



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Farmacología

**“Evaluación del efecto del ácido nicotínico sobre un
modelo murino de esteatohepatitis no alcohólica”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Irina Cardoso Lezama

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Farmacología

Director de la tesis

Dr. Pablo Muriel de la Torre

Ciudad de México

Enero 2024

El trabajo experimental presentado en este escrito se realizó en el Laboratorio de Hepatología Experimental del departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Pablo Muriel de la Torre.

Se contó con el apoyo de Ciencia de Frontera número **53358** y con la beca de investigación **762331**, otorgados por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (Conahcyt) de México.

Índice general

	Abreviaturas	7
1	Resumen	9
2	Abstract	10
3	Introducción	11
3.1	La enfermedad del hígado graso no alcohólico	12
3.2	Esteatohepatitis no alcohólica	13
3.3	El papel del inflammasoma y la piroptosis en la progresión de la EHNA	16
3.4	La inflamación conduce a la fibrosis hepática	17
3.5	El ácido nicotínico (AN) como posible tratamiento para la EHNA	19
4	Justificación	21
5	Hipótesis	21
6	Objetivos	21
6.1	Objetivos generales	21
6.2	Objetivos particulares	21
7	Metodología	22
7.1	Animales	22
7.2	Tratamientos	22
7.3	Análisis bioquímicos	24
7.4	Determinaciones histológicas	24
7.5	Ensayos inmunohistoquímicos	25
7.6	Western blot	25
7.7	Zimografía	25
7.8	Ensayos de inmunofluorescencia	26
7.9	Acoplamiento molecular	27
8	Análisis estadístico	27
9	Resultados	28
9.1	La administración de una dieta alta en grasa, azúcar y colesterol sin algún inductor químico no conduce a fibrosis hepática y el AN no previene la esteatosis hepática	28

9.2	El AN previene el daño hepático inducido con una dieta alta en grasa, azúcar y colesterol + CCl ₄	30
9.3	Efecto del AN sobre la acumulación de lípidos de ratas tratadas con Dieta+CCl ₄	32
9.4	El AN inhibe la activación de la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis	34
9.5	El AN reduce el ambiente inflamatorio inducido por el modelo de EHNA	36
9.6	Efecto del AN sobre el inflamasoma NLRP3 en el tejido hepático de ratas sujetas a un modelo de EHNA	38
9.7	El AN disminuye los cambios patológicos hepáticos y atenúa la fibrosis, inducidos con la Dieta + CCl ₄	42
9.8	El AN previene la activación de las células estelares hepáticas	44
9.9	La activación de las células estelares es mediada por el NLRP3 y atenuada por el AN	46
9.1.1	El acoplamiento molecular muestra las interacciones del AN con posibles blancos terapéuticos	48
10	Discusión	51
11	Conclusión	54
12	Bibliografía	56

Índice de figuras

1	Factores asociados al desarrollo de la EHNA	13
2	Mecanismo molecular de la progresión de la HGNA a la EHNA	15
3	El inflammasoma NLRP3 y la activación de las células estelares	18
4	Estructura del AN y su actividad farmacológica	20
5	Diseño experimental	23
6	Efecto del AN sobre el tejido hepático de ratas sometidas a un modelo de HGNA	29
7	Efecto del AN sobre el tejido hepático y los marcadores de daño hepático	31
8	Efecto del AN sobre la acumulación de lípidos	33
9	Efecto del AN sobre la activación de la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis	35
10	Efecto del AN sobre los niveles hepáticos de las proteínas p65, NLRP3 y caspasa-1	37
11	Efecto del AN sobre el ensamblaje del inflammasoma NLRP3	39
12	Efecto de la administración del AN sobre los niveles de la caspasa-1 y la IL-1 β y su co-localización	40
13	Efecto del AN sobre los niveles hepáticos de las proteínas caspasa-1 e IL-18 así como su co-localización	41
14	Efecto del AN sobre la fibrosis hepática inducida en el modelo de la EHNA	43
15	Efecto del AN sobre la fibrosis hepática producida en los animales con EHNA	45
16	Efecto del AN sobre la activación de las HCSs inducida por el inflammasoma NLRP3	47
17	Acoplamiento molecular del AN con proteínas involucradas en la vía NLRP3/piroptosis	49
18	Acoplamiento molecular del AN con proteínas involucradas en la activación de la vía del inflammasoma NLRP3	50
19	El AN atenúa la EHNA mediante la modulación de la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis	55

Índice de tablas

Tabla

1	Composición de la dieta regular	23
2	Composición de la dieta alta en azúcar, grasas y colesterol	24
3	Anticuerpos utilizados en IHQ, Western blot e IF	26
4	Resultados del acoplamiento molecular del AN con proteínas involucradas en la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis	50

Abreviaturas

α -SMA: Alfa ctina de músculo liso
 γ -GTP: gamma-glutamil transpeptidasa
AGL: ácidos grasos libres
ALT: alanino aminotransferasa
AN: ácido nicotínico
ANOVA: análisis de varianza
ASC: Proteína tipo speck asociada a la apoptosis
ATP: Adenosín trifosfato
CCl₄: tetracloruro de carbono
CHC: carcinoma hepatocelular
Col-1: colágena-1
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño
DAG: diacilglicerol
EHNA: esteatohepatitis no alcohólica
ERO: especies reactivas de oxígeno
GSDMD: Gasdermina D
GSDMDi: Gasdermina D inactiva
GSDMD-N: Gasdermina D activa
GSH: glutatión reducido
HGNA: enfermedad del hígado graso no alcohólico
HSC: células estelares hepáticas
IL: interleucina
kcal: kilocalorías
LDN: lipogénesis de novo
LPS: lipopolisacárido
M: molar
MEC: matriz extracelular
MMP: metaloproteasa
NAD: coenzima nicotinamida adenina dinucleótido
NASH: non-alcoholic steatohepatitis

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NLRP3: receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina

ORO: rojo oleoso "O"

P2X7R: Receptor purinérgico 7

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

RI: resistencia a la insulina

SREBP-1c: proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides

TAA: tioacetamida

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TLR4: receptor tipo Toll-4

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNFR1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral

TXNIP: Proteína que interactúa con la tioredoxina

1 Resumen

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es un problema de salud pública a nivel mundial que puede progresar a fibrosis, cirrosis y cáncer hepático, con opciones limitadas de tratamiento. El inflammasoma receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina 3 (NLRP3) está estrechamente ligado a la progresión de la EHNA. El ácido nicotínico (AN) es una vitamina utilizada para el tratamiento de la dislipidemia, la esteatosis hepática y la fibrosis. En este trabajo, investigamos los efectos farmacológicos del AN en un modelo experimental de EHNA en la rata, y la posible participación de la inhibición de la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis como un mecanismo de acción de este compuesto. Las ratas fueron alimentadas con una dieta alta en azúcar, grasas y colesterol y administradas con una dosis semanal baja de CCl₄. El AN redujo significativamente la inflamación por medio de la disminución de los niveles del factor de necrosis tumoral alfa y el factor nuclear kappa B. Además, el AN inhibió la formación del complejo NLRP3- proteína tipo speck asociada a la apoptosis-caspasa-1 que, a su vez, disminuyó los niveles de las proteínas interleucina 1 beta, interleucina 18 y la gasdermina. Adicionalmente, el AN redujo el factor de crecimiento transformante beta, la alfa actina de músculo liso y los niveles hepáticos de colágena-1, y por consecuencia evitó la formación descontrolada de matriz extracelular. Nuestros resultados indican que el AN inhibe la progresión de la EHNA, sin embargo, serán necesarios estudios básicos y clínicos adicionales para recomendar el uso del AN como tratamiento de la EHNA en seres humanos.

2 Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a global public health concern that may progress into fibrosis, cirrhosis, and liver cancer, and curative treatment options are limited. While the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome is closely linked to NASH progression, nicotinic acid (NA), a vitamin used for the treatment of dyslipidemia, is an emerging pharmaceutical treatment for hepatic steatosis and fibrosis. Here, we investigated the pharmacological effects of NA on experimental NASH and whether NLRP3 inflammasome/pyroptosis inhibition is an associated mechanism of action. Rats were fed a high-fat sucrose diet supplemented with cholesterol and a low dose of CCl₄. NA significantly reduced inflammation by decreasing the protein levels of tumor necrosis factor-alpha and nuclear factor kappa B. Moreover, NA inhibited the formation of NLRP3-apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain-Caspase-1, decreasing interleukin-1beta, interleukin-18, and gasdermin D protein. In addition, NA reduced tumor growth factor-beta, alpha-smooth muscle actin, and hepatic levels of collagen-1, consequently decreasing extracellular matrix synthesis. Our results indicate that NA inhibits NASH progression and encourage further basic and clinical studies on the use of NA for the treatment of human NASH.

3 Introducción

El hígado es un órgano capaz de realizar múltiples procesos biológicos como la síntesis de proteínas, la homeostasis de lípidos y colesterol o el metabolismo de xenobióticos en el ser humano [1]. Debido a su importancia, cuando su funcionamiento es alterado las consecuencias pueden ser graves, cuando este importante órgano padece de alguna enfermedad, se ven alteradas las funciones que cumple y la evidencia de la última década ha demostrado que los problemas hepáticos actuales están estrechamente relacionados con enfermedades metabólicas [2].

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA) es una de las tantas complicaciones de pacientes con obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus o hiperlipidemia [3]. La HGNA se caracteriza por la acumulación de lípidos en al menos el 5% de la población de los hepatocitos, esta enfermedad se diagnostica en personas cuyo historial clínico menciona que la ingesta de alcohol es fortuita o prácticamente nula, por lo que el alcohol no se toma como un factor causante de la acumulación lipídica [4].

A pesar de que la HGNA se considera un estadio benigno, la acumulación de lípidos favorece la liberación de citocinas proinflamatorias que, a su vez, activan vías proinflamatorias y profibrogénicas conduciendo a un estadio severo denominado esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) [5].

En México, el riesgo de padecer EHNA incrementa con el padecimiento previo de otras enfermedades como la obesidad y la diabetes mellitus, las cuales las padecen la mayoría de la población mexicana. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del año 2018, el 39.1% de los adultos mayores de 20 años sufren de sobrepeso mientras que el 36.1% padecen obesidad y se estima que en una década este porcentaje aumente significativamente [6]. Por otra parte, 12 millones 400 mil personas en México padecen diabetes, y la diabetes tipo dos tiene la mayor prevalencia en adultos mayores de 60 años [6]. Lo anterior, asocia estrechamente la incidencia de ambas enfermedades con el aumento de casos de EHNA en México, por lo que esta enfermedad es un problema de salud pública que requiere atención inmediata.

3.1 La enfermedad del hígado graso no alcohólico

La HGNA se describe histológicamente como la acumulación de lípidos en al menos el 5% de los hepatocitos y está relacionada con la resistencia a la insulina, la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico. Se estima que mundialmente la HGNA tiene una prevalencia del 30% en Sur América, 27% en Asia, 24% en Norte América, 23% en Europa y 13% en África y se espera que la prevalencia incremente en los próximos años debido al estilo de vida, entre otros factores [2].

La HGNA inicia con el desbalance en el metabolismo de carbohidratos y lípidos que, aunado a una vida sedentaria de quienes la padecen, potencia el proceso de acumulación de lípidos. También se ha reportado que los factores genéticos, el desbalance en la microbiota intestinal, la resistencia a la insulina y la dislipidemia son importantes en la progresión de HGNA a EHNA [3] (**Fig. 1**).

El glucógeno es un polisacárido que está conformado por ramificaciones de glucosa, y se almacena principalmente en el hígado, músculo y en el cerebro en menor proporción. En el metabolismo del glucógeno, el hígado juega un papel importante ya que se encarga de almacenar o liberar glucosa dependiendo del requerimiento energético del organismo [7]. Sin embargo, el aumento en la ingesta de azúcares como la glucosa y/o la fructosa, provenientes principalmente de bebidas azucaradas, exacerbaban la acumulación de glucógeno en los hepatocitos. Los hepatocitos glucogénicos se observan en el 54% de los casos de pacientes con HGNA y se han relacionado con una importante disfunción hepática [8]. Las principales fuentes de lípidos del organismo derivan de la ingesta diaria de grasas y azúcares. El consumo excesivo de azúcares refinados y grasas saturadas resulta en un desbalance entre el gasto de energía y el almacenamiento de ésta, por lo que la consecuencia generalmente es el incremento en las reservas de grasa en el organismo [9]. La lipogénesis de *novo* (LDN) es un sistema complejo por el cual los azúcares se convierten en ácidos grasos y posteriormente son esterificados para formar triglicéridos y ser almacenados en forma de lípidos en el hígado. La alteración de esta vía ocurre en padecimientos como la obesidad, el síndrome metabólico y la HGNA [10], los cuales son factores de riesgo para el desarrollo de la EHNA.

Los ácidos grasos libres (AGL) provenientes de la lipólisis comienzan a transitar a través del sistema circulatorio y arriban al hígado para ser almacenados [11]. Por una parte, la resistencia a la insulina (RI) favorece la liberación excesiva de lípidos que son almacenados

en el hígado [11] y, por otra parte, el consumo de azúcares activa la vía de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides (SREBP-1c), la cual activa la LDN [12].

Los AGL provenientes de la lipólisis pueden ser reesterificados en triglicéridos o eliminados por medio de la β -oxidación mitocondrial. La HGNA es considerado como una enfermedad benigna debido a que con una dieta saludable y, ejercicio el hígado retorna a un estadio normal [13].

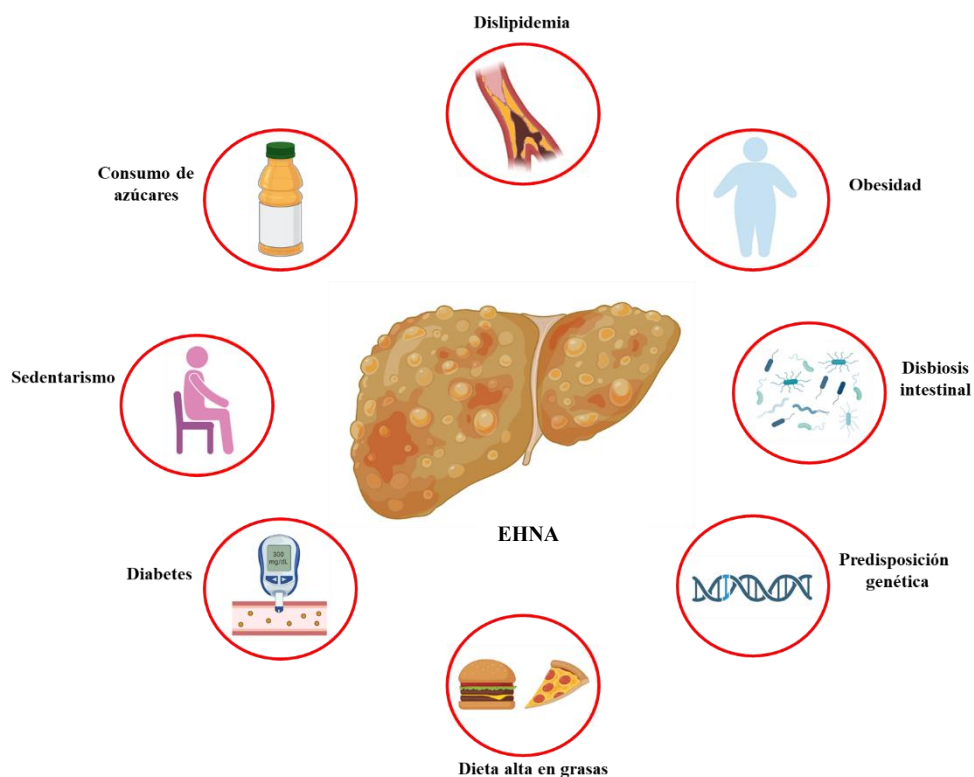


Figura 1. Factores asociados al desarrollo de la EHNA.

Entre los factores que están estrechamente relacionados con el desarrollo de la EHNA se encuentran el consumo excesivo de azúcares, principalmente de la fructosa, alimentos altos en grasas saturadas y el sedentarismo que, a su vez, pueden favorecer el desarrollo de la resistencia a la insulina y posteriormente a la diabetes, dislipidemia y obesidad. La disbiosis intestinal y la misma predisposición genética son factores que aumentan la probabilidad de padecer EHNA.

3.2 Esteatohepatitis no alcohólica

Para comprender el proceso por el cual la HGNA progresa a EHNA es importante mencionar las teorías que tratan de explicarlo.

En 1998, Day y James propusieron una teoría de dos “hits” que explicaba a *grosso modo* el probable mecanismo por el cual la HGNA evolucionaba a EHNA [14]. Ellos concluyeron que el primer “hit” era dado por la acumulación de lípidos en el hígado, sin embargo, este proceso necesitaba de un impulso para provocar daño a los hepatocitos, de manera que era necesario un segundo “hit” para la progresión de HGNA a EHNA. Ellos propusieron que este segundo “hit” era proporcionado por los radicales libres provenientes de la oxidación de los ácidos grasos libres, lo que provocaba a su vez estrés del retículo endoplásmico y la activación de vías proinflamatorias con la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias (**Fig. 2**).

No obstante, numerosas incógnitas no fueron despejadas con esta teoría, por lo que en la actualidad se considera como una teoría obsoleta [15]. Posteriormente, fue postulada la teoría multifactorial, que es considerada como la explicación más cercana para la transición de HGNA a EHNA.

Una diferencia marcada entre el HGNA y la EHNA, es la ausencia de inflamación y fibrosis en el HGNA y una relativamente fácil reversión de esta condición, mientras que la EHNA es una enfermedad compleja que abarca distintas vías moleculares, su inicio está marcado por “un estadio benigno” del HGNA. Cuando la eliminación de los AGL no es suficiente, la aparición de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación del inflammasoma se hacen presentes, haciendo que el daño a los hepatocitos es más severo.

El desbalance en la formación y la incapacidad de eliminación de los AGL favorece la aparición de especies lipotóxicas como las ceramidas, los diacilgliceroles y colesterol, los cuales actúan sobre las estructuras celulares, promocionan la aparición de radicales libres y activan una respuesta inmune [2].

