



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

# **El papel de resistina en la modulación de células inmunológicas y su relación con las Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Licenciada Cecilia Claudia Garcia**

Directora de tesis: Dra. Alejandra C. Cherñavsky

Consejero de estudios: Dr. Guillermo L. Alonso

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo – CONICET – FFyB - UBA  
Hospital de Clínicas “José de San Martín”

Buenos Aires, 2021

## **El papel de resistina en la modulación de células inmunológicas y su relación con las Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico**

La progresión de las Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) se caracteriza por el desarrollo de estrés oxidativo e inflamación. Los pacientes con EHGNA presentan altos niveles plasmáticos y hepáticos de resistina. La resistina, producida y secretada por células inmunológicas, se ha asociado con la inflamación y el estrés oxidativo. Sin embargo, el efecto que ejerce resistina sobre células inmunológicas aún es controversial. Hipotetizamos que resistina ejerce una acción moduladora sobre la funcionalidad de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y hepáticas, que se encuentra alterada en el contexto de las EHGNA y contribuye con el estado inflamatorio. El objetivo fue evaluar el efecto regulatorio de resistina sobre la funcionalidad y la homeostasis redox de CMSP y células inmunológicas hepáticas provenientes de pacientes con EHGNA y de individuos control metabólicamente sanos. Demostramos que las células periféricas y hepáticas de pacientes con EHGNA presentan una expresión elevada del receptor de resistina, CAP-1. En linfocitos T (LT) de controles, la resistina indujo la producción de AMPc y previno la activación y proliferación celular. En monocitos de controles, la resistina previno la activación celular y la producción de IL-6, e indujo un aumento de la endocitosis. Estos efectos de resistina sobre la funcionalidad celular no se observaron en células de pacientes con EHGNA. Las CMSP de estos pacientes presentaron un alto contenido de oxidantes, un bajo contenido de glutatión reducido y un perfil alterado de la actividad de enzimas antioxidantes. La resistina indujo una disminución del contenido de oxidantes, previno el estallido respiratorio inducido por ácido palmítico, y moduló la actividad de enzimas antioxidantes en CMSP de controles, pero no en CMSP de EHGNA. Concluimos que la resistina posee un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, y que la disminución de la respuesta a resistina presente en las células inmunológicas de pacientes con EHGNA les provee un carácter inflamatorio y contribuye con la pérdida de la homeostasis redox. En consecuencia, la alteración en la capacidad de las células inmunológicas de responder a resistina contribuiría con la inmunopatogénesis de las EHGNA.

Palabras clave: EHGNA, linfocitos T, monocitos, células inmunológicas hepáticas, CAP-1, estrés oxidativo

## **The role of resistin in the modulation of immune cells and its relationship with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease**

Non-Alcoholic Fatty Liver disease (NAFLD) progression is characterized by the development of oxidative stress and inflammation. NAFLD patients show high plasmatic and hepatic levels of resistin. Resistin, which is produced and secreted by immune cells, is associated with inflammation and oxidative stress. However, resistin influence on immune cells is still controversial. We hypothesized that resistin exerts a modulatory action on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and hepatic cells, which is altered in cells from NAFLD patients and contributes to inflammation. The aim was to evaluate the regulatory effect of resistin on the functionality and redox homeostasis of PBMC and hepatic immune cells from NAFLD patients and from metabolic healthy control individuals. We demonstrated that peripheral and hepatic mononuclear cells from NAFLD patients show increased expression of resistin receptor, CAP-1. Resistin induced an increase in cAMP production and prevented cell activation and proliferation in T cells from controls. Resistin prevented cell activation and IL-6 production, and increased endocytosis in monocytes from controls. These resistin-induced functional effects were not observed in cells from patients with NAFLD. PBMC from NAFLD patients showed high oxidants content, low reduced glutathione content, and an altered profile of antioxidant enzyme activities. Resistin induced a decrease in oxidants levels, prevented palmitic acid-induced respiratory burst, and modulated antioxidant enzyme activities in PBMC from controls but not from NAFLD patients. We concluded that resistin plays an important role in regulating inflammatory response, and that the decreased response to resistin in immune cells from patients with NAFLD provides them an inflammatory profile and contributes to redox homeostasis impairment. Consequently, an impaired response to resistin in immune cells might contribute to the immunopathogenesis of NAFLD.

Key words: NAFLD, T cells, monocytes, hepatic immune cells, CAP-1, oxidative stress

A mi directora, la Dra. Alejandra Cherñavsky, por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio: a Euge, quien me acompañó en los primeros años de laboratorio, por sus consejos y por enseñarme con amor y paciencia; a Nadia, por su ayuda y los enriquecedores debates científicos.

A mis compañeros del INIGEM: a Lindy, Ari, Andi, Coni por su compañerismo, su amistad y por todas las charlas y mates compartidos; a Adri y Gaby por su apoyo y por hacer cada largo día en cultivo más ameno y divertido; a Ariel y Pachi, que me enseñaron y ayudaron con la citometría, y a quienes les debo todo lo que aprendí sobre esa técnica; a Vero, por su apoyo y preocupación.

A Anto, por su colaboración con los ensayos de AMPc, pero sobre todo por su amistad y sus palabras de aliento.

A la Dra. Bárbara Piotrkowski, con quien tuve el placer de trabajar en colaboración, por su buena predisposición y su orientación en el campo de las defensas antioxidantes.

A mi familia, especialmente a mi mamá, quien me acompañó y me apoyó en este proceso.

A mis amigas y hermanas de vida, Bele, Mechi, Naty, Agus y Vicky, quienes confiaron en mí, me acompañaron y me alentaron siempre.

---

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>9</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>10</b>
1. El sistema inmunológico .....	11
1.1. Inmunidad innata .....	11
1.2. Inmunidad adaptativa .....	13
2. Homeostasis redox .....	14
2.1. Fuentes de oxidantes .....	15
2.2. Defensas antioxidantes .....	16
2.3. Homeostasis redox y estrés oxidativo. Implicancias en la respuesta inmunológica.....	19
3. Obesidad: el papel del tejido adiposo blanco y las alteraciones metabólicas .....	20
3.1. El tejido adiposo .....	20
3.2. Síndrome metabólico y resistencia a la insulina .....	22
3.3. Obesidad .....	24
3.4. Patogénesis de la obesidad .....	25
4. El hígado .....	26
5. Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico.....	29
5.1. Características clínicas, diagnóstico y tratamiento .....	30
5.2. Patogénesis de las EHGNA: de la homeostasis hepática a la hepatopatía .....	33
5.2.1. Desarrollo de esteatosis hepática .....	34
5.2.2. Progresión de las EHGNA: estrés oxidativo e inflamación crónica .....	37
6. Resistina.....	40
6.1. Receptores de Resistina .....	42
6.2. Resistina en las EHGNA .....	43
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>45</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>48</b>
1. Pacientes con EHGNA e individuos control .....	49
1.1. Características del grupo de pacientes con EHGNA reclutado .....	52
2. Reactivos.....	54
3. Procesamiento de las muestras.....	55
3.1. Obtención de sangre y biopsias hepáticas .....	55
3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).....	56
3.3. Purificación de linfocitos T .....	56

---

3.4. Obtención de suspensiones celulares hepáticas.....	57
4. Cultivos celulares .....	57
4.1. Cultivos celulares para determinaciones en LT .....	57
4.1.1. Modulación de la expresión génica de Res .....	57
4.1.2. Modulación de la expresión proteica de CAP-1 por Res .....	57
4.1.3. Modulación de los niveles de AMPc total por Res .....	58
4.1.4. Modulación de marcadores de activación por Res .....	58
4.1.5. Modulación de la proliferación y la Muerte celular por Res.....	59
4.1.6. Migración celular .....	59
4.2. Cultivos celulares para determinaciones en Mo .....	59
4.2.1. Modulación de la expresión proteica de CAP-1 por Res .....	59
4.2.2. Modulación del marcador temprano de activación CD69 por Res .....	60
4.2.3. Modulación de la producción de citoquinas por Res .....	60
4.2.4. Modulación de la endocitosis por Res .....	60
4.3. Cultivos celulares para el estudio de parámetros asociados a la homeostasis redox en Mo y LT .....	61
4.3.1. Modulación del contenido de oxidantes y de GSH por Res .....	61
4.3.2. Modulación del estallido respiratorio por Res.....	61
4.3.3. Modulación de la actividad de enzimas antioxidantes .....	61
5. Extracción de ARN, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) .....	62
6. Ensayo de unión a la proteína quinasa A (PKA) para el dosaje de AMPc .....	63
7. Marcación para cuantificaciones por citometría de flujo.....	64
7.1. Inmunomarcación de superficie.....	64
7.2. Marcación con sondas fluorescentes.....	65
7.3. Inmunomarcación citoplasmática e intranuclear .....	66
7.4. Análisis citométrico y estrategias de <i>gating</i> .....	66
8. Determinación de la actividad enzimática antioxidante .....	70
8.1. Actividad CAT .....	70
8.2. Actividad SOD total .....	70
8.3. Actividad GPx.....	71
8.4. Actividad GRd .....	72
8.5. Dosaje de proteínas.....	72

---

9. Análisis estadístico.....	72
<b>Capítulo I: El papel de Res en la regulación funcional de células inmunológicas mononucleares y su implicancia en las EHGNA .....</b>	<b>74</b>
1. Células mononucleares de sangre periférica: Mo y LT .....	75
1.1. Caracterización de la expresión de CAP-1 .....	75
1.1.1. Expresión proteica de CAP-1 en distintas poblaciones de CMSP.....	75
1.1.2. Expresión génica de CAP-1 en LT .....	78
1.2. Influencia de Res sobre características funcionales de LT .....	79
1.2.1. Expresión génica de Res en LT y su modulación por la Res exógena.....	79
1.2.2. Modulación de la expresión de CAP-1 por Res .....	80
1.2.3. Inducción de la producción de AMPc total por Res .....	80
1.2.4. Modulación de la activación celular por Res .....	81
1.2.5. Modulación de la proliferación celular por Res .....	88
1.2.6. Inducción de la migración celular por Res .....	91
1.3. Influencia de Res sobre características funcionales de Mo .....	93
1.3.1. Modulación de CAP-1 por Res.....	93
1.3.2. Modulación de la activación celular por Res .....	93
1.3.3. Modulación de la producción de citoquinas por Res.....	95
1.3.4. Modulación de la endocitosis por Res .....	98
2. Células inmunológicas hepáticas: MF y LT.....	100
2.1. Expresión proteica de CAP-1.....	101
2.2. Modulación de la activación celular por Res .....	102
2.3. Estudio comparativo del efecto preventivo ejercido por Res sobre la activación temprana entre células mononucleares periféricas y hepáticas.....	104
<b>Discusión .....</b>	<b>105</b>
<b>Capítulo II: El papel de Res en la regulación de la homeostasis redox de células inmunológicas mononucleares y su implicancia en las EHGNA.....</b>	<b>116</b>
1. Células mononucleares de sangre periférica: Mo y LT .....	117
1.1. Estado oxidativo basal en CMSP de pacientes con EHGNA .....	117
1.1.1. Contenido de oxidantes .....	117
1.1.2. Contenido de glutatión reducido (GSH).....	118
1.1.3. Actividad enzimática antioxidante .....	119
1.2. Influencia de Res sobre parámetros asociados a la homeostasis redox .....	121

---

1.2.1. Modulación de los niveles de oxidantes por Res .....	121
1.2.2. Modulación de los niveles de GSH por Res .....	125
1.2.3. Modulación de la actividad de enzimática antioxidante por Res .....	126
2. Células inmunológicas hepáticas: MF y LT.....	129
2.1. Contenido basal de oxidantes .....	129
2.2. Modulación del contenido de oxidantes por Res.....	131
2.3. Modulación del contenido de GSH por Res .....	132
2.4. Estudio comparativo del efecto de Res sobre el contenido de oxidantes entre células mononucleares periféricas y hepáticas.....	132
<b>Discusión .....</b>	<b>134</b>
<b>Discusión: relación entre la señalización redox y la inflamación .....</b>	<b>141</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>144</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>148</b>



<b>AGNE:</b> ácidos grasos no esterificados	<b>GSSG:</b> glutatión disulfuro (oxidado)
<b>AL:</b> ácido linoleico	<b>HSC:</b> células estrelladas hepáticas (del inglés <i>hepatic stellate cells</i> )
<b>ALT:</b> alanina aminotransferasa	<b>IMC:</b> índice de masa corporal
<b>AMPc:</b> adenosín monofostato cíclico	<b>IMF:</b> intensidad media de fluorescencia
<b>AO:</b> ácido oleico	<b>IP:</b> ioduro de propidio
<b>AP:</b> ácido palmítico	<b>LPS:</b> lipopolisacárido
<b>AST:</b> aspartato aminotransferasa	<b>LT:</b> linfocitos T
<b>CAP-1:</b> proteína asociada a adenilato ciclasa 1 (del inglés <i>adenylate cyclase-associated protein 1</i> )	<b>MCB:</b> monoclorobimano
<b>CAT:</b> catalasa	<b>MF:</b> macrófagos
<b>CMSP:</b> células mononucleares de sangre periférica	<b>Mo:</b> Monocitos
<b>DCF:</b> 2',7'-diclorofluoresceína	<b>NAS:</b> actividad histológica de EHGNA (del inglés <i>NAFLD activity score</i> )
<b>DCFH-DA:</b> 2',7'-diclorofluorescina diacetato	<b>NK:</b> <i>Natural Killer</i>
<b>EHGNA:</b> Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico	<b>NKT:</b> <i>T Natural Killer</i>
<b>EHNA:</b> Esteatohepatitis No Alcohólica	<b>NOX:</b> NADPH oxidasa
<b>ERO:</b> especies reactivas del oxígeno	<b>PKA:</b> proteína quinasa A
<b>FMO:</b> fluorescencia menos uno (del inglés <i>fluorescence minus one</i> )	<b>PKC:</b> proteína quinasa C
<b>GPx:</b> glutatión peroxidasa	<b>Res:</b> resistina
<b>GRd:</b> glutatión reductasa	<b>SOD:</b> superóxido dismutasa
<b>GSH:</b> glutatión reducido	<b>TLR:</b> receptor de tipo toll (del inglés <i>toll-like receptor</i> )

# Introducción

---

## 1. El sistema inmunológico

La supervivencia de los organismos multicelulares requiere mecanismos de defensa frente a las infecciones, así como la eliminación de células dañadas o muertas. El sistema inmunológico trabaja de una manera coordinada para responder a las numerosas amenazas presentes en el ambiente, y así prevenir y erradicar infecciones. Las células inmunológicas patrullan constantemente el cuerpo para detectar y responder ante agentes exógenos y endógenos dañinos. Sin embargo, la defensa del organismo es sólo una de las manifestaciones del sistema inmunológico en el mantenimiento de su homeostasis e integridad. El sistema inmunológico también está involucrado en procesos fisiológicos fundamentales tales como la reparación y cicatrización de tejidos dañados, y se comunica activamente con otros sistemas del organismo como el sistema nervioso central, metabólico y cardiovascular<sup>1</sup>. Según la mirada clásica, el sistema inmunológico puede dividirse en inmunidad innata y adaptativa.

### 1.1. Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y provee protección inmediata contra patógenos. Comprende barreras físicas y químicas, tales como epitelios y mucosas, y las sustancias con actividad antimicrobiana presentes en su superficie; proteínas plasmáticas de reconocimiento como las que componen el sistema complemento; y las células efectoras<sup>2(p3)</sup>. El componente celular consiste en células fagocíticas (neutrófilos, monocitos (Mo), macrófagos (MF), células presentadoras de antígenos (células dendríticas), y células de origen linfoide con función citotóxica (células *natural killer* (NK)).

Las células de la inmunidad innata reconocen la presencia de patógenos mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés *pattern recognition receptor*). Estos receptores, como su nombre lo indica, reconocen patrones estructurales compartidos por un conjunto de microorganismos y ausentes en el hospedador, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés *pathogen-associated molecular patterns*). La ubicación estratégica de los PRR en diferentes

compartimientos celulares permite reconocer distintos tipos de PAMPs y activar cascadas específicas de señalización<sup>3</sup>.

Los PRR también reconocen los llamados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés *damage-associated molecular patterns*), mediadores endógenos liberados ante una lesión tisular o muerte celular que actúan como señales de daño. Los DAMPs comprenden ADN mitocondrial y nuclear, histonas, ARN, ATP, entre otros<sup>4,5</sup>. Luego de su activación, los PRR inducen tres tipos de respuestas: fagocitosis, inflamación y maduración de células presentadoras de antígenos. Mo y MF, pertenecientes al sistema de células mononucleares con capacidad fagocítica, responden al daño tisular mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas, la fagocitosis de células necróticas, la secreción de proteínas proteolíticas y remodeladoras de la matriz extracelular, y la producción de factores de crecimiento en los tejidos<sup>6</sup>.

Los Mo constituyen aproximadamente el 10% de los leucocitos presentes en sangre periférica. En ausencia de estímulos inflamatorios, los Mo circulan en sangre durante un período corto de tiempo y posteriormente mueren por apoptosis. Durante el curso de una infección o un proceso inflamatorio, los Mo infiltran al tejido inflamado, donde se induce su supervivencia y diferenciación a MF, contribuyendo así al mantenimiento de la respuesta inflamatoria<sup>7</sup>.

Los MF son células altamente especializadas, con características funcionales específicas para el tejido en el que se encuentran, y en el cual poseen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y la remodelación tisular. La polarización de los MF depende del tipo de estímulo y determina su función y su fenotipo. De acuerdo a su estado de polarización, los MF pueden clasificarse como activados clásicamente o M1, o activados alternativamente o M2. Los MF de tipo M1 son activados a través de los PRR y poseen un perfil inflamatorio caracterizado por la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , quimioquinas, óxido nítrico, y una mayor capacidad presentadora de antígenos. En contraposición, los MF de tipo M2 poseen un perfil antiinflamatorio caracterizado por la producción de IL-10, TGF- $\beta$  y el antagonista del receptor de IL-1<sup>8,9</sup>, y participan en la remodelación tisular.

Otro tipo celular que pertenece a la inmunidad innata son las células NK. Son de origen linfoide y constituyen aproximadamente el 10% de la población linfocitaria en periferia. Su estado de activación es el resultado de la integración de señales activadoras e inhibitorias que recibe a través de sus receptores. Dentro de la población de células NK se distinguen dos subpoblaciones en función de su expresión del marcador CD56. La subpoblación cuya expresión de CD56 es baja (CD56<sup>low</sup>) corresponde al 90% de la población de células NK y posee fuertes propiedades citotóxicas, mientras que la subpoblación con una expresión alta de este marcador (CD56<sup>high</sup>) se caracteriza por sus propiedades inmunorreguladoras<sup>10</sup>.

## 1.2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa se desarrolla más lentamente que la inmunidad innata, pero provee una defensa más especializada contra las infecciones. Comprende a la inmunidad celular mediada principalmente por los linfocitos T (LT), y la humoral mediada por linfocitos B (LB).

Los LT reconocen fragmentos de péptidos procesados y presentados por las células presentadoras de antígenos mediante los denominados receptores de células T (TCR, por sus siglas en inglés *T cell receptors*). Los LB, en cambio, reconocen moléculas intactas mediante los receptores de células B (BCR, por sus siglas en inglés *B cell receptors*) y como resultado se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los TCR y los BCR pueden reconocer un número casi ilimitado de antígenos gracias a un complejo proceso de rearrreglos génicos que permiten la generación de un extenso repertorio de receptores antigénicos a partir de un grupo de genes<sup>11</sup>.

Los LT se originan a partir de células precursoras que migran de la médula ósea al timo, donde finalizan su maduración para luego ser exportados a la periferia. Los LT maduros expresan un único tipo de TCR y un único correceptor, CD4 o CD8. Los LT periféricos comprenden células vírgenes, que nunca se han encontrado a su antígeno específico; células de memoria, originadas como resultado del reconocimiento antigénico y la activación celular; y células regulatorias, encargadas de la regulación de la respuesta inflamatoria. Cuando una célula virgen reconoce el antígeno presentado por las células

dendríticas, se activa y se induce la producción de IL-2, la proliferación celular y la diferenciación a células efectoras y de memoria. Las células efectoras, de corta vida media, migrarán a los sitios inflamados para asistir en el proceso inflamatorio, mientras que las células de memoria mantendrán la inmunidad a largo plazo<sup>12</sup>.

Según el perfil de citoquinas presente en el ambiente en el que se produce la activación, los LT CD4<sup>+</sup> se diferenciarán a uno de entre varios tipos de efectores productores de citoquinas, denominados en su conjunto como LT colaboradores (Th, por sus siglas en inglés *T helpers*). Las células Th se clasifican según el perfil de citoquinas que producen y cada subtipo ejerce protección ante distintos patógenos. Algunos de los perfiles Th más descritos son Th1, Th2, Th17 caracterizados por la producción de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17, respectivamente<sup>13</sup>.

La activación de los LT CD8<sup>+</sup> genera células efectoras citotóxicas, que reconocen el antígeno en células blanco y las destruye. Los LT citotóxicos se caracterizan por la expresión de granzimas y perforinas, y por la producción de citoquinas inflamatorias como IFN- $\gamma$ <sup>14</sup>.

Las células NKT son una subpoblación de LT que llevan a cabo funciones del tipo innatas, ya que pueden producir grandes cantidades de citoquinas y quimioquinas tras su activación sin necesidad de reconocimiento antigénico. Esta subpoblación de LT expresa un repertorio acotado de TCR caracterizado por reconocer antígenos lipídicos. A diferencia de los LT convencionales que en su estado de reposo circulan a través de los nodos linfáticos, sólo una pequeña proporción de células NKT circulan en periferia, mientras que la mayoría se encuentra en órganos como el hígado, pulmones, bazo y médula ósea<sup>15,16</sup>.

## 2. Homeostasis redox

Los procesos aeróbicos fisiológicos dan lugar a la formación de agentes oxidantes que pueden reaccionar con moléculas orgánicas como ADN, proteínas y lípidos, generándoles daños estructurales que alteran su funcionalidad. Sin embargo, los sistemas biológicos poseen sistemas antioxidantes que neutralizan a los oxidantes producidos e impiden el daño de macromoléculas. El estrés oxidativo se define como el desbalance entre agentes

oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, llevando a una alteración de la señalización redox y, como consecuencia, de las funciones fisiológicas<sup>17</sup>.

El estudio de los oxidantes toma cada vez mayor relevancia debido a su característica dual. Por un lado, cumplen un papel central como moléculas de señalización en procesos fisiológicos, regulando tanto procesos celulares como procesos sistémicos asociados a la regulación de la presión arterial, funciones cognitivas e inmunológicas. Por otro lado, son factores causales implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, entre otras<sup>18</sup>. Por lo tanto, el rol de estas moléculas en el mantenimiento de la salud está relacionada a su tasa de producción, su concentración, y a la habilidad de los sistemas antioxidantes celulares para regular su actividad.

### 2.1. Fuentes de oxidantes

Las especies que contienen oxígeno y son altamente reactivas son referidas como especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas especies incluyen radicales del oxígeno y peróxidos como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); radicales del nitrógeno tales como el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ ); y otras especies como el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y el hipoclorito ( $ClO^-$ ). A las especies que contienen nitrógeno se las suele tratar de manera independiente bajo el nombre de especies reactivas del nitrógeno (ERN)<sup>19</sup>. Las ERO y ERN tienen su origen de fuentes endógenas y exógenas. Las fuentes exógenas incluyen contaminación, tabaco, alcohol, metales pesados, pesticidas, radiaciones, entre otras. Los oxidantes de origen endógeno se generan como resultado del metabolismo celular en mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático, así como por la acción de enzimas citosólicas<sup>20</sup>.

La mitocondria es la principal fuente endógena de ERO debido a que allí tiene lugar el proceso de fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP, en el cual el oxígeno molecular es reducido a agua. Los principales sitios de generación de radicales superóxido son los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo c reductasa) de la cadena de transporte de electrones, en los que los electrones pueden difundir y ser capturados por el oxígeno<sup>21</sup>. En los peroxisomas, el proceso metabólico más relevante en la generación de

peróxido de hidrógeno es la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, aunque también se llevan a cabo otros procesos metabólicos que dan lugar a la producción de anión superóxido y óxido nítrico<sup>22</sup>. El retículo endoplasmático también es una fuente de oxidantes, principalmente por acción de los citocromos P450 y b5, responsables de la oxidación de ácidos grasos insaturados y de xenobióticos mediante la reducción del oxígeno molecular y la formación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno<sup>23</sup>.

Otra fuente importante de ERO es la familia de enzimas NADPH oxidasas (NOX). Las proteínas que integran esta familia enzimática, transportan electrones a través de membranas biológicas para reducir el oxígeno a anión superóxido<sup>24</sup>. La primera isoforma caracterizada, NOX2, comprende seis subunidades, dos de las cuales son proteínas integrales de membrana, tres subunidades regulatorias, y la restante es una proteína de unión a GTP (Rac). En ausencia de estímulo, las subunidades regulatorias permanecen en el citosol formando un complejo multiproteico. Luego de la estimulación, el complejo regulatorio transloca a la membrana y se asocia con las subunidades transmembrana para dar lugar a la forma activa<sup>25</sup>. La NOX2 es particularmente importante en la respuesta inmunológica, participando en la eliminación de microorganismos y en la activación de vías de señalización necesarias para orquestar una adecuada respuesta inflamatoria.

## 2.2. Defensas antioxidantes

El sistema antioxidante regula los niveles de oxidantes, manteniendo la homeostasis redox y protegiendo a los sistemas biológicos de su toxicidad. Este sistema incluye moléculas antioxidantes exógenas y endógenas. Las primeras son moléculas suplementadas en la dieta e incluyen vitaminas C y E, antioxidantes fenólicos, selenio, zinc, y drogas como acetilcisteína<sup>26</sup>. Las defensas antioxidantes endógenas son sintetizadas por las células y pueden ser de tipo no enzimáticas o enzimáticas. Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas que interactúan con los oxidantes truncando su cadena de reacciones. Dentro de este grupo se encuentran el glutatión, el ácido úrico, y la taurina, entre otros.

