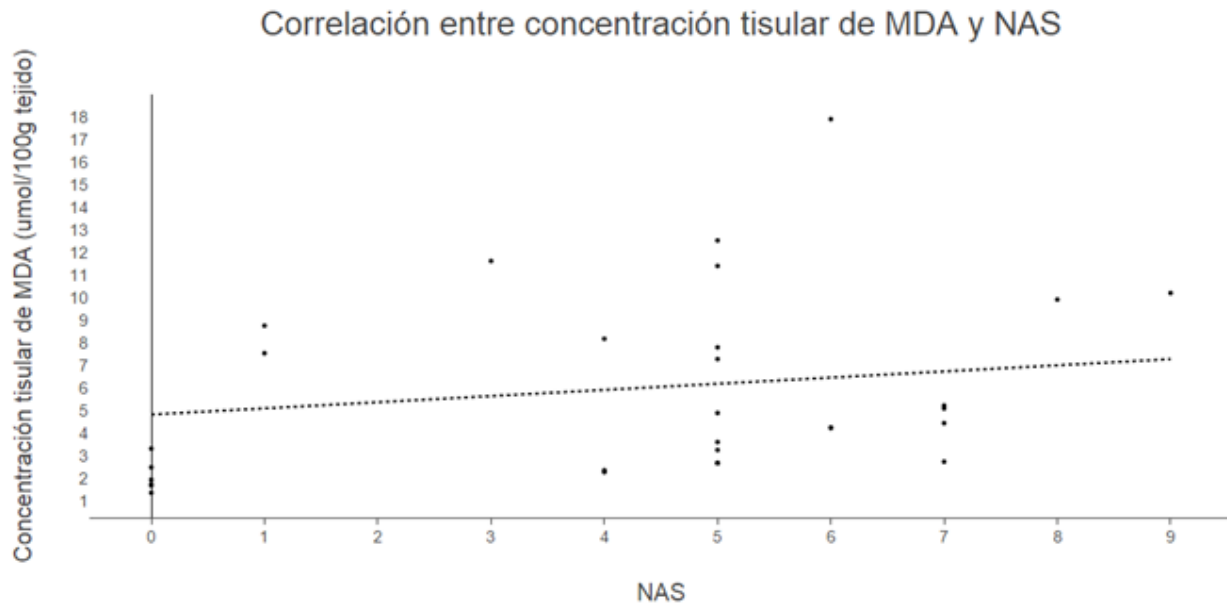


Las figuras A y B corresponden al grupo 1, en las que se halló esteatosis principalmente microvesicular (cabezas de flecha), infiltrado celular (asterisco) y fibrosis periportal (flecha). Las figuras C, D y E corresponden a los grupos 2, 3 y 4 respectivamente, en las cuales las cabezas de flecha señalan las microvesículas lipídicas.

Figura 5. Evaluación del nivel de estrés oxidativo



a. Concentración hepática de MDA según diagnóstico histológico de NASH



b. Curva de correlación entre concentración tisular de MDA y NAS