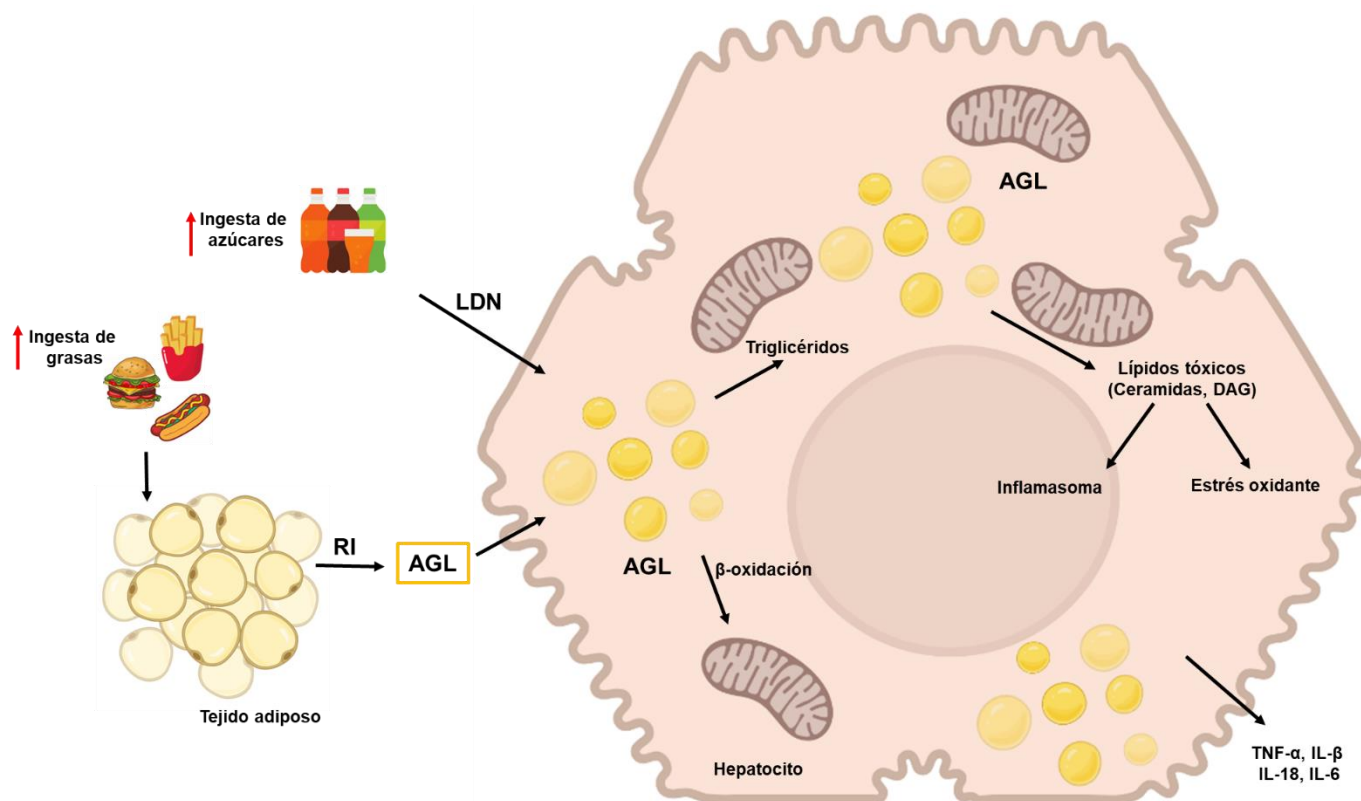


Figura 2. Mecanismo molecular de la progresión de la HGNA a la EHNA.

El consumo excesivo de grasas actúa sobre el tejido adiposo provocando una inflamación y favoreciendo el desarrollo de la RI, la cual, ayuda a la lipólisis y a la formación de AGL. Por otra parte, el consumo de azúcares como la fructosa activa la LDN, quien convierte a los azúcares en grasas. Ambas vías se activan para almacenar a los AGL en el citoplasma de los hepatocitos, estos AGL pueden ser esterificados a triglicéridos o se eliminan mediante la β -oxidación mitocondrial, cuando el aumento de AGL no puede ser compensado comienzan a aparecer especies lipotóxicas como las ceramidas o los DAG quienes dañan estructuras celulares y favorecen la aparición de ERO y la activación del inflammasoma. Por último, estos procesos conllevan a la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β , IL-18 e IL-6. RI: Resistencia a la insulina; AGL: Ácidos grasos libres; LDN: lipogénesis de novo; DAG: Diacilgliceroles; ERO: Especies reactivas de oxígeno; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleucina.

Las células de Kupffer liberan citocinas como respuesta ante el daño causado por las especies lipotóxicas y las ERO. Entre las citocinas proinflamatorias que se liberan se encuentran el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y las interleucinas (IL) 1 β , la IL-6 y la IL-18, sin embargo, para tratar de compensar este ambiente inflamatorio también se liberan citocinas antiinflamatorias como la IL-10 [16].

Por otra parte, se ha identificado que endotoxinas derivadas de la microbioma intestinal juegan un papel importante en el desarrollo de la HGNA y la EHNA. En personas que padecen esteatosis hepática se han detectado niveles séricos altos de lipopolisacárido (LPS), una endotoxina considerada como un patrón molecular asociado a patógenos, que es capaz de activar al receptor tipo toll 4 (TLR4), retroalimentando así positivamente la inflamación [17].

Simultáneamente la liberación de TNF- α y la activación del TLR4 activan al factor maestro de la inflamación, el factor nuclear kappa B (NF- κ B). La vía del NF- κ B está ampliamente estudiada y está estrechamente relacionada con la activación del complejo multiproteico llamado inflamasoma [18].

3.3 El papel del inflamasoma y la piroptosis en la progresión de la EHNA

La activación de la vía inflamasoma NLRP3/piroptosis se realiza mediante dos importantes pasos. El primer paso consiste en la iniciación o “priming”, donde el TNF- α y el LPS se unen al receptor TNF1 y al TLR4 respectivamente, así, después de varios cambios conformacionales y fosforilaciones se activa la vía del NF- κ B. El NF- κ B normalmente se encuentra inhibido, pero al activarse mediante la señalización del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y del TLR-4, una vez que un estímulo es capaz de activar al NF- κ B éste migra hacia el núcleo para favorecer la transcripción de genes relacionados con la inflamación, principalmente TNF- α , pro-IL-1 β , pro-IL-18, receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina 3 (NLRP3) y la proteína tipo speck asociada a la apoptosis (ASC) [19]. Una vez que los genes se transcriben y forman proteínas la vía del inflamasoma comienza a tener un papel importante en el desarrollo de la EHNA.

El complejo inflamasoma NLRP3 está conformado por tres proteínas importantes, el NLRP3 que actúa como un sensor, la ASC que funge como proteína adaptadora y la pro-caspasa-1 que funge como la proteína efectora [20].

En el segundo paso se lleva a cabo la activación del inflamasoma NLRP3, la cual ocurre de dos maneras. Por una parte, el receptor purinérgico 7 (P2X7R) se activa mediante cristales de colesterol o por el adenosín trifosfato que actúan como patrones moleculares asociados a daño [21], y por otra parte la proteína que interactúa con la tiorredoxina (TXNIP) es activada

mediante las ERO [22]. En conjunto, estas dos proteínas y su vía de acción son capaces de oligomerizar al NLRP3, ASC y pro-caspasa-1. Una vez que el complejo inflammasoma NLRP3 se encuentra en su forma activa, la pro-caspasa-1 se convierte a su forma activa, la caspasa-1, que a su vez transforma a la pro-IL-1 β y la pro-IL-18 en sus formas activas, IL-1 β e IL-18, respectivamente [23].

El sitio catalítico de la caspasa-1 es capaz de escindir a una proteína llamada gasdermina D (GSDMD). La GSDMD es una proteína que se encuentra auto inhibida, al momento de ser cortada por medio de la caspasa-1, el N-terminal de la GSDMD se libera y migra hacia la membrana celular [24], para posteriormente unirse a ésta y formar un poro, por el cual, el NLRP3, la IL-1 β y la IL-18 son liberados hacia el espacio extracelular y provoca la muerte de las células vecinas, este proceso es denominado piroptosis [25].

3.4 La inflamación conduce a la fibrosis hepática

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un factor implicado en diferenciación, angiogénesis y apoptosis celular, este factor es liberado al igual que las IL en procesos inflamatorios [26] y una vez que la piroptosis permite la liberación del NLRP3, la IL-1 β y la IL-18 al espacio extracelular estas interactúan con otras células denominadas células estelares hepáticas (HSCs).

Éstas, son células mesenquimales que en un estado quiescente almacenan retinol en su citoplasma, mientras que, en un estado activo, su fenotipo cambia hacia un tipo miofibroblasto y pierden la capacidad de almacenar retinol, y expresan una proteína llamada alfa actina de músculo liso (α -SMA) [27], una vez activadas, las HSCs comienzan a producir proteínas de la matriz extracelular entre ellas colágena-1 (**Fig. 3**) [28].

De este modo, el hígado comienza la etapa de fibrogénesis, que, con la ingesta descontrolada de azúcares, grasas y el ambiente inflamatorio producido además de la activación de las HSCs, conducen a la fibrosis, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC).

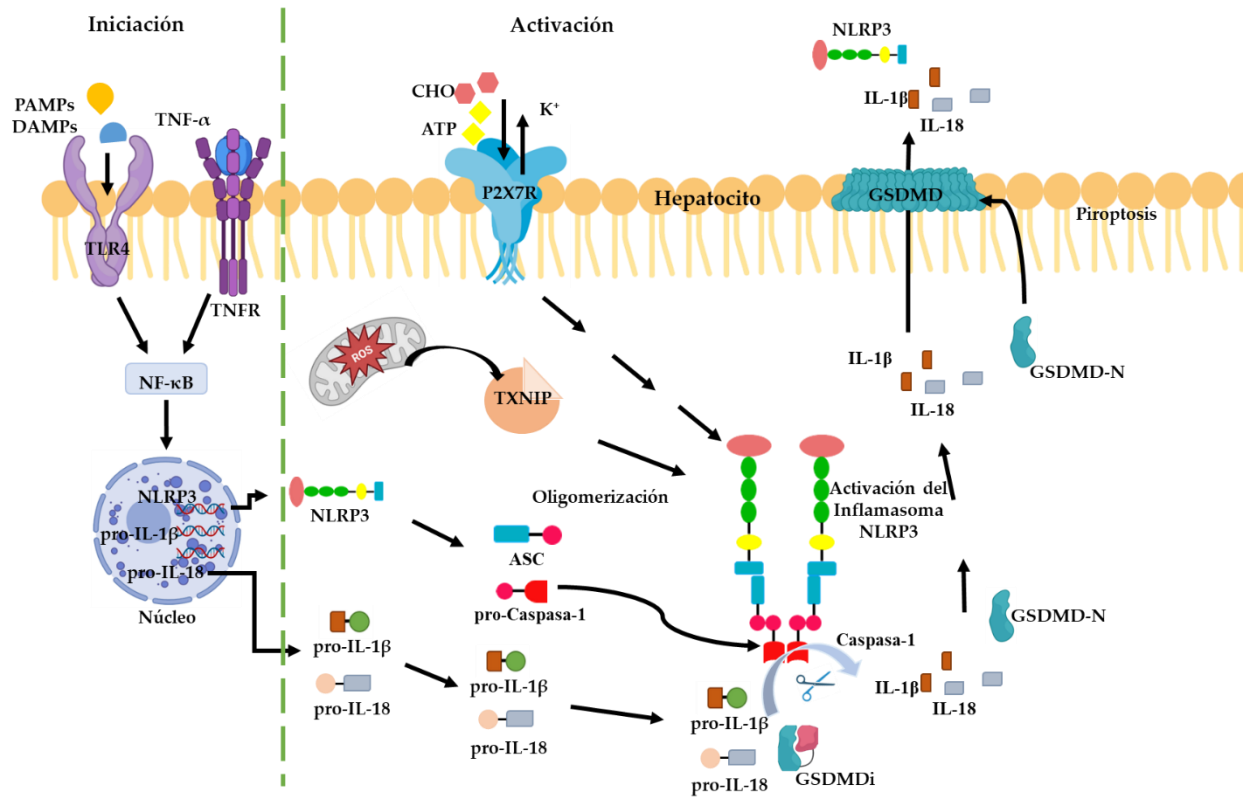


Figura 3. El inflammasoma NLRP3 y la activación de las células estelares.

La iniciación de la vía del inflammasoma NLRP3 comienza con la liberación de PAMPs y DAMPs que activan la vía del NF-κB y se sintetizan proteínas como el NLRP3, la pro-IL1β, pro-IL-18, y la pro-caspasa-1. Mientras que la activación del inflammasoma NLRP3, el P2X7R y el TXNIP activados por el colesterol y las ERO respectivamente, favorecen la oligomerización del complejo y además facilitan la transición de la pro-caspasa-1 a su forma activa la caspasa-1. El sitio catalítico de la caspasa-1 es capaz de escindir a la pro-IL-1β, la pro-IL-18 para transformarlas a sus formas activas la IL-1β y la IL-18, además de liberar de su auto inhibición a la GSDMD. El N-terminal de la GSDMD migra hacia la membrana celular para formar un poro y así liberar las citocinas maduras hacia el espacio extracelular. Una vez fuera de los hepatocitos, el TGF-β, el NLRP3, la IL-1β y la IL-18 interactúan con las HSCs activándolas y favoreciendo la formación de MEC y por consecuencia fibrosis hepática. DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño; PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos, TLR4: Receptor tipo Toll-4, TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa, TNFR1: Receptor 1 del factor de necrosis tumoral, NF-κB: Factor nuclear kappa B, NLRP3: Receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina, IL: Interleucina, ASC: Proteína tipo speck asociada a la apoptosis, ATP: Adenosín, P2X7R: Receptor purinérgico 7, TXNIP: Proteína que interactúa con la tiorredoxina, GSDMD: Gasdermina D, GSDMDi: Gasdermina D inactiva, GSDMD-N: Gasdermina D activa, TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta , HSCs: Células estelares hepáticas, α-SMA: Alfa actina de músculo liso, MEC: Matriz extracelular.

3.5 El ácido nicotínico (AN) como posible tratamiento para la EHNA

Debido a la complejidad en el desarrollo de EHNA no existe un tratamiento específico y eficaz para poder curar dicha enfermedad.

Por lo tanto, la investigación de nuevos blancos terapéuticos, así como la investigación básica en la búsqueda de fármacos que puedan funcionar como tratamiento para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EHNA es necesaria.

En esta investigación se propuso al AN como posible fármaco para tratar la EHNA. El AN, también conocido como niacina o vitamina B3, es una vitamina muy importante involucrada en procesos oxidativos como la formación de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) [29].

El AN se encuentra normalmente en carnes, verduras y leguminosas, la deficiencia en la ingesta de esta vitamina causa una enfermedad llamada pelagra, la cual se caracteriza por dermatitis, diarrea y en algunos casos demencia [29].

Desde hace 50 años, el AN ha sido utilizado como tratamiento para la dislipidemia por tener acción sobre la enzima diacilglicerol aciltransferasa 2 y consecuentemente disminuir los niveles de triglicéridos en la sangre [30]. Sin embargo, grupos de estudio han demostrado que el AN no tiene únicamente efecto sobre la dislipidemia.

Li y colaboradores en el 2016 reportaron que el AN tuvo actividad antiinflamatoria al inhibir al inflammasoma NLRP3 por medio de la sirtuina-1 en células endoteliales vasculares [31].

Además, en el 2015, Arauz y colaboradores demostraron que el AN, en un modelo murino con tioacetamida fue capaz de actuar como antifibrótico al disminuir los niveles de TGF- β y de α -SMA [32]. Algo destacable del AN es que también tiene efectos protectores contra la enfermedad de Alzheimer como lo indica Morris et al. [33].

Por otra parte, es de suma importancia señalar que la ingesta diaria de AN recomendada para adultos es de aproximadamente 3 g por día. En dosis mayores y/o exposiciones prologadas los pacientes presentan hipotensión [34] y algunos pacientes pueden desarrollar lesiones hepáticas [35].

Teniendo en cuenta los efectos secundarios y debido a la actividad farmacológica del AN (**Fig. 4**) se propone en este trabajo como posible tratamiento para EHNA inducida en roedores.

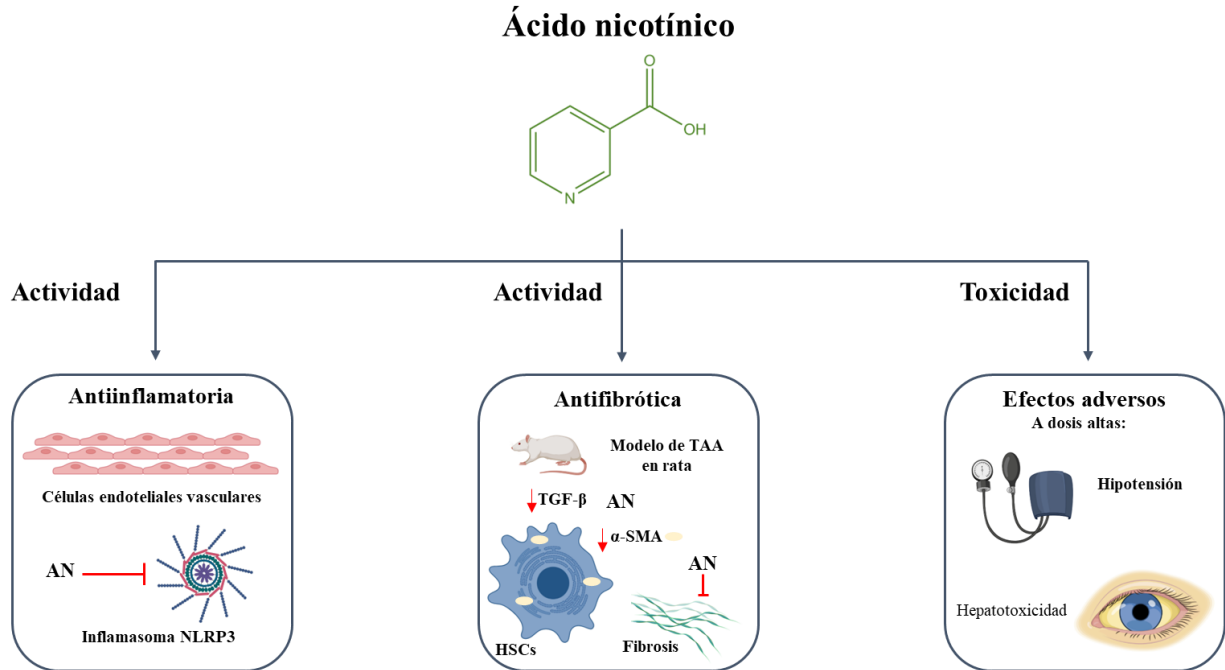


Figura 4. Estructura del AN y su actividad farmacológica.