El glutatión es la molécula antioxidante de bajo peso molecular más importante en la célula. Se trata de un tripéptido ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que se sintetiza gracias al



agregado secuencial de cisteína al aminoácido glutamato seguido por la adición de glicina. La unión atípica de la cisteína al glutamato a través del grupo  $\gamma$ -carboxilo le confiere protección ante la degradación intracelular, ya que este enlace sólo puede ser hidrolizado por la enzima  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa, presente únicamente en la superficie externa de algunos tipos celulares<sup>27</sup>. En condiciones normales, aproximadamente el 98% del glutatión intracelular se encuentra en su forma reducida (GSH). La mayor parte del GSH (80-85%) se encuentra en el citosol, mientras que el contenido restante puede encontrarse en las mitocondrias y, en menor medida, en el retículo endoplasmático y el núcleo. El GSH participa en el mantenimiento de la homeostasis gracias a su capacidad de eliminar ERO tanto de manera directa como indirecta a través de reacciones enzimáticas. Está involucrado en la eliminación de xenobióticos y metabolitos fisiológicos a través de reacciones de conjugación con estos compuestos. También participa en la regulación de procesos fisiológicos, como el ciclo celular y la apoptosis<sup>28</sup>. Los grupos sulfhidrilo (-SH) de la cisteína actúan como donantes de electrones y son los responsables de las reacciones de óxido-reducción y conjugación que lleva a cabo el GSH. En condiciones oxidantes, los grupos sulfhidrilo de dos moléculas de GSH donan un electrón cada uno al agente oxidante, neutralizándolo y convirtiéndose en glutatión disulfuro (GSSG)<sup>29</sup>. Los niveles intracelulares de GSH son regulados a través del control de sus tasas de síntesis y exportación fuera de la célula. Sin embargo, el contenido intracelular de GSH también está influenciado por agentes que alteren el estado redox, que lleven a la formación de conjugados, o que alteren la distribución del GSH entre los distintos compartimientos intracelulares. La deficiencia en el contenido de GSH se manifiesta principalmente en la susceptibilidad al desarrollo de estrés oxidativo y al daño oxidativo resultante, paso clave para la progresión de muchas patologías<sup>30</sup>.

Dentro de las defensas antioxidantes enzimáticas, las principales enzimas son las superóxido dismutasas (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd).

Como se mencionó anteriormente, el anión superóxido es la principal especie radicalaria generada como consecuencia del metabolismo aeróbico. La principal defensa

celular contra el anión superóxido es el grupo de enzimas SOD. Este grupo de enzimas catalizan la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno. El mecanismo de dismutación catalizado por estas enzimas involucra la reducción y reoxidación de un metal de transición presente en el sitio activo. En mamíferos existen tres isoformas: cobre-zinc SOD (Cu/ZnSOD/SOD1), manganeso SOD (MnSOD/SOD2) y SOD extracelular (ecSOD), codificadas por distintos genes, con distintos cofactores metálicos y con distintas localizaciones subcelulares<sup>31</sup>. Las isoformas Cu/ZnSOD y ecSOD utilizan el ion cobre como cofactor y el zinc ayuda a mantener la estabilidad de la enzima. La isoforma Cu/ZnSOD se localiza en citoplasma, núcleo y membrana mitocondrial, mientras que la ecSOD se encuentra en la membrana plasmática y en fluidos extracelulares. La MnSOD utiliza al ión manganeso como cofactor y se localiza en la matriz mitocondrial<sup>32</sup>. Si bien el peróxido de hidrógeno es potencialmente menos tóxico que el anión superóxido, en presencia de  $Fe^{2+}$  puede ser reducido a radical hidroxilo, el cual es altamente reactivo. Por lo tanto, el peróxido de hidrógeno generado por acción de SOD debe ser eliminado. Las enzimas responsables de su eliminación son la CAT y la GPx.

La CAT cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Se localiza en los peroxisomas y en el citosol<sup>33</sup>. Esta enzima contiene un grupo hemo como grupo prostético y utiliza NADPH como cofactor. Durante la reacción de detoxificación, el hierro presente en el grupo hemo es oxidado por una molécula de peróxido de hidrógeno dando lugar a un radical intermediario, el cual reacciona rápidamente con una segunda molécula de peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno<sup>33</sup>.

La familia GPx incluye isoenzimas que catalizan la reducción de peróxidos de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos a agua o alcoholes, utilizando GSH como dador de electrones. Dentro de la célula, la GPx se localiza principalmente en el citosol, núcleo y mitocondrias<sup>34</sup>. Cuando el residuo de seleniocisteína o cisteína presente en el sitio activo de la GPx es oxidado por una molécula de peróxido de hidrógeno, una molécula de GSH reduce dicho residuo dando lugar a un intermediario. Una segunda molécula de GSH reduce este intermediario, resultando en la restauración del sitio activo de la GPx y la formación de GSSG<sup>35</sup>. El GSSG es reciclado a su forma reducida por la enzima GRd.

La enzima GRd es una oxidorreductasa que cataliza la reducción del GSSG para generar dos moléculas de GSH, utilizando NADPH como cofactor. Es una enzima altamente conservada en la naturaleza, con un alto grado de similitud desde *E. coli* hasta el hombre. Se localiza principalmente en citoplasma, núcleo y mitocondrias, aunque también se ha detectado actividad oxidorreductasa en retículo endoplasmático y en lisosomas<sup>36</sup>. La GRd ayuda a mantener la homeostasis redox manteniendo los niveles de GSH altos y los de GSSG bajos. El mecanismo de acción de esta enzima incluye dos pasos: primero, el NADPH reduce a la GRd y luego los electrones son transferidos a la molécula de GSSG, reduciéndola y regenerando la enzima<sup>37</sup>.

### 2.3. Homeostasis redox y estrés oxidativo. Implicancias en la respuesta inmunológica

En condiciones fisiológicas, los radicales libres y las especies reactivas no radicalarias permanecen en las células y tejidos a bajas concentraciones. En estas condiciones, cumplen un importante rol como mediadores regulatorios en la señalización redox, induciendo respuestas protectoras contra el daño oxidativo y restableciendo la homeostasis redox luego de una exposición temporaria a oxidantes<sup>38</sup>.

La concentración de oxidantes está determinada por el balance entre su tasa de producción y su tasa de eliminación por las defensas antioxidantes. La señalización redox requiere la ruptura de dicho balance, ya sea por un aumento en la producción de oxidantes o por la disminución de uno o varios de los sistemas antioxidantes. Estos eventos oxidativos pueden ser inducidos de manera regulada por la activación de los sistemas productores de oxidantes como parte de los mecanismos celulares fisiológicos. Sin embargo, respuestas similares pueden ser inducidas por condiciones de estrés generadas por factores ambientales. Si el aumento inicial de ERO es relativamente pequeño, las defensas antioxidantes suelen ser suficientes para compensarlo y restaurar la homeostasis redox. En cambio, cuando el aumento de oxidantes es mayor o persistente, las respuestas antioxidantes no son suficientes para restaurar la homeostasis redox. En estos casos, el sistema puede llegar a un equilibrio que, si bien es estable, resulta en un estado asociado a altas concentraciones de ERO y patrones de expresión génica alterados como consecuencia

de la activación de vías de señalización inducibles por el estado redox. En casos extremos, el gran desbalance entre agentes oxidantes y antioxidantes se manifiesta en un estado patológico, el estrés oxidativo, que involucra un cambio crónico hacia un estado más oxidativo y daños a macromoléculas inducidos por las ERO que resultan en la alteración de las funciones celulares<sup>38</sup>.

En células inmunológicas, la activación celular induce una reprogramación metabólica que lleva a la producción de ERO citosólicos y mitocondriales<sup>39</sup>. La activación, proliferación y diferenciación celular requieren una producción moderada de ERO<sup>40</sup>. Además, las ERO participan en la respuesta inmunológica a través de la activación de vías inflamatorias y de la inducción de la presentación antigénica por las células dendríticas<sup>41</sup>. La producción de ERO a través de la activación de la NOX, proceso denominado estallido respiratorio, es la principal respuesta antimicrobiana de células fagocíticas. Sin embargo, niveles excesivos de ERO inhiben la actividad inmunológica e inducen apoptosis<sup>40</sup>. Así, alteraciones en la producción o eliminación de ERO repercutirán en la señalización redox y, por ende, en la respuesta inmunológica.

### 3. Obesidad: el papel del tejido adiposo blanco y las alteraciones metabólicas

#### 3.1. El tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano esencial en la regulación de la homeostasis energética del organismo que actúa como reservorio calórico. En condiciones de exceso de nutrientes, el tejido adiposo almacena el excedente de nutrientes en forma de lípidos neutros, los triglicéridos, mientras que en condiciones de déficit nutricional, provee de nutrientes a otros tejidos a través de la lipólisis de los triglicéridos almacenados<sup>42</sup>. El tejido adiposo está conformado por adipocitos, pre-adipocitos, células endoteliales, células inmunológicas, fibroblastos y células madre. Los adipocitos cargados de lípidos conforman sólo el 20-40% del contenido celular del tejido adiposo, aunque corresponde a más del 90% de su volumen.

El 60-80% restante corresponde a células de la fracción vascular estromal, de las cuales más de la mitad son leucocitos<sup>43</sup>.

Existen dos tipos principales de tejido adiposo, el pardo y el blanco. El tejido adiposo pardo es abundante en recién nacidos y se localiza en las regiones intraescapulares e intraclaviculares, a lo largo del sistema vascular, y rodeando órganos críticos como riñones, corazón, hígado y páncreas<sup>44</sup>. Su principal función es el mantenimiento de la temperatura corporal a través del gasto energético por termogénesis<sup>45</sup>. El tejido adiposo blanco se especializa en el almacenamiento y liberación de lípidos. El balance entre ambos procesos es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis energética, ya que el excesivo almacenamiento de lípidos o la disminución de su eliminación lleva a la obesidad y a sus comorbilidades asociadas<sup>46</sup>. Según su localización en el cuerpo, el tejido adiposo blanco se clasifica en subcutáneo o visceral. El tejido adiposo visceral incluye depósitos abdominales, perirrenales y pericárdicos. El tejido adiposo abdominal es el de mayor relevancia clínica debido a que su acumulación se correlaciona con el desarrollo de alteraciones metabólicas<sup>47</sup>.

Si bien históricamente el tejido adiposo fue considerado únicamente como reservorio energético, actualmente es reconocido como un órgano endócrino involucrado en la regulación de diversas funciones biológicas tales como el apetito, el metabolismo de glucosa y lípidos, peso corporal, inmunidad, angiogénesis, reproducción, coagulación, entre otras<sup>48</sup>. Los adipocitos maduros expresan y secretan una variedad de proteínas, conocidas como adipoquinas, que actúan tanto a nivel local como sistémico. Las adipoquinas más estudiadas son la leptina y la adiponectina.

La leptina es un péptido sintetizado principalmente por el tejido adiposo blanco y cuya expresión y secreción es regulada por diversos factores, como citoquinas proinflamatorias, glucocorticoides e insulina<sup>49</sup>. Los niveles circulantes de leptina son directamente proporcionales a la cantidad de grasa corporal y fluctúan de acuerdo a los cambios en el consumo calórico<sup>50</sup>. A nivel central, el papel de la leptina es transmitir el estado de saciedad al hipotálamo<sup>51</sup>. La leptina hipotalámica regula el gasto energético mediante la estimulación neuroendócrina de la tiroides y las gónadas, y la supresión de la actividad adrenal<sup>52</sup>. En los

tejidos periféricos, especialmente en hígado, páncreas, músculo esquelético y tejido adiposo, la leptina favorece el transporte de glucosa, la glucólisis, la sensibilidad a la insulina, y también modula enzimas clave del metabolismo de lípidos<sup>51</sup>.

La adiponectina es una adipoquina con efectos antiinflamatorios, antidiabéticos, antiaterogénicos y cardioprotectivos, y está implicada en un amplio espectro de actividades tejido específicas<sup>53</sup>. En el páncreas, la adiponectina favorece el consumo de glucosa. En el hígado, activa el transporte de glucosa y la oxidación de ácidos grasos, e inhibe la gluconeogénesis<sup>54</sup>. La acción antiinflamatoria de la adiponectina se debe a la supresión de la vía inflamatoria mediada por NFκB y de la producción de ERO, así como también a la estimulación de la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10<sup>55</sup>.

### 3.2. Síndrome metabólico y resistencia a la insulina

Según la Federación Internacional de Diabetes, el síndrome metabólico se define como la presencia de obesidad central, determinada por la circunferencia de cintura, sumado al menos a dos de las siguientes características: niveles de triglicéridos séricos elevados, niveles de colesterol HDL reducidos, hipertensión arterial, hiperglucemia en ayunas o diabetes tipo 2<sup>56</sup>. Tradicionalmente, la clínica ha evaluado de manera individual cada uno de los factores de riesgo que contribuyen al síndrome metabólico. Sin embargo, las evidencias sugieren que los factores de riesgo son más que aditivos<sup>57</sup>.

El síndrome metabólico representa un factor de riesgo para el desarrollo de varias patologías. Pacientes con síndrome metabólico presentan entre dos y cinco veces mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes de tipo 2 en los primeros cinco a diez años de evolución<sup>58</sup>. Uno de los principales factores de riesgo que contribuye al desarrollo de este síndrome es la resistencia a la insulina<sup>57</sup>.

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. Su principal función es el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, aunque también está involucrada en procesos anabólicos como el crecimiento y desarrollo tisular<sup>58</sup>. Si bien el receptor de insulina se expresa en varios tipos celulares, el efecto principal de la insulina en

la homeostasis de la glucosa es el resultado de su efecto directo sobre el hígado y el tejido adiposo blanco. En el hígado, la insulina activa la síntesis de glucógeno, induce la expresión de genes lipogénicos y modula negativamente la expresión de genes gluconeogénicos. En el tejido adiposo blanco, la insulina suprime la lipólisis, incrementa el transporte de la glucosa e induce la lipogénesis<sup>59</sup>.

La resistencia a la insulina sistémica se evidencia cuando los niveles plasmáticos normales de insulina son insuficientes para lograr que los tejidos blanco articulen una respuesta coordinada que baje los niveles de glucosa en sangre. En etapas tempranas de insulinorresistencia, el páncreas compensa la falta de respuesta a la insulina en los tejidos periféricos aumentando su secreción al torrente sanguíneo. En ayunas, esta compensación es suficiente para mantener la glucemia en el rango adecuado. Sin embargo, luego de una comida donde la glucosa es rápidamente absorbida, esta compensación no es suficiente y se genera un estado de hiperglucemia. Esta incapacidad de regular adecuadamente la concentración de glucosa luego de una comida se conoce como intolerancia a la glucosa<sup>58</sup>. En estas condiciones, el esfuerzo de las células  $\beta$  para producir y liberar más insulina genera estrés celular y un deterioro en su funcionalidad, causando eventualmente su apoptosis. Como consecuencia de la disfunción de las células  $\beta$ , los niveles de insulina disminuyen. El descenso de los niveles de insulina junto con la resistencia a la insulina a nivel sistémico, determinan la incidencia y severidad de la diabetes tipo 2<sup>60</sup>.

A nivel molecular, la resistencia a la insulina ocurre debido a la inhibición de la vía de señalización de la insulina. En condiciones normales, la unión de la insulina a su receptor resulta en su autofosforilación en varios residuos tirosina. Estos residuos fosforilados actúan como sitios de unión de los sustratos del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés *insulin receptor substrate*). La fosforilación de los IRS por el receptor de insulina permite la activación de las vías mediadas por la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y las quinasas activadas por mitógenos (MAPK)<sup>61,62</sup>. La resistencia a la insulina se desarrolla como consecuencia de diversos procesos de estrés celular. Las citoquinas proinflamatorias, derivados de ácidos grasos, y las ERO activan serina/treonina quinasas que actúan como reguladores negativos de la señalización intracelular inducida por la insulina. En la obesidad,

la fosforilación de residuos serina de los IRS es un mecanismo por el cual el estrés metabólico e inflamatorio promueve la resistencia a la insulina en tejido adiposo e hígado<sup>63</sup>.

### 3.3. Obesidad

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por la acumulación excesiva de grasa corporal. El grado de obesidad se determina utilizando el índice de masa corporal (IMC), definido como el cociente entre el peso en kg y la altura en metros cuadrados<sup>64</sup>. Según su IMC, los individuos se clasifican en cinco categorías: con normopeso (18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>), con sobrepeso (25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup>), con obesidad clase I (30,0-34,9 kg/m<sup>2</sup>), con obesidad clase II (35,0-39,9 kg/m<sup>2</sup>) y con obesidad clase III (mayor o igual a 40,0 kg/m<sup>2</sup>). Se considera obesidad mórbida a la obesidad clase III, o la obesidad clase II cuando existen comorbilidades asociadas<sup>65</sup>. Si bien el IMC es un índice de adiposidad, su limitación radica en la imposibilidad de obtener información precisa sobre la composición corporal, y por ende, de diferenciar entre la adiposidad abdominal y la adiposidad menos dañina presente en otras áreas del cuerpo. Sin embargo, es el método aceptado internacionalmente para clasificar la obesidad<sup>64</sup>. La circunferencia de cintura se ha propuesto como otro parámetro relevante para clasificar la obesidad, ya que mide específicamente la adiposidad abdominal<sup>66</sup>.

En las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de la obesidad se convirtió en una de las principales problemáticas de salud a nivel mundial, ya que el exceso de peso aumenta el riesgo de desarrollar diversas patologías como enfermedades cardiovasculares<sup>67</sup>, diabetes<sup>68</sup>, cáncer<sup>69</sup>, enfermedades del hígado graso no alcohólico<sup>70</sup>, entre otras. Según la Organización Mundial de la Salud, la prevalencia de la obesidad se triplicó entre los años 1975 y 2016. En el año 2016, el 39% de la población mundial adulta presentaba sobrepeso, mientras que el 13% presentaba obesidad<sup>71</sup>. En Argentina, el 36% de la población adulta presenta sobrepeso y el 25% obesidad<sup>72</sup>.

La causa más común de obesidad es el exceso de consumo calórico en relación al gasto calórico. En la actualidad, el aumento del consumo calórico es promovido por la producción de alimentos procesados que suelen tener alto contenido de azúcares, grasas y sodio,



sumado al aumento en el tamaño de la porción de los alimentos comerciales y a su accesibilidad económica. A su vez, la actividad física ha bajado dramáticamente en las últimas décadas, disminuyendo significativamente el gasto energético<sup>73</sup>. Sin embargo, la etiología de la obesidad es compleja y dinámica, e incluye factores genéticos, fisiológicos, ambientales, económicos y sociales que interactúan entre sí promoviendo el desarrollo de la obesidad<sup>66</sup>.

### 3.4. Patogénesis de la obesidad

La disfunción del tejido adiposo es una de las primeras anormalidades que ocurre durante el desarrollo de la obesidad y sucede bajo condiciones de continuo desbalance energético positivo<sup>74</sup>. En una primera instancia, el exceso calórico positivo lleva al agrandamiento de los adipocitos maduros, dando como resultado la hipertrofia celular y el almacenamiento de mayor cantidad de lípidos. Si el desbalance calórico continúa, las células hipertrofiadas secretan factores que favorecen el reclutamiento y maduración de pre-adipocitos, resultando en el aumento del número de células residentes en el tejido adiposo, condición denominada hiperplasia<sup>75</sup>. Así, la disponibilidad excesiva y crónica de nutrientes lleva al agrandamiento de gotas lipídicas, con la consecuente hipertrofia de los adipocitos e hiperplasia tisular, que culmina eventualmente en el aumento de los depósitos de grasa y la ganancia de peso corporal<sup>46</sup>.

El factor crítico en el desarrollo de la alteración metabólica del tejido adiposo es su capacidad de desarrollar hipertrofia e hiperplasia<sup>76</sup>. La habilidad del tejido adiposo de aumentar dramáticamente su tamaño en respuesta a la demanda nutricional requiere una capacidad de remodelación única y una flexibilidad de la matriz extracelular suficiente para permitir la expansión del tejido adiposo. Los adipocitos expresan una gran variedad de proteínas de matriz extracelular y las enzimas necesarias para su remodelación, cuya expresión génica es modulada por la disponibilidad nutricional<sup>77</sup>. Cuando la matriz extracelular se vuelve rígida, como ocurre en la obesidad, la capacidad de los adipocitos de almacenar el exceso de nutrientes se ve limitada y, como consecuencia, tienen lugar procesos inflamatorios, la activación de vías asociadas con la respuesta al estrés, y la

acumulación de lípidos en otros tejidos<sup>78</sup>. Si bien el proceso de remodelación exige el aumento de la vascularización, el tejido adiposo de pacientes obesos sufre hipoxia debido a que el gran tamaño de los adipocitos limita su disponibilidad de oxígeno. La hipoxia induce resistencia a la insulina, un aumento del metabolismo celular anaeróbico, y un estado tisular inflamatorio como resultado de la regulación negativa de adiponectina y positiva de leptina y citoquinas inflamatorias<sup>79</sup>.

Como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo funciona como un depósito de energía que puede ser liberada en momentos de necesidad. Los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son transportados a los sitios que lo requieran en forma de ácidos grasos no esterificados (AGNE). Así, el tejido adiposo es el único tejido que libera cantidades significativas de AGNE a plasma<sup>80</sup>. Este mecanismo es regulado por la insulina. La elevación de los niveles plasmáticos de insulina suprime la lipólisis en el adipocito, disminuyendo los niveles de AGNE en plasma. La resistencia a la insulina desarrollada como respuesta al desbalance calórico continuo, disminuye el efecto inhibitorio que tiene la insulina sobre la lipólisis, resultando en una lipólisis descontrolada y en el incremento de los niveles de AGNE en plasma<sup>81</sup>. La tasa de liberación de AGNE a la circulación aumenta de manera proporcional con el incremento de la masa de tejido adiposo<sup>82</sup>, fenómeno que posiblemente se deba tanto a la alteración metabólica en el tejido adiposo como al desafío de su capacidad de almacenaje. El incremento de AGNE en plasma favorece su captación por otros órganos, principalmente el hígado, contribuyendo a la alteración metabólica multiorgánica.

#### 4. El hígado

El hígado, reconocido como el órgano metabólico por excelencia, es el órgano sólido más grande del cuerpo humano. Con un peso aproximado de 1,5 kg, corresponde al 2-5% del peso corporal de un adulto<sup>83</sup>. Las funciones esenciales del hígado comprenden el metabolismo de macronutrientes, síntesis proteica, control homeostático de lípidos y colesterol, regulación de la glucemia y del volumen sanguíneo, control endócrino de vías de

señalización relacionadas con el crecimiento, funciones inmunológicas, y descomposición de xenobióticos<sup>84</sup>.

Gracias a la localización estratégica y a su irrigación particular, el hígado lleva a cabo la degradación de toxinas y de productos de desecho<sup>83</sup>, maximiza las interacciones entre las células inmunológicas y los patógenos<sup>85</sup> y es responsable de la remoción de patógenos y antígenos exógenos de la circulación sistémica<sup>83</sup>. El hígado es el único órgano abastecido tanto por la sangre arterial como venosa, y cuya organización anatómica permite que ambos suministros accedan simultáneamente a las distintas estructuras hepáticas. Debido a que el 70% de la sangre es suministrada al hígado desde el intestino a través de la vena porta, el hígado se encuentra expuesto a bacterias y moléculas derivadas de patógenos como el LPS<sup>86</sup>. Por lo tanto, es necesario desarrollar mecanismos de tolerancia inmunológica para evitar la sobreactivación de los componentes del sistema inmunológico y, a su vez, ser capaz de llevar a cabo respuestas efectivas frente a patógenos<sup>87</sup>.

El hígado está compuesto por una fracción parenquimática y una no parenquimática. Las células de la fracción parenquimática, los hepatocitos, ocupan el 78-80% del tejido hepático. Las células no parenquimáticas ocupan el 5-6% del tejido hepático, mientras que el 14-17% restante corresponde a espacios extracelulares (conductos biliares, lumen sinusoidal y espacio de Disse)<sup>87</sup>. Las células no parenquimáticas incluyen a las células estrelladas hepáticas, células endoteliales sinusoidales hepáticas, células dendríticas, células de Kupffer y linfocitos residentes.

Las células estrelladas hepáticas (HSC, del inglés *hepatic stellate cells*) comprenden el 1% de las células no parenquimáticas<sup>88</sup> y se localizan en el espacio de Disse<sup>89</sup>, espacio comprendido entre las células endoteliales sinusoidales y las células epiteliales. En un hígado sano, las HSC se encuentran en estado quiescente y almacenan vitamina A dentro de las gotas lipídicas presentes en el citoplasma, constituyendo el mayor reservorio de esta vitamina en el cuerpo<sup>90</sup>. Cuando el hígado sufre algún tipo de lesión, las HSC se activan y se diferencian dando lugar a miofibroblastos. Las HSC activadas producen componentes de la matriz extracelular, generando una cicatriz en el sitio lesionado para proteger al hígado de

lesiones posteriores. Asimismo, estas células activadas secretan citoquinas y factores de crecimiento que promueven la regeneración del epitelio hepático<sup>89,91</sup>.

Las células presentadoras de antígenos residentes en el hígado comprenden a las células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales y células dendríticas. Estas células capturan antígenos que pasan a través del hígado o que son liberados por hepatocitos infectados al morir, y son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en condiciones no inflamatorias<sup>88</sup>.

Las células endoteliales sinusoidales hepáticas comprenden el 50% de las células no parenquimáticas<sup>88</sup>. Estas células forman la pared fenestrada del sinusoides hepático, que regula y supervisa el tráfico de células y moléculas entre el parénquima hepático y la sangre<sup>92</sup>.

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado y constituyen el 25% de las células hepáticas no parenquimáticas<sup>88</sup>, siendo la mayor población de MF tisulares residentes en el cuerpo. La principal función de las células de Kupffer es fagocitar patógenos o productos derivados de éstos que llegan desde la circulación portal, constituyendo una barrera que previene el pasaje de estos productos a la circulación periférica. Estas células también se encargan de fagocitar *debris* celulares y de presentar antígenos *in situ* a los LT citotóxicos y regulatorios<sup>93</sup>.

Los linfocitos residentes hepáticos constituyen el 20% de las células no parenquimáticas<sup>88</sup> y comprenden a las células NK, NKT, linfoides innatas, LT $\gamma\delta$ , LT y LB. La composición linfocitaria del hígado difiere de la presente en otros órganos y en sangre periférica<sup>94</sup>. La función principal de estas células es el mantenimiento de la homeostasis inmunológica hepática y la resistencia a infecciones virales, tumores y enfermedades autoinmunes<sup>94</sup>.

## 5. Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico

Las Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) se definen por la acumulación de grasa, denominada esteatosis, en al menos un 5% de los hepatocitos en ausencia de otras causas de enfermedad hepática<sup>95</sup>. Se trata de un amplio espectro de hepatopatías que abarcan desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), siendo esta última la condición de mayor severidad. La incidencia de las EHGNA ha aumentado significativamente en los últimos años como resultado de cambios en los hábitos alimentarios y el aumento del sedentarismo, convirtiéndose en la enfermedad hepática más frecuente en el mundo<sup>96</sup>. La prevalencia global de las EHGNA es del 25%, mientras que la de EHNA se estima entre 1,5% y 6,45%<sup>97</sup>. En Sudamérica, la prevalencia de las EHGNA es de 31%<sup>97</sup>, y de 6-18% para la EHNA<sup>98</sup>, siendo la región con mayor prevalencia reportada.

Las EHGNA tienen tasas de progreso muy variadas entre los individuos que la padecen debido al impacto de factores ambientales, metabólicos, microbioma, comorbilidades y factores de riesgo genético. Los factores de riesgo para el progreso a la EHNA incluyen la obesidad, edad, diabetes tipo 2, hipertensión, síndrome metabólico, hiperlipidemia, consumo de dieta alta en fructosa, raza blanca, y variantes del gen PNPLA3<sup>99</sup>.

Si bien la esteatosis simple es reversible, estudios longitudinales realizados en los últimos años han cambiado la creencia de que la esteatosis simple tiene un curso benigno. En base al diagnóstico histológico, se ha descrito que la esteatosis simple progresa a EHNA en el 23% de los casos en un periodo de tres años<sup>100</sup>, y que desarrolla algún grado de fibrosis en el 37% de los casos, llegando a ser severa en el 22% de los casos<sup>101</sup>.

La EHNA se asocia con un aumento en la tasa de mortalidad y se cree que será la principal causa de trasplante hepático. Se estima que el 20% de los pacientes con EHNA desarrollan cirrosis<sup>102</sup>, aunque la EHNA puede progresar a carcinoma hepatocelular incluso en ausencia de cirrosis<sup>103</sup>.

Las manifestaciones clínicas de las EHGNA no están limitadas únicamente a las enfermedades hepáticas, sino que involucran múltiples órganos como consecuencia de las alteraciones metabólicas multiorgánicas. Los pacientes con EHGNA poseen mayor riesgo de

padecer enfermedad renal crónica<sup>104</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>105</sup>, y diabetes tipo 2<sup>106</sup>. Nueva evidencia indica una asociación entre las EHGNA y otras enfermedades que no se relacionan intuitivamente con los desórdenes metabólicos presentes en estos pacientes, como osteoporosis, psoriasis, urolitiasis, síndrome de ovario poliquístico, periodontitis, entre otras<sup>107</sup>.

### 5.1. Características clínicas, diagnóstico y tratamiento

La mayoría de los pacientes con EHGNA son clínicamente asintomáticos, aunque algunos pueden presentar síntomas inespecíficos como fatiga, dispepsia, y hepatoesplenomegalia<sup>108</sup>. Debido a la escasa sintomatología, muchos pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas, cuando los tratamientos actuales ya no son eficientes, motivo por el cual resulta importante el uso de métodos no invasivos para el diagnóstico temprano.

Las EHGNA son diagnosticadas en base a la historia clínica, el laboratorio, y estudios por imágenes, pudiendo ser confirmadas histológicamente. El diagnóstico de las EHGNA requiere la exclusión clínica de otras causas de esteatosis, tales como hepatitis virales, daño hepático inducido por drogas, enfermedades autoinmunes, enfermedad de Wilson, deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina. Asimismo, requiere la exclusión de ingesta de alcohol diaria mayor o igual a 30 g en hombres o 20 g en mujeres, ya que el consumo sobre estos límites indicaría enfermedad hepática alcohólica<sup>109</sup>.

Los biomarcadores utilizados para el diagnóstico de las EHGNA incluyen los niveles de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), y componentes del síndrome metabólico. Si bien las EHGNA son la principal causa de elevación inesperada de enzimas hepáticas<sup>109</sup>, alrededor del 80% de los pacientes con EHGNA presentan niveles normales de estas enzimas<sup>110</sup>. Se desarrollaron diversos modelos predictivos para el diagnóstico de las EHGNA y el grado de fibrosis. Estos modelos incluyen edad y sexo, datos antropométricos como el IMC o la circunferencia de cintura, y datos bioquímicos como los niveles de AST y ALT, triglicéridos, colesterol, glucosa, insulina, entre otros. Sin embargo, los modelos predictivos actuales tienen una utilidad clínica moderada

y ninguno de ellos permite diferenciar entre esteatosis simple y EHNA con alta sensibilidad y especificidad<sup>111</sup>.

El diagnóstico por imágenes se utiliza para detectar la presencia de esteatosis e incluye el ultrasonido abdominal, tomografía computada y resonancia magnética. Entre ellos, el ultrasonido abdominal es el más utilizado por tratarse de un método no invasivo, ampliamente disponible y con menor costo, aunque posee baja sensibilidad en pacientes con menos del 30% de esteatosis<sup>99</sup>.

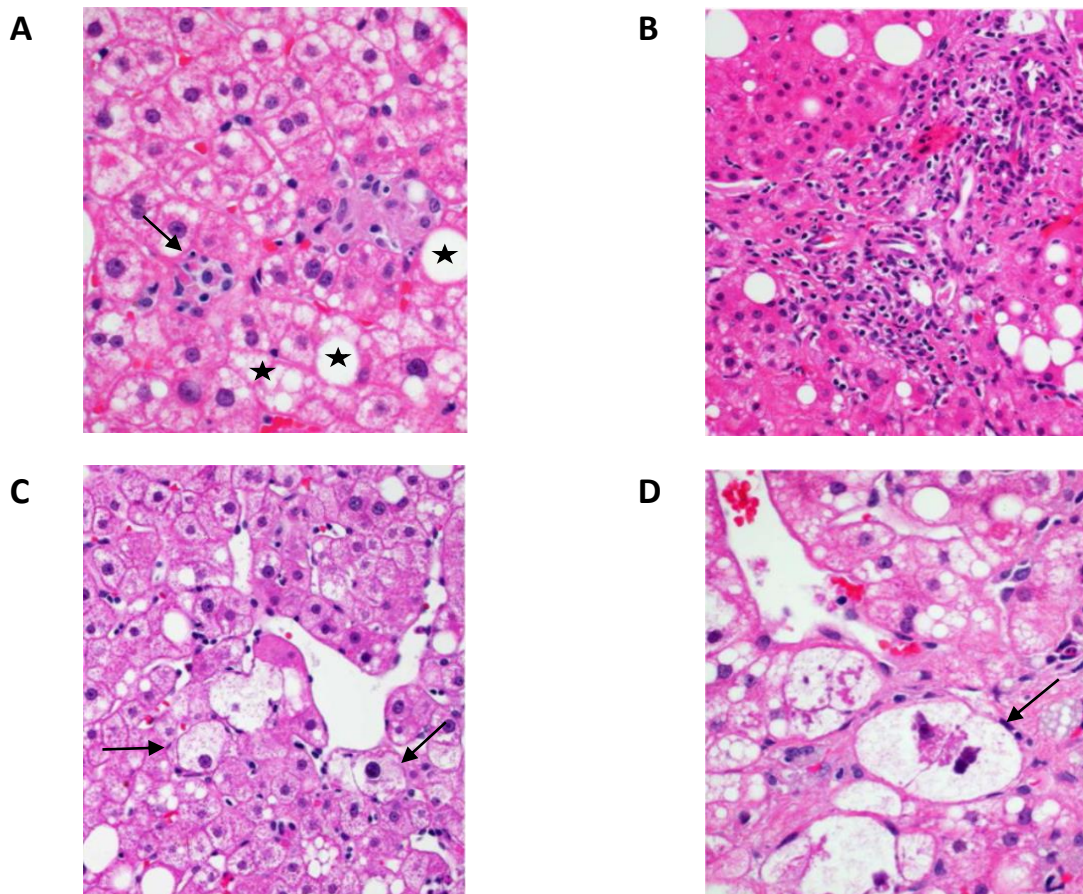
Debido a que la distinción entre esteatosis simple y EHNA no puede hacerse por métodos por imágenes ni por marcadores serológicos, el análisis histológico de biopsia hepática es hasta el momento la única herramienta disponible para diferenciar ambos estadios, detectar la severidad de la enfermedad hepática y clasificar correctamente casos en los que hay más de un diagnóstico posible<sup>112</sup>.

A nivel histológico, los pacientes con EHGNA presentan frecuentemente esteatosis de tipo macrovesicular, con una gran gota de grasa que desplaza al núcleo celular o varias gotas que lo rodean dejándolo en el centro (Figura 1A). Una de las características diagnósticas de la EHNA es la presencia de focos inflamatorios compuestos principalmente por LT y MF (Figura 1B). La otra característica diagnóstica que define a la EHNA es el daño hepatocelular que se muestra en forma de balonamiento celular con o sin cuerpos de Mallory-Denk (Figura 1C-D)<sup>112</sup>.

La fibrosis comienza en la región hepática pericentral, y se vuelve más compleja en los espacios perisinusoidales (Figura 2A-B). Eventualmente, la fibrosis puede progresar al denominado puente de fibrosis, en el que los hepatocitos quedan atrapados alrededor del área portal y el colágeno se extiende al parénquima circundante (Figura 2C). Finalmente, los puentes de fibrosis pueden progresar formando una única banda entre el área portal y las venas centrales, dando lugar a la cirrosis (Figura 2D)<sup>112</sup>.

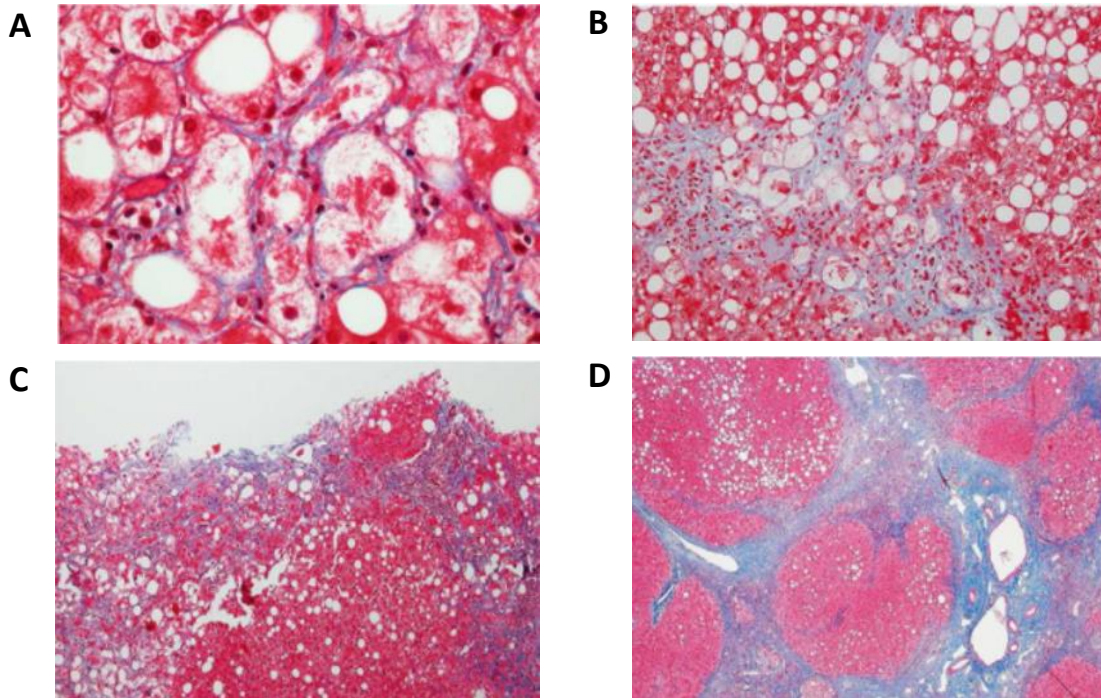
En la actualidad no existe un tratamiento farmacológico establecido y aprobado para tratar las EHGNA, por lo que las indicaciones médicas se basan en reducir los factores de riesgo, revertir las manifestaciones clínicas, mejorar las comorbilidades asociadas, y prevenir la progresión a cirrosis o hepatocarcinoma y la mortalidad asociada a EHNA<sup>113</sup>. La

principal indicación para pacientes con EHGNA es la modificación del estilo de vida, principalmente aumento de actividad física y cambios alimentarios<sup>114</sup>. En pacientes con sobrepeso u obesidad, el principal objetivo es la pérdida de un 7-10% del peso corporal mediante la modificación del estilo de vida, ya que se ha demostrado que dicho descenso mejora los niveles de las enzimas hepáticas y las alteraciones histológicas<sup>109</sup>.



**Figura 1. Histología de las EHGNA.** Se muestran cortes de tejido hepático teñidos con Hematoxilina y Eosina. **A.** Hepatocitos cargados con gotas lipídicas (estrellas). Se observa infiltrado linfocitario (flecha), (600X). **B.** Foco inflamatorio portal (400X). **C.** Balonamiento de hepatocitos (flechas) (400X). **D.** Inclusiones citoplasmáticas de cuerpos de Mallory-Denk (flecha) (600X). Imágenes extraídas del trabajo de Kleiner y Makhlof<sup>112</sup>.





**Figura 2. Fibrosis en las EHNA.** Se muestran cortes de tejido hepático teñidos con Tricrómico de Masson. **A.** Fibrosis perisinusoidal temprana (600X). **B.** Fibrosis perisinusoidal avanzada (200X). **C.** Puente de fibrosis (100X). **D.** Cirrosis (40X). Imágenes extraídas del trabajo de Kleiner y Makhoul<sup>112</sup>.

## 5.2. Patogénesis de las EHNA: de la homeostasis hepática a la hepatopatía

Durante muchos años, la patogénesis de las EHNA se explicó mediante la hipótesis de los “dos *hits*”. Esta hipótesis sugiere que la acumulación de triglicéridos en el hígado es el “primer *hit*”, que aumenta la susceptibilidad del hígado a sufrir daño mediado por el “segundo *hit*” y lleva al desarrollo de EHNA. Este segundo hit incluye citoquinas inflamatorias, estrés oxidativo, y disfunción mitocondrial<sup>115</sup>.

El avance del conocimiento permitió descubrir que son muchas las vías moleculares que contribuyen al desarrollo de la EHNA y que los disparadores no son los mismos en todos los pacientes, dejando obsoleta la hipótesis de los dos *hits*<sup>116</sup>. Como resultado, se desarrolló la hipótesis de “múltiples *hits*”. Esta nueva hipótesis considera que múltiples insultos actúan en conjunto en sujetos predispuestos genéticamente para inducir el desarrollo de EHNA. Estos “*hits*” incluyen resistencia a la insulina, adipocinas, factores nutricionales, microbiota intestinal, y factores genéticos y epigenéticos<sup>117</sup>.

### 5.2.1. Desarrollo de esteatosis hepática

El hígado juega un rol crucial en el metabolismo lipídico mediante la síntesis, almacenamiento, secreción y oxidación de ácidos grasos. Los ácidos grasos utilizados para la formación de triglicéridos hepáticos provienen de tres fuentes: (I) la dieta; (II) los AGNE derivados del tejido adiposo; y (III) la lipogénesis *de novo*<sup>118</sup>. Por otro lado, la eliminación hepática de lípidos se lleva a cabo mediante dos mecanismos: (I) la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos; y (II) la exportación de lípidos<sup>119</sup>.

La esteatosis hepática surge como consecuencia del desbalance entre la incorporación y la eliminación de los ácidos grasos a favor de la primera. Por lo tanto, la esteatosis se desarrollará si (I) aumenta el flujo de AGNE al hígado; (II) aumenta la lipogénesis *de novo*; (III) disminuye la oxidación de ácidos grasos; y/o (IV) disminuye la exportación de lípidos<sup>120</sup> (Figura 3).

Los ácidos grasos provenientes de la dieta son absorbidos en el intestino delgado, ensamblados en triglicéridos, incorporados en quilomicrones, y secretados a la circulación sistémica. El 70% de los triglicéridos presentes en los quilomicrones es hidrolizado y almacenado en el tejido adiposo, mientras que el 30% restante es captado por el hígado<sup>119</sup>. Como se mencionó anteriormente, en situaciones de exceso calórico crónico el desafío de la capacidad de almacenamiento de los adipocitos sumado al desarrollo de resistencia a la insulina en el tejido adiposo, provoca la liberación descontrolada de AGNE a la circulación. Simultáneamente, el exceso de ácidos grasos adquiridos con la dieta contribuye al flujo de AGNE a través de los quilomicrones remanentes<sup>121</sup>. Así, la elevada concentración plasmática de AGNE promueve su ingreso al hígado<sup>122</sup>. Debido a que los AGNE son hepatotóxicos, son utilizados por los hepatocitos para la síntesis de triglicéridos como mecanismo protector de su efecto pro-apoptótico<sup>123</sup>.

En la lipogénesis *de novo*, la glucosa es convertida a ácidos grasos monoinsaturados que son utilizados para formar triglicéridos. Las enzimas involucradas en este proceso son inducidas a nivel transcripcional por la glucosa y la insulina como respuesta a la disponibilidad de nutrientes<sup>124</sup>. En condiciones normales, la lipogénesis *de novo* es escasa. Sin embargo, en el contexto patológico de las EHGNA se evidencia un aumento de este

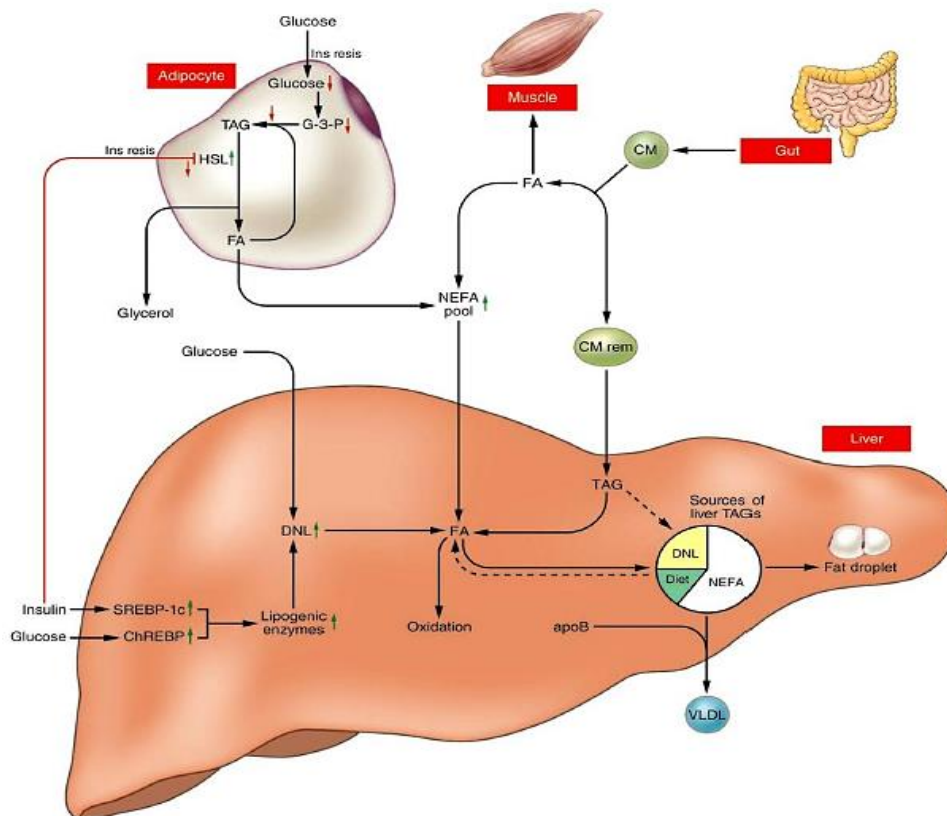
mecanismo gracias a la denominada resistencia a la insulina selectiva. Se esperaría que la resistencia a la insulina hepática genere un aumento de la gluconeogénesis y una disminución de la lipogénesis *de novo*. Sin embargo, la lipogénesis *de novo* se mantiene intacta mientras aumenta la gluconeogénesis<sup>125</sup>. Más aún, la hiperinsulinemia y la hiperglucemia derivadas de la falta de sensibilidad a la insulina determinan el aumento de la lipogénesis *de novo* hepática.

Donnelly y col. demostraron que el 59% de los triglicéridos hepáticos se originan a partir de los AGNE liberados por el tejido adiposo, el 26% de la lipogénesis *de novo*, y el 15% de la dieta. Esta evidencia confirma que la desregulación metabólica a nivel del tejido adiposo es un factor crítico en el desarrollo de la esteatosis hepática<sup>126</sup>.

La oxidación de ácidos grasos ocurre en la mitocondria cuando los niveles de glucosa son bajos, y provee la energía necesaria en forma de ATP<sup>127</sup>. En condiciones de disponibilidad nutricional, la oxidación de ácidos grasos es inhibida debido a la disminución del flujo de AGNE como consecuencia de la acción de la insulina sobre la lipólisis en el tejido adiposo, y a la acción directa de la glucosa y la insulina sobre la tasa de ingreso de los ácidos grasos a la mitocondria<sup>119</sup>. Los pacientes con EHGNA presentan un aumento en la tasa de oxidación hepática de ácidos grasos como respuesta adaptativa a la sobrecarga lipídica y a la lipotoxicidad<sup>128</sup>. Sin embargo, este aumento en la oxidación de ácidos grasos no sólo no es suficiente para depurar al hígado del exceso de lípidos, sino que el resultado es negativo debido a la excesiva generación de ERO<sup>129</sup>. Como consecuencia de la sobreproducción de ERO, se genera daño oxidativo en el ADN mitocondrial, lo cual disminuye su función. La oxidación de ácidos grasos en mitocondrias disfuncionales produce un exceso de ERO aún mayor, y genera una respuesta compensatoria mediante la utilización de vías de oxidación alternativas, principalmente en peroxisomas y citocromos, que generan aún más ERO<sup>128</sup>, estableciéndose así un círculo vicioso que exacerba la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo<sup>130</sup>.

El hígado secreta triglicéridos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *very low density lipoprotein*), cuyo ensamblaje tiene lugar en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi<sup>131</sup>. Ante una baja disponibilidad de triglicéridos

hepáticos o en respuesta a la acción de la insulina, la tasa de secreción de VLDL disminuye gracias a la degradación de la apolipoproteína B (apoB), una proteína necesaria para su ensamblaje<sup>132</sup>. En las EHGNA, se ha observado un incremento en el ensamblaje y secreción de VLDL, posiblemente como resultado de la pérdida de respuesta a la insulina y del aumento en el contenido de triglicéridos hepáticos<sup>121</sup>. Esta observación sugiere que la hipertrigliceridemia presente en muchos pacientes con EHGNA es atribuible, al menos en parte, al aumento en la producción de VLDL<sup>133</sup>. Lamentablemente, el esfuerzo del hígado por exportar los triglicéridos no logra contrarrestar su acumulación.



**Figura 3. Desarrollo de esteatosis en EHGNA.** Los ácidos grasos llegan al hígado a través de la dieta transportados por quilomicrones (CM) y del pool de ácidos grasos no esterificados (NEFA) derivados del tejido adiposo. En el hígado, la glucosa es utilizada en la lipogénesis *de novo* (DNL) para la producción de ácidos grasos. Una vez en el hígado, los ácidos grasos son oxidados, ensamblados en VLDL y secretados al plasma, o almacenados en forma de triglicéridos. En el contexto de obesidad, y debido a la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, la falta de inhibición de la lipasa sensible a hormona (HSL) genera un aumento de la lipólisis y del flujo de NEFA hacia el hígado y el músculo. En el hígado, la insulina y la glucosa modulan positivamente la lipogénesis *de novo* a través de la inducción de los factores de transcripción lipogénicos SREBP-1c y ChREBP, respectivamente. Los altos niveles de insulina y de glucosa que resultan de la resistencia a la insulina, determinan un aumento de la lipogénesis *de novo*. El exceso de ácidos grasos que recibe el hígado no logra ser compensado por los mecanismos de oxidación y secreción, resultando en la acumulación de triglicéridos en gotas lipídicas. Imagen extraída del trabajo de Liu y col.<sup>122</sup>.

En conclusión, el hígado posee la capacidad de almacenar ácidos grasos, altamente energéticos pero citotóxicos, estabilizados en forma de lípidos neutros, los triglicéridos. Sin embargo, cuando el contenido hepático de triglicéridos supera el 5% y excede la capacidad máxima de los hepatocitos de acumular lípidos, la célula sufre lipotoxicidad que, a su vez, impactará negativamente en la señalización de la insulina, causará daño oxidativo, y promoverá la inflamación y la fibrosis, dando como resultado la progresión a la EHNA<sup>134</sup>.

#### 5.2.2. Progresión de las EHGNA: estrés oxidativo e inflamación crónica

Como en la mayoría de los órganos, la inflamación hepática tiene lugar para proteger a los hepatocitos del daño celular, favorecer la reparación del tejido dañado, y promover el restablecimiento de la homeostasis. Sin embargo, las respuestas inflamatorias extremadamente fuertes o que no se resuelven adecuadamente llevan a la pérdida masiva de hepatocitos, causando daños irreversibles al parénquima hepático y al organismo.