El AN, además de tener actividad hipolipemiante, también posee actividad antiinflamatoria y actividad antifibrótica. En dosis altas promueve la hipotensión y hepatotoxicidad. AN: Ácido nicotínico, NLRP3: Receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina, TAA: Tioacetamida, TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta, α -SMA: Alfa actina de músculo liso alfa, HSCs: Células estelares hepáticas.

4 Justificación

Las enfermedades hepáticas relacionadas con el metabolismo son una de las principales causas de muerte en México. Además, el aumento de obesidad en nuestro país favorece el desarrollo de la EHNA y la aparición de fibrosis hepática.

Actualmente no se cuenta con un tratamiento específico para la EHNA, razón por la que se pretende evaluar el efecto farmacológico del AN en un modelo de EHNA desarrollado en nuestro laboratorio.

5 Hipótesis

El AN disminuye la inflamación y la fibrosis en un modelo de EHNA.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto farmacológico del AN en un modelo de EHNA inducido con una dieta alta en grasas, azúcares y colesterol en conjunto con tetracloruro de carbono como inductor químico.

6.2 Objetivos particulares

- Determinar la capacidad del AN para preservar la integridad del parénquima hepático en un modelo de EHNA.
- Determinar la capacidad del AN para prevenir la acumulación de lípidos en el parénquima hepático en un modelo de EHNA.
- Investigar si la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis se activa en el modelo de EHNA y si el AN es capaz de inhibir dicha activación.
- Evaluar la actividad antifibrótica del AN en un modelo de EHNA e investigar las posibles vías moleculares involucradas en dicha actividad.
- Investigar las posibles interacciones del AN a nivel molecular involucradas en sus efectos antiinflamatorios y antifibróticos por métodos *in silico*.

7 Metodología

7.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 7 semanas de edad al inicio del estudio y con un peso de 100 ± 20 g ($n = 32$). Todos los procedimientos realizados fueron bajo el protocolo 207-16 creado bajo los lineamientos institucionales, aprobado por el comité de ética del CINVESTAV-IPN. Asimismo, bajo la regulación de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

7.2 Tratamientos

Los animales fueron divididos aleatoriamente en seis grupos de estudio ($n = 8$): Control; Dieta; Dieta + CCl_4 ; Dieta + AN; Dieta + CCl_4 + AN y AN.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas (21 ± 1 °C, 50-60% de humedad relativa y ciclos de noche/oscuridad de 12 h cada uno), también fueron aclimatados durante una semana en cajas de policarbonato con libre acceso al agua.

Posteriormente, el grupo control fue administrado con una dieta regular (Labdiet® No. 5053, Indiana, USA) (Tabla 1); el grupo Dieta fue administrado con una dieta alta en azúcar, grasa y colesterol (Tabla 2), Dieta + CCl_4 se administró con la dieta mencionada además de una dosis intraperitoneal de 400 mg/kg de CCl_4 (Cat. 31996-1, Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) una vez a la semana. Al grupo Dieta + AN se le administró una dosis diaria de 50 mg/kg de AN por vía oral, mientras que al grupo Dieta + CCl_4 + AN se le administró la dieta, la dosis de CCl_4 y la dosis de AN mencionadas anteriormente. Por último, al grupo AN se le administró la dosis de AN con la posología que el grupo anterior. Todas las dietas fueron administradas *ad libitum* y el tratamiento se realizó durante 15 semanas, posterior a este periodo se realizó la eutanasia de los animales (**Fig. 5**). La eutanasia se llevó a cabo mediante una extracción de sangre por vía intracardíaca con previa anestesia con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) (Anestek, LN: A028062, PiSA®, Jalisco, México) y xilacina (8 mg/kg) (Procin, LN: A114218, PiSA®, Jalisco, México).

La sangre fue centrifugada a 3000 r.p.m durante 10 min para obtener suero sanguíneo y una vez extraído fue almacenado a 4° C. El hígado fue diseccionado inmediatamente después de la extracción de sangre y se realizaron cortes del tejido para ser distribuidos y almacenados

a -60°C y/o fijados de acuerdo con los requerimientos de las técnicas a continuación mencionadas.

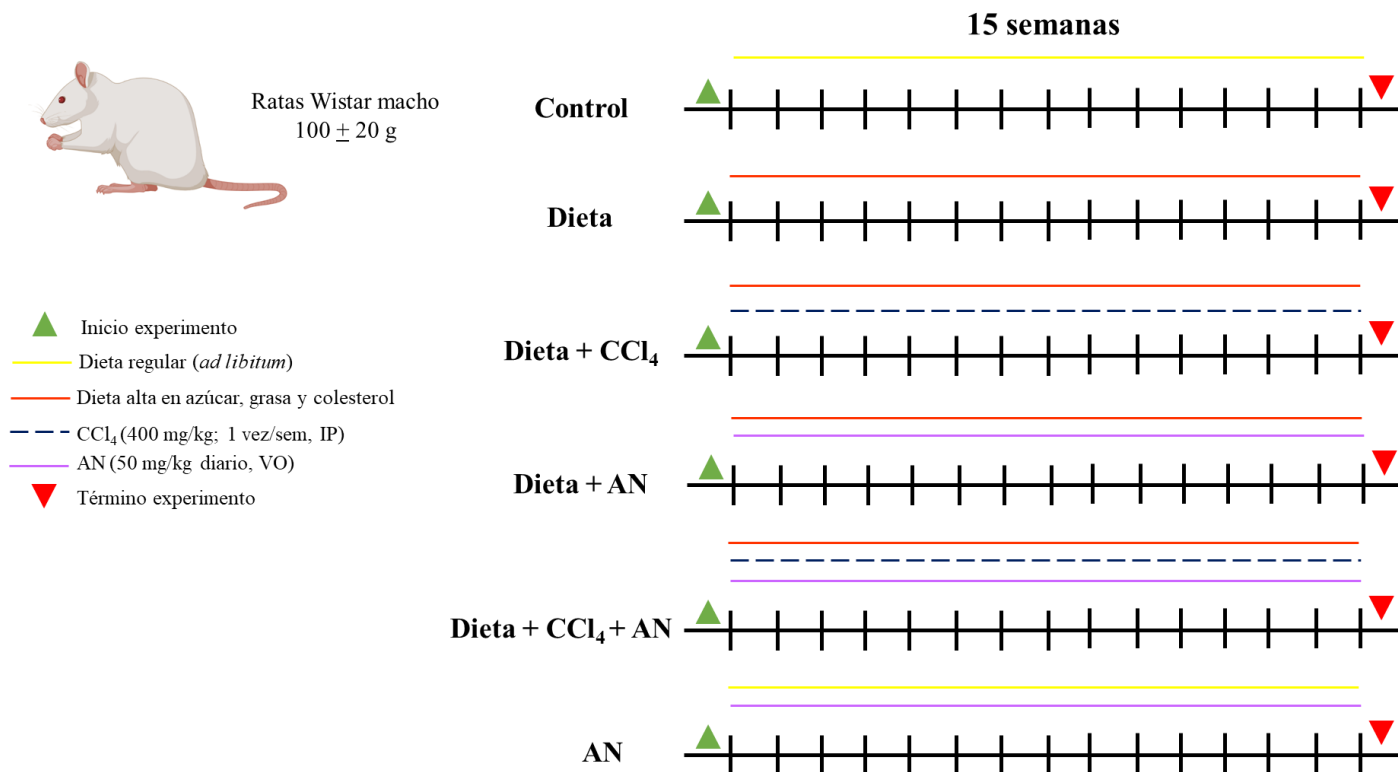


Figura 5. Diseño experimental.

Los animales fueron divididos en 6 grupos de estudio y administrados de acuerdo con el protocolo con una dieta estándar o una dieta alta en azúcar, grasa y colesterol, con o sin administración semanal de CCl₄ o una administración semanal de AN. La duración del tratamiento fue de 15 semanas. CCl₄: Tetracloruro de carbono, IP: Vía intraperitoneal, AN: Ácido nicotínico, VO: Vía oral.

Tabla 1. Composición de la dieta regular

Componente	%
Proteínas	21.0
Grasas (extracto en éter)	5.1
Grasas (hidrólisis ácida)	6.4
Fibra (cruda)	4.3
Extracto libre de nitrógeno (by difference)	53.5
Cenizas	6.0
Otros	3.7

Table 2. Composición de la dieta alta en azúcar, grasas y colesterol

Componente	(g/kg)	Marca
Caseína	100.0	Rennet Casein Irish Dairy Board
Colato de sodio	5.0	Sigma-Aldrich® (Missouri, USA)
Colesterol	10.0	Sigma-Aldrich® (Missouri, USA)
Ázucar glass	300.0	Zulka ® (Zucarmex S.A. de C.V., Sinaloa, Mexico)
Mantequilla sin sal	50.0	Gloria® (Cremería Americana S.A. de C.V., Mexico City, Mexico)
Labdiet®	535.0	No. 5053, Indiana, USA

7.3 Análisis bioquímicos

En el suero sanguíneo se midió la actividad de las enzimas gamma-glutamyl transpeptidasa (γ -GTP) y la alanina aminotransferasa (ALT) de acuerdo con protocolos anteriormente usados [36,37], mientras que con tejido hepático se llevó a cabo la determinación de glutatión reducido (GSH) [38] y de la hidroxiprolina presente en la colágena como se describió anteriormente [39].

7.4 Determinaciones histológicas

Los tejidos fijados fueron lavados con agua destilada y posteriormente deshidratados con gradientes de etanol (1/5853, Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) /xilol (Cat: 917, Hycel®, Jalisco, México) y embebidos en parafina (Ref: 39601006, Leica®, Wetzlar, Germany)[40]. Se realizaron cortes de secciones hepáticas de 5 μ m y posteriormente se realizaron tinciones estándar de hematoxilina (Cat: 1465, Meyer®, CDMX, México) y eosina (Cat: 300, Hycel®, Jalisco, México), rojo oleoso “O” (ORO) y tricrómica de Masson como previamente fueron descritas [40].

7.5 Ensayos inmunohistoquímicos

De acuerdo con el protocolo de la inmunoperoxidasa, secciones de hígado embebidos en parafina fueron desparafinadas durante toda la noche, rehidratadas y se realizó la recuperación del antígeno con buffer de citratos (0.01 M, pH 6). Posteriormente las muestras fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno, lavadas e incubadas con anticuerpos primarios contra p65, NLRP3, Caspasa-1, GSDMD, IL-1 β , TGF- β y α -SMA, los anticuerpos fueron diluidos con suero fetal bovino al 3% durante toda la noche (Tabla 3). Se realizaron 5 lavados de 5 minutos con una solución tampón fosfato salino, para posteriormente ser incubados por 2 horas con anticuerpos secundarios y revelados con DAB, después de este tratamiento los cortes fueron teñidos con hematoxilina (Cat: 1465, Meyer®, CDMX, México) durante 30 s, se enjuagaron con agua corriente, se deshidrataron y fueron montados con resina. Después de dos días, las muestras fueron visualizadas utilizando un microscopio de campo claro (80i, Eclipse, Nikon®, Tokio, Japón). Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando ImageJ® software (versión 1.53q, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Las coloraciones marrones se consideraron como marca positiva.

7.6 Western blot

El extracto de las proteínas totales se realizó de acuerdo con lo previamente reportado [41], para la cuantificación de proteínas se usó el método del ácido bicinonínico [42]. La tabla 3 muestra los anticuerpos utilizados para el análisis de Western blot. Se utilizó β -actina (Ab5694, Abcam®, Cambridge, UK) y GADPH (MA5-15738, Thermo Fisher, Waltham, MA) como controles de carga. Posteriormente, los blots fueron digitalizados y la intensidad de las bandas fue calculada con ImageJ® software (versión 1.53q, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

7.7 Zimografía

La actividad enzimática de las metaloproteasas (MMP)-2 y MMP-9 fue estimadas mediante la medición de la degradación de gelatina [41]. Los geles fueron digitalizados para su

posterior análisis el cual se realizó con ImageJ® software (versión 1.53q, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

7.8 Ensayos de inmunofluorescencia

La técnica que inmunofluorescencia fue llevada a cabo como previamente fue reportada [40], las imágenes fueron obtenidas mediante Leica® TCS SP8 y la intensidad de fluorescencia se cuantificó con ImageJ® software (versión 1.53q, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Los anticuerpo y diluciones utilizados se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en IHQ, Western blot e IF.

Proteína	Dilución IHC	Dilución WB	Dilución IF	Catálogo	Marca
SREBP1C	-	1:500	-	AB28481	Abcam® (Cambridge, UK)
PPAR- α	-	1:500	-	SC-398394	Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, TX, USA)
TNF- α	-	1:500	-	SC-52746	Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, TX, USA)
p65 (NF- κ B)	1:25	1:500	-	MAB3026	Merck Millipore® (MA, USA)
NLRP3	1:25	1:500	1:250	NBP2-12446	Novus biologicals® (Littleton, CO, USA)
ASC	1:25	1:500	-	SC-514414	Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, TX, USA)
Caspasa-1	1:25	1:500	1:250	SC-392736	Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, TX, USA)
IL-1 β	-	1:500	1:250	AB18329	Abcam® (Cambridge, UK)
IL-18	-	1:500	1:250	A16737	Abclonal® (Woburn, MA, USA)
GSDMD	-	1:500	-	SC-393581	Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, TX, USA)
IL-6	-	1:500	-	ARC0962	Thermo Fisher® (Waltham, MA, USA)
IL-10	-	1:500	-	ARC9102	Thermo Fisher® (Waltham, MA, USA)
TGF- β	1:25	1:500	-	MAB1032	Merck-Millipore® (Burlington, MA, USA)
α -SMA	1:25	1:500	1:250	A-5691	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MI, USA)
Colágena-1	-	1:500	-	C2456	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MI, USA)
Anticuerpos secundarios					
Anti-ratón	1:1000	1:5000	1:1000	62-6520	Thermo Fisher® (Waltham, MA, USA)
Anti-conejo	1:1000	1:3000	1:1000	A0545	Merck-Millipore® (Burlington, MA, USA)
Alexa flúor 488	-	-	1:1000	Z25302	Thermo Fisher® (Waltham, MA, USA)
Alexa flúor 594	-	-	1:1000	Z25007	Thermo Fisher® (Waltham, MA, USA)

7.9 Acoplamiento molecular

El modelo molecular de mínima energía para el AN (MMFF94) fue usado como el punto de inicio para la preparación del ligando. Las estructuras cristalinas de TLR4-MD2 (3FX1), TNFR1 (2ZJC), NF-Kb (6YPY), NLRP3 (7ALV), ASC (2KN6), Caspasa-1 (1RWK), IL-1 β (1ITB), IL-18 (3F62), GSDMD (6N9O), P2X7R (4NTJ) y TXNIP (4GEI) (**Tabla 4**) fueron obtenidas de RCSB Protein Data Bank. El acoplamiento se realizó con AutoDock Tools 4.2 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), en una computadora con AMD Ryzen 7 a 1.80 GHz, Radeon Graphics y 16 GB de RAM. Los resultados fueron visualizados y analizado con AutoDock Tools 4.2 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), PyMOL 2.1 (Schrödinger), y BIOVIA Discovery Studio 2018 (BIOVIA, San Diego, CA, USA) para Windows.

8 Análisis estadístico

Todos los datos mostrados en este trabajo están expresados como la media de los valores \pm el error estándar de la media (EE). Los cálculos fueron realizados usando ANOVA de dos vías con un análisis post hoc Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como diferencia significativa. Todos los análisis fueron realizados en el software GraphPad en su versión 8.

9 Resultados

9.1 La administración de una dieta alta en grasa, azúcar y colesterol sin algún inductor químico no conduce a fibrosis hepática y el AN no previene la esteatosis hepática

La **figura 6** muestra en el hígado los cambios histológicos de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, azúcar y colesterol. Las imágenes macroscópicas y microscópicas representativas del tejido hepático se muestran en la **Figura 6A**. Los hígados representativos de los grupos Control y AN muestran una coloración rojiza típica además de una apariencia saludable, sin aparente alteración. Por otra parte, los hígados representativos de los grupos Dieta y Dieta+AN exhiben una coloración amarillenta-blanquecina con disrupción en el parénquima, y las imágenes correspondientes a la tinción de hematoxilina y eosina (**Fig 6B**) muestran que los grupos Control y AN tienen un parénquima aparentemente normal, con cordones de hepatocitos y núcleo central, mientras que las imágenes de los grupos Dieta y Dieta + AN los hepatocitos se muestran en forma de balón con núcleos periféricos e infiltración celular.

La tinción de ORO demostró que los grupos Dieta y Dieta+AN muestran una coloración positiva a lípidos neutros dentro del citoplasma de los hepatocitos, los grupos Control y AN no muestran una tinción positiva para lípidos (**Fig. 6B**).

Por otra parte, las imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson de los grupos Control y AN muestran una coloración positiva a fibras de colágena alrededor de los vasos sanguíneos, pero no en el parénquima hepático, de manera similar los grupos Dieta y Dieta+AN muestran fibras de colágena en la misma zona que los grupos anteriormente mencionados (**Fig 6B**).

Debido a la ausencia de fibrosis en el modelo de HGNA, se consideró continuar con el modelo de EHNA administrado en conjunto con CCl₄.