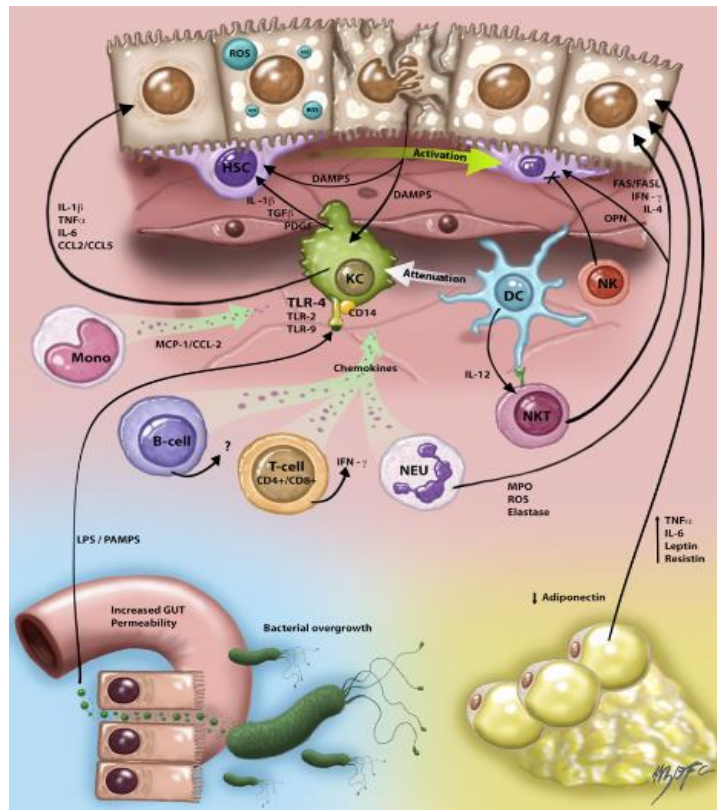
Como se describió anteriormente, las ERO median importantes funciones celulares, motivo por el cual su producción se encuentra estrictamente regulada. En el contexto de las EHGNA, la producción excesiva de ERO en los hepatocitos supera la capacidad compensatoria de las defensas antioxidantes, comprometiendo la señalización redox y provocando daño celular. Más aún, los lípidos acumulados en los hepatocitos sirven de sustrato para las ERO, formando sustancias lipotóxicas que generan estrés metabólico y promueven la liberación de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, y su muerte celular<sup>135</sup>. Las células de Kupffer son las primeras en responder a las señales de daño liberadas por los hepatocitos, produciendo TNF- $\alpha$  e IL-6, y secretando quimioquinas que inducirán el reclutamiento de monocitos, aumentando así el *pool* de MF<sup>136</sup> (Figura 4). Sumado a las señales de daño que liberan los hepatocitos al volverse disfuncionales y morir, los ácidos grasos por sí mismos son reconocidos como señales de daño por los receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés *toll-like receptor*) presentes en las células de Kupffer<sup>135</sup>. Adicionalmente, algunos ácidos grasos inducen la producción de ERO en MF hepáticos a través de la activación de NOX2<sup>137</sup>, contribuyendo al estrés oxidativo y al daño hepático.

Además de las DAMPs, las células de Kupffer también reciben señales de PAMPs a través de sus TLR. La microbiota intestinal tiene un papel relevante en la salud del individuo al cumplir importantes funciones en el metabolismo de nutrientes, metabolismo de drogas y xenobióticos, protección antimicrobiana, inmunomodulación e integridad de la barrera intestinal<sup>138</sup>. La composición de la microbiota intestinal es dinámica, siendo influenciada por factores externos como la dieta, el uso de antibióticos, y la higiene ambiental<sup>138</sup>. La disbiosis, definida como la modificación cuantitativa y cualitativa de la microbiota intestinal normal, está involucrada en el desarrollo y progresión de las EHGNA<sup>139</sup>. La disbiosis compromete la integridad de la barrera intestinal, permitiendo la translocación de bacterias y productos bacterianos a la circulación portal, que son reconocidos por los TLR presentes en MF, hepatocitos y adipocitos, activando vías inflamatorias<sup>140</sup>. Simultáneamente, los adipocitos disfuncionales liberan grandes cantidades de leptina, TNF- $\alpha$  e IL-6 a la circulación, que impactan en el hígado. La leptina aumenta la respuesta inflamatoria de hepatocitos y células de Kupffer frente a bajas dosis de LPS y promueve la liberación de TGF- $\beta$  por estas últimas. Por otro lado, la producción de adiponectina disminuye en presencia de estos mediadores inflamatorios, contribuyendo al estado inflamatorio general<sup>141</sup>.

Como respuesta a todos estos estímulos, se genera una gran producción de TNF- $\alpha$  que impacta sobre la viabilidad de los hepatocitos, induciendo su muerte celular y generando la liberación masiva de señales de daño. En este contexto, tendrá lugar un reclutamiento masivo de células inmunológicas (Mo, LT, NK, LB, neutrófilos) y la secreción de un panel de citoquinas inflamatorias y quimioquinas que aumentará aún más la inflamación, dando lugar a un círculo vicioso en el que la inflamación y la muerte celular llevará a efectos hepatotóxicos severos<sup>142</sup>.

La principal característica histológica de las EHNA es el infiltrado linfocitario del parénquima hepático. En el 60% de los pacientes, los LB y LT forman agregados focales cuyo tamaño y prevalencia correlaciona positivamente con el grado de inflamación lobular y de fibrosis<sup>143</sup>. Al reclutamiento de LT CD4<sup>+</sup> al hígado le sigue la polarización a perfiles Th1 y Th17, caracterizados por la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el primer caso y por IL-17 en el segundo<sup>144</sup>. La secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  polariza a los MF hacia un perfil inflamatorio,

mientras que la secreción de IL-17 induce la activación de neutrófilos y la expresión de genes pro-fibrogénicos en HSC<sup>145</sup>. La progresión a EHNA también es acompañada por el aumento en la prevalencia de LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos, reclutados al hígado principalmente como respuesta a señales mediadas por IFN- $\alpha$ <sup>146</sup>. De esta forma, las citoquinas generadas por los LT proveen un estímulo de activación y polarización potente hacia perfiles inflamatorios para los MF hepáticos y éstos, a su vez, contribuyen con la activación y reclutamiento de los LT mediante la liberación de IL-12, IL-23, y quimioquinas<sup>144</sup>. Esta situación es exacerbada por la pérdida de células T regulatorias como consecuencia del aumento de LT efectores, y también gracias a su mayor susceptibilidad a la muerte celular por daño oxidativo<sup>145</sup>.



**Figura 4. Progresión de las EHNA.** La sobrecarga de lípidos en los hepatocitos induce lipotoxicidad y libera señales de daño celular (DAMPs) que activan a las células de Kupffer (KC) y a las células estrelladas hepáticas (SHC), promoviendo la inflamación y la fibrosis, respectivamente. Las KC activadas producen citoquinas proinflamatorias que contribuyen al daño celular y muerte de los hepatocitos. La secreción de TGF- $\beta$  por parte de las KC también promueve la fibrosis mediante la activación de las HSC. Los productos derivados de bacterias que se filtran desde el intestino y llegan al hígado a través de la circulación portal también activan a las KC. La secreción de quimioquinas promueve el infiltrado de Mo, LT, LB, NKT y neutrófilos, que amplifican la inflamación mediante la liberación de mediadores proinflamatorios. La alteración en el tejido adiposo promueve la secreción de leptina, TNF- $\alpha$  e IL-6, que impactan directamente en el hígado y contribuyen, junto con la reducción de adiponectina, con la inflamación hepática. Imagen extraída de Arrese y col.<sup>93</sup>.

Las ERO y las citoquinas pro-fibrogénicas como TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 promueven la activación y proliferación de las HSC<sup>147</sup>. Asimismo, los PAMPs que se filtran desde el intestino como resultado de la disbiosis son reconocidos por las HSC a través de sus TLR y contribuyen con su activación<sup>148</sup>. En el contexto de las EHNA, donde los disparadores pro-fibrogénicos son persistentes, las HSC permanecen en constante activación, dando lugar a una acumulación excesiva de colágeno que altera la arquitectura hepática, reduce su elasticidad, e incrementa el riesgo de falla hepática y carcinogénesis<sup>149</sup>.

## 6. Resistina

La resistina (Res) es un polipéptido perteneciente a la familia RELM (del inglés, *resistin-like molecules*), una familia de pequeñas proteínas secretadas ricas en cisteínas y con actividad hormonal<sup>150</sup>. Fue descubierta en el año 2001 en un *screening* de genes modulados negativamente por la droga antidiabética tiazolidinediona en adipocitos murinos<sup>151</sup>. Las primeras observaciones en modelos murinos mostraron que la Res disminuía la tolerancia a la glucosa e inducía el desarrollo de resistencia a la insulina<sup>152,153</sup>, lo que dio origen a su nombre. En roedores, Res es una proteína de 11 kDa codificada por el cromosoma 8A1 y producida casi exclusivamente por los adipocitos<sup>154</sup>. La expresión de la Res murina es regulada negativamente por la insulina<sup>155,156</sup> y por citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ <sup>157</sup>, mientras que los altos niveles de glucosa inducen su expresión<sup>155</sup>. Su secreción está influenciada por la dieta y por el contenido de grasa visceral, por lo que sus niveles plasmáticos son elevados en modelos murinos de obesidad<sup>158</sup>. Estos hallazgos llevaron a pensar que Res podría ser el nexo entre la obesidad y la resistencia a la insulina.

A pesar de que las evidencias indican una asociación entre la Res murina y la resistencia a la insulina, esta asociación no pudo ser demostrada en humanos<sup>159-161</sup>. Más aún, se encontraron grandes diferencias entre la Res humana y su contraparte murina, evidenciando las limitaciones que presenta el modelo murino en el estudio del metabolismo humano y, en particular, en el estudio de Res.



En humanos, la Res es un polipéptido de 12,5kDa codificado por el gen *RETN*, localizado en el cromosoma 19. La Res humana y murina comparten sólo un 46,7% de similitud a nivel de ADN, un 64,4% de homología de secuencia a nivel de ARN, y un 59% de identidad a nivel de aminoácidos<sup>162</sup>.

A diferencia de la Res murina, la Res humana es producida por células inmunológicas, principalmente Mo<sup>163</sup>, MF<sup>164</sup> y neutrófilos<sup>165</sup>, y en menor medida por LT<sup>163,165</sup>. La Res se ha detectado en médula ósea, bazo, ganglios linfáticos, así como en el espacio extracelular de la mayoría de los tejidos<sup>166</sup>. La expresión génica y proteica de Res humana es inducida por estímulos inflamatorios como LPS, IL-6 y TNF- $\alpha$ <sup>163,167</sup>. Esta evidencia, sumada a la pobre correspondencia entre el efecto de Res y la resistencia a la insulina, llevaron a hipotetizar que Res podría estar involucrada en eventos inflamatorios.

Actualmente se cree que el principal rol de Res es modular la respuesta inmunológica<sup>150</sup> y se la ha relacionado con diversos procesos patológicos, tales como disfunción endotelial<sup>168</sup>, enfermedad renal crónica<sup>169</sup>, arterosclerosis<sup>170</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>171</sup>, cancer<sup>172</sup>, y obesidad<sup>173</sup>. En este sentido, se ha propuesto que Res actuaría como una citoquina proinflamatoria, activando y promoviendo la secreción de citoquinas inflamatorias en MF<sup>174</sup> y neutrófilos<sup>175</sup>. En contraposición, se ha observado que Res inhibe la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por LPS en MF<sup>176</sup> y por ácido lipoteicoico en células dendríticas<sup>177</sup>. Otros estudios demuestran que Res es capaz de regular negativamente la respuesta inflamatoria en neutrófilos<sup>178,179</sup>. Estas observaciones indican que Res posee un importante rol en la regulación de la respuesta inflamatoria y que, posiblemente, dicha regulación sea dependiente del contexto. Si bien son poco conocidos los mecanismos por los cuales la Res induciría una respuesta inflamatoria o antiinflamatoria, se cree que podría actuar de ambas formas según el ambiente en el que se encuentre: favoreciendo la inflamación para controlar una infección o responder ante estímulos inflamatorios, pero también modulando la inflamación para prevenir el daño ocasionado por un proceso inflamatorio excesivo<sup>180</sup>.

## 6.1. Receptores de Resistina

Hasta hoy, varias moléculas han sido propuestas como posibles receptores de Res, ellos son TLR4<sup>181</sup>, la proteína asociada a adenilato ciclasa 1 (CAP-1, de sus siglas en inglés *adenylate cyclase-associated protein 1*)<sup>182</sup>, una isoforma de decorina<sup>183</sup>, y el receptor huérfano del tipo de receptor tirosina quinasas 1 (ROR1, de sus siglas en inglés *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1*)<sup>184</sup>. Sin embargo, ningún estudio pudo probar la existencia de un receptor específico para Res. Entre estos receptores propuestos, TLR4 y CAP-1 son los más estudiados *in vivo* y los únicos estudiados en células humanas, convirtiéndolos en los más aceptados actualmente.

CAP-1 fue descubierto como un componente del complejo asociado a la enzima adenilato ciclasa en *Saccharomyces cerevisiae*<sup>185</sup>, involucrado en la vía Ras-AMPC y en la regulación de la dinámica de actina. Estudios posteriores demostraron que los homólogos de CAP se encuentran estructural y funcionalmente conservados en todos los organismos procariontes y eucariotes<sup>186</sup>.

CAP-1 es una proteína de unión a actina que juega un importante rol en la organización del citoesqueleto. Se une a los monómeros de actina por su dominio central y C-terminal inhibiendo la polimerización espontánea, mientras que por su dominio N-terminal se une a cofilina, una proteína de unión a actina involucrada en la despolimerización de los filamentos de actina<sup>187</sup>. CAP-1 actúa acelerando la remodelación de los filamentos de actina mediante el intercambio de la actina monomérica con cofilina<sup>188</sup>. Por lo tanto, es de esperar que CAP-1 tenga un papel esencial en mecanismos dependientes de la dinámica de actina. Se ha demostrado que la ausencia de CAP-1 en células de mamífero genera una acumulación de agregados de cofilina y una disminución de la tasa de despolimerización de los filamentos de actina, lo que resulta en la pérdida de la polarización del lamelopodio y la disminución de la endocitosis mediada por receptor<sup>189</sup>. Estas evidencias demuestran que el mantenimiento de la polaridad celular, esencial para la migración celular y la endocitosis, requiere de la regulación de la dinámica de la actina promovida por CAP-1.

Por algunos años se creyó que la función de CAP-1 asociada a la enzima adenilato ciclasa se había perdido en células de mamífero, quedando sólo la función sobre el citoesqueleto. Sin embargo, trabajos recientes han probado que CAP-1 se une y activa a adenilato ciclasa, modulando la concentración de AMPc<sup>182,190</sup>.

## 6.2. Resistina en las EHGNA

Si bien el papel de Res en la patogénesis de las EHGNA aún no es claro, diversos estudios demostraron que los pacientes con EHGNA presentan altos niveles plasmáticos de Res, en asociación con el grado de esteatosis<sup>191</sup>, inflamación<sup>192</sup> y severidad de la enfermedad<sup>191,193</sup>. Asimismo, los niveles plasmáticos de Res correlacionan positivamente con el grado de fibrosis en pacientes con EHGNA, siendo mayores en pacientes con fibrosis avanzada<sup>194,195</sup>.

Estudios en hígado evidenciaron una elevada expresión de Res en pacientes con EHGNA<sup>191,196,197</sup>. Shen y col. demostraron que la expresión proteica de Res en hígado correlaciona con el grado de inflamación lobular, de balonamiento de los hepatocitos, y de fibrosis<sup>191</sup>. Por otra parte, se demostró la presencia de acúmulos de Res en áreas fibróticas, sugiriendo que la matriz extracelular actuaría como reservorio de Res en el parénquima hepático<sup>197</sup>.

Estos hallazgos llevaron a hipotetizar que Res juega un papel en la patogénesis de las EHGNA. Teniendo en cuenta que Res es secretada por células inmunológicas en respuesta a estímulos inflamatorios, resulta lógico que los niveles de Res aumenten a medida que las EHGNA progresan. Sin embargo, el mecanismo por el cual Res podría contribuir en estas enfermedades es desconocido. Si bien se asocia a Res con una respuesta inflamatoria, la evidencia más reciente indica que la acción de Res es dependiente del contexto, motivo por el cual es indispensable estudiar el rol de Res en cada contexto patológico.

La asociación de Res con las EHGNA se basa principalmente en las concentraciones plasmáticas y hepáticas anómalas observadas, pero su acción sobre las células inmunológicas que derivan de pacientes con EHGNA es desconocida. La Res actúa de manera endócrina, y también localmente de forma parácrina y autócrina sobre las células

inmunológicas. Debido a que los MF y neutrófilos son los principales productores de Res, estas células fueron el foco de la mayor parte de los estudios destinados a evaluar los efectos de Res sobre células inmunológicas, siendo escasa la información acerca del efecto que ejerce Res sobre los LT.

# Hipótesis y Objetivos

En función de la evidencia existente, hipotetizamos que Res ejerce una acción moduladora sobre la funcionalidad de células inmunológicas mononucleares periféricas y hepáticas, la cual se encuentra alterada en el contexto de las EHGNA y contribuye con el estado inflamatorio.

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto regulatorio de Res sobre características funcionales y la homeostasis redox de células inmunológicas mononucleares periféricas y hepáticas de individuos control y de pacientes con EHGNA, haciendo hincapié en los posibles efectos regulatorios diferenciales en función del contexto del cual estas células provengan.

Como objetivos específicos nos propusimos:

**1. *Evaluar el papel de Res en la regulación funcional de células inmunológicas mononucleares***

- Estudiar la expresión del receptor de Res, CAP-1, en las distintas poblaciones de células mononucleares periféricas y hepáticas y su relación con diversos parámetros de relevancia clínica.
- Estudiar la expresión génica de Res en LT y su regulación por la Res proteica.
- Evaluar la capacidad de Res de modular la activación, proliferación y migración en LT.
- Evaluar la capacidad de Res de modular la activación, la producción de citoquinas y la endocitosis en Mo.
- Evaluar la capacidad de Res de modular la activación de LT y MF hepáticos, y compararla con su capacidad moduladora en el contexto periférico.

**2. *Evaluar el papel de Res en la regulación de la homeostasis redox de células inmunológicas mononucleares***

- Estudiar el estado redox de Mo y LT de pacientes con EHGNA a través del estudio del contenido de oxidantes y de GSH, y de la actividad de enzimas antioxidantes.
- Evaluar la capacidad de Res de modular el contenido de oxidantes y el estallido respiratorio inducido por PMA y ácidos grasos en Mo y LT.
- Evaluar la capacidad de Res de modular las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas en células mononucleares de sangre periférica.
- Evaluar la capacidad de Res de modular el contenido de oxidantes en LT y MF hepáticos, y compararla con su capacidad moduladora en el contexto periférico.

# Metodología



## 1. Pacientes con EHGNA e individuos control

Se incluyeron 94 pacientes adultos con EHGNA provenientes de los Servicios de Hepatología del Hospital Británico de Buenos Aires, del Hospital General de Agudos “José María Ramos Mejía”, del Sanatorio Municipal “Dr. Julio Méndez”, y del Hospital Universitario “Fundación Favaloro”. Se obtuvieron muestras de sangre entera y, adicionalmente, se incluyeron biopsias hepáticas concomitantes con las muestras de sangre de 42 pacientes provenientes de los primeros dos centros de salud.

La inclusión de pacientes se basó en el diagnóstico clínico de EHGNA sumado a la presencia de hiperecogenicidad hepática por imagen ecográfica. Como criterios de inclusión para este estudio, los pacientes debían presentar un IMC mayor o equivalente a 25 kg/m<sup>2</sup> e ingesta diaria de alcohol menor a 20 g. Se descartaron causas primarias no metabólicas de obesidad y sobrepeso tales como enfermedades endocrinológicas, lesiones hipotalámicas y síndromes genéticos, así como otras causas de daño hepático como hepatitis autoinmune, hepatitis B o C, daño hepático por tratamiento con corticoides u otras drogas hepatotóxicas, enfermedad de Wilson, déficit de  $\alpha$ -1 anti-tripsina, enfermedad por depósito de lípidos, alteración de la oxidación de los ácidos grasos o enfermedad celíaca. La ausencia de síndrome metabólico no fue excluyente para la inclusión de pacientes que cumplían los criterios anteriormente mencionados.

El síndrome metabólico fue definido por la presencia de tres o más de los siguientes factores: circunferencia de cintura mayor a 94 cm en el hombre u 80 cm en la mujer, niveles séricos de triglicéridos mayores a 150 mg/dl o en tratamiento, colesterol HDL sérico menor a 40 mg/dl en hombres o 50 mg/dl en mujeres o en tratamiento, presencia de hipertensión arterial (sistólica mayor a 130 mmHg o diastólica mayor a 85 mmHg) o en tratamiento, y glucemia en ayunas mayor a 100 mg/dl o en tratamiento farmacológico para diabetes, hiperglucemia o insulinoresistencia.

La biopsia hepática fue en todos los casos indicada en pacientes con sospecha de esteatohepatitis y/o fibrosis por la suma de factores de riesgo (edad, síndrome metabólico, índices de fibrosis persistentemente elevados), o en pacientes con diagnóstico clínico de esteatosis que debieron ser sometidos a cirugía abdominal.

La evaluación histopatológica fue realizada en cortes fijados y teñidos con Hematoxilina y Eosina y su clasificación se llevó a cabo utilizando el NAS (del inglés *NAFLD activity score*)<sup>198</sup>, un sistema de clasificación basado en criterios histopatológicos internacionalmente aceptados. El NAS indica el grado de actividad histológica y consiste en una escala de 9 puntos (0-8) que resulta de la suma de tres factores: esteatosis, inflamación lobular y balonamiento hepatocelular. El grado de esteatosis fue determinado según el porcentaje de hepatocitos afectados (0: menos del 5%; 1: 5-33%; 2: 33-66%; y 3: más del 66%). La inflamación lobular se determinó según la cantidad de focos inflamatorios en el campo de análisis (0: ausencia; 1: 1 foco; 2: 2-4 focos; 3: más de 4 focos). El grado de balonamiento hepatocelular fue determinado según la cantidad relativa de hepatocitos afectados en el campo de análisis (0: ninguno; 1: escasos; 2: abundantes). Aquellos pacientes que presentaron las tres características histológicas o cuyo valor de NAS fue mayor o igual a 5 fueron considerados como EHNA. La detección de fibras colágenas en cortes de tejido hepático se llevó a cabo mediante la tinción Tricrómico de Masson. El grado de fibrosis se evaluó según el algoritmo Metavir<sup>199</sup>, que consta de una escala de 5 puntos según la localización de los depósitos de colágeno (F0: ausencia; F1: fibrosis perisinusoidal o periportal; F2: fibrosis perisinusoidal y portal/periportal; F3: fibrosis en puente (conexiones entre espacios portales y/o centrilobulares); F4: cirrosis). Pacientes con cirrosis fueron excluidos del estudio.

Para predecir el grado de fibrosis hepática presente en los pacientes, se utilizaron los siguientes tres índices:

- BARD: es una escala de 5 puntos (0-4) que se basa en la relación AST/ALT, el IMC y la presencia de diabetes. Una relación AST/ALT mayor o igual a 0,8 otorga 2 puntos, un IMC mayor o igual a 28 kg/m<sup>2</sup> otorga 1 punto y la presencia de diabetes otorga 1 punto. Valores de BARD de cero o 1 poseen un alto valor predictivo negativo para fibrosis avanzada<sup>200</sup>.
- FIB-4: es una escala basada en la edad, los niveles de AST y ALT, y el recuento de plaquetas (Plq), según la siguiente fórmula:

$$FIB4 = \frac{Edad \times AST}{Plq \times \sqrt{ALT}}$$

Valores de FIB-4 menores a 1,45 poseen un valor predictivo negativo del 90% para fibrosis avanzada, mientras que valores de FIB-4 mayores a 3,45 poseen un valor predictivo positivo del 65% para fibrosis avanzada, y una especificidad del 97%<sup>201</sup>.

- NFS (del inglés *NAFLD Fibrosis Score*): es una escala basada en la edad, el IMC, la relación AST/ALT, la presencia de diabetes o alteración de niveles glucosa en ayunas (DBT), el recuento de plaquetas (Plq), y los niveles de albúmina (Alb), según la siguiente fórmula:

$$NFS = -1,675 + 0,037xEdad + 0,094xIMC + 1,13xDBT + 0,99x\left(\frac{AST}{ALT}\right) - 0,013xPlq - 0,66xAlb$$

donde la presencia de diabetes (nivel de glucosa en ayunas mayor o igual a 126 mg/dL) o alteración de niveles glucosa en ayunas (100-125 mg/dL) equivale a 1, mientras que su ausencia equivale a cero.

Valores de NFS menores a -1,455 excluye fibrosis avanzada (comprende F0-F2), mientras que valores mayores a 0,675 predice fibrosis avanzada (F3-F4). Aquellos valores comprendidos entre -1,455 y 0,675 son considerados indeterminados<sup>202</sup>.

El grupo control incluyó muestras de sangre de 120 individuos provistas por el Servicio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas “José de San Martín” y 13 muestras de tejido hepático control provenientes del Servicio de Hepatología del Hospital Universitario “Fundación Favalaro”. En el grupo control fueron incluidos individuos metabólicamente sanos, con IMC menor a 25 kg/m<sup>2</sup>, ingesta de alcohol menor a 20 g diarios, y ausencia de consumo de medicamentos en un período de tres meses anterior a la extracción de la muestra. Las muestras hepáticas control fueron obtenidas de donantes cadavéricos o de individuos sometidos a cirugía por padecer tumor hepático, en cuyo caso las muestras se tomaron del parénquima normal, a una distancia de al menos 3 cm del sitio lesionado.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de los respectivos centros de salud siguiendo los estándares internacionales para la aplicación de la Declaración de Helsinki. Todos los individuos incluidos en el estudio fueron informados acerca de las características generales del protocolo y firmaron el consentimiento informado.

### 1.1. Características del grupo de pacientes con EHGNA reclutado

El grupo de pacientes con EHGNA incluyó 57 mujeres y 37 hombres. La tabla 1 reúne las características antropométricas y bioquímicas relevantes de los pacientes reclutados. El 77% de los pacientes incluidos en el estudio presentó obesidad, mientras que el 23% restante poseía sobrepeso. Todos los pacientes exhibieron valores de circunferencia de cintura mayores a los valores de referencia. En relación a los parámetros metabólicos, el 74% de los pacientes reclutados presentó síndrome metabólico. El perfil lipídico se encontró alterado en el 53% de los pacientes, con niveles séricos de triglicéridos y colesterol total elevados en el 48% y 46% de los casos, respectivamente. Asimismo, el 59% de los pacientes presentó hiperglucemia o diabetes. Se observaron alteraciones en los niveles séricos de las enzimas hepáticas en el 68% de los pacientes estudiados.

**Tabla 1. Características antropométricas y bioquímicas de los pacientes con EHGNA.**

Edad (años)	55,0 (45,0 - 63,0)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	32,9 (30,2 - 35,6)
Circunferencia de cintura (cm)	100,0 (94,5 - 105,5) (mujeres)
	110,0 (102,0 - 120,0) (hombres)
Triglicéridos (mg/dL)	147,0 (104,5 - 185,8)
Colesterol Total (mg/dL)	196,0 (168,0 - 222,0)
Glucosa (mg/dL)	102,0 (93,0 - 116,0)
Insulina (μU/mL)	16,2 (10,4 - 22,0)
HOMA	4,0 (2,6 - 5,7)
AST (IU/L)	30,0 (21,0 - 44,0)
ALT (IU/L)	43,0 (25,5 - 62,5)
Relación AST/ALT	0,8 (0,63 - 0,98)

Se presenta la mediana y los rangos intercuartiles (n= 94). Los valores de referencia son los siguientes: IMC: 25-29,9 Kg/m<sup>2</sup> (sobrepeso), ≥30 Kg/m<sup>2</sup> (obesidad); circunferencia de cintura: <84 cm (mujeres) y <94 cm (hombres); triglicéridos: <150 mg/dL; colesterol total: 150-199 mg/dl; glucosa: <100 mg/dL; insulina: 2-20 μU/mL; HOMA: <2,5; AST: <48 IU/L; ALT: <32 IU/L. Relación AST/ALT: <0,8. IMC: índice de masa corporal; HOMA: *Homeostasis Model Assessment*; AST: aspartato aminotransferasas; ALT: alanina aminotransferasa.

El grupo de pacientes con indicación de biopsia hepática incluyó 18 pacientes con esteatosis simple y 24 pacientes con EHNA. La tabla 2 reúne las características histológicas de los pacientes sometidos a biopsia hepática. El 74% de los pacientes biopsiados presentó fibrosis hepática, de los cuales el 81% exhibió fibrosis leve o moderada, mientras que el 19% restante presentó fibrosis severa.

La tabla 3 muestra los índices predictivos de fibrosis de los pacientes reclutados sin indicación de biopsia hepática. Lamentablemente, en algunos casos no contamos con los datos bioquímicos necesarios para calcular los índices de fibrosis.

**Tabla 2. Características histológicas de los pacientes con EHGNA sometidos a biopsia hepática.**

Parámetro histológico	Puntaje	n
NAS	0	0
	1	3
	2	14
	3	10
	4	6
	5	7
	6	2
	7	0
	8	0
Esteatosis	0	0
	1	29
	2	6
	3	7
Balonamiento	0	4
	1	35
	2	3
Inflamación	0	17
	1	21
	2	4
	3	0
Fibrosis	F0	10
	F1	22
	F2	4
	F3	6
	F4	0

Se presenta el número de pacientes con EHGNA (n) que reunieron cada una de las características histológicas observadas en la biopsia hepática (n= 42).

**Tabla 3. Índices predictivos de fibrosis de los pacientes con EHGNA.**

Índices predictivos de fibrosis	Categoría	n
BARD	0	1
	1	10
	2	3
	3	6
	4	3
FIB4	< 1,45	21
	1,45 - 3,25	8
	> 3,25	0
NFS	< -1,455	0
	-1,455 - 0,675	5
	> 0,675	13

Se presenta el número de pacientes con EHGNA (n) sin indicación de biopsia hepática incluidos en cada categoría para cada índice predictivo de fibrosis (n= 29).

## 2. Reactivos

El Ficoll-Hypaque fue adquirido en GE Healthcare Life Sciences (Chicago, Estados Unidos). El medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, L-glutamina, gentamicina, albúmina sérica bovina (BSA), forbol 12-miristato 14-acetato (PMA), ionomicina, lipopolisacárido bacteriano de *Escherichia Coli* (LPS), ácidos grasos (palmítico, oleico y linoleico), metil-isobutilxantina (IBMX), AMPc, 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), monoclorobimano (MCB), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merk KGaA, St. Louis, USA). El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Natocor (Córdoba, Argentina). El compuesto radiactivo [<sup>3</sup>H]AMPc fue adquirido en Perkin Elmer, Life Sciences (Boston, Estados Unidos). Los insertos *transwells* fueron obtenidos en Corning (Nueva York, Estados Unidos).

Los kits *BD Imag Human T Lymphocyte Enrichment Set*, *anexin V-FITC apoptosis kit* y el kit para inmunomarcación citoplasmática *Fixation/Permeabilization Solution* fueron obtenidos de BD Biosciences (New Jersey, Estados Unidos). De esta empresa también se adquirió el anticuerpo monoclonal anti-CD3 purificado para cultivo celular (clon UCHT1), y los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (FITC), anti-CD14 (PE), anti-TNF $\alpha$  (PE-Cy7).

La resistina recombinante humana (Res), el ligando de quimioquina C-C (CCL) 5 recombinante humana, brefeldina A, el anticuerpo monoclonal anti-CD28 purificado para cultivo celular (clon CD28.2), y los anticuerpos monoclonales anti-CD69 (PE), anti-CD25 (PE), anti-CD4 (PerCP y APC), anti-CD8 (Pacific Blue), anti-CD56 (Brilliant Violet 421), anti-CD14 (FITC), anti-CD11b (APC y PerCp-Cy5.5), anti-ki-67 (PE) fueron adquiridos de Biolegend (California, Estados Unidos). El anticuerpo monoclonal anti-CAP1, su control de isotipo, y el anticuerpo secundario anti-conejo (Alexa Fluor 647) fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales anti-CD8 (APC), anti-IL-6 (PE), anti-CD3 (PE) fueron adquiridos en Immunotools (Friesoythe, Alemania). El kit para inmunomarcaciones intranucleares *FOXP3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent* y los marcadores de viabilidad (eFluor 780 y eFluor 650) fueron obtenidos de eBiosciences (California, Estados Unidos). Las partículas de látex para endocitosis se adquirieron en Life Technologies (California, Estados Unidos).

El Trizol y las enzimas transcriptasa reversa MMLV SuperScript II y RNAsa OUT fueron provistos por Invitrogen (California, Estados Unidos). El kit para PCR cuantitativa *FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)* y el *cocktail* de inhibidores de proteasas fueron adquiridos en Roche (Basilea, Suiza).

### 3. Procesamiento de las muestras

#### 3.1. Obtención de sangre y biopsias hepáticas

Se obtuvieron muestras de 15 ml de sangre entera en presencia de heparina como agente anticoagulante. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento dentro de las 24 h desde su obtención.

Las biopsias fueron obtenidas por punción intrahepática percutánea o transyugular e incluidas en solución fisiológica para su inmediato procesamiento.

### 3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Las CMSP fueron aisladas mediante una centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque durante 20 min a 2000 rpm, a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con solución fisiológica, las CMSP obtenidas fueron suspendidas en medio de cultivo RPMI 1640, buffer Imag, buffer de lisis en presencia de inhibidores de proteasas, o buffer fosfato salino (PBS: cloruro de Sodio (NaCl) 137 mM, Cloruro de potasio (KCl) 2,7 mM, fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 10 mM, y fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2 mM, pH 7,4) según su aplicación posterior.

### 3.3. Purificación de linfocitos T

La purificación de LT se llevó a cabo por selección negativa utilizando el kit *BD Imag Human T Lymphocyte Enrichment Set*. Las CMSP se resuspendieron en buffer Imag (PBS suplementado con BSA 0,5%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM, y azida sódica 0,1%) a concentración de  $10 \times 10^6$  CMSP/ml y se incubó con el *cocktail* comercial de anticuerpos biotinilados (anti-CD11b, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD41a, anti-CD56, anti-CD235a) durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, las CMSP se lavaron con buffer Imag y se resuspendieron en una solución conteniendo partículas magnéticas conjugadas a estreptavidina. Finalizada la incubación de 30 min a temperatura ambiente, las células se llevaron a una concentración de  $20 \times 10^6$  CMSP/ml con buffer Imag y se incubaron 6-8 min en el magneto. Pasado este tiempo, se recuperó la fracción negativa y la fracción positiva se resuspendió nuevamente en buffer Imag para ser incubada nuevamente en el magneto. Se realizaron tres pasajes por el magneto. Para verificar la pureza de los LT, las células se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 y se evaluó el porcentaje de LT por citometría de flujo. Se obtuvo una pureza del 96%. Los LT purificados se resuspendieron en RPMI 1640 para su cultivo o se resuspendieron en Trizol y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$ .



### 3.4. Obtención de suspensiones celulares hepáticas

Las biopsias hepáticas fueron disgregadas mecánicamente mediante reiterados pasajes a través de aguja y jeringa. La suspensión celular obtenida fue resuspendida en RPMI 1640 para su cultivo o sometida a inmunomarcación para su evaluación por citometría de flujo.

## 4. Cultivos celulares

El RPMI 1640 fue reconstituido en agua destilada con 2 g/L de carbonato de sodio y se esterilizó por filtración (poro de 22  $\mu\text{m}$  de diámetro). Una vez estéril, se suplementó con SFB 10%, L-glutamina 2 mM, y 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina.

Los cultivos celulares se realizaron en medio RPMI 1640 suplementado, a 37°C, y en una atmósfera conteniendo 5% de dióxido de carbono, salvo que se indique de otra manera.

### 4.1. Cultivos celulares para determinaciones en LT

#### 4.1.1. Modulación de la expresión génica de Res

Se cultivaron  $1 \times 10^6$  de LT purificados en RPMI a concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 19 h. Pasado dicho tiempo, se lavaron las células, se resuspendieron en Trizol y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

#### 4.1.2. Modulación de la expresión proteica de CAP-1 por Res

Para estudiar si Res modula la expresión de su receptor, se cultivaron  $5 \times 10^5$  CMSP en RPMI ( $1 \times 10^6$  células/ml) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. Transcurrido el tiempo de cultivo, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en PBS para su inmunomarcación.

#### 4.1.3. Modulación de los niveles de AMPc total por Res

Para evaluar si Res induce la producción de AMPc, se cultivaron LT purificados en una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en RPMI 1640 sin rojo fenol y sin suplementar. Se realizó una pre-incubación por 3-5 min a  $37^\circ\text{C}$  con el inhibidor de fosfodiesterasas IBMX (1 mM), luego de la cual las células fueron tratadas con Res (20 ng/ml) durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . La reacción fue detenida por el agregado de 1 ml de etanol absoluto y las muestras fueron almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento. Se utilizó isoproterenol (1  $\mu\text{M}$ ) como control positivo de la producción de AMPc.

#### 4.1.4. Modulación de marcadores de activación por Res

Se sembraron  $5 \times 10^5$  de CMSP o LT purificados suspendidos en RPMI ( $1 \times 10^6$  células/ml) y se activaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) adherido previamente a una placa de 24 pocillos, en presencia o ausencia de Res (10-500 ng/ml) durante 24 h o 72 h. Como control negativo se cultivaron las células únicamente en medio de cultivo.

Se cuantificó la frecuencia de células que expresan el marcador de activación y su nivel de expresión en la población celular blanco, dada esta última por la intensidad media de fluorescencia (IMF). En este caso, para poder comparar la magnitud de la activación en presencia o ausencia de Res, se calculó el índice de activación según:

$$\text{Índice de activación} = \frac{\text{Relación IMF en LT activados} \pm \text{Res}}{\text{Relación IMF en control negativo}}$$

donde la relación IMF corresponde al cociente entre el IMF obtenido para la población positiva y el IMF de la población negativa para el marcador de activación.

Para estudiar la activación de LT hepáticos, se sembraron 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular hepática resuspendida en RPMI. Los LT se activaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) adherido previamente a una placa de 48 pocillos, en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 24 h. Transcurrido el tiempo de cultivo, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en PBS para su inmunomarcación.

#### 4.1.5. Modulación de la proliferación y la muerte celular por Res

Se activaron  $2 \times 10^5$  LT purificados ( $1 \times 10^6$  células/ml en RPMI) con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), adherido previamente a una placa de 48 pocillos, y anti-CD28 soluble (1  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. Transcurrido el tiempo de cultivo, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en PBS para su inmunomarcación.

#### 4.1.6. Migración celular

Se activaron  $1 \times 10^6$  LT purificados con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) adherido a la placa y anti-CD28 soluble (1  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 5 días. Al finalizar el periodo de activación, se realizó el ensayo de migración. Para ello se utilizaron cámaras de Boyden, con insertos cuya membrana de policarbonato poseía un grosor de 10  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$ . En las cámaras inferiores se sembraron 0,6 ml de RPMI suplementado con BSA 0,5% en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) o de la quimioquina CCL5 (100 ng/ml). En la cámara superior se sembraron  $1 \times 10^5$  LT activados en RPMI suplementado con BSA 0,5% en una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. La migración se llevó a cabo durante 3 h a 37°C. El recuento de las células que migraron a través de la membrana y se encontraban en la cámara inferior se realizó por citometría de flujo.

### 4.2. Cultivos celulares para determinaciones en Mo

#### 4.2.1. Modulación de la expresión proteica de CAP-1 por Res

Al igual que para la determinación en LT, se cultivaron  $5 \times 10^5$  CMSP en RPMI ( $1 \times 10^6$  células/ml) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. Transcurrido el tiempo de cultivo, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en PBS para su inmunomarcación.

#### 4.2.2. Modulación del marcador temprano de activación CD69 por Res

Se sembraron  $5 \times 10^5$  CMSP ( $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI) o 200  $\mu$ l de la suspensión de células hepáticas en RPMI y se activaron con PMA (10 ng/ml) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 24 h. Transcurrido el tiempo del cultivo, las células fueron despegadas de la placa de cultivo con una solución fría de PBS suplementada con EDTA 0,02%, centrifugadas, y suspendidas en PBS para su inmunomarcación.

Se cuantificaron la frecuencia de células que expresan el marcador de activación y su expresión. El índice de activación se calculó de igual forma a la descrita para LT.

#### 4.2.3. Modulación de la producción de citoquinas por Res

Se indujo la producción de citoquinas en CMSP ( $1 \times 10^6$  células/ml) con LPS (20 ng/ml) en presencia o ausencia de Res (10-50 ng/ml) durante 16 h. La producción de citoquinas también fue inducida utilizando PMA (50 ng/ml) e ionomicina (1  $\mu$ g/ml). Para lograr la detección intracelular de citoquinas, los cultivos se realizaron en presencia de Brefeldina A (5  $\mu$ g/ml) como inhibidor del tráfico proteico intracelular. Finalizado el tiempo del cultivo, las células fueron despegadas de la placa de cultivo con una solución fría de PBS suplementada con EDTA 0,02%, centrifugadas, y suspendidas en PBS para su inmunomarcación.

#### 4.2.4. Modulación de la endocitosis por Res

Se sembraron  $5 \times 10^5$  CMSP en RPMI sin suplementar en una placa de cultivo de 24 pocillos y se favoreció su adhesión durante 30 min a 37°C. Una vez adheridas a la placa, se cambió dicho medio por RPMI suplementado y se adicionaron las partículas de látex fluorescentes (Ex: 580; Em: 605) de 100 nm de diámetro a una concentración de 40  $\mu$ g/ml. La endocitosis se llevó a cabo en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 1 h a 37°C. El ensayo de endocitosis también se realizó en presencia de LPS (20 ng/ml) con o sin Res (20 ng/ml). Al finalizar el ensayo, las células fueron despegadas de la placa de cultivo con una

solución fría de PBS suplementada con EDTA 0,02% y marcadas para su detección por citometría de flujo.

Se cuantificaron el porcentaje de endocitosis, dado por el porcentaje de Mo positivos para las partículas de látex, y el índice de endocitosis, dado por la relación de IMF entre las subpoblaciones de Mo positiva y negativa para las partículas de látex.

#### 4.3. Cultivos celulares para el estudio de parámetros asociados a la homeostasis redox en Mo y LT

##### 4.3.1. Modulación del contenido de oxidantes y de GSH por Res

Para evaluar el efecto de Res sobre el contenido de oxidantes y de GSH, se cultivaron CMSP ( $1 \times 10^6$  células/ml) en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. Transcurrido el tiempo de cultivo, se lavaron las células y se resuspendieron en PBS para su marcación.

##### 4.3.2. Modulación del estallido respiratorio por Res

Se indujo el estallido respiratorio con PMA (100 ng/ml), ácido palmítico (AP, 200  $\mu$ M), ácido oleico (AO, 200  $\mu$ M) o ácido linoleico (AL, 100  $\mu$ M) en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 30 min (AL) o 60 min (PMA, AP, AO). El contenido de oxidantes en ausencia de estímulo se utilizó como control negativo para relativizar el contenido de oxidantes obtenido en los distintos tratamientos.

##### 4.3.3. Modulación de la actividad de enzimas antioxidantes por Res

Se cultivaron  $5 \times 10^6$  CMSP ( $1 \times 10^6$  células/ml) en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. Al finalizar el tiempo de cultivo, las células se resuspendieron en buffer de lisis celular (Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Tritón X-100 0,5%) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1  $\mu$ g/ml, leupeptina 2  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM), se sonicaron durante 10 min en baño frío, y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min a

4°C. El sobrenadante resultante conteniendo las proteínas se almacenó a -70°C hasta su utilización.

5. Extracción de ARN, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total fue extraído a partir de muestras congeladas de LT purificados en Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN copia (ADNc) se obtuvo por la transcripción reversa del ARN extraído, utilizando OligodT como *primers* (25 µg/ml) y la transcriptasa reversa MMLV SuperScript II, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la qPCR se utilizó la *mix* FastStart Universal SYBR Green Master (ROX). Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 300 nM), Res (500 nM) y CAP-1 (300 nM) se detallan en la Tabla 4. Los *primers* fueron diseñados utilizando la herramienta *primer-blast*. El programa de amplificación utilizado consistió en un periodo inicial de 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 seg a 95°C seguido por 30 seg a 63°C; y un periodo final de 1 min a 72°C. La curva de disociación se obtuvo de la siguiente forma: 15 seg a 95°C; 1 min barriendo de 60°C a 95°C, y 15 seg a 95°C. La amplificación se llevó a cabo en el equipo de PCR en tiempo real OneStep (Applied Biosystems). Se realizaron duplicados de cada medición y se utilizó el promedio del ciclo umbral (Ct, del inglés *Cycle Threshold*) para los cálculos de expresión génica. Se utilizó GAPDH como gen de referencia y la expresión relativa de los genes de interés se obtuvo mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  203.

**Tabla 4. Secuencias de los *primers* utilizados para amplificación de los genes estudiados.**

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
GAPDH	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	TTACTCCTTGGAGGCCATGT
Res	GGATGAAAGCTCTCTGTCTCCT	AGGCCAATGCTGCTTATTGC
CAP-1	TCAGGGGGAGAGCATTACAC	GAGAATGGTTTGGGGCCACT

## 6. Ensayo de unión a la proteína quinasa A (PKA) para el dosaje de AMPc

El contenido de AMPc fue determinado mediante un ensayo de competencia del [<sup>3</sup>H]AMPc por la unión a PKA, utilizando una adaptación<sup>204</sup> de la técnica original de unión a proteína ligadora<sup>205</sup>.

La PKA utilizada en este ensayo se obtuvo de tejido muscular bovino. Para su obtención, se homogenizó el tejido en PBS conteniendo EDTA (5 mM) en frío. Se centrifugó a 27000 x g durante 20 min y el sobrenadante resultante se dejó sedimentar durante un día en heladera. Posteriormente, se precipitó con una solución 32,4% m/v de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se centrifugó a 16000 x g por 20 min. El precipitado obtenido se resuspendió en un volumen de PBS equivalente al 6% del volumen inicial de homogenato. Finalmente, se dializó durante dos días a 4°C en PBS y se centrifugó a 27000 x g por 20 min. El sobrenadante obtenido se utilizó como fuente de proteína ligadora para el ensayo. El rendimiento fue de aproximadamente 60 ml de una solución cuya concentración proteica fue de 30 mg/ml. La concentración óptima de proteína ligadora se determinó mediante curvas de unión máxima en función de distintas diluciones de proteína (1/10 - 1/500) en presencia de 40000 dpm de [<sup>3</sup>H]AMPc. La proteína ligadora se utilizó en una dilución capaz de unir entre el 35 y 50% del [<sup>3</sup>H]AMPc.

Como trazador se utilizó [<sup>3</sup>H]AMPc en buffer de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; BSA 0,1%; EDTA 4 mM y azida sódica 0,1%), a una concentración equivalente a 40000 dpm/tubo (3 nM). Para procesar las muestras, la fase etanólica conteniendo el AMPc se evaporó en baño termostático a 70-80°C, y el residuo seco resultante se resuspendió en buffer de incubación. El ensayo se realizó incubando el [<sup>3</sup>H]AMPc, la proteína ligadora y los estándares o muestras a analizar durante 2 h a 4°C. Luego del periodo de incubación, se separó el AMPc unido a la proteína ligadora del AMPc libre mediante precipitación con carbón-dextrán. Para ello, las muestras se incubaron con una suspensión de carbón-dextrán durante 15 min a 4°C y luego fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min a igual temperatura. Los sobrenadantes se transfirieron a viales con solución centelladora y la radioactividad se midió en un equipo de centelleo líquido de partículas beta. La unión inespecífica del trazador a la proteína ligadora se determinó utilizando una concentración

alta de AMPc (1 mM). La curva estándar se construyó con 10 estándares de masa de AMPc conocida (0,18 - 91 pmol). Las muestras de interés se diluyeron de forma tal que su concentración de AMPc se encontrara dentro del rango lineal de la curva estándar. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

## 7. Marcación para cuantificaciones por citometría de flujo

### 7.1. Inmunomarcación de superficie

Las suspensiones celulares fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos. La identificación de las distintas poblaciones celulares se realizó utilizando los siguientes anticuerpos de identificación: anti-CD3 junto con anti-CD4 y anti-CD8 para la identificación de LT *helpers* y LT citotóxicos, respectivamente; anti-CD56 para la identificación de células NK y NKT; anti-CD14 para la identificación de Mo; anti-CD14 y anti-CD11b para la identificación de MF. Para la inmunomarcación de moléculas de superficie de interés se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD69 y anti-CD25.

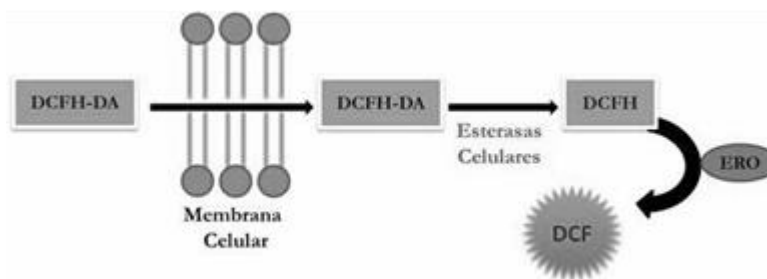
Para el estudio de muerte celular se utilizó un kit comercial para la detección de apoptosis. Luego de la marcación de superficie con los anticuerpos de identificación, las células se resuspendieron en el *buffer* de unión (*buffer* 10X: HEPES 0,1 M, pH 7,4; NaCl 1,4 M, CaCl<sub>2</sub> 25 mM) y se marcaron con yoduro de propidio y anexina V (FITC) durante 15 min a temperatura ambiente.

La viabilidad celular en las muestras hepáticas se comprobó utilizando un marcador de viabilidad que resiste el proceso de fijación luego de su marcación. Este marcador sólo puede ingresar y teñir células no viables, ya que no puede atravesar una membrana celular intacta.



## 7.2. Marcación con sondas fluorescentes

Para la detección de oxidantes se utilizó la molécula no fluorescente 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). El principio del ensayo consiste en introducir en las células una molécula capaz de ser oxidada. DCFH-DA es una molécula lipofílica y, como tal, puede cruzar la membrana celular. Dentro de la célula, las enzimas esterasas desacetilan el compuesto transformándolo en un compuesto oxidable no fluorescente, 2',7'-diclorofluorescina (DCFH), que es atrapado en el citoplasma debido a su naturaleza polar. El potencial oxidativo de los oxidantes es capaz de oxidar esta molécula, convirtiéndola en la molécula fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), cuya fluorescencia a 525 nm es detectable mediante citometría de flujo (Figura 5). La intensidad de fluorescencia observada es proporcional a la concentración de oxidantes presente en la célula. Por lo tanto, esta técnica es considerada un indicador general del contenido de oxidantes, incluyendo peróxidos de hidrógeno, radicales hidroxilo, peroxinitritos, y en menor medida aniones superóxido<sup>206</sup>.



**Figura 5. Reacción del DCFH-DA.** La 2',7'-diclorofluorescina penetra libremente en la célula, donde es clivada por las esterasas intracelulares que la convierten en una molécula polar (DCFH). Los oxidantes reaccionan con DCFH, oxidándolo y dando como resultado un compuesto fluorescente (DCF) cuya emisión en el rango del verde es detectable por citometría de flujo.