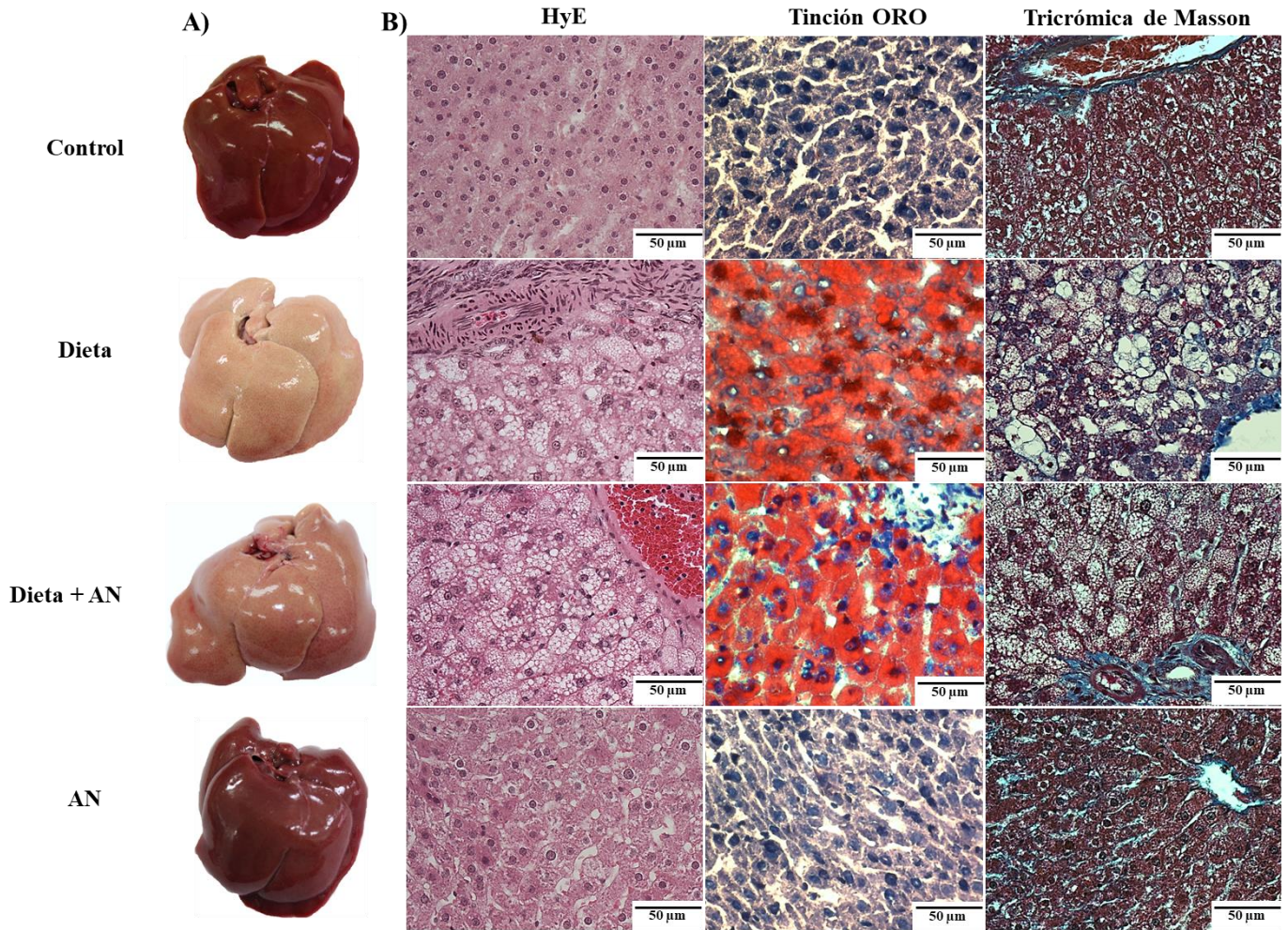


Figura 6. Efecto del AN sobre el tejido hepático de ratas sometidas a un modelo de HGNA.

(A) Imágenes macroscópicas de los hígados representativos de cada grupo de estudio e (B) imágenes microscópicas de la tinción de H&E, ORO y tricrómica de Masson. AN: Ácido nicotínico.

9.2 El AN previene el daño hepático inducido con una dieta alta en grasa, azúcar y colesterol + CCl₄

La **figura 7** muestra los cambios histológicos, el contenido de glutatión reducido (GSH), así como las actividades enzimáticas de la ALT y la γ -GTP. Las imágenes macroscópicas y microscópicas representativas del tejido hepático se muestran en la **Figura 7A**. Los hígados representativos de los grupos Control y AN muestran una coloración rojiza típica además de una apariencia saludable, sin alteraciones visibles. Por otra parte, los hígados representativos de los grupos Dieta+CCl₄ y Dieta+CCl₄+AN exhiben una coloración amarillenta-blanquecina con disrupción en el parénquima, hepatocitos en forma de balón con núcleos periféricos e infiltración celular. Los hígados del grupo Dieta+CCl₄ muestra fibras de colágena en el espacio sinusoidal formando puntos de ramificación. Notablemente, los hígados del grupo Dieta+CCl₄+AN no mostraron fibras de colágena en los sinusoides.

El daño hepático fue evaluado midiendo los niveles séricos de la actividad enzimática de la ALT y la γ -GTP (**Fig. 7B**). Las actividades de estas enzimas indicadora de daño hepático tuvieron un aumento significativo en el grupo Dieta+CCl₄ (ALT: $p = 0.001$; γ -GTP: $p = 0.0376$), mientras que la administración del AN previno significativamente estas alteraciones (ALT: $p = 0.026$; GGT: $p = 0.0414$) (**Fig. 7B, Fig. 7C**). Los niveles hepáticos de GSH no fueron significativamente alterados por ningún tratamiento ($p = 0.2859$) (**Fig. 7D**). Ninguno de estos parámetros fue afectado por la administración del AN comparados con el grupo control.

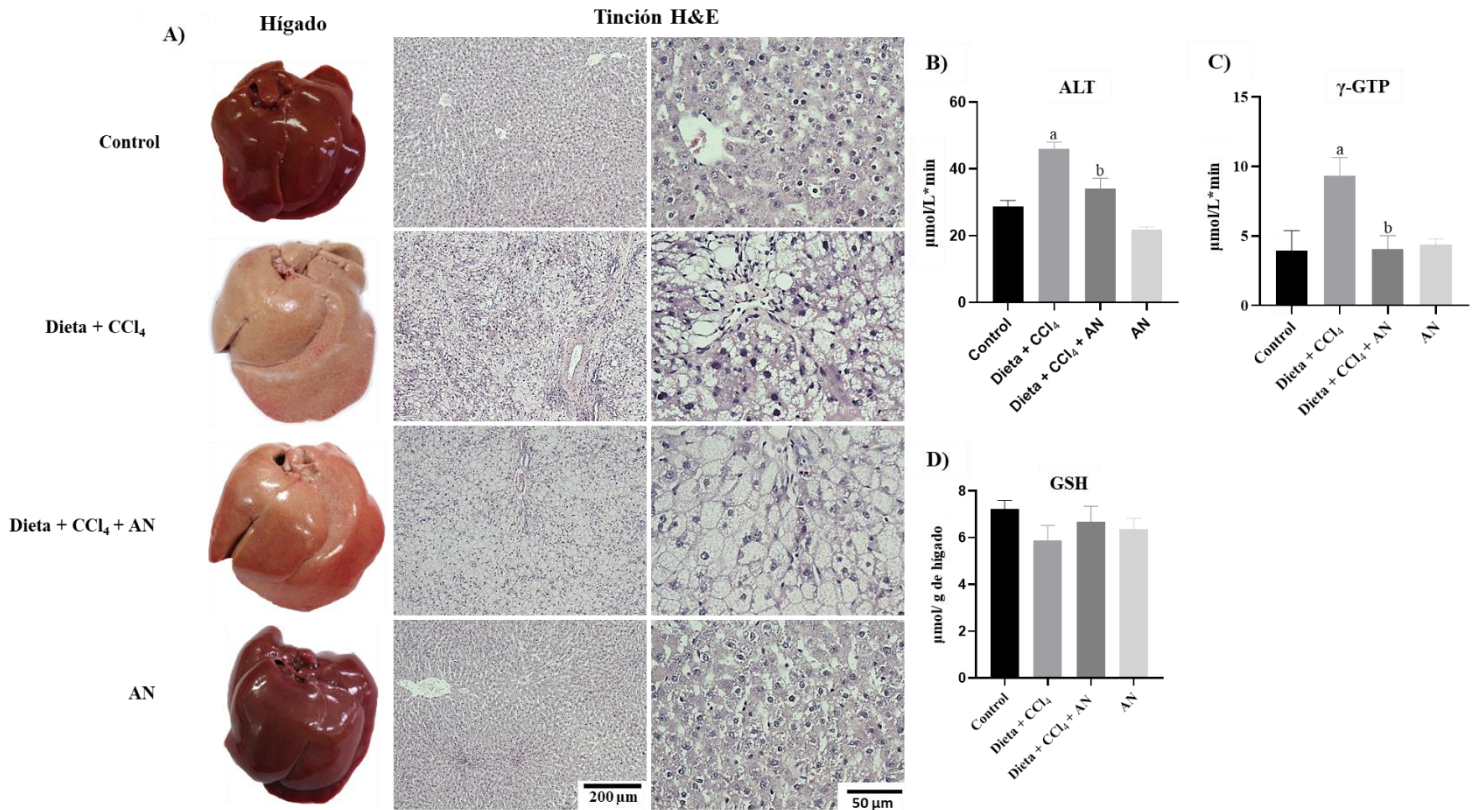


Figura 7. Efecto del AN sobre el tejido hepático y los marcadores de daño hepático de ratas sometidas a un modelo de EHNA.

(A) Imágenes macroscópicas de los hígados representativos de cada grupo de estudio e imágenes microscópicas de la tinción de H&E. Actividades enzimáticas de la ALT (B) y la γ -GTP (C) y contenido hepático de GSH (D). En las gráficas las barras representan la media de 8 ratas \pm EE de ensayos realizados por duplicado. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.3 Efecto del AN sobre la acumulación de lípidos de ratas tratadas con Dieta+CCL₄

Los animales que desarrollaron EHNA mostraron una esteatosis severa, donde macroscópicamente los hígados tuvieron una apariencia blanca (**Fig. 7A**). Para corroborar esta información, se realizó una tinción de ORO y se cuantificó el área positiva. Como se esperaba, los hígados de las ratas del grupo Dieta+CCL₄ acumularon abundantes gotas de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos (**Fig. 8A**), sin embargo, la administración del AN no tuvo un efecto significativo en la acumulación de lípidos en las ratas del grupo Dieta+CCL₄+AN (**Fig. 8B**). El análisis de western blot mostró que los niveles relativos de SREBP-1c no fueron afectados en ningún grupo experimental (**Fig. 8B**). Notablemente, el nivel de PPAR- α incrementó significativamente ($p = 0.0033$) en los animales del grupo Dieta+CCL₄. Por otra parte, el tratamiento con el AN no modificó este parámetro.

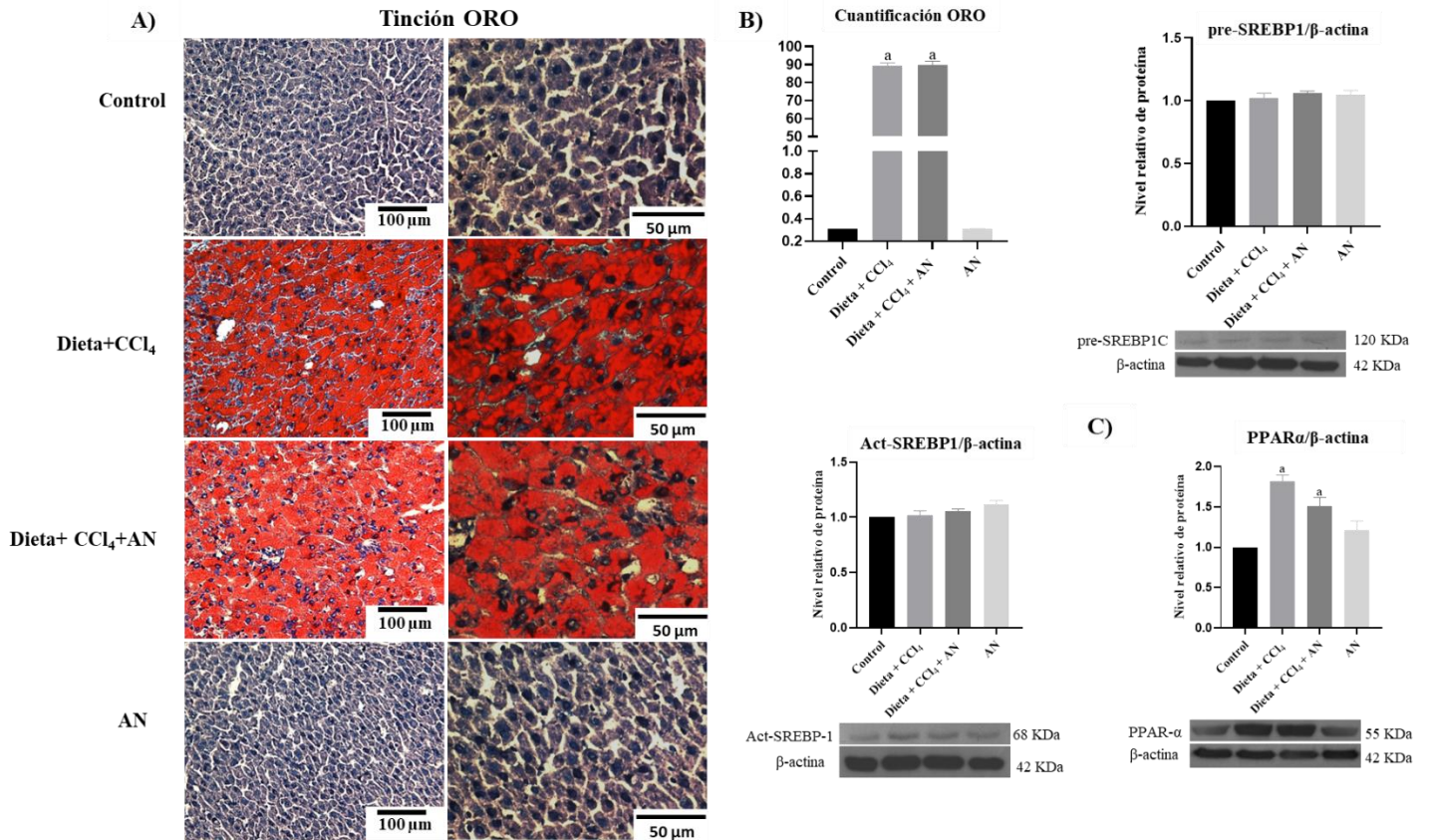


Figura 8. Efecto del AN sobre la acumulación de lípidos.

(A) Imágenes representativas de la tinción de ORO. (B) Cuantificación del área positiva de la tinción de ORO y análisis de western blot de las proteínas pre-SREBP1C y (Acti-SREBP1C). (C) Análisis de western blot de la proteína PPAR- α . La β -actina fue utilizada como control de carga. En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄, $p < 0.05$. pre-SREBP1C: Precursor de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides; Act-SREBP1C: Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides activa; ORO: Rojo oleoso "O"; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.4 El AN inhibe la activación de la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis

Para explorar el efecto del AN sobre el complejo inflamasoma NLRP3 y la vía de la piroptosis, se determinaron los niveles de proteínas inflamatorias como TNF- α , p65 (NF- κ B) así como los componentes del inflamasoma NLRP3, por medio de western bot (**Fig. 9A**). Se encontró que el tratamiento con Dieta+CCl₄ facilitó el microambiente proinflamatorio por medio del aumento de los niveles de TNF- α y p65, así como también promovió el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 por medio del incremento de los niveles de NLRP3, ASC y caspasa-1 en el tejido hepático. De manera similar, los grupos tratados con Dieta+CCl₄ mostraron un incremento en la actividad proteolítica de la caspasa-1, así como los niveles relativos de la IL-1 β , la IL-18 y la GSDMD, las cuales están involucradas en la vía de la piroptosis. Sin embargo, el tratamiento con el AN previno significativamente la activación del NLRP3, inhibiendo la piroptosis en el tejido hepático de los animales tratados con Dieta+CCl₄ (TNF- α : $p = 0.0304$; p65: $p = 0.0017$; NLRP3: $p = 0.0092$; ASC: $p = 0.0061$; caspasa-1: $p = 0.0111$; IL-1 β : $p = 0.0109$; IL-18: $p = 0.0009$; GSDMD: $p = 0.0013$). La vía de señalización del inflamasoma/piroptosis no fue modificada significativamente por ningún vehículo o por el tratamiento con AN (**Fig. 9**).

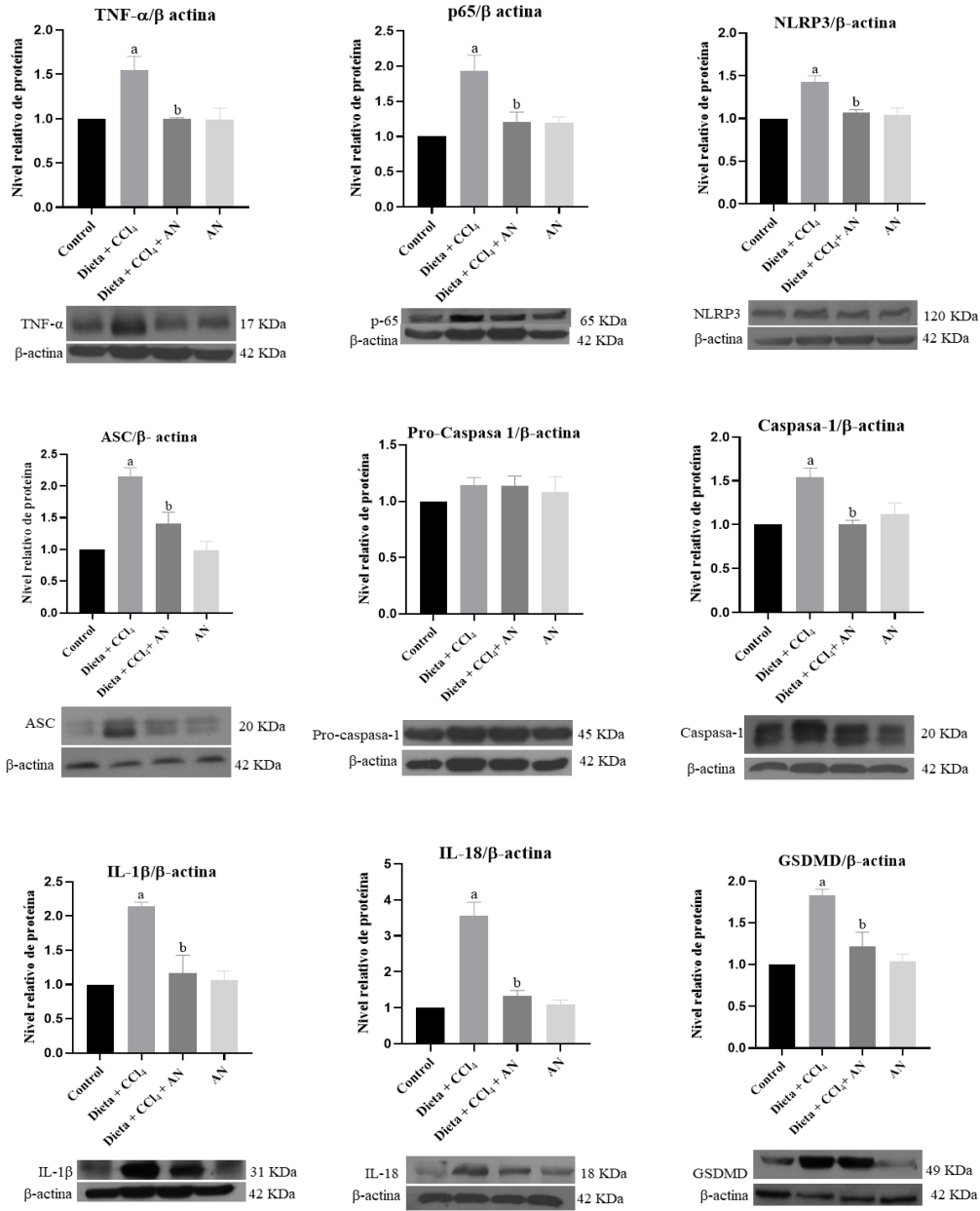


Figura 9. Efecto del AN sobre la activación de la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis.