Para la detección del GSH, se utilizó la sonda no fluorescente monoclorobimano (MCB). El MCB ingresa libremente a la célula, donde se une a los tioles de bajo peso molecular formando un aducto fluorescente que puede ser detectado mediante un método fluorométrico a 490 nm. La unión a los tioles no proteicos, principalmente al GSH, tiene lugar gracias a la reacción catalizada por la enzima Glutación S-transferasa<sup>207</sup>.

Luego de la marcación con los anticuerpos de identificación, las CMSP resuspendidas en PBS ( $1 \times 10^6$  células/ml) se incubaron con la solución de DFCH-DA ( $20 \mu\text{M}$ ) o de MCB ( $80 \mu\text{M}$ ) durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . En el caso del ensayo de inducción del estallido respiratorio, la marcación con la sonda DCFH-DA se realizó previo a la estimulación debido a que la producción de oxidantes es muy rápida.

### 7.3. Inmunomarcación citoplasmática e intranuclear

La expresión de CAP-1 y la secreción de citoquinas *in vitro* fue evaluada mediante la marcación citoplasmática con anticuerpos monoclonales. Luego de la marcación de superficie, las CMSP se lavaron con PBS y fueron fijadas y permeabilizadas con la solución comercial de fijación y permeabilización *Cytofix/Cytoperm* siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se incubaron con  $250 \mu\text{l}$  de *buffer Cytofix/Cytoperm* durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . A continuación, se lavaron con el *buffer* de permeabilización *Permwash*. La tinción con los anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$  y anti-IL-6 o anti-CAP-1 (anticuerpo primario de conejo) se realizó durante 45 min a  $4^\circ\text{C}$ . Para la detección de CAP-1, se realizó una segunda incubación con el anticuerpo policlonal secundario anti-conejo durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$ .

Para la detección de la proteína intranuclear Ki-67, marcador de proliferación celular, las células fueron fijadas y permeabilizadas con la solución *FOXP3/ Transcription Factor Fixation/ Permeabilization Concentrate and Diluent* durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Luego de un lavado con PBS, las células se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 durante 30 min a temperatura ambiente.

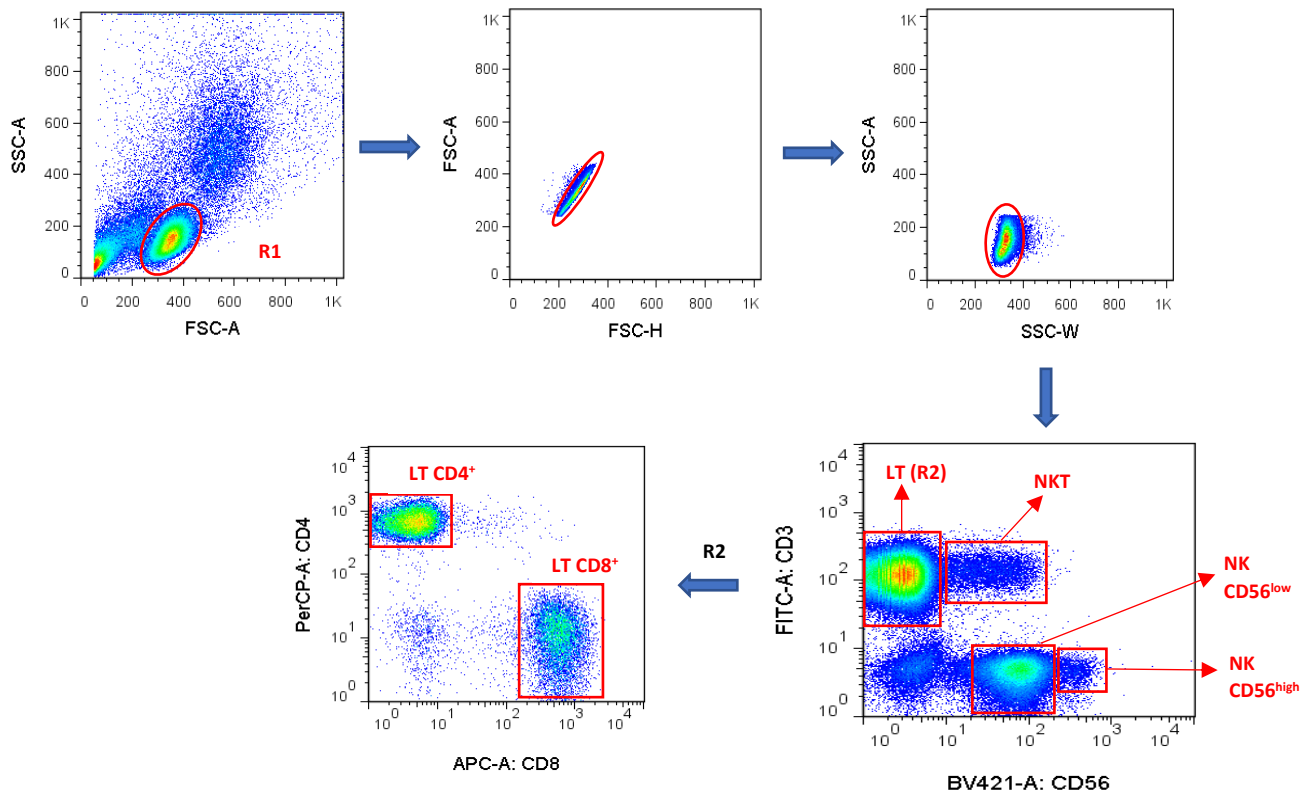
La adquisición se realizó con el citómetro de flujo FACS Aria II (BD).

### 7.4. Análisis citométrico y estrategias de *gating*

El análisis fue realizado utilizando el software FlowJo v10.

Estrategia de gating para la identificación de LT, NK y NKT de sangre periférica

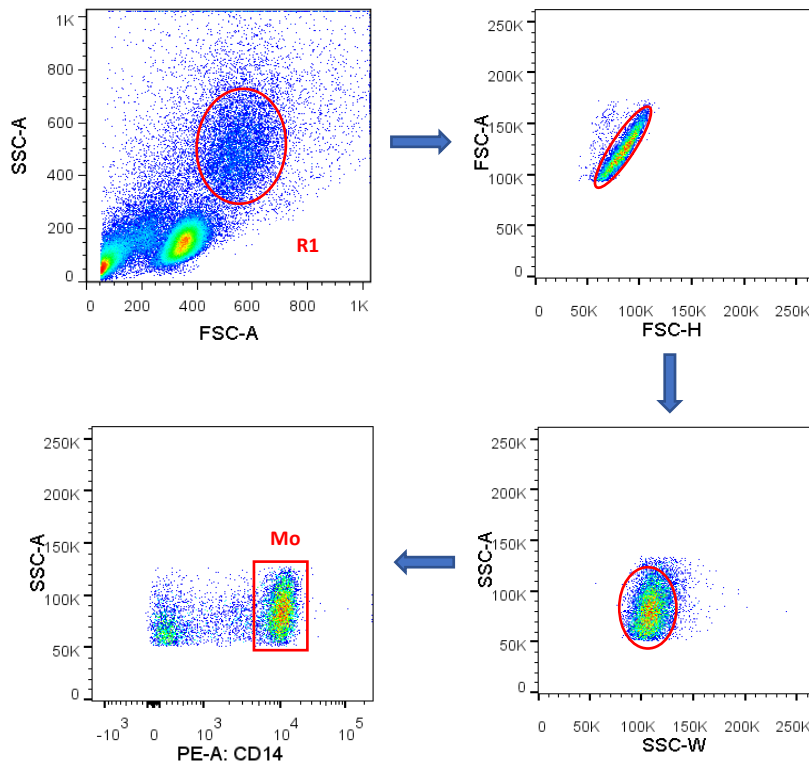
En primer lugar, se identificó la nube linfóide en el *dot plot side scatter* (SSC) vs. *forward scatter* (FSC) (región R1). Dentro de R1, se realizó una primera exclusión de los dobletes de células en el *dot plot* FSC-A vs. FSC-H, seguida por una segunda exclusión en el *dot plot* SSC-A vs. SSC-W. La identificación de LT se realizó por la expresión del marcador CD3 (región R2). Dentro de R2, se identificaron los LT *helpers* y citotóxicos por su expresión de los marcadores CD4 y CD8, respectivamente. En los ensayos realizados con LT purificados, se omitió el paso de identificación con anti-CD3 debido a la alta pureza obtenida. Las células NKT se identificaron por la coexpresión de las moléculas CD3 y CD56. Las células NK se identificaron por la expresión del marcador CD56 y la falta de expresión de CD3. Dentro de la población de células NK, se distinguieron dos subpoblaciones según la intensidad de expresión del marcador CD56, identificadas como NK<sup>CD56<sup>high</sup></sup> y NK<sup>CD56<sup>low</sup></sup> (Figura 6).



**Figura 6. Estrategia de *gating* para la identificación de poblaciones de origen linfóide en sangre periférica.** Se identificó la nube linfóide en el *dot plot* SSC vs. FSC (R1). Dentro de R1, se excluyeron los dobletes y se identificó la población de LT (R2), NKT, y NK, según la expresión de los marcadores CD3 y CD56. Dentro de R2, se identificaron las subpoblaciones LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

### Estrategia de gating para la identificación de Mo

Se identificó la nube correspondiente a los Mo en el *dot plot* SSC vs. FSC de acuerdo con sus propiedades de tamaño y complejidad (región R1). Dentro de R1, se excluyeron los dobletes de células como se explicó anteriormente, y se identificaron los Mo por la expresión del marcador CD14 (Figura 7).

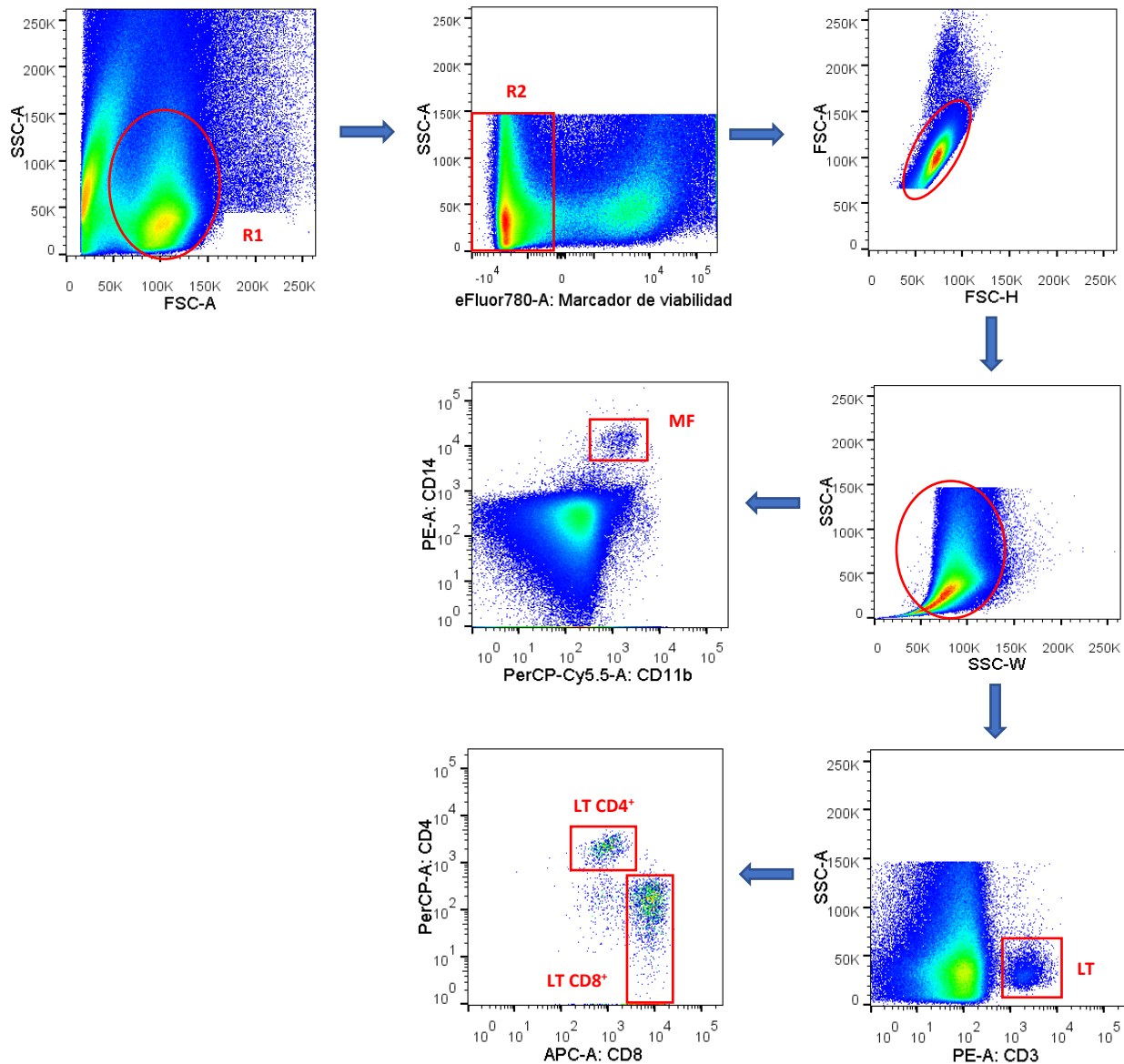


**Figura 7. Estrategia de *gating* para la identificación de monocitos en sangre periférica.** Se identificó la nube correspondiente a monocitos en el *dot plot* SSC vs. FSC (R1). Dentro de R1, se excluyeron los dobletes y se identificó la población CD14<sup>+</sup>.

### Estrategia de gating para identificación de LT y MF en suspensiones celulares hepáticas

Debido a la gran cantidad de células parenquimáticas en este tipo de muestras, se realizó una primera selección de las células no parenquimáticas en el *dot plot* SSC vs. FSC (Región R1). Dentro de R1, se seleccionaron las células viables por la ausencia de fluorescencia del marcador de viabilidad (Región R2). Dentro de R2, se excluyeron los dobletes de células como en los casos anteriores. Igual que para CMSP, los LT hepáticos se

identificaron por su expresión de CD3 y, dentro de ellos, se identificaron las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los MF fueron distinguidos en base a la coexpresión de los marcadores CD14 y CD11b (Figura 8).

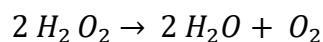


**Figura 8. Estrategia de *gating* para la identificación de poblaciones de origen linfóide y mielóide en biopsia hepática.** Se identificó la nube correspondiente a las células no parenquimáticas en el dot plot SSC vs. FSC (R1). Dentro de R1, se seleccionaron las células viables (R2) y se excluyeron los dobletes de células. Se identificó la población de LT y MF según la expresión del marcador CD3 y la coexpresión de los marcadores CD14 y CD11b, respectivamente. Dentro de la población de LT hepáticos, se identificaron las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

## 8. Determinación de la actividad enzimática antioxidante

### 8.1. Actividad CAT

La CAT cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno ( $O_2$ ) y agua ( $H_2O$ ), según:



La detección de la actividad CAT se basa en la determinación de la velocidad de descomposición del  $H_2O_2$  por la enzima presente en la muestra en estudio. Se determinó la actividad CAT siguiendo el consumo de peróxido de hidrógeno a 240 nm en un medio de reacción compuesto por  $H_2O_2$  (10 mM) y fosfato de potasio (50 mM, pH 7,0). Se calculó la constante de velocidad de pseudo-primer orden ( $k'$ ) de la disminución de la absorbancia del  $H_2O_2$  como:

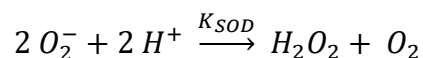
$$k' = k[CAT]$$

donde  $k = 4,6 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  para  $CAT^{208}$  y  $[CAT]$  es la concentración de enzima presente en la muestra.

La actividad CAT se expresó como pmol de CAT por mg de proteína.

### 8.2. Actividad SOD total

La enzima SOD cataliza la dismutación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) a  $H_2O_2$  y  $O_2$ , según la siguiente reacción:



donde  $k_{SOD} = \sim 2,0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ .

El método para la determinación de SOD se basa en la inhibición de la autooxidación de adrenalina en medio alcalino, dependiente del anión superóxido. En medio alcalino, la oxidación de la adrenalina posee como intermediario de reacción al anión superóxido y su producto final es el adrenocromo, el cual es coloreado y puede detectarse

espectrofotométricamente a 480 nm. La SOD presente en la muestra compete por el anión superóxido producido por el sistema de detección.

Para la determinación de la actividad SOD total, se monitoreó espectrofotométricamente la autooxidación de adrenalina, en términos de la producción de adenocromo, en un *buffer* conteniendo glicina (50 mM, pH 10) a 30°C (modificado del método original<sup>209</sup>). Se determinó el cambio de absorbancia ( $\Delta Abs$ ) a 480 nm durante 2 min en ausencia o presencia de volúmenes variables de muestra y se calculó la pendiente  $\Delta Abs/min$  para cada caso.

Se definió una unidad de SOD como la cantidad de muestra necesaria para generar una inhibición del 50% de la velocidad de formación de adenocromo. Los valores fueron expresados como unidades de SOD por mg de proteína.

### 8.3. Actividad GPx

La enzima GPx participa en la detoxificación del peróxido de hidrógeno utilizando GSH como cofactor. Durante esta reacción, el GSH es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG), el cual luego es reducido nuevamente por la enzima glutatión reductasa (GRd), que utiliza NADPH como cofactor para su reciclado.

La determinación de la actividad GPx se llevó a cabo midiendo el consumo de NADPH en la reacción de reducción del GSH por acción de la GRd agregada exógenamente. Se monitoreó espectrofotométricamente la desaparición de NADPH a 340 nm durante 1 min a 37°C en el medio de reacción (*buffer* fosfato de potasio 50 mM, pH 7,7; GSH 1 mM; NADPH 0,15 mM;  $NaN_3$  1 mM; GRd 0,25 U/ml;  $H_2O_2$  0,5 mM)<sup>210</sup>. La variación en la absorbancia registrada en ausencia de muestra corresponde a la oxidación inespecífica del NADPH (pendiente a), mientras que la variación en la absorbancia en presencia de la muestra corresponde a la suma de la oxidación específica e inespecífica (pendiente b). Por lo tanto, la oxidación específica del NADPH se calculó restando la oxidación inespecífica a la registrada en presencia de la muestra ( $b-a = \Delta Abs_{\text{específica}}/min$ ).

Una unidad de GPx se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto a 37°C. Los valores fueron expresados como unidades de GPx por mg de proteína, según la siguiente fórmula:

$$\frac{U_{GPx}}{\text{mg proteína}} = \frac{2 \times \left( 6,22 \times \left( \frac{\Delta Abs_{específica}}{\text{min}} \right) \right) \times \text{volumen de reacción (ml)}}{\text{volumen muestra (ml)} \times [\text{proteína}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

#### 8.4. Actividad GRd

La actividad GRd se determinó registrando la oxidación del NADPH a 340 nm en la solución de reacción (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; GSSG 0,5 mM; NADPH 0,15 mM). Una unidad de GRd se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto a 30°C<sup>211</sup>. Los valores se expresaron como unidades de GRd por mg de proteína.

#### 8.5. Dosaje de proteínas

El dosaje de proteínas se realizó mediante la técnica de Lowry<sup>212</sup>, utilizando BSA como estándar. El rendimiento fue de 50-70 mg de proteína/5x10<sup>6</sup> CMSP.

### 9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPadPrism© versión 6 para Windows. En todos los casos se evaluó la normalidad en la distribución de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de D'Agostino-Pearson omnibus. En los casos en los que la distribución de los datos fue normal, la comparación entre dos grupos se realizó mediante el test t de Student para muestras pareadas o no pareadas, según correspondiera. En todos los casos se verificó la homogeneidad de varianza con el test F de igualdad de varianzas, y en los casos en los que los datos no cumplieron este supuesto, se aplicó la corrección de Welch. La comparación pareada entre más de dos grupos se realizó con el



test ANOVA de un factor de medidas repetidas seguido por el test de Dunnett o Tukey de comparaciones múltiples, mientras que la comparación no pareada se realizó con el test clásico de ANOVA de un factor seguido por el test de Sidak.

Cuando los datos no cumplieron la condición de normalidad, se aplicaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon o Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos experimentales, según los datos fuesen pareados o no pareados, respectivamente. Para comparar más de dos grupos de datos pareados que no seguían una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico de Friedman seguido por el test de Dunn para comparaciones múltiples.

Los análisis de correlaciones entre los valores experimentales y los datos clínicos se realizaron mediante el test de Spearman.

En el caso de los datos pareados, cada par de datos correspondientes al mismo sujeto experimental fueron presentados unidos por una línea. En los gráficos de barras, se representa la media de los datos con su error estándar. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

# Capítulo I

---

El papel de Res en la regulación funcional de células inmunológicas mononucleares y su implicancia en las EHGNA

Como se mencionó en la Introducción, la EHNA es una condición patológica caracterizada por el infiltrado hepático de células inmunológicas mononucleares y polimorfonucleares provenientes del compartimiento periférico. A pesar de que en esta patología los niveles plasmáticos y hepáticos de Res se encuentran aumentados, poco se conoce acerca del papel que cumple Res sobre la funcionalidad y la homeostasis de las células inmunológicas mononucleares. En el presente capítulo se exhibirán resultados de la expresión del receptor de Res propuesto en diversas poblaciones de células inmunológicas, del estudio de LT como fuente de Res, y de la influencia de Res sobre diversos aspectos funcionales de células mononucleares. Asimismo, se presentará el estudio comparativo de la respuesta a Res en células mononucleares según provengan de un contexto no patológico o patológico como el de las EHGNA.

## 1. Células mononucleares de sangre periférica: Mo y LT

### 1.1. Caracterización de la expresión de CAP-1

Debido a que CAP-1 es uno de los receptores de Res propuestos más aceptados, nos propusimos evaluar su expresión en distintas poblaciones celulares. Además, según nuestro conocimiento, no se ha estudiado la expresión de este receptor en células inmunológicas de pacientes con EHGNA, por lo que se cuantificó su expresión en cada población celular de estos pacientes con el fin de descubrir posibles variaciones en su expresión.

#### 1.1.1. Expresión proteica de CAP-1 en distintas poblaciones de CMSP

Dado que la expresión de CAP-1 en CMSP de origen linfoide no es conocida, se realizó un *screening* de su expresión proteica en estas células y, a fines comparativos, también en CMSP de origen mieloide. La expresión proteica de CAP-1 fue mayor en las células de origen linfoide que en las de origen mieloide, mientras todas las poblaciones de origen linfoide presentaron una expresión de CAP-1 similar (Tabla 5).

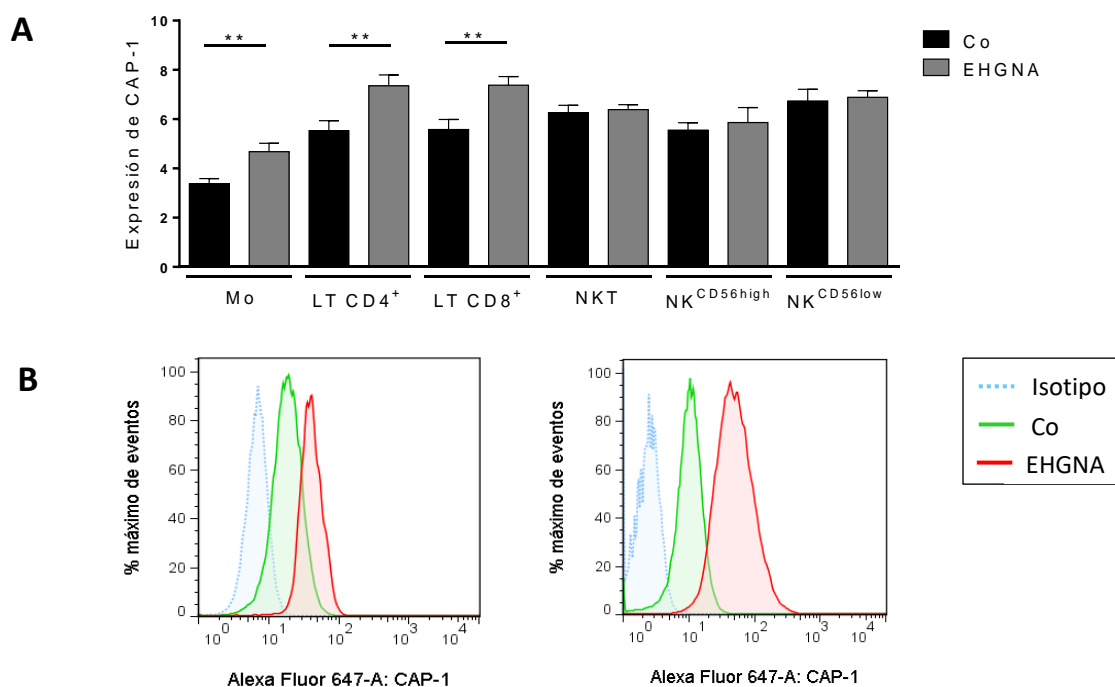
Por otro lado, los pacientes con EHGNA presentaron una expresión promedio de CAP-1 39% mayor en Mo ( $p= 0,003$ ) y 33% mayor en LT ( $CD4^+$ :  $p= 0,005$ ;  $CD8^+$ :  $p= 0,002$ ) en

comparación con las células de controles. En células NKT y NK no se observaron diferencias significativas en la expresión de CAP-1 entre ambos grupos experimentales (Figura 9 A-B).

**Tabla 5. Expresión proteica de CAP-1 en distintas poblaciones de CMSP de origen linfoide y mieloide.**

Población celular	Expresión proteica de CAP-1 (media ± SEM)	Valor p
Mo	3,37 ± 0,22	
LT	CD4 <sup>+</sup> : 5,53 ± 0,41	0,0002
	CD8 <sup>+</sup> : 5,58 ± 0,40	0,0002
NKT	6,25 ± 0,31	0,0001
	CD56 <sup>high</sup> : 6,74 ± 0,48	0,0001
NK	CD56 <sup>low</sup> : 5,55 ± 0,30	0,0005

La tabla muestra la expresión de CAP-1 en las poblaciones de origen mieloide (Mo, n= 18) y linfoide (LT: n= 18; NKT: n= 14; NK: n= 14) provenientes de controles. Los datos se presentan relativizados al control de isotipo. Se utilizó el test ANOVA de un factor seguido por el test de Sidak de comparaciones múltiples. El valor p corresponde a la comparación de cada población de origen linfoide con la población de Mo.



**Figura 9. Expresión proteica de CAP-1 en CMSP. A.** Expresión de CAP-1 en Mo (n= 18), LT (n= 18), NKT (Co: n= 14; EHGNA: n= 8) y NK (Co: n= 14; EHGNA: n= 8) de controles (Co) y de pacientes con EHGNA. Los datos se presentan relativizados al control de isotipo. La comparación se realizó mediante el test t de Student. Las barras representan la media ± SEM. **B.** Histogramas representativos de la fluorescencia emitida por el control de isotipo (celestine) y por CAP-1 en Co (verde) y EHGNA (rojo) en Mo (izquierda) y LT (derecha). \*\* p < 0,01.

Con el fin de estudiar si existía algún correlato con los parámetros antropométricos, bioquímicos e histológicos que caracterizan a las EHGNA, se empleó un método estadístico de asociación entre la expresión proteica de CAP-1 y los parámetros de mayor relevancia clínica. Tanto en Mo como en LT se observaron correlaciones positivas entre la expresión de CAP-1 y el IMC, la circunferencia de cintura, la glucemia en ayunas, el NAS y el grado de fibrosis hepática. Adicionalmente, los niveles séricos de triglicéridos correlacionaron positivamente con la expresión de CAP-1 en LT (Tabla 6).

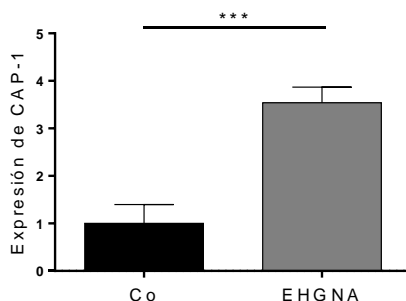
**Tabla 6. Correlaciones entre la expresión proteica de CAP-1 y parámetros antropométricos, bioquímicos e histológicos de pacientes con EHGNA.**

Parámetro clínico	Población celular					
	Mo		LT CD4 <sup>+</sup>		LT CD8 <sup>+</sup>	
	r	p	r	p	r	p
IMC	0,574	0,035	0,714	0,004	0,635	0,013
Circunferencia de cintura	0,609	0,030	0,568	0,046	0,603	0,032
Glucemia en ayunas	0,618	0,021	0,708	0,003	0,651	0,008
Colesterol total	0,257	ns	0,203	ns	0,433	ns
Triglicéridos	0,423	ns	0,653	0,007	0,717	0,002
AST	0,405	ns	0,526	ns	0,234	ns
ALT	0,386	ns	0,474	ns	0,331	ns
NAS	0,667	0,009	0,870	0,0001	0,755	0,002
Fibrosis	0,706	0,008	0,739	0,002	0,769	0,001

La tabla muestra el coeficiente de Spearman (r) y el valor p para cada correlación realizada entre los parámetros de relevancia clínica y la expresión de CAP-1 en Mo (n= 15) y LT (n= 15) de pacientes con EHGNA. Las correlaciones se llevaron a cabo mediante el test de Spearman. Valores de p < 0,05 fueron considerados significativos. ns: no significativo; IMC: índice de masa corporal; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; NAS: *NAFLD Activity Score*.

## 1.1.2. Expresión génica de CAP-1 en LT

Como se mencionó anteriormente, si bien se conoce que los Mo expresan CAP-1, su expresión en células linfoides no había sido explorada. A su vez, teniendo en cuenta que existe una expresión proteica diferencial en CMSP según provengan de pacientes con EHGNA o de controles, se hipotetizó que también habría una expresión génica diferencial. Para indagar sobre esta hipótesis, se evaluó la expresión génica de CAP-1 por RT-qPCR en LT purificados. Como se esperaba, los LT de pacientes con EHGNA presentaron una expresión de CAP-1 3,5 veces mayor que aquellos procedentes de controles ( $p= 0,0005$ ) (Figura 10).



**Figura 10. Expresión génica de CAP-1 en LT.** Expresión de CAP-1 en LT purificados a partir de sangre periférica de controles (Co,  $n= 6$ ) y de pacientes con EHGNA ( $n= 9$ ). Se muestra el incremento según el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . La comparación se realizó mediante el test t de Student. \*\*\*  $p < 0,001$ .

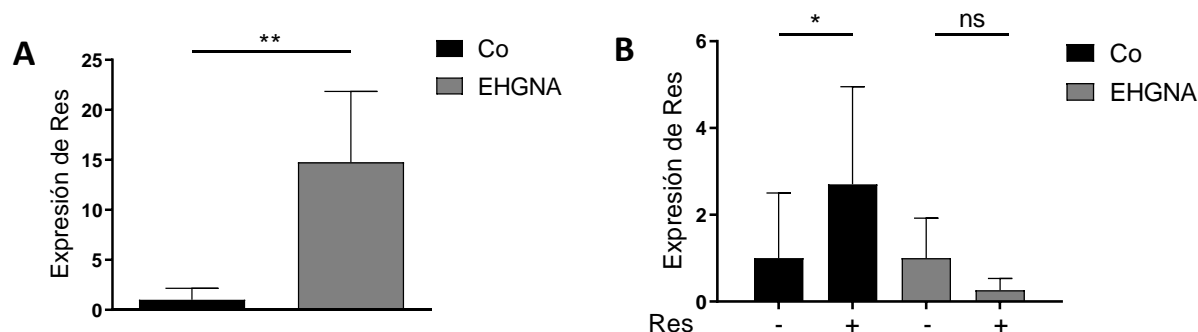
Al circular por el torrente sanguíneo, las CMSP se encuentran bajo la influencia de las variaciones bioquímicas y metabólicas que ocurren en las EHGNA, las cuales pueden afectar su respuesta. Además, debido a que se observaron diferencias en la expresión de CAP-1 entre Mo y LT de pacientes con EHGNA y controles, se infirió que la respuesta a Res en estas células podría variar según su procedencia. Para indagar sobre este interrogante, se estudió el efecto de Res sobre diversos aspectos funcionales en ambas poblaciones leucocitarias.

## 1.2. Influencia de Res sobre características funcionales de LT

### 1.2.1. Expresión génica de Res en LT y su modulación por la Res exógena

Si bien en los últimos años los niveles de Res en pacientes con EHGNA fueron ampliamente estudiados, la mayoría de los trabajos se enfocaron en el estudio de sus niveles séricos. Sólo unos pocos trabajos investigaron la expresión de Res en células inmunológicas y, entre ellos, los estudios se enfocaron principalmente en células polimorfonucleares o en el conjunto de CMSP. Por lo tanto, hay escasas evidencias de la producción de Res en LT y se desconoce su aporte en las EHGNA. Por este motivo estudiamos la expresión génica de Res en LT periféricos purificados mediante RT-qPCR. Los LT provenientes de pacientes con EHGNA presentaron una expresión de Res 15 veces mayor que los LT de controles ( $p = 0,007$ ) (Figura 11 A). Cabe destacar que la expresión génica de Res correlacionó positivamente con el NAS ( $r = 0,684$ ;  $p = 0,012$ ;  $n = 13$ ) y el grado de fibrosis ( $r = 0,757$ ;  $p = 0,006$ ;  $n = 13$ ), indicando que la expresión de Res es mayor cuanto mayor es la severidad de las EHGNA.

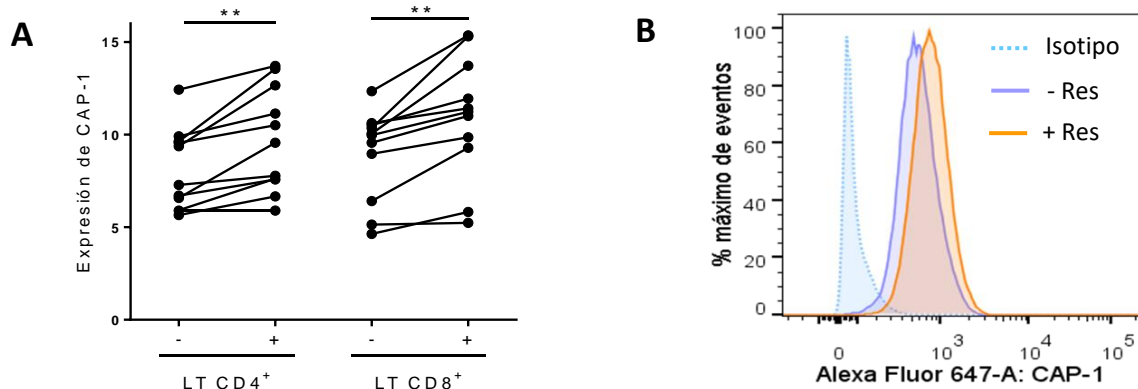
Para estudiar si la Res exógena modula su expresión génica, se cultivaron LT purificados en presencia o ausencia de la dosis fisiológica de Res durante 19 h. La Res indujo su expresión génica en LT de controles ( $p = 0,012$ ). Sin embargo, en LT de pacientes con EHGNA no se observó esta respuesta (Figura 11 B).



**Figura 11. Expresión génica de Res en LT. A.** Expresión de Res en LT purificados a partir de sangre periférica de controles (Co,  $n = 8$ ) y de pacientes con EHGNA ( $n = 8$ ). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante el test de Mann-Whitney. **B.** Modulación de la expresión génica de Res. LT purificados provenientes de controles (Co,  $n = 8$ ) y de pacientes con EHGNA ( $n = 6$ ) fueron cultivados en presencia (+) o ausencia (-) de Res (10 ng/ml) durante 19 h. La comparación dentro de cada grupo se realizó mediante el test t pareado. En ambos casos se muestra la expresión génica según el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ns: no significativo.

### 1.2.2. Modulación de la expresión de CAP-1 por Res

Con el fin de estudiar el efecto de Res sobre la expresión proteica de su receptor, se realizaron cultivos de CMSP procedentes de controles en presencia o ausencia de Res durante 72 h. La presencia de Res indujo un aumento promedio del 20% en la expresión de CAP-1 en ambas subpoblaciones de LT ( $CD4^+$ :  $p=0,002$ ;  $CD8^+$ :  $p=0,001$ ) (Figura 12 A-B).

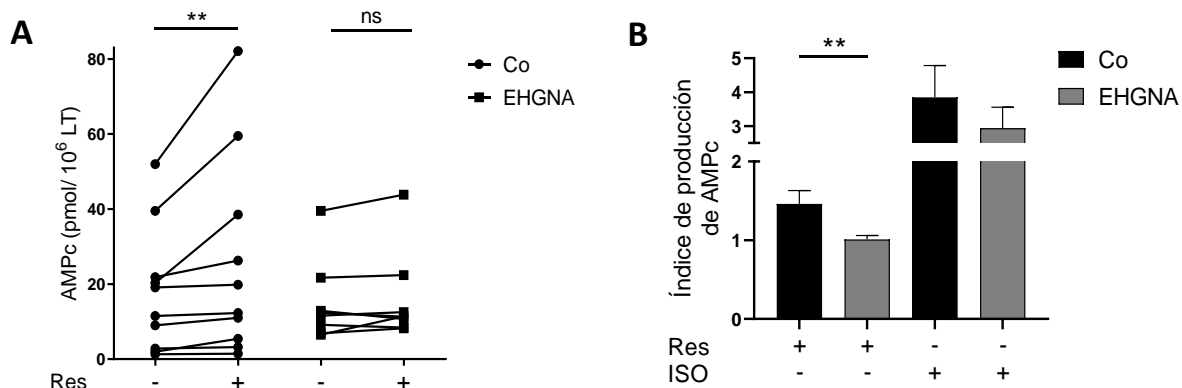


**Figura 12. Modulación de la expresión proteica de CAP-1 inducida por Res.** CMSP provenientes de controles fueron cultivadas en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. **A.** Expresión de CAP-1 en LT  $CD4^+$  y  $CD8^+$  ( $n=11$ ). Los datos se presentan relativizados al control de isotipo. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la expresión de CAP-1 en presencia (+) o ausencia (-) de Res para el mismo individuo. **B.** Histogramas representativos de la expresión de CAP-1. Se muestra la fluorescencia emitida por el control de isotipo (celestes) y por CAP-1 en ausencia (azul) y presencia de Res (naranja). \*\*  $p < 0,01$ .

### 1.2.3. Inducción de la producción de AMPc total por Res

Como su nombre lo indica, CAP-1 es una proteína asociada a la enzima adenilato ciclasa. Por este motivo, se infirió que la activación de CAP-1 por Res induciría un aumento en la producción de AMPc, uno de los segundos mensajeros involucrados en la regulación homeostática de LT. Para comprobarlo, se midió la producción de AMPc total en LT purificados cultivados en presencia o ausencia de Res. La Res indujo un aumento promedio del 45% en los niveles de AMPc en LT provenientes de controles ( $p=0,002$ ), mientras que en LT de pacientes con EHGNA no se observaron diferencias en la producción de AMPc (Figura 13 A-B).





**Figura 13. Producción de AMPc total inducida por Res.** LT purificados a partir de sangre periférica fueron cultivados en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 1 h. Se realizó una pre-incubación con un inhibidor de fosfodiesterasas para evitar la degradación del AMPc. **A.** Producción de AMPc total en LT de controles (círculos, n= 10) o pacientes con EHGNA (cuadrados, n= 8). La comparación se realizó mediante el test de Wilcoxon. Las líneas unen los puntos correspondientes a los niveles de AMPc en ausencia (-) o presencia (+) de Res para el mismo individuo. **B.** Índice de producción de AMPc total en LT de controles y de pacientes con EHGNA. El índice se obtuvo al relativizar los niveles de AMPc en presencia de Res o isoproterenol (ISO) respecto de los niveles observados en su ausencia. La comparación entre ambos grupos experimentales se realizó mediante el test de Mann-Whitney. Se presenta la media  $\pm$  SEM. \*\* p < 0,01; ns: no significativo.

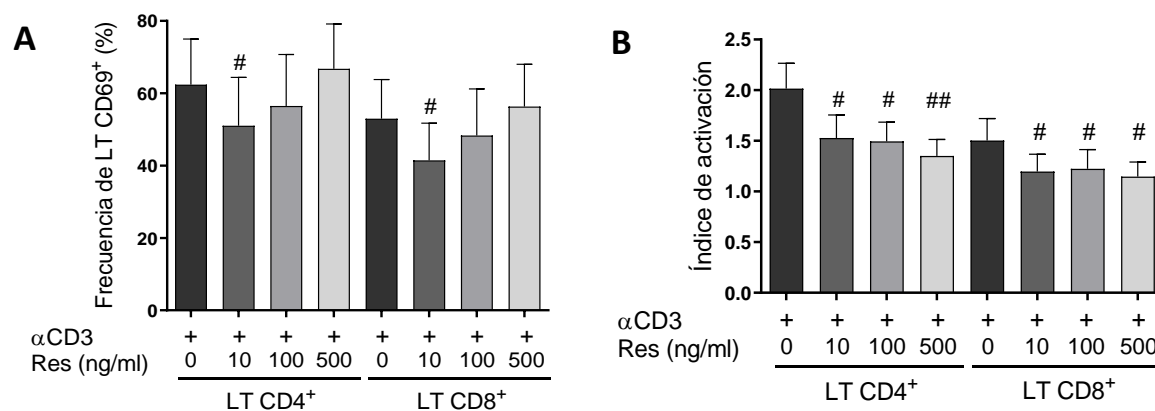
#### 1.2.4. Modulación de la activación celular por Res

Considerando que el AMPc actúa como regulador de la activación de leucocitos y que la Res indujo su producción únicamente en LT de controles, se infirió que la Res modularía la activación celular de manera diferencial según el origen de estas células. Para evaluar el efecto de Res sobre la activación de LT periféricos, se cultivaron CMSP con el anticuerpo anti-CD3 en presencia o ausencia de Res, y se determinó la expresión de CD69 como marcador temprano de activación.

En una primera instancia, se estudió el efecto de distintas concentraciones de Res sobre la modulación de la activación celular temprana de los LT contenidos en CMSP. Para ello, se utilizó la concentración fisiológica de Res (10 ng/ml) y dos dosis suprafisiológicas comúnmente encontradas en la bibliografía (100 y 500 ng/ml). Llamativamente, sólo con la menor dosis de Res se observó una modulación de la frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> (Figura 14 A).

El nivel de expresión de CD69, dado por la intensidad media de fluorescencia (IMF), es otra manera de evaluar el grado de activación celular. En este caso, para comparar la

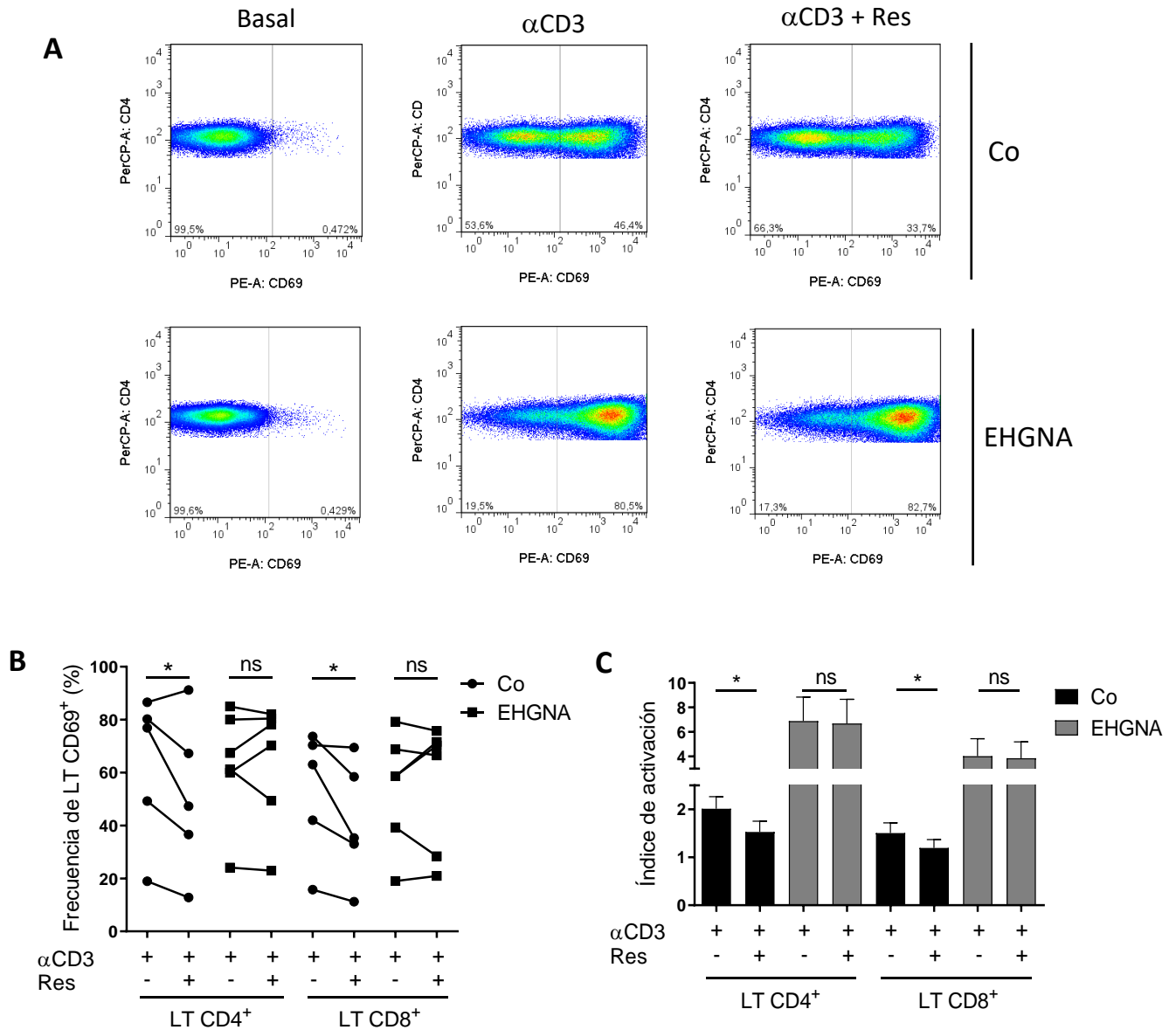
magnitud de la activación inducida por anti-CD3 en presencia o ausencia de Res, se calculó el índice de activación como se detalló en la sección de Metodología. La presencia de Res previno el aumento de la expresión de CD69 inducido por el estímulo con anti-CD3 en ambas subpoblaciones de LT, en todas las concentraciones evaluadas (Figura 14 B).



**Figura 14. Curvas dosis-respuesta de la modulación de la activación celular temprana de LT inducida por Res.** CMSP procedentes de controles (n= 5) fueron activadas con el anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) adherido a la placa, en presencia o ausencia de Res (10-500 ng/ml) durante 24 h. **A.** Frecuencia de LT activados que expresan CD69 para cada dosis de Res. **B.** Índice de activación de LT. Este índice se obtuvo de relativizar la relación de IMF para CD69 en LT activados en presencia o ausencia de Res respecto de la relación de IMF en el control negativo. La comparación se realizó mediante el test ANOVA de un factor de medidas repetidas seguido por el test de Dunnett. Se presenta la media ± SEM. # p < 0,05; ## p < 0,01 vs. LT activados en ausencia de Res.

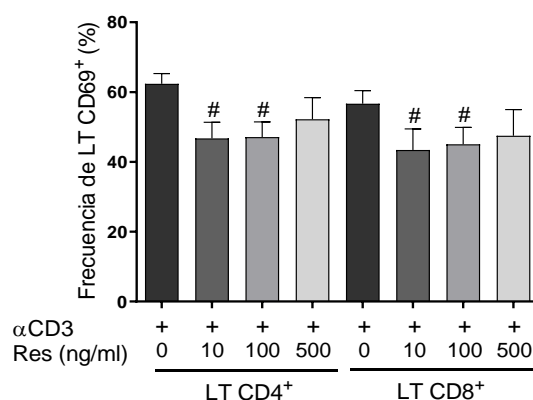
El estudio comparativo del efecto de Res sobre la activación de LT provenientes de controles o de pacientes con EHGNA se llevó a cabo utilizando la concentración fisiológica de Res. Como se esperaba, la Res previno el aumento de la frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> inducida por la estimulación con anti-CD3 cuando las células provenían de controles. Este efecto preventivo fue en promedio del 21,6% en LT CD4<sup>+</sup> (p= 0,045) y del 23% en LT CD8<sup>+</sup> (p= 0,038). Sin embargo, dicho efecto no se observó en las células que provenían de pacientes con EHGNA (Figura 15 A-B).

En base al índice de activación, la Res previno parcialmente el aumento de la expresión de CD69 inducido por el estímulo con anti-CD3 en LT de controles (CD4<sup>+</sup>: p= 0,031; CD8<sup>+</sup>: p= 0,042), pero no en LT de pacientes con EHGNA (Figura 15 C).



**Figura 15. Modulación de la activación celular temprana de LT inducida por Res.** CMSP fueron activadas con el anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) adherido a la placa, en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 24 h. **A.** Dot Plots representativos de la frecuencia de LT provenientes de un control (Co) y de un paciente con EHGNA en los distintos tratamientos. **B.** Frecuencia de LT que expresan CD69 en Co (círculos, n= 5) y EHGNA (cuadrados, n= 6). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la frecuencia de LT CD69+ en ausencia o presencia de Res para el mismo individuo. **C.** Índice de activación de LT de Co y de pacientes con EHGNA. Este índice se obtuvo de relativizar la relación de IMF para CD69 en LT activados en presencia o ausencia de Res respecto de la relación de IMF en el control negativo. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Se presenta la media ± SEM. \* p < 0,05; ns: no significativo.