Imagen representativa del análisis de Western blot sobre las proteínas totales utilizado para detectar los niveles relativos de TNF-α, p65, NLRP3, ASC, pro-Caspasa-1, Caspasa-1, IL-1β, IL-18 y GSDMD. Los niveles de proteína fueron normalizados con β-actina, la cual fue usada como control de carga. En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas ± EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa; p65: subunidad del factor nuclear kappa B; NLRP3: Receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina; ASC: Proteína tipo speck asociada a la apoptosis; IL: Interleucina;

GSDMD: Gasdermina D; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.5 El AN reduce el ambiente inflamatorio inducido por el modelo de EHNA

La **figura 10A** muestra las imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico para detectar a las proteínas p65, caspasa-1 y NLRP3. El tratamiento con la Dieta+CCl₄ incrementa la expresión hepática de p65 ($p = 0.0027$), NLRP3 ($p = 0.0001$) y caspasa-1 ($p = 0.0027$) comparando con el grupo control (**Fig. 10B**). Sin embargo, el tratamiento con el AN previno estos cambios (p65, $p = 0.0190$; NLRP3, $p = 0.0002$; caspasa-1: $p = 0.0068$). Estos resultados sugieren fuertemente que el AN inhibe la activación del NLRP3 durante la progresión de EHNA en las ratas. Adicionalmente, la cuantificación de los niveles de las proteínas IL-6 (**Fig. 10C**) mostró que los niveles no fueron significativamente afectados, mientras que se previno la elevación de los niveles de la IL-10 en el grupo Dieta+CCl₄; y el tratamiento con el AN previno eficazmente esta alteración ($p = 0.0475$) (**Fig. 10D**). El tratamiento con el AN no modificó ningún parámetro comparado con los controles.

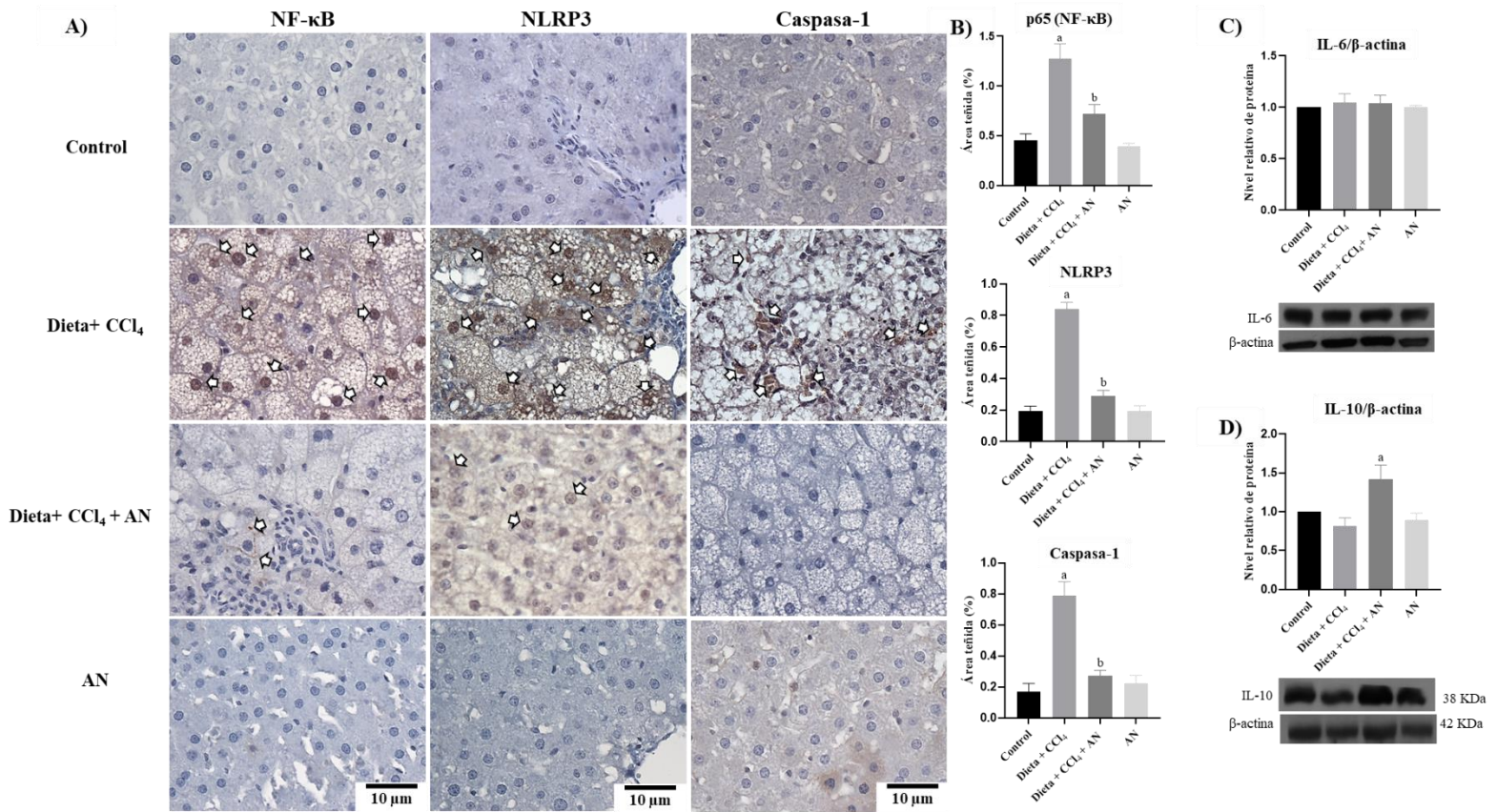


Figura 10. Efecto del AN sobre los niveles hepáticos de las proteínas p65, NLRP3 y caspasa-1.

(A) Imágenes representativas de las tinciones de inmunohistoquímica (IHQ), las flechas indican una reacción positiva. (B) Porcentaje de área de inmunoreacción positiva de las proteínas p65, NLRP3 y caspasa-1. (C) Cuantificación de los niveles de las proteínas IL-6 e IL-10 por medio de western blot. La β-actina fue utilizada como control de carga. En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas ± EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. p65 (NF-κB): Factor nuclear kappa B; NLRP3: Receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina 3; IL: Interleucina; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.6 Efecto del AN sobre el inflamasoma NLRP3 en el tejido hepático de ratas sujetas a un modelo de EHNA

Con el fin de verificar el efecto del tratamiento con AN sobre la activación del inflamasoma NLRP3, se detectaron proteínas del complejo inflamasoma NLRP3 mediante inmunofluorescencia. (**Figs. 11-13**). Los resultados muestran que el tratamiento con Dieta+CCl₄ incrementa los niveles de NLRP3 y caspasa-1 (**Fig. 11A**), así como la co-localización de ambas proteínas. Por otra parte, los niveles de fluorescencia de la caspasa-1 e IL-1 β y la co-localización se incrementaron en el parénquima hepático de animales tratados con Dieta+CCl₄ (**Fig. 12A**). De manera similar, los niveles de fluorescencia de las proteínas caspasa-1 e IL-18 y la co-localización de ambas proteínas aumentó en el grupo Dieta+CCl₄ (**Fig. 13A**). Notablemente, la administración de AN redujo significativamente los niveles de inmunofluorescencia NLRP3 ($p = 0.0151$), caspasa-1 ($p = 0.0010$), IL-1 β ($p = 0.0008$), IL-18 ($p = 0.0015$) y la co-localización de las proteínas anteriormente mencionadas. Esto sugiere fuertemente que el tratamiento con el AN disminuye la activación del inflamasoma NLRP3 y las proteínas blanco involucradas en esta vía de señalización (**Figs. 11-13**).

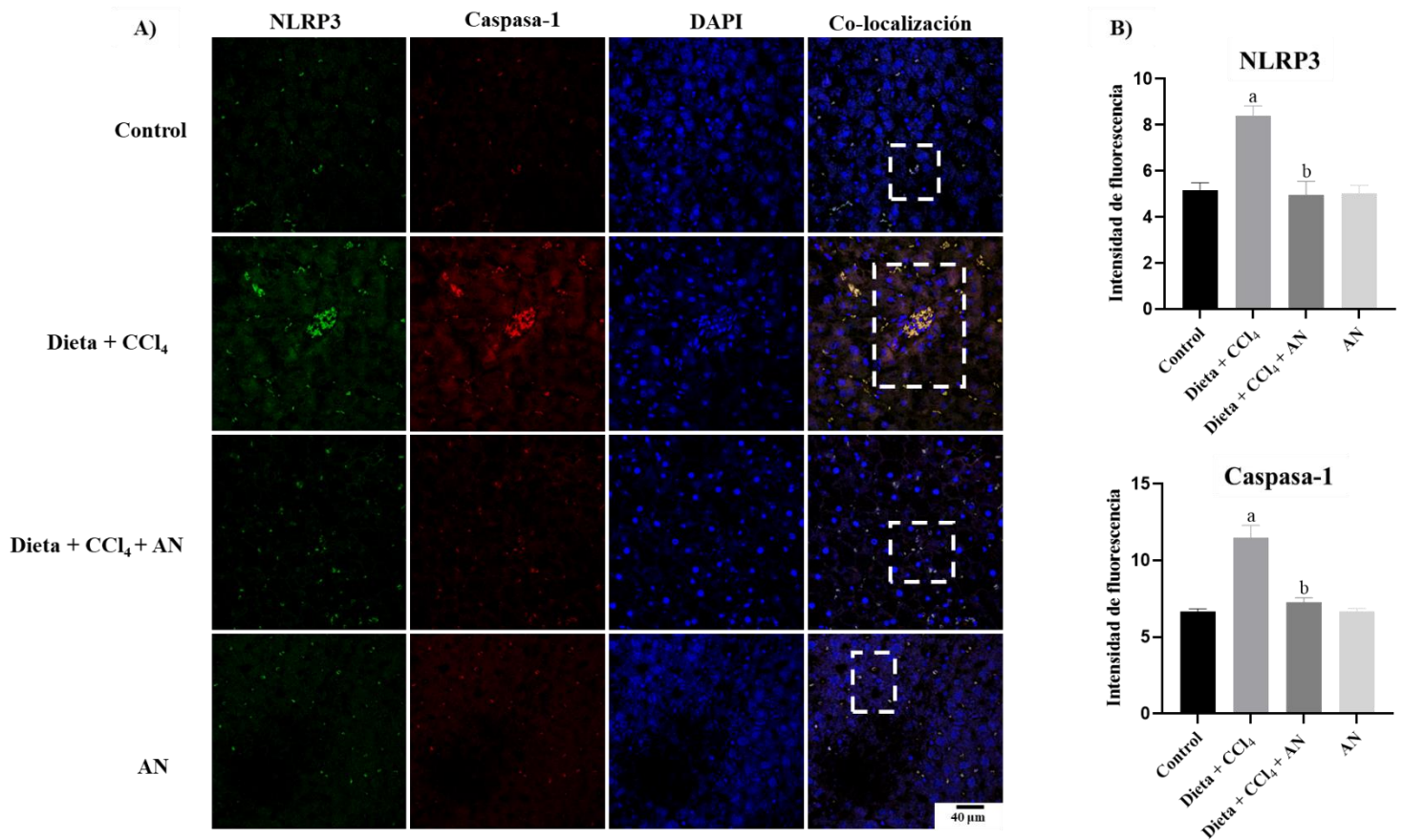


Figura 11. Efecto del AN sobre el ensamblaje del inflammasoma NLRP3.

(A) Imágenes representativas del análisis de inmunofluorescencia para detectar a las proteínas NLRP3 y caspasa-1 en secciones de hígado de todos los grupos de estudio. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Los rectángulos blancos indican la co-localización entre NLRP3 y caspasa-1 de las señales positivas. Magnificación: 40X. (B) Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de NLRP3 y caspasa-1. En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. NLRP3: Receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

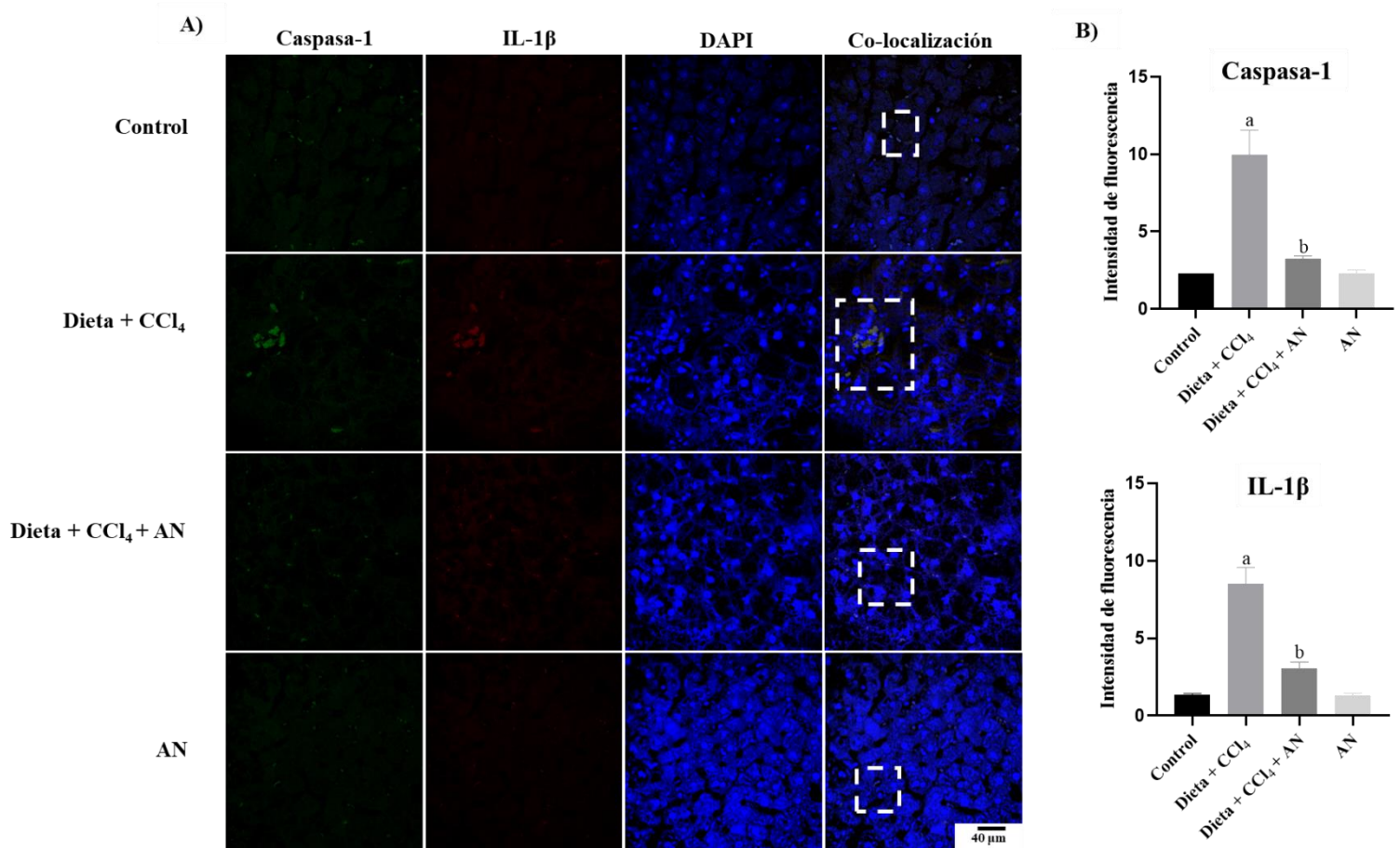


Figura 12. Efecto de la administración del AN sobre los niveles de la caspasa-1 y la IL-1 β y su co-localización.

(A) Imágenes representativas del análisis de inmunofluorescencia para detectar caspasa-1 e IL-1 β de todos los grupos de estudio. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Los rectángulos blancos indican la co-localización entre la caspasa-1 y la IL-1 β de las señales positivas. Magnificación: 40X. (B) Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de la caspasa-1 e IL-1 β . En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. IL: Interleucina; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

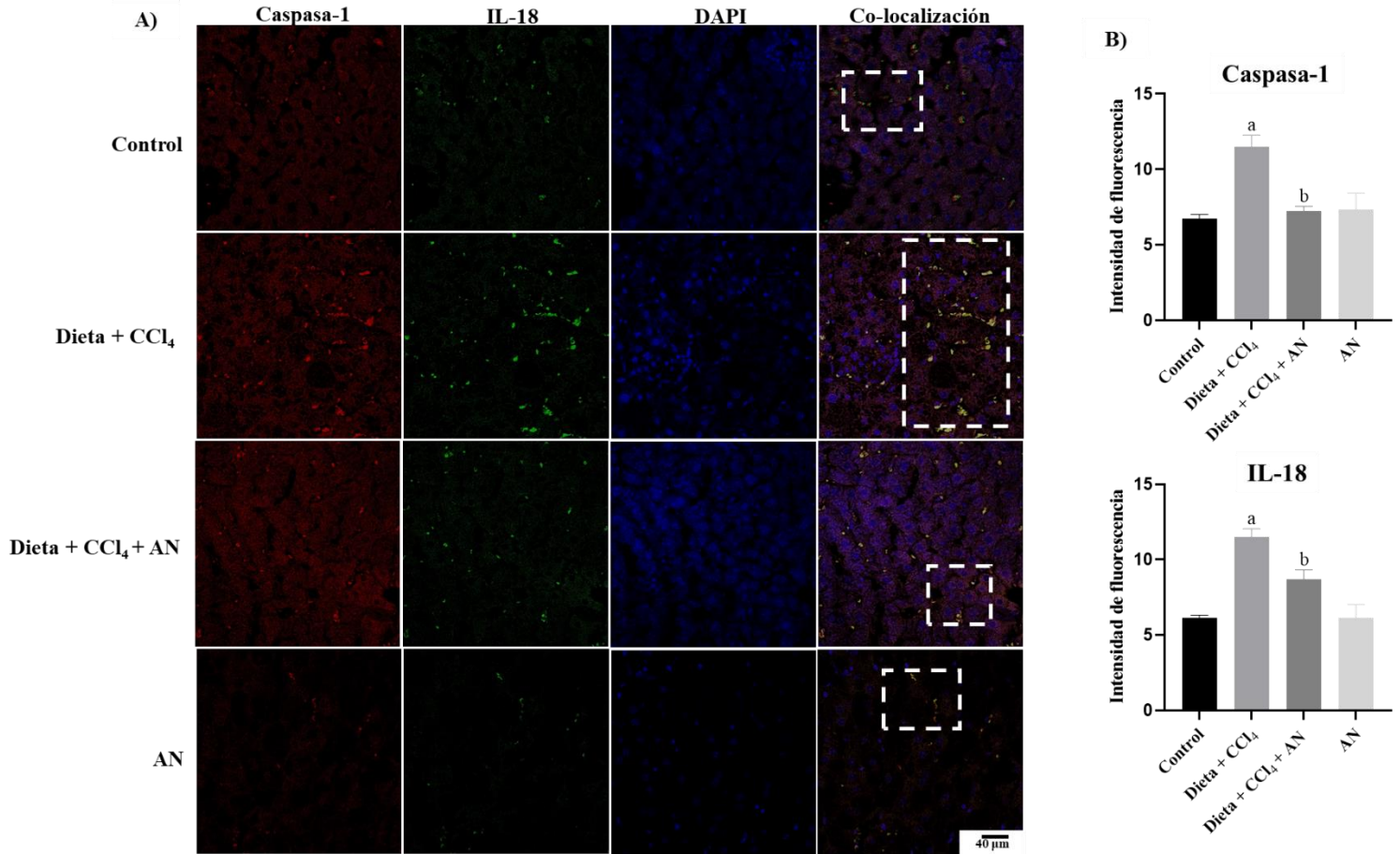


Figura 13. Efecto del AN sobre los niveles hepáticos de las proteínas caspasa-1 e IL-18 así como su co-localización.

(A) Imágenes representativas del análisis de inmunofluorescencia para detectar caspasa-1 e IL-18 de todos los grupos de estudio. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Los rectángulos blancos indican la co-localización entre la caspasa-1 y la IL-18 de las señales positivas. Magnificación: 40X. (B) Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de la caspasa-1 e IL-18. En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. IL: Interleucina; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.7 El AN disminuye los cambios patológicos hepáticos y atenúa la fibrosis, inducidos con la Dieta + CCl₄

La tinción tricrómica de Masson muestra que la administración de la Dieta + CCl₄ incrementa la acumulación de las fibras de colágena en tejido hepático. Sin embargo, el tratamiento con el AN previno significativamente ($p = 0.0207$) este incremento (Fig. 14A y 14B). Para corroborar este hallazgo, se cuantificaron los niveles de hidroxiprolina en muestras de hígado. De manera similar a los resultados obtenidos con la tinción de tricrómica de Masson, los niveles de hidroxiprolina se elevaron significativamente ($p = 0.0001$) en el grupo con EHNA comparado con el grupo control, mientras que el tratamiento con el AN previno este fenómeno ($p = 0.0113$) (Fig. 14C). No se observaron cambios histológicos en el grupo tratado únicamente con el AN. Por otra parte, para evaluar la capacidad fibrinolítica del hígado, se midió la actividad de las MMP 2 y 9 por medio de zimografías (Fig. 14D). La actividad de la MMP-2 incrementó significativamente ($p = 0.0013$) después de la administración de la Dieta + CCl₄; sin embargo, la administración del AN mostró un efecto preventivo parcial pero significativo ($p = 0.0277$) en la actividad de esta enzima (Fig. 14E). Mientras que la elevación de la actividad de la MMP-9 por el tratamiento con Dieta+CCl₄ no fue prevenida por el tratamiento con el AN.

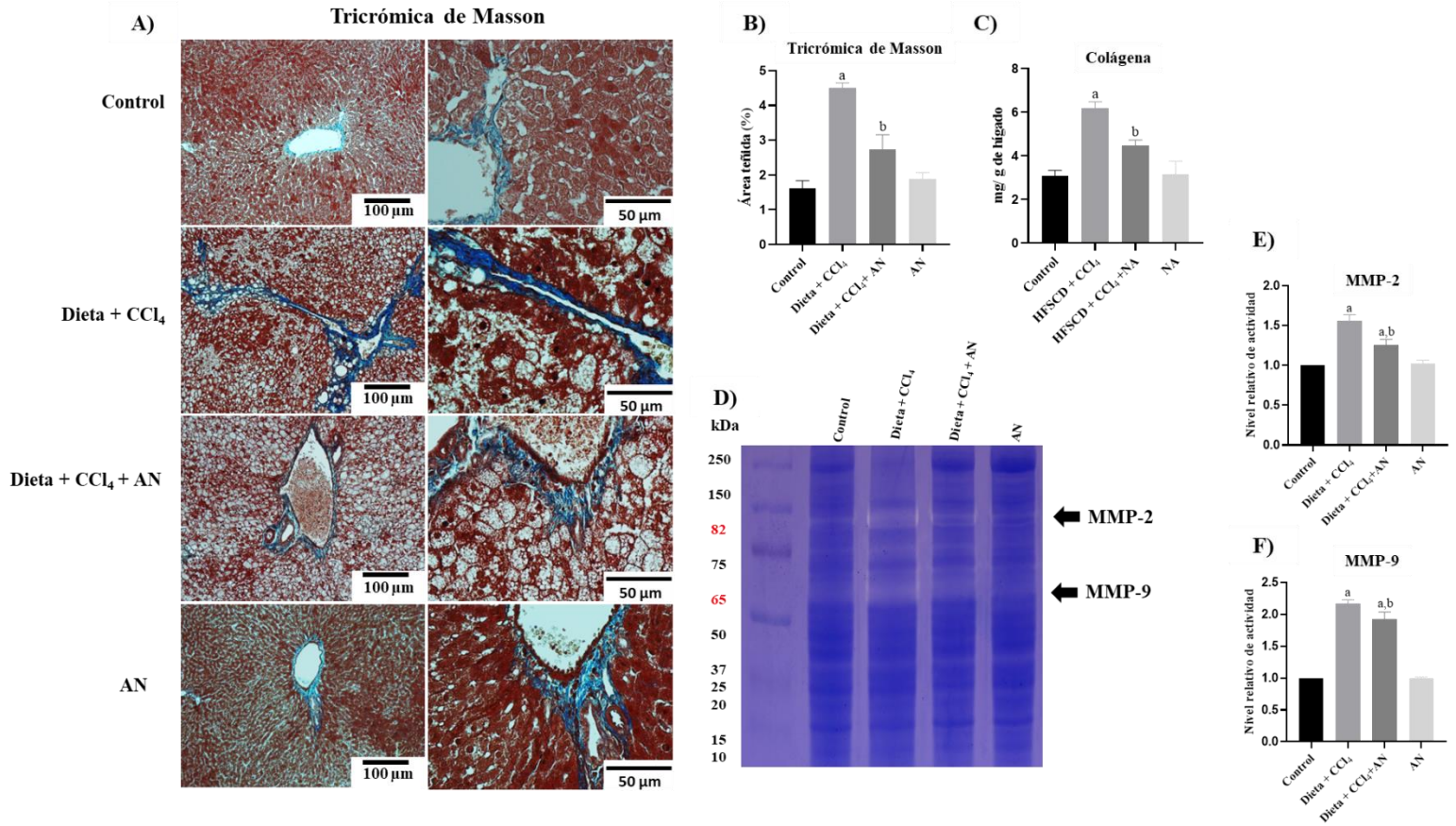


Figura 14. Efecto del AN sobre la fibrosis hepática inducida en el modelo de la EHNA.

(A) Imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson. (B) Cuantificación del área positiva de la tinción de tricrómica de Masson, en la gráfica las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (C) Nivel de colágena hepática total, en la gráfica las barras representan la media de 8 ratas \pm EE. (D) Zimografía para detectar la actividad enzimática de la MMP-2 (E) y la MMP-9 (F). En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. MMP: Metaloproteinasas; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.8 El AN previene la activación de las células estelares hepáticas

La figura 15A muestra el análisis por medio de IHQ de tejido hepático. El tratamiento con la Dieta + CCl₄ incrementó los niveles de TGF- β ($p = 0.0006$) y de α -SMA ($p = 0.0001$) (Fig. 15B y 15C) ambos comparados con los grupos control y NA. Estos incrementos fueron prevenidos por medio del tratamiento con AN en los animales sometidos al modelo de EHNA. Los análisis de western blot confirmaron estos hallazgos, los niveles de proteína fueron incrementados significativamente en el grupo de Dieta+CCl₄ (TGF- β : $p = 0.0013$; α -SMA: $p = 0.0115$; col-1: $p = 0.0257$). Sin embargo, el tratamiento con AN previno parcialmente la elevación de los niveles de TGF- β ($p = 0.0131$) (Fig. 15D), pero fue capaz de preservar los niveles de α -SMA ($p = 0.0072$) (Fig. 15E) y de col-1 ($p = 0.0279$) (15F) en niveles basales.

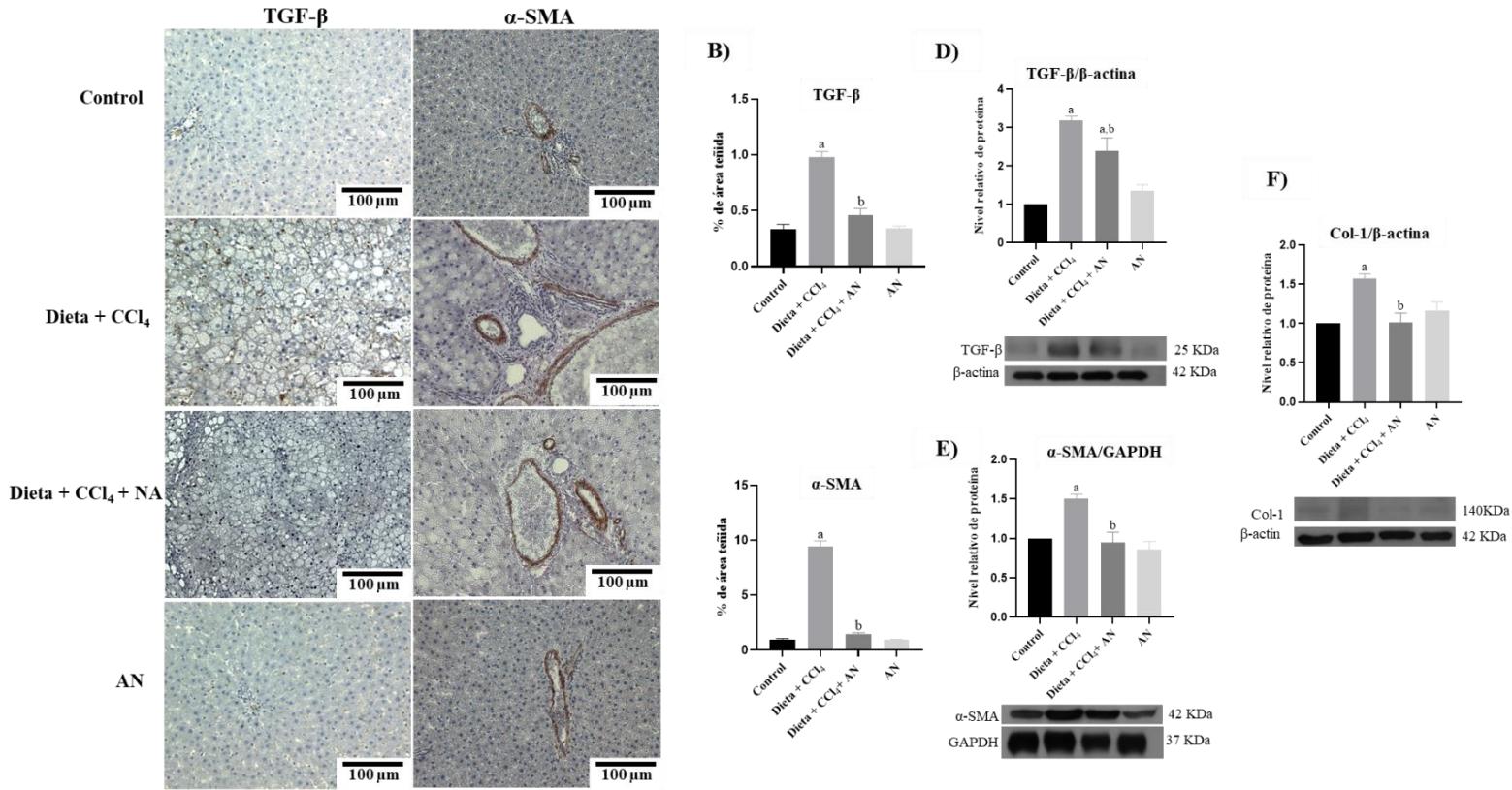


Figura 15. Efecto del AN sobre la fibrosis hepática producida en los animales con EHNA.

(A) Imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson. (B) Cuantificación del área positiva de la tinción de las fibras de colágena. En la gráfica las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (C) Nivel de colágena hepática total, en la gráfica las barras representan la media de 8 ratas \pm EE. (D) Zimografía para detectar la actividad enzimática de la MMP-2 (E) y la MMP-9 (F). En las gráficas las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄, $p < 0.05$. MMP: Metaloproteinasas; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.9 La activación de las células estelares es mediada por el NLRP3 y atenuada por el AN

Para evaluar el papel del inflamasoma NLRP3 en la activación de las HSCs, se determinó la interacción entre el NLRP3 y el α -SMA por medio de un análisis de inmunofluorescencia en tejido hepático. La figura 16 muestra la intensidad de fluorescencia de las proteínas NLRP3 y α -SMA, las cuales incrementaron significativamente (NLRP3: $p = 0.0287$; α -SMA: $p = 0.0003$) en muestras del grupo de Dieta+CCl₄ (Fig. 16B). Además, se observó una co-localización elevada entre ambas proteínas en muestras hepáticas de los animales tratados con la Dieta+CCl₄. Notablemente, el tratamiento con el AN atenúo significativamente la co-localización entre NLRP3 y α -SMA (NLRP3: $p = 0.0495$; α -SMA: $p = 0.0004$) (Fig. 16A). El tratamiento con el AN no modificó ninguno de los parámetros anteriormente mencionados, comparándolos contra el grupo control. Estos resultados sugieren que el inflamasoma NLRP3 induce la activación de las HSCs.

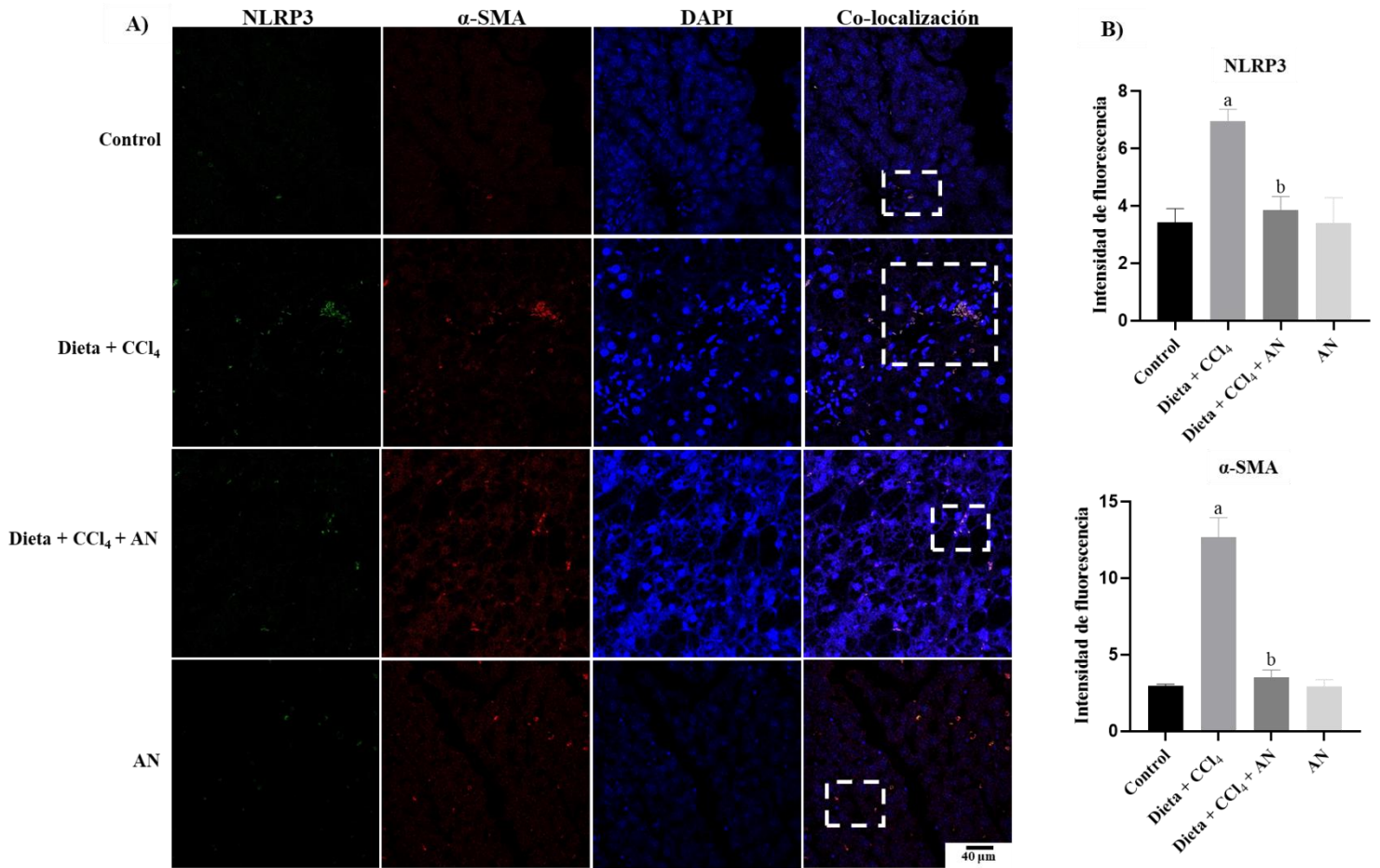


Figura 16. Efecto del AN sobre la activación de las HCSs inducida por el inflammasoma NLRP3.

(A) Micrografías representativas del análisis de inmunofluorescencia de las proteínas NLRP3 y α -SMA en tejido hepático de todos los grupos experimentales. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Los rectángulos blancos indican la co-localización entre NLRP3 y α -SMA de las señales positivas. Magnificación: 40X. (B) Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia del NLRP3 y α -SMA. En la gráfica las barras representan la media de 3 ratas \pm EE. (a) Diferencia significativa comparado con el control y (b) con Dieta+CCl₄; $p < 0.05$. NLRP3: Receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; AN: Ácido nicotínico; Dieta+CCl₄: Dieta alta en grasa, azúcar suplementada con colesterol y administración de una dosis baja de CCl₄.

9.1.1 El acoplamiento molecular muestra las interacciones del AN con posibles blancos terapéuticos

Como se muestra en la figura 17, el análisis de acoplamiento molecular del AN muestra una energía de unión media de -3.9 kcal/mol, así como la interacción entre el AN y el TLR4. La principal interacción del AN con el TLR4 fue entre los aminoácidos GLU169, VAL197 y la SER172 (**Fig. 17A**). La energía de unión entre el receptor para el factor de necrosis 1 (TNFR1) y el AN (**Fig. 17B**) mostró una energía media de unión de -3.8 kcal/mol e interactuando con LEU67, ALA62, LYS32 y ASN65.

La energía del acoplamiento molecular entre el AN y p65 (NF- κ B) fue de -4.7 kcal/mol y las principales interacciones fueron con los aminoácidos PHE119, CSO38, ILE168 y ARG41 (**Fig. 17C**). De manera notable, la unión entre el AN y el NLRP3 obtuvo una energía de acoplamiento de -5.8 kcal/mol interactuando con los aminoácidos LEU171, ILE234, PHE373 y PRO412 respectivamente (**Fig. 17D**). Por otra parte, el acoplamiento molecular del ASC con el AN mostró una energía de unión de -4.3 kcal/mol, interactuando con los residuos de los aminoácidos PHE63, ILE168 y LYS174 (**Fig. 17E**).

La energía de unión de la caspasa-1 y el AN fue de -4.5 kcal/mol interactuando con los residuos de aminoácidos ARG179, SER236, HIS237, GLN283, CYS285 y ARG341 (**Fig. 17F**).

Además, la IL-1 β (**Fig. 17G**) y la IL-18 (**Fig. 17H**) mostraron una energía de unión de -4.3 y -4.6 kcal/mol respectivamente, interactuando con SER125, PRO131 y PHE133 para IL-1 β y con PRO57, ARG58, GLY59, ALA61 y THR113 para la IL-18. La energía de acoplamiento de la GSDMD con el AN fue de -4.3 kcal/mol, interactuando con los residuos de aminoácidos PRO36, TYR37 y SER60 (**Fig. 17I**).

La figura 18 muestra el acoplamiento molecular del AN con el P2X7R y con TXNIP, las energías de acoplamiento fueron -5.8 (**Fig. 18A**) y -5.2 (**Fig. 18B**) kcal/mol, respectivamente, interactuando con VAL102, TYR105, SER156, VAL190, y CYS194 para P2X7R; mientras que para TXNIP las interacciones fueron con VAL44, LEU77 y VAL89. Las energías de unión correspondientes se muestran en la tabla 4.

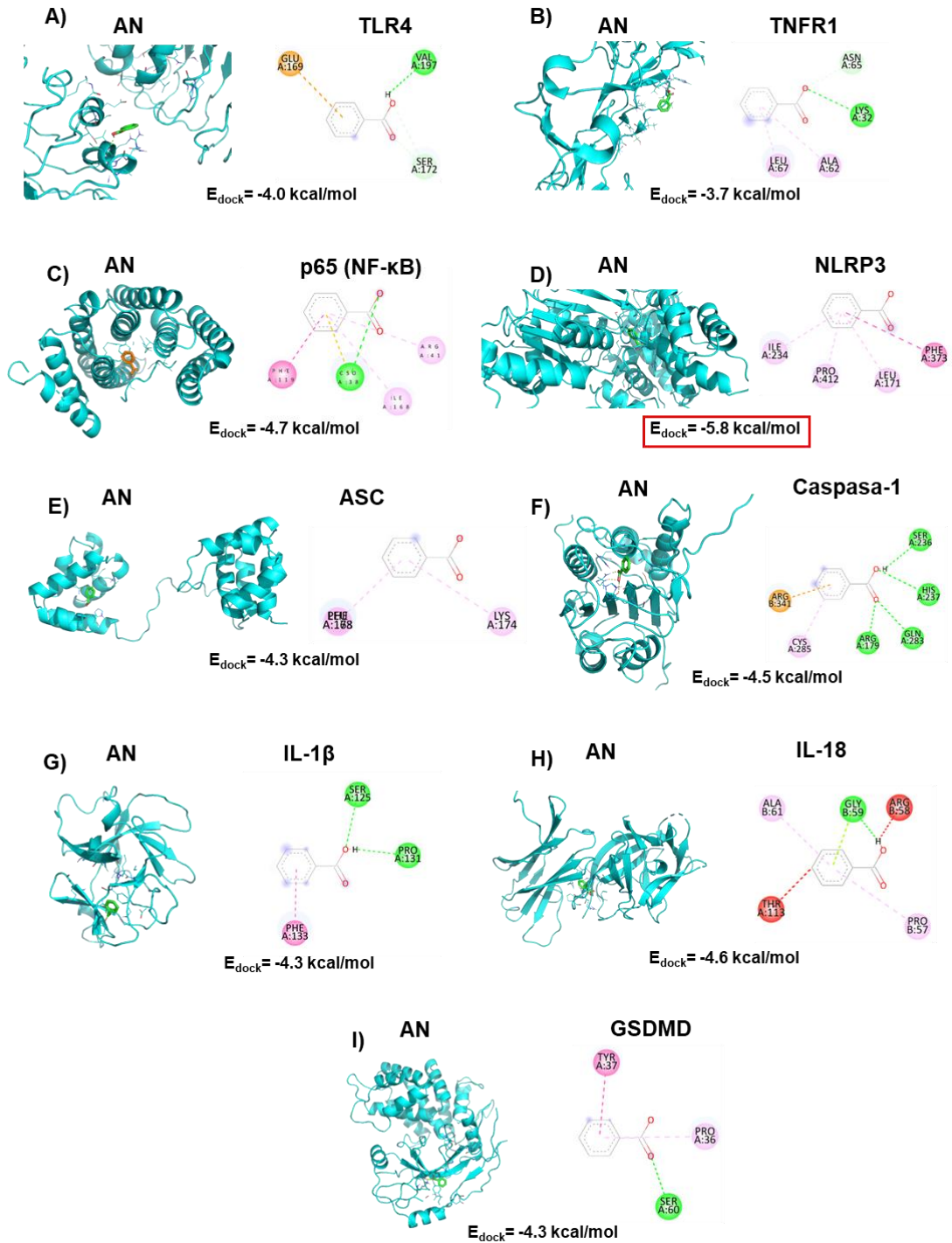


Figura 17. Acoplamiento molecular del AN con proteínas involucradas en la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis.

Energías de unión e interacción de aminoácidos entre AN y TLR4 (A), TNFR1 (B), p65 (C), NLRP3 (D), ASC (E), caspasa-1 (F), IL-1 β (G), IL-18 (H) y GSDMD (I).

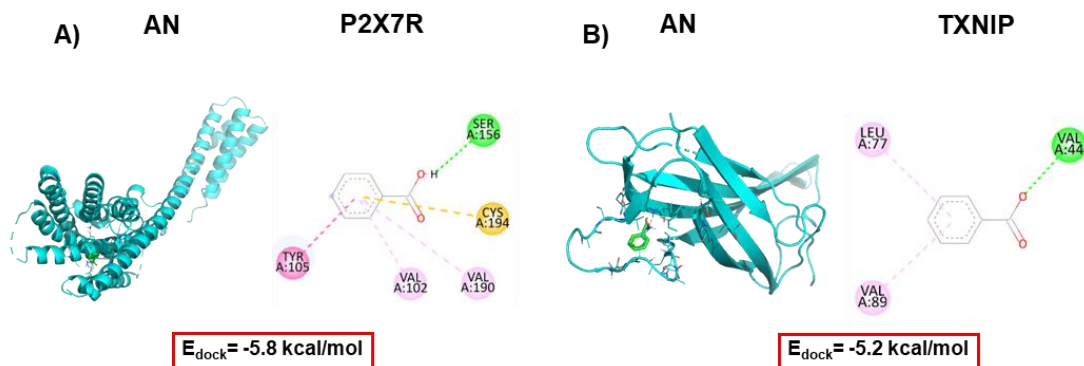


Figura 18. Acoplamiento molecular del AN con proteínas involucradas en la activación de la vía del inflammasoma NLRP3.

Energías de unión e interacción de aminoácidos entre AN y P2X7R (A) y TXNIP (B).

Tabla 4. Resultados del acoplamiento molecular del AN con proteínas involucradas en la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis.

Proteína	ID PDB	Vina Score	Centro (x,y,z)	Tamaño (x,y,z)	Interacciones
TLR4	3FXI	-4.0	25.65, -22.35, 12.04	15,15,15	GLU169 _{pi-an} ; SER172 _P ; VAL197 _P
TNFR1	2ZJC	-3.7	-9.61, 26.33, 5.31	10,10,10	LYS32 _P ; ALA62 _{NP} ; ASN65 _P ; LEU67 _{NP}
p65 (NF-κB)	6YPY	-4.7	18.75, 22.49, -0.17	10,10,10	CSO38 _{P, pi-cat} ; ARG41 _{NP} ; PHE119 _{NP} ; ILE168 _{NP}
NLRP3	7ALV	-5.8	21.32, 33.51, 138.21	15,15,15	LEU171 _{NP} ; ILE234 _{NP} ; PHE373 _{NP} ; PRO412 _{NP}
ASC	2KN6	-4.3	-15, 0.1, -13	17,17,17	PHE63 _{NP} ; ILE168 _{NP} ; LYS174 _{NP}
Caspasa-1	1RWK	-4.5	33.09, 60.69, 4.87	12,12,12	ARG179 _P ; SER236 _P ; HIS237 _P ; GLN283 _P ; CYS285 _{NP} ; ARG341 _{pi-cat}
IL-1β	1ITB	-4.3	30, -2, 7	15,15,15	SER125 _P ; PRO131 _P ; PHE133 _{NP}
IL-18	3F62	-4.6	10, 5, 14	14,14,14	PRO57 _{NP} ; GLY59 _P ; ALA6 _{NP}
GSDMD	6N9O	-4.3	18, -40, 80	20,20,20	PRO36 _{NP} ; TYR37 _{NP} ; SER60 _P
P2X7R	4NTJ	-5.8	17, 101.02, 50.65	15,15,15	VAL102 _{NP} ; TYR105 _{NP} ; SER156 _P ; VAL190 _{NP} ; CYS194 _{pi-cat}
TXNIP	4GEI	-5.2	17, 39, -8	19,19,19	VAL44 _P ; LEU77 _{NP} ; VAL89 _{NP}

P: interacciones polares, NP: interacciones no polares, pi-cat: interacciones pi-cación, pi-an: interacciones pi-anión.

10 Discusión

Con el fin de proponer nuevos compuestos capaces de combatir a la EHNA, se decidió investigar los efectos benéficos del AN en un modelo experimental de esta enfermedad desarrollado recientemente por nuestro grupo de trabajo [42]. Además, nos propusimos determinar si el mecanismo de acción de este compuesto está asociado con su habilidad para interferir con la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis. Encontramos que el AN atenúa la severidad de la EHNA experimental y que el mecanismo molecular más probable es la intervención a diferentes niveles en el proceso de activación de la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis, conducente a la disrupción del proceso proinflamatorio y la prevención del daño hepatocelular y la fibrosis.

El hígado graso simple es una fase reversible de la enfermedad que puede progresar a EHNA, una etapa avanzada que puede resultar en cirrosis, CHC, y la muerte del paciente [43]. Este resultado se debe en parte a la activación de un proceso proinflamatorio progresivo que desencadena otras alteraciones en el hígado, como la fibrosis y la cirrosis; así pues, la activación de las vías de señalización proinflamatorias desempeña un papel clave en la progresión de la EHNA y representa un atractivo blanco terapéutico [11,44]. Previamente reportamos que una dosis baja semanal de CCl₄, como la usada en este estudio o la dieta hepatopatogénica no inducen inflamación o fibrosis cuando se usan por separado; sin embargo, cuando estas se combinan, se observó una fuerte respuesta inflamatoria y profibrogénica [42]. Generalmente es aceptado que la señalización de la vía del inflamasoma NLRP3 juega un papel fundamental en el desarrollo de la EHNA [42,45,46]. Por lo tanto, el bloqueo observado de la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis por medio del AN puede ser una valiosa terapia para tratar pacientes con EHNA; sin embargo, se necesitan más estudios antes de recomendar al AN como un tratamiento útil y eficaz para la EHNA en humanos.

El AN, también conocido como niacina o vitamina B₃, se encuentra en vegetales, leguminosas y carne [47]. El AN es un compuesto soluble derivado de la piridina y es precursor de las coenzimas NAD y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP). NAD y NADP están involucradas en reacciones catabólicas y anabólicas de los carbohidratos, grasas y colesterol [48]. El AN ha sido utilizado como tratamiento para la dislipidemia debido a la habilidad que tiene para disminuir los niveles de las lipoproteínas de

baja densidad y de los triglicéridos, también por favorecer los niveles de lipoproteínas de alta densidad [48].

El modelo de EHNA usado en esta investigación causó una gran acumulación de lípidos y fibrosis comparado con otros modelos reportados [42]. Previamente, la dosis de AN utilizada en este estudio mostró efectos antiinflamatorios y antifibróticos en un modelo de daño hepático inducido con tioacetamida [32]. A pesar del gran efecto antiinflamatorio y antifibrótico del AN observados en este estudio, este fármaco no mostró propiedades antiesteatóticas, por lo que se sugiere que el principal efecto benéfico del AN es por medio de la habilidad para inhibir la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis en lugar de modular la vía metabólica de los lípidos. Existe evidencia que respalda los efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antifibróticos y antidislipémicos del AN [32,48,49,50]. Sin embargo, la evidencia de los efectos antiesteatóticos por parte del AN no es concluyente. Algunos estudios han demostrado que los efectos antiesteatóticos del AN únicamente se han observado utilizando altas dosis de este fármaco [51, 52, 53] las cuales en humanos se consideran como dosis tóxicas. En este estudio, se utilizó una dosis relativamente baja de AN, la cual ha sido una dosis efectiva para prevenir inflamación y fibrosis hepática [31], sin embargo, no fue capaz de tener un efecto antiesteatótico. Similarmente, algunos ensayos clínicos han demostrado que una dosis baja de AN no es eficaz para disminuir los niveles de triglicéridos o hígado graso [53]. En congruencia con la falta de efecto sobre la esteatosis hepática que se observó en este estudio, las proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos (SREBP-1c y PPAR- α) no fueron modificadas con el tratamiento de AN. Cabe destacar que el hígado graso simple se considera una enfermedad benigna reversible, sin embargo, puede progresar a EHNA y CHC como consecuencia de la activación del proceso inflamatorio. De manera interesante, éste fue bloqueado eficazmente por el AN y previno el progreso de la enfermedad a estados más graves.

Reportes previos han demostrado que la vía de señalización del inflammasoma NLRP3/piroptosis está estrechamente relacionado en la progresión de un simple hígado graso hacia EHNA y fibrosis [54,55,56]. En este estudio, se confirmó que la activación de la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis es esencial para la progresión en nuestro modelo experimental de EHNA. Hallamos que este modelo incrementa los niveles de NLRP3, ASC y caspasa-1, y exacerbó la producción y la liberación de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-

18 que inducen inflamación y fibrosis. Nuestros principales hallazgos sugieren que la administración del AN previene la progresión de la EHNA experimental por medio de la inhibición de la activación de la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Li y colaboradores [31], quienes demostraron la habilidad del AN para inactivar la vía del inflamasoma NLRP3 por medio de la proteína SIRT1 en células endoteliales. Además, Ganji et al. [49] demostraron que el AN es capaz de disminuir los niveles de IL-18 en cultivos celulares de hepatocitos. Destacadamente, por primera vez, encontramos que el AN no solamente es capaz de disminuir la activación de la vía de señalización del inflamasoma NLRP3 sino también previene la elevación en los niveles de GSDMD e inhibió la piroptosis. Por lo que proponemos que el AN previene la EHNA al ser un fármaco multiobjetivo. Por una parte, mediante la disminución de los niveles de NLRP3 y NF- κ B, y, por otra parte, por medio de la interacción directa del AN con el NF- κ B, previno la translocación de este factor de transcripción hacia el núcleo celular y como consecuencia la transcripción de NLRP3, TNF- α , pro-IL-1 β y pro-IL-18.

Adicionalmente, la unión entre el AN y el receptor TLR4 podría disminuir la señalización del NF- κ B; así, las interacciones del AN con NLRP3, ASC, caspasa-1, IL-1 β , IL-18 y GSDMD podrían incrementar la actividad hepatoprotectora de este fármaco, como lo sugieren los análisis de acoplamiento molecular. La disociación del TXNIP y su unión con el NLRP3 dispara la activación del inflamasoma [22]. Por lo tanto, basándonos en el análisis del acoplamiento molecular, nuestros resultados mostraron que el AN posee una gran afinidad por TXNIP, lo que sugiere que este fármaco podría también atenuar la activación del inflamasoma NLRP3 a través de un mecanismo que involucra directamente la interacción con diversas moléculas implicadas en esta vía inflamatoria. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones *in vivo* e *in vitro* que puedan validar esta hipótesis.

Además, descubrimos que el fuerte efecto antifibrótico del AN está asociado con la inhibición de la activación de las HSCs. El TGF- β [56], NLRP3, IL-1 β e IL-18 [58,59] son citocinas conocidas por ser potentes disparadoras de la activación de las HSCs, lo cual conduce al desarrollo de la fibrosis hepática. Además, nuestros resultados muestran que el AN atenúa los niveles de TGF- β e inhibiendo la vía del inflamasoma NLRP3/piroptosis, lo que puede ser otro probable mecanismo de acción antifibrótico.

Existen diversos modelos animales de EHNA [60,61,62], los cuales ofrecen tanto ventajas como desventajas. Recientemente desarrollamos un modelo experimental que fue utilizado que fue completamente caracterizado [63]. Una de las ventajas de este modelo, además del corto tiempo de experimentación, es que reproduce las diferentes etapas de la EHNA en humanos, incluyendo la inflamación y la activación del inflamasoma NLRP3, que es uno de los blancos terapéuticos del AN para atenuar la EHNA como lo observamos en este estudio. También sugerimos que el AN debería ser evaluado en otros modelos animales de EHNA, donde se incluya el modelo de la dieta western, el modelo STAM y el de la dieta deficiente en metionina-colina [60] para investigar más a fondo estas propiedades benéficas, los mecanismos y efectos secundarios antes de ser utilizado como tratamiento de la EHNA en humanos.

11 Conclusión

En conclusión, este estudio provee una fuerte evidencia de la capacidad antiinflamatoria y antifibrótica del AN en la progresión de la EHNA experimental y fundamenta el camino para el tratamiento de esta enfermedad hepática. La inhibición de la activación de la vía de señalización del inflamasoma NLRP3 por medio del AN previene la piroptosis y, consecuentemente, la fibrosis hepática. Adicionalmente, debido al perfil de seguridad de este fármaco, nuestros resultados sugieren fuertemente que podría ser utilizado en el tratamiento de EHNA en humanos. No obstante, son necesarios más estudios básicos y clínicos para elucidar mecanismos adicionales involucrados en la atenuación de moléculas clave implicadas en la progresión de EHNA, como la activación del NLRP3. La **figura 19** muestra un resumen pictográfico de los posibles mecanismos propuestos por los cuales el AN atenúa la EHNA en un modelo *in vivo*.

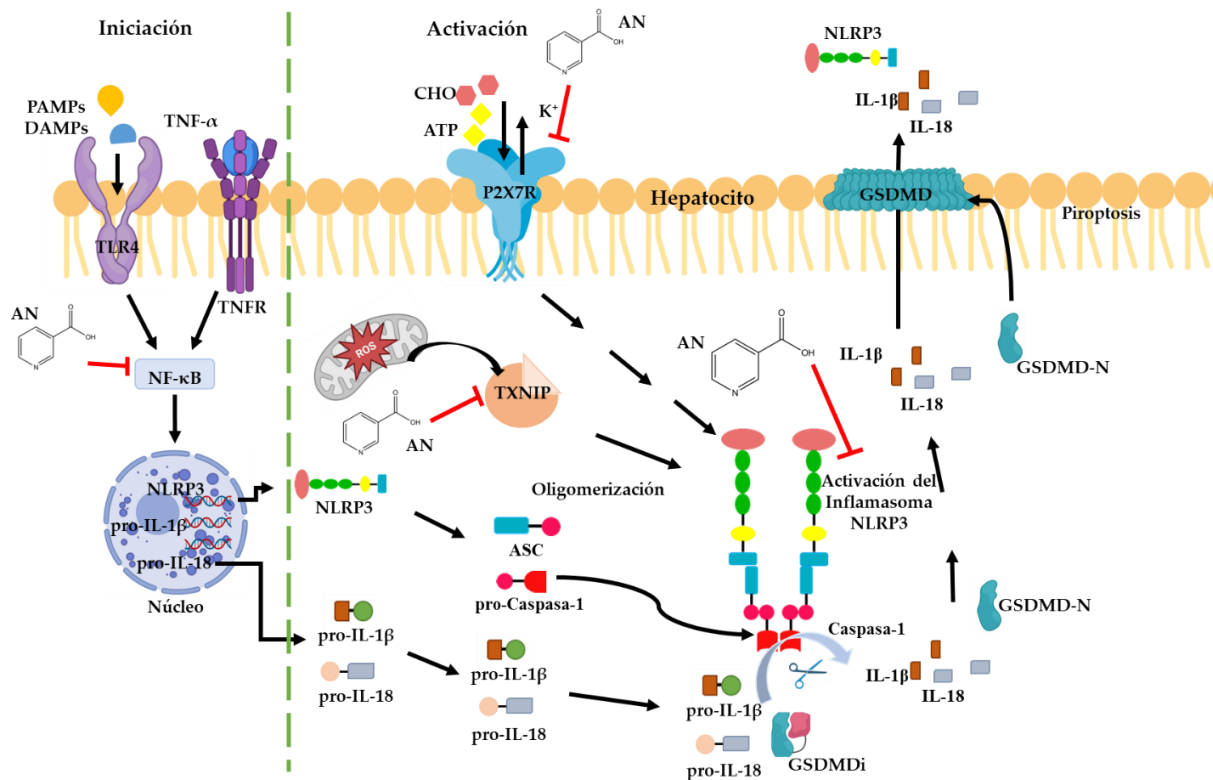


Figura 19. El AN atenúa la EHNA mediante la modulación de la vía del inflammasoma NLRP3/piroptosis.

Esta imagen muestra los posibles mecanismos moleculares por los cuales el AN atenúa la EHNA. El modelo de EHNA induce la liberación de PAMPs y DAMPs que posteriormente activan la vía del inflammasoma NLRP3. Estos PAMPs o DAMPs se unen con TLR4 y el TNF- α con TNFR. Esta interacción activa al NF- κ B. El acoplamiento molecular sugiere que el AN se une débilmente con el TLR4 y el TNFR, por lo que la unión del AN con el NF- κ B disminuye la transcripción de NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18. El complejo NLRP3 inflammasoma puede ser activado por colesterol y con la unión del ATP con P2X7R, provocando el flujo de K⁺ y la activación de TXNIP mediante las ERO. Sin embargo, el AN se une tanto a P2X7R como a TXNIP para prevenir la oligomerización entre el NLRP3, ASC y la pro-caspasa-1, para así evitar la activación de este complejo. Posteriormente el AN es capaz de disminuir la maduración de las interleucinas y la GSDMD al impedir la activación del inflammasoma NLRP3 y la piroptosis. Por otra parte, el AN también previno la activación de las HSCs al disminuir el TGF- β y como consecuencia previno la fibrogénesis. DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño; PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos; TLR4: Receptor tipo Toll-4; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; TNFR1: Receptor 1 del factor de necrosis tumoral; NF- κ B: Factor nuclear kappa B; NLRP3: Receptor tipo NOD que contiene el dominio de pirina; IL: Interleucina; ASC: Proteína tipo speck asociada a la apoptosis; ATP: Adenosín; P2X7R: Receptor purinérgico 7; TXNIP: Proteína que interactúa con la tiorredoxina; GSDMD: Gasdermina D; GSDMDi: Gasdermina D inactiva; GSDMD-N: Gasdermina D activa; TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta; HSCs: Células estelares hepáticas; α -SMA: Alfa actina de músculo liso alfa; MEC: Matriz extracelular.

12 Bibliografía

- [1] Trefts E, Ganon M, Wasserman DH. 2017. The liver. *Curr Biol.* 27(21): R1147-R1151.
- [2] Armandi A, Schattenberg JM. 2022. NAFLD and NASH: The metabolically disease liver. In: Juerguen Eckel and Klarine Clément editors. *From obesity to diabetes.* Switzerland: Springer; 253-267.
- [3] Henry L, Paik J, Younossi ZM. 2022. Review article: the epidemiologic burden of non-alcoholic fatty liver disease across the world. *Aliment Pharmacol Ther.* 56(6): 942-956.
- [4] Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. 2016. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 65(8): 1017-1025.
- [5] Sanyal AJ, Harrison SA, Ratziu V, Abdelmalek MF, Diehl AM, et al. 2019. The natural history of advance fibrosis due to nonalcoholic steatohepatitis: data from the simtuzumab trials. *Hepatology.* 70(6): 1913-1927.
- [6] Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Consultada el 14 de junio del 2023 en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- [7] Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. 2017. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 13(10):572-587.
- [8] Soon GS, Torbenson M. The liver and glycogen: In sickness and in health. *Int J Mol Sci.* 24(7) (2023) 6133.
- [9] Loffler MC, Betz MJ, Blondin DP, Augustin R, Sharma AK, et al. Challenges in tackling energy expenditure as obesity therapy: From preclinical models to clinical application. *Mol Metab.* 51(2021) 101237.
- [10] Stricker S, Rudloff S, Geier A, Steveling A, Roeb E, et al. Fructose consumption-free sugars and their health effects. *Dtsch Arztebl Int.* 118 (5) (2021) 71-78.
- [11] Mantovani A, Byrne CD, Bonora E, Targher G. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care.* 41(2) (2018) 372-382.
- [12] Khan RS, Bril F, Cusi K, Newsome PN. Modulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 70(2) (2019) 711-724.
- [13] Friedman SL, Neuschwander BA, Rinella M, AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutics strategies. *Nat Med.* 24(7) (2018) 908-922.

- [14] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 114 (1998) 842-845.
- [15] Zhu B, Chan SL, Li J, Li K, Wu H., et al. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Front Cardiovasc Med*. 8 (2021) 742382.
- [16] Huang X, Chen H, Wen S, Dong M, Zhou L, Yuan X. Therapeutic approaches for nonalcoholic fatty liver disease: Established targets and drugs. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 16 (2023) 1809-1819.
- [17] Fei N, Bruneau A, Zhang X, Wang R, Wang J et al. Endotoxin producers overgrowing in human gut microbiota as the causative agents for nonalcoholic fatty liver disease. *mBio*. 11(1) (2020) e03219-e03263.
- [18] Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 13(7) (2016) 412-425.
- [19] de Carvalho Ribeiro M, Szabo G. Role of the inflammasome in liver disease. *Annu Rev Pathol*. 17 (2021) 345-365.
- [20] Ran Y, Su W, Gao F, Ding Z, Yang S, Ye L, Chen X, Tian G, Xi J, Liu Z. Curcumin ameliorates white matter injury after ischemic stroke by inhibiting microglia/macrophage pyroptosis through NF- κ B suppression and NLRP3 inflammasome inhibition. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 (2021) 1552127.
- [21] Baeza-Raja B, Goodyear A, Liu X, Lam K, Yamamoto L, et al. Pharmacological inhibition of P2X7R ameliorates liver injury by reducing inflammation and fibrosis. *PLOS ONE*. 15(6) (2020) e0234038.
- [22] Mai W, Xu Y, Xu J, Zhao D, Ye L, et al. Berberine inhibits Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome activation and pyroptosis in nonalcoholic steatohepatitis *via* the ROS/TXNIP axis. *Front Pharmacol*. 11 (2020) 185.
- [23] Al Mamun A, Wu Y, Jia C, Munir F, Sathy KJ, et al. Role of pyroptosis in liver diseases. *Int Immunopharmacol*. 84 (2020) 106489.
- [24] Khanova E, Wu R, Wang W, Yan R, Chen Y, et al. Pyroptosis by caspase 11/4-gasdermin-D pathway in nonalcoholic hepatitis in mice and patients. *Hepatology*. 67(5) (2018) 1737-1753.

- [25] Xu B, Jiang M, Chu Y, Wang W, Chen D, et al. Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor on non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J Hepatol.* 68(4) (2018) 773-782.
- [26] Hamang M, Yaden B, Dai G. Categories: Gastrointestinal pharmacology activins in liver health and disease. *Biochem Pharmacol.* 214 (2023) 115668.
- [27] Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 121 (2017) 27-42.
- [28] Muriel P. Cells, cytokines, and factors involved in profibrogenic pathways. In: *Hepatic fibrosis: Mechanisms and targets.* Elsevier. (2022) 55-70.
- [29] Meyer-Ficca M, Kirkland JB. Niacin. *Adv. Nutr.* 7(3) (2016) 556-558.
- [30] Ginsberg HN, Reyes-Soffer G. Niacin: a long history, but a questionable future. *Curr Opin Lipidol.* 6 (2013) 475-479.
- [31] Li Y, Yang G, Yang X, Wang W, Zhang J, et al. Nicotinic acid inhibits NLRP3 inflammasome activation via SIRT1 in vascular endothelial cells. *Int Immunopharmacol.* 40 (2016) 211-218.
- [32] Arauz J, Rivera-Espinoza Y, Shibayama M, Favari L, Flores-Beltrán RE. Nicotinic acid prevents experimental liver fibrosis by attenuating the prooxidant process. *Int Immunopharmacol.* 28(1) 244-251.
- [33] Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Scherr PA, Tangney CC, et al. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75(8) (2004) 1093-1098.
- [34] Mularski RA, Grazer RE, Santoni L, Strother JS, Bizovi KE. Treatment advice on the internet leads to a life-threatening adverse reaction: hypotension associated with niacin overdose. *Clin Toxicol.* 44(1) (2006) 81-84.
- [35] García-Cortés M, Andrade RJ, Lucen MI, González-Grande R, Camargo R, et al. Hepatotoxicidad secundaria a fármacos de uso común. *Gastroentrol Hepatol.* 28(8) (2005) 461-472.
- [36] Glossmann H, Neville DM. Gamma-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett.* 19(4) (1972) 340-344.
- [37] Reitman S, Frankel SA. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 28(1) (1957) 56-63.

- [38] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25(1) (1968) 192-205.
- [39] Rojkind M, Dunn MA. Hepatic fibrosis. *Gastroenterol.* 76(4) (1979) 849-863.
- [40] Vargas-Pozada EE, Ramos-Tovar E, Rodriguez-Callejas JD, Cardoso-Lezama I, Galindo-Gómez S, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by CCl₄ exacerbates hepatopathogenic diet-induced experimental NASH. *Ann. Hepatol.* 28 (1) (2023) 100780.
- [41] Casas-Grajales S, Reyes-Gordillo K, Cerda-García-Rojas CM, Tsutsumi V, Lakshman MR, et al. Rebaudioside A administration prevents experimental liver fibrosis: an in vivo and vitro study of the mechanisms of action involved. *J Appl Toxicol.* 39(8) (2019) 1118-1131.
- [42] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1) (1985) 76-85.
- [43] Scwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of fibrosis development in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol.* 158 (7) (2020) 1913-1928.
- [44] Parthasaeathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An overview. *Hepatol Commun.* 4 (4) (2020) 478-492.
- [45] Mridha AR, Wree A, Robertson AA, Yeh MM, Johnson CD, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol.* 66 (5) (2017) 1037-1046.
- [46] Wu X, Dong L, Lin X. Relevance of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of chronic liver disease. *Front Immunol.* 8(2017) 1728.
- [47] Kirkland JB, Meyer-Ficca ML. Niacin. *Adv. Food Nutr. Res.* 83 (2018) 83-149.
- [48] Ulrich J. Niacin as antidyslipidemic drug. *Can J Physiol Pharmacol.* 93 (12) (2015) 1043-1054.
- [49] Ganji SH, Kashyap ML, Kamanna VS. Niacin inhibits fat accumulation, oxidative stress, and inflammatory cytokine IL-8 in culture hepatocytes: Impact on non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 64 (9) (2015) 982-990.
- [50] Zeman M, Vecka M, Perlík F, Staňková B, Hromádka R, et al. Pleiotropic effects of niacin: Current possibilities for its clinical use. *Acta Pharm.* 66(4) (2016) 449-469.
- [51] Linder K, Willmann C, Kantartzis K, Machann J, Schick F, et al. Dietary niacin intake predicts the decrease of liver fat content during a lifestyle intervention. *Sci Rep.* 9(1) (2019) 1303.

- [52] Ganji SH, Kukes GD, Lambrecht N, Kashyap ML, Kamanna VS. Therapeutic role of niacin in the prevention and regression of hepatic steatosis in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *AM J Physiol Gastrointest Liver.* 306(4) (2014) G320-G327.
- [53] Fabbrini E, Mohammed BS, Korenblat KM, Magkos J, McCrea J, et al. Effect of fenofibrate and niacin on intrahepatic triglyceride content, very low-density lipoprotein kinetics, and insulin action in obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(6) (2010) 2727-2735.
- [54] Deng YF, Xu QQ, Chen TQ, Ming JX, Wang YF, et al. Ginsenoside alleviates inflammation and fibrosis experimental NASH mice by suppressing the NF- κ B/NLRP3 signaling pathway. *Phytomedicine.* 104 (2020) 154241.
- [55] Knorr J, Kaufmann P, Inzaugarat ME, Holtmann TM, Geisler L, et al. Interleukin-18 signaling promotes activation of hepatic stellate cells in mouse liver fibrosis. *Hepatology.* 77(6) (2022) 1-15.
- [56] Kashyap ML, Ganji S, Nakra NN, Kamanna VS. Niacin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): novel use for an old drug? *J. Clin. Lipid.* 13(6) (2019) 873-879.
- [57] Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol.* 18(9) (2021) 407-420.
- [58] Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis updated 2019. *Cells.* 8(11) (2019) 1419.
- [59] Gaul S, Leszczynska A, Alegre F, Kaufmann B, Johnson CD, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis. *J Hepatol.* 74(1) (2021) 156-167.
- [60] Márquez-Quiroga LV, Arellanes-Robledo J, Vásquez-Garzón VR, Villa-Treviño S, Muriel P. Models of nonalcoholic steatohepatitis potentiated by chemical inducers leading to hepatocellular carcinoma. *Biochem Pharmacol.* 195 (2022) 114845.
- [61] TSuchida T, Lee YA, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, et al. A simple diet-and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol.* 69(2) (2018) 385-395.
- [62] Haczeyni F, Yeh MM, Loannou GN, Leclercq IA, Goldin R, et al. Mouse models of non-alcoholic steatohepatitis: A reflection on recent literature. *J Gastroenterol Hepatol.* 33(7) (2018) 1312-1320.

[63] Vargas-Pozada EE, Ramos-Tovar E, Acero-Hernández C, Cardoso-Lezama I, Galindo-Gómez S, et al. Caffeine mitigates experimental nonalcoholic steatohepatitis and the progression of thioacetamide-induced liver fibrosis by blocking the MAPK and TGF- β /Smad3 signaling pathways. *Ann Hepatol.* 27 (2) (2022) 100671.