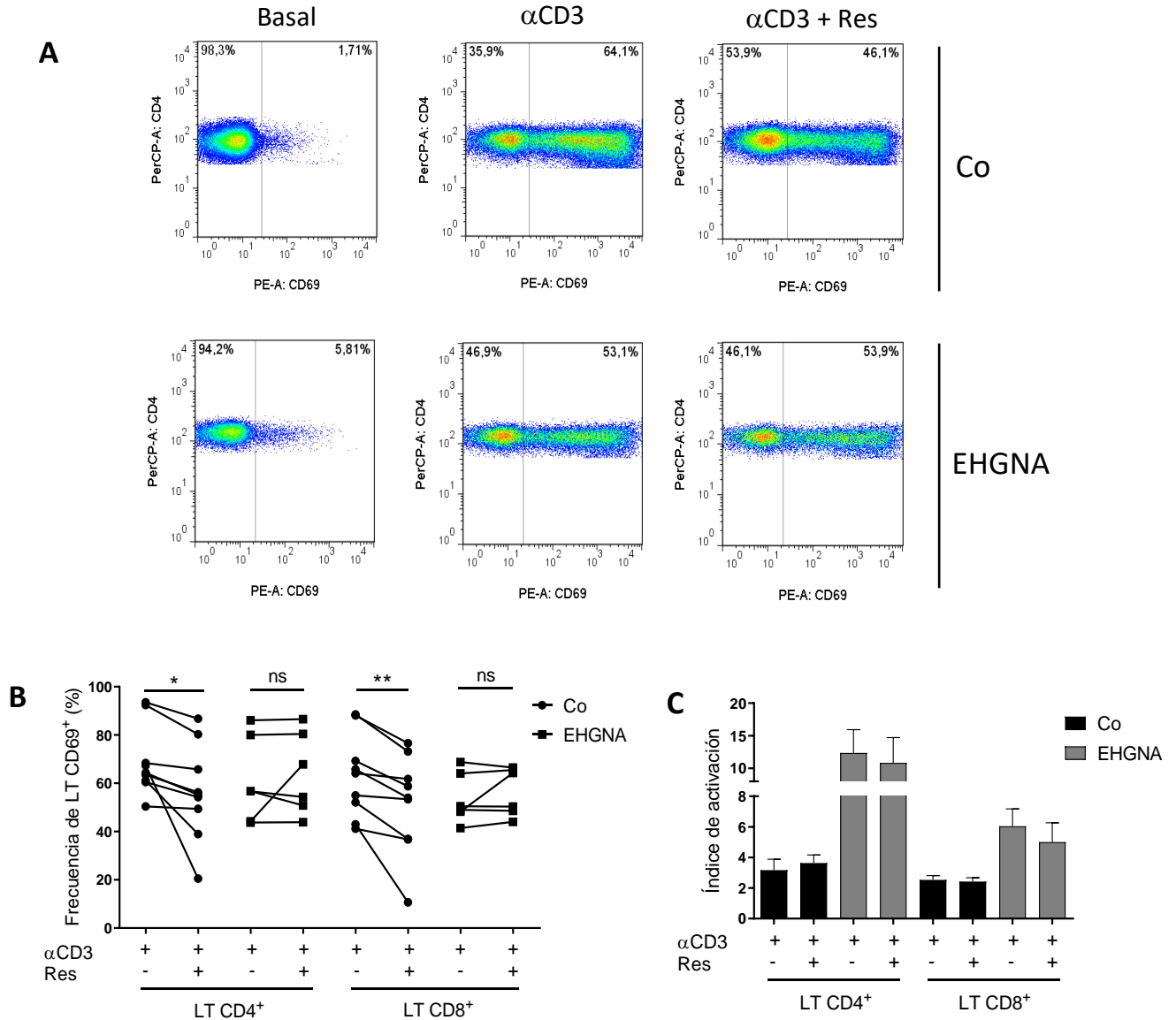
Dado que los LT pueden mostrar diferente respuesta frente al mismo estímulo según se encuentren aislados o en contacto con otras poblaciones celulares, surgió preguntarse si la Res interactuaría de manera directa con los LT regulando su activación, o si los efectos observados se debían a una respuesta indirecta gracias a la presencia de otros tipos celulares. Para responder este interrogante, se realizó el ensayo descrito anteriormente utilizando LT periféricos purificados. Similar al resultado obtenido con CMSP, se observó una modulación directa de la frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> con las concentraciones más bajas de Res (10 y 100 ng/ml) (Figura 16). Por otro lado, a diferencia de lo observado al cultivar CMSP, no se observó una modulación directa del índice de activación (datos no mostrados).



**Figura 16. Curva dosis-respuesta de la modulación directa de la activación celular temprana de LT inducida por Res.** LT purificados a partir de sangre periférica de controles (n= 9) fueron activados con el anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) adherido a la placa, en presencia o ausencia de Res (10-500 ng/ml) durante 24 h. Se muestra la frecuencia de LT activados que expresan CD69 para las distintas dosis de Res. La comparación se realizó mediante el test ANOVA de un factor de medidas repetidas seguido por el test de Dunnett. Se presenta la media ± SEM. # p < 0,05; ## p < 0,01 vs. LT activados en ausencia de Res.

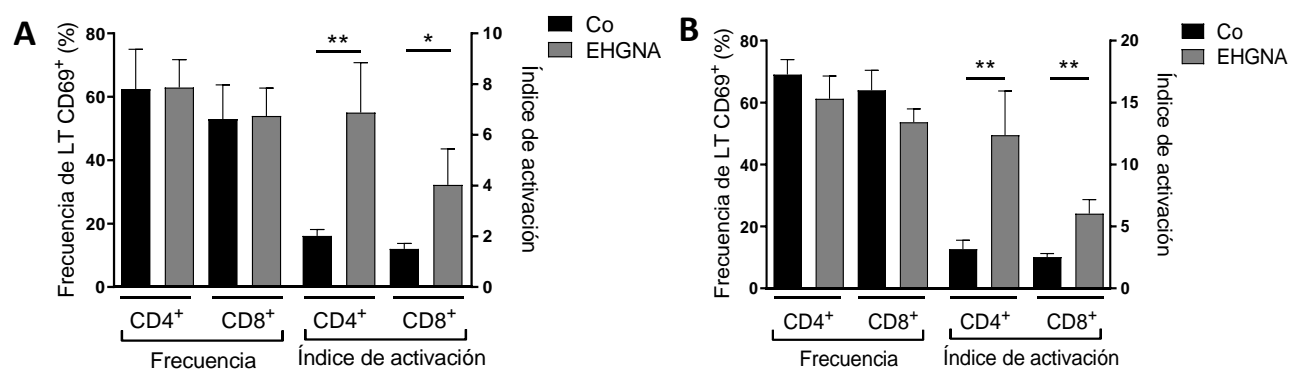
Se realizó el estudio comparativo del efecto directo de la dosis fisiológica de Res sobre la activación de LT periféricos provenientes de controles y de pacientes con EHGNA. Como sucedió al cultivar CMSP, la Res previno el aumento de la frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> inducido por la activación con anti-CD3 en un 19% promedio en LT de controles (CD4<sup>+</sup>: p= 0,028; CD8<sup>+</sup>: p= 0,005), mientras que no se observaron diferencias en LT de pacientes (Figura 17 A-B). En relación a los niveles de expresión de CD69, no se observó ningún efecto

significativo de Res sobre el índice de activación en los grupos experimentales evaluados (Figura 17 C).



**Figura 17. Modulación directa de la activación celular temprana de LT inducida por Res.** LT purificados a partir de sangre periférica fueron activados con el anticuerpo anti-CD3 (0,5  $\mu$ g/ml) adherido a la placa, en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 24 h. **A.** Dot Plots representativos de la frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> provenientes de un control (Co) y de un paciente con EHGNA en los distintos tratamientos. **B.** Frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> provenientes de Co (círculos, n= 9) y EHGNA (cuadrados, n= 6). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> en ausencia o presencia de Res para el mismo individuo. **C.** Índice de activación de LT de Co y de pacientes con EHGNA. Este índice se obtuvo de relativizar la relación de IMF para CD69 en LT activados en presencia o ausencia de Res respecto de la relación de IMF en el control negativo. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Se presenta la media  $\pm$  SEM. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; ns: no significativo.

Cabe destacar que la respuesta de LT de pacientes con EHGNA frente al estímulo de activación con anti-CD3 en ausencia de Res se caracterizó por una elevada expresión de CD69. Esto se observó tanto en los cultivos de CMSP (CD4<sup>+</sup>: p= 0,004; CD8<sup>+</sup>: p= 0,049) como en LT purificados (CD4<sup>+</sup>: p= 0,009; CD8<sup>+</sup>: p= 0,004) (Figura 18 A-B). Sin embargo, no se observaron diferencias en las frecuencias de LT CD69<sup>+</sup> inducidas por la activación con anti-CD3 en ausencia de Res entre controles y pacientes con EHGNA.

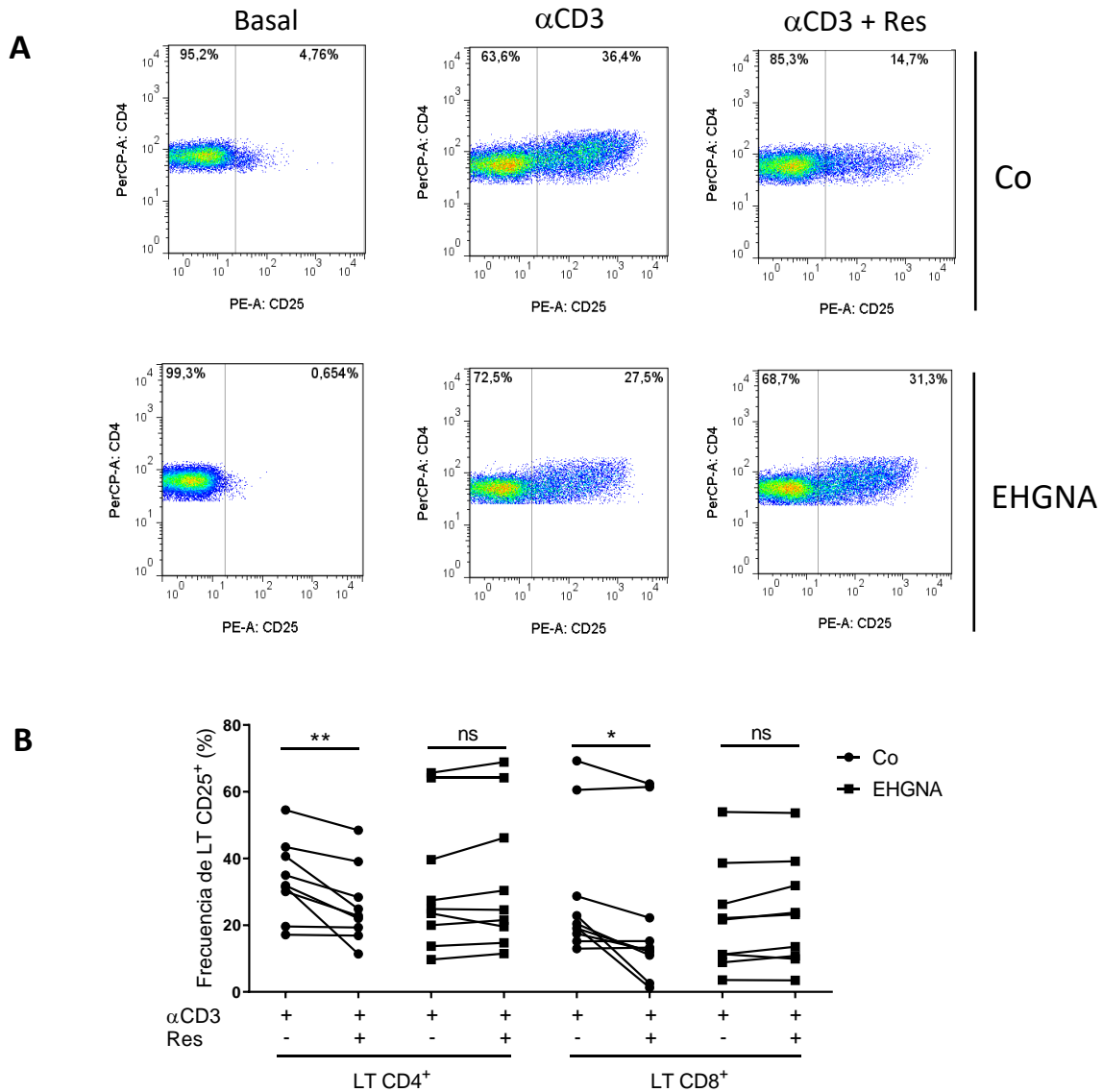


**Figura 18. Activación de LT en respuesta al estímulo de activación con anti-CD3.** LT contenidos en CMSP (A) o LT purificados a partir de sangre periférica (B) fueron activados con el anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) adherido a la placa durante 24 h. Se muestra la frecuencia de LT CD69<sup>+</sup> y el índice de activación de células provenientes de Co y EHGNA. La comparación se realizó mediante el test t de Student. El índice se obtuvo de relativizar el IMF para CD69 en LT activados respecto del IMF en ausencia de estímulo de activación. Se presenta la media ± SEM. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Para evaluar el efecto directo de Res sobre la activación de LT en una etapa tardía, se midió la subunidad inducible del receptor de IL-2 (CD25) como marcador de activación. Para ello, LT purificados fueron activados en presencia o ausencia de Res y se determinó la frecuencia de LT CD25<sup>+</sup> y el nivel de expresión de CD25 a las 72 h de cultivo. Similar a lo observado para CD69, la Res previno el aumento de la frecuencia de LT CD25<sup>+</sup> inducido por la estimulación con anti-CD3 en células de controles. Este efecto preventivo fue en promedio de 22,5% para la subpoblación CD4<sup>+</sup> (p= 0,008) y de 32,4% para CD8<sup>+</sup> (p= 0,012). Por el contrario, en LT de pacientes con EHGNA no se observó el efecto preventivo de Res (Figura 19 A-B).

Al igual que para CD69, se calculó el índice de activación para comparar los niveles de expresión de CD25 entre los distintos tratamientos. No se observó ningún efecto significativo inducido por Res sobre este índice (datos no mostrados).

Por otro lado, a diferencia de lo observado para CD69, tanto la frecuencia de LT CD25<sup>+</sup> como la expresión de CD25 en respuesta al estímulo de activación con anti-CD3 en ausencia de Res fueron similares entre controles y pacientes con EHGNA (datos no mostrados).



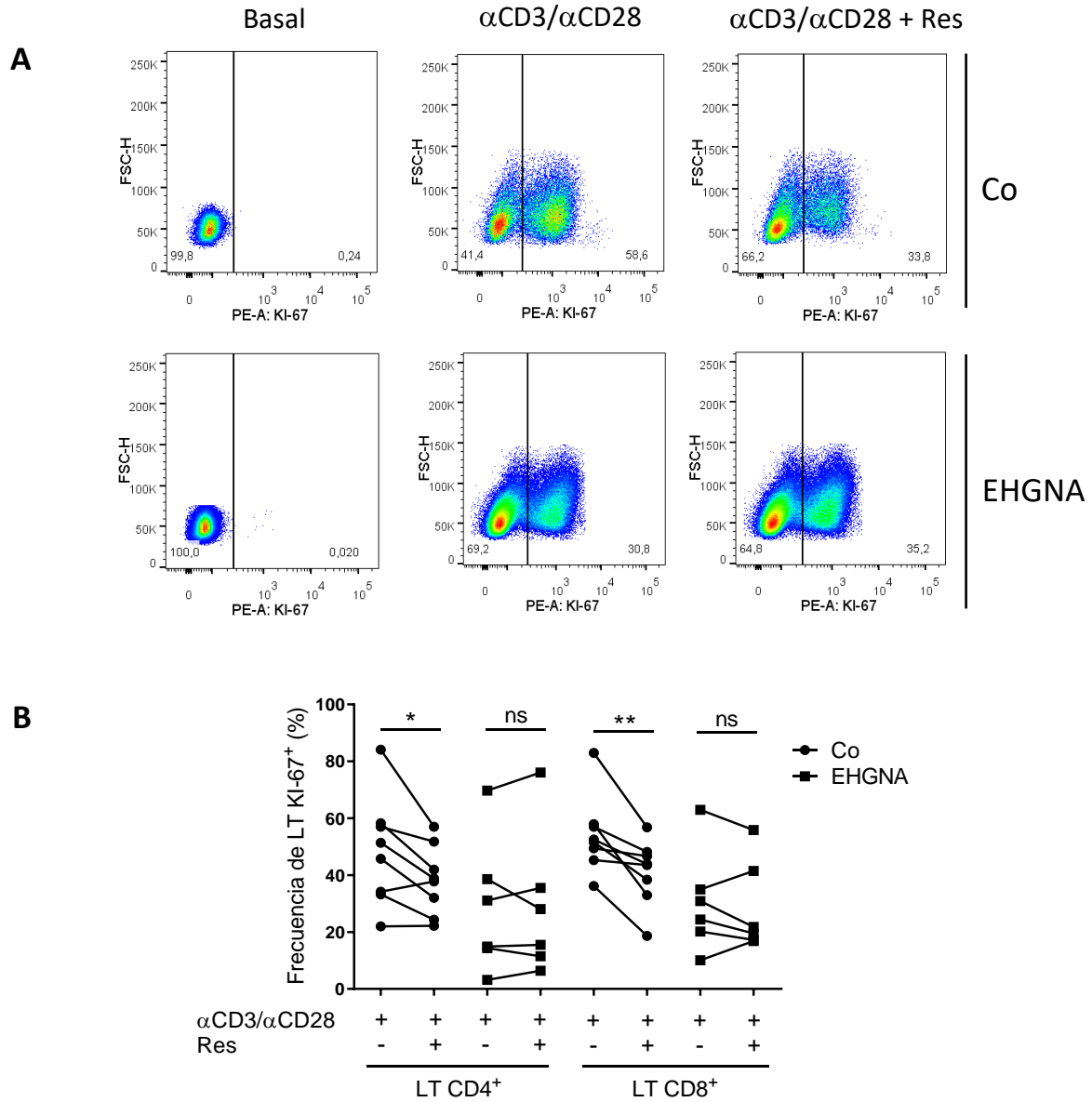
**Figura 19. Modulación directa de la activación celular tardía de LT inducida por Res.** LT purificados a partir de sangre periférica fueron activados con el anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml) adherido a la placa en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. **A.** Dot Plots representativos de la frecuencia de LT CD25<sup>+</sup> provenientes de un control (Co) y de un paciente con EHGNA. **B.** Frecuencia de LT que expresan CD25 provenientes de Co (círculos, n= 9) o EHGNA (cuadrados, n= 9). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la frecuencia de LT CD25<sup>+</sup> en ausencia o presencia de Res para el mismo individuo. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; ns: no significativo.

### 1.2.5. Modulación de la proliferación celular por Res

Teniendo en cuenta que Res modula la expresión de la cadena inducible del receptor de IL-2, y que esta cadena es necesaria para aumentar la afinidad del receptor por IL-2 y así favorecer la proliferación celular, se hipotetizó que Res estaría involucrada en la homeostasis de LT mediante la modulación de su proliferación. Para corroborar dicha hipótesis, se indujo la proliferación de LT purificados con una combinación mitogénica de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de Res, y se cuantificó la frecuencia de LT proliferantes mediante la identificación de Ki-67 luego de 72 h de cultivo. La proteína nuclear Ki-67 sólo se expresa en células que se encuentran en alguna fase activa del ciclo celular (de G<sub>1</sub> a mitosis) y está ausente en células quiescentes (G<sub>0</sub>), por lo que su presencia indica que la célula se encuentra proliferando.

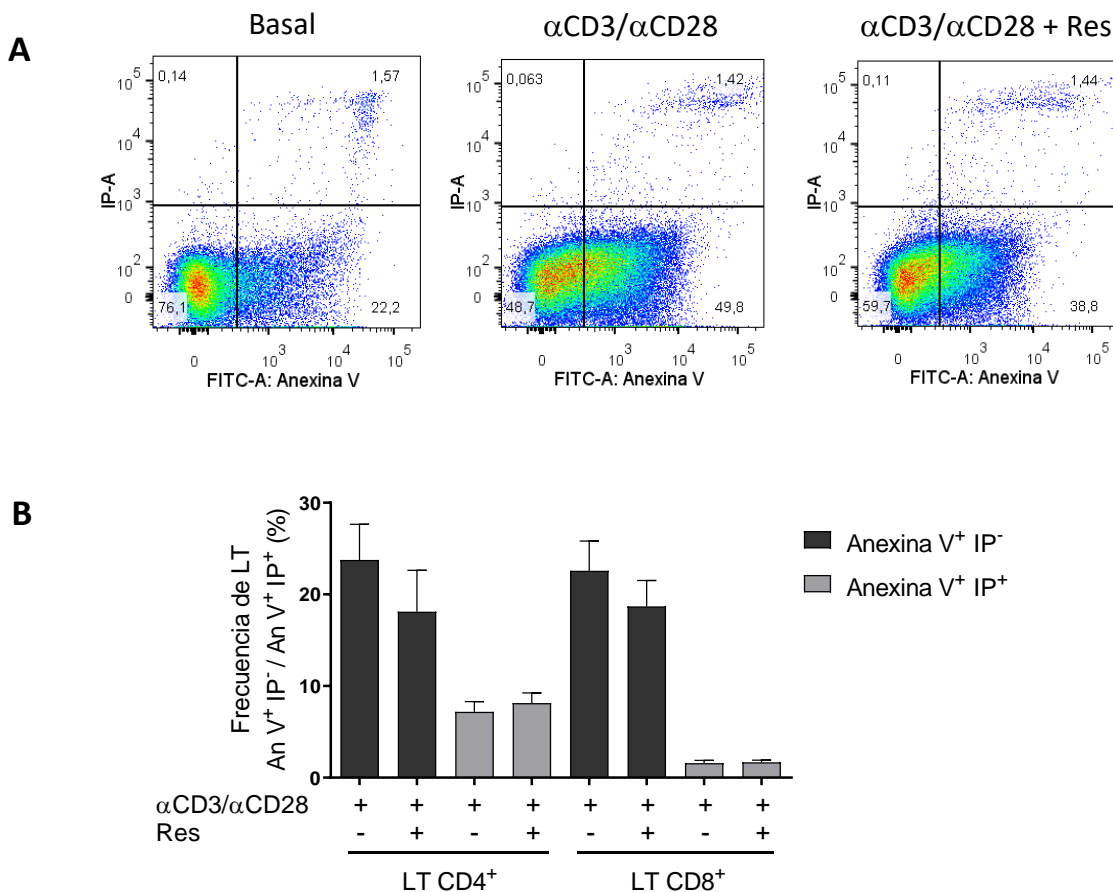
En LT procedentes de controles, la presencia de Res previno la proliferación celular inducida por el estímulo mitogénico, tal como lo denota la reducción promedio de 21,4% y 26,4% en la frecuencia de células Ki-67<sup>+</sup> en LT CD4<sup>+</sup> (p= 0,023) y LT CD8<sup>+</sup> (p= 0,006), respectivamente. En LT de pacientes, en cambio, no se observaron diferencias en la frecuencia de LT Ki-67<sup>+</sup> cuando las células fueron inducidas a proliferar en presencia de Res (Figura 20).





**Figura 20. Modulación directa de la proliferación celular inducida por Res.** Se indujo la proliferación de LT purificados a partir de sangre periférica con los anticuerpos anti-CD3 (0,5 µg/ml) adherido a la placa y anti-CD28 soluble (1 µg/ml) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. **A.** Dot Plots representativos de las frecuencias de LT proliferantes provenientes de un control (Co) y de un paciente con EHGNA. **B.** Frecuencia de LT que expresan Ki-67 provenientes de controles (círculos, n= 8) o pacientes con EHGNA (cuadrados, n= 6). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la frecuencia de LT Ki-67<sup>+</sup> en ausencia o presencia de Res para el mismo individuo. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; ns: no significativo.

Para descartar la posibilidad de que el efecto preventivo de Res observado sobre la proliferación de los LT de controles fuera secundario a un aumento de la muerte celular, se realizó un ensayo de apoptosis. Para ello, se cultivaron LT en las mismas condiciones que en el ensayo de proliferación y se evaluó la presencia de marcadores tempranos y tardíos de muerte celular utilizando Anexina V/Ioduro de propidio (IP). Como se esperaba, no se observó un aumento en la muerte celular temprana (Anexina V<sup>+</sup> IP<sup>-</sup>) ni tardía (Anexina V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>) debido a la presencia de Res (Figura 21).

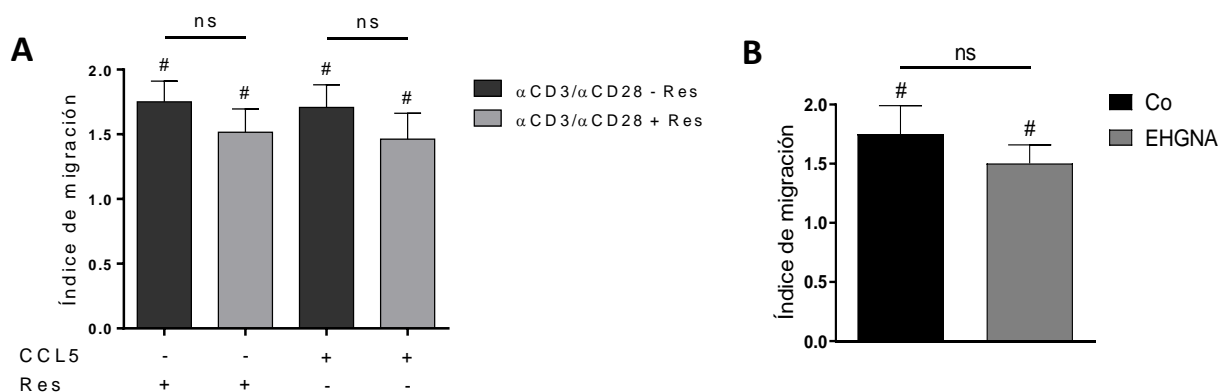


**Figura 21. Modulación directa de la muerte celular inducida por Res.** Se indujo la proliferación de LT purificados a partir de sangre periférica con los anticuerpos anti-CD3 (0,5 μg/ml) adherido a la placa y anti-CD28 soluble (1 μg/ml) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. **A.** Dot Plots representativos de la expresión de Anexina V e ioduro de propidio (IP) en LT provenientes de un control. **B.** Frecuencia de LT provenientes de controles (n= 5) que expresan anexina V e IP. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Se presenta la media ± SEM. Valor p < 0,05 fue considerado significativo.

### 1.2.6. Inducción de la migración celular por Res

Considerando que CAP-1 está involucrado en la regulación de la dinámica de polimerización y despolimerización de la actina, proceso determinante para la migración celular, resultó de importancia estudiar el efecto de Res sobre la migración de LT. Se estudió la capacidad quimioattractante de Res sobre LT previamente activados. Asimismo, se investigó si la presencia de Res durante la activación de los LT influencia su capacidad migratoria.

En LT de controles, la Res indujo un aumento promedio de la migración del 75% ( $p=0,019$ ) respecto del control negativo. Este efecto quimioattractante de Res fue comparable con el inducido por la quimioquina CCL5, el cual fue de 71% ( $p=0,010$ ). Asimismo, la activación celular en presencia de Res realizada previo al ensayo de migración no afectó el efecto quimioattractante de ninguna de las dos quimioquinas utilizadas (Figura 22 A). En los LT de pacientes con EHGNA, la Res indujo un aumento promedio del 50% en el índice de migración ( $p=0,016$ ), comparable con la migración observada en controles (Figura 22 B).



**Figura 22. Migración de LT inducida por Res.** LT purificados a partir de sangre periférica fueron activados con los anticuerpos anti-CD3 adherido a la placa (0,5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 soluble (1  $\mu$ g/ml) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 5 días. Luego de este periodo, se indujo la migración hacia Res (20 ng/ml) o CCL5 (100 ng/ml) por 3 h. El índice de migración se obtuvo como el cociente entre el número de LT que migraron hacia el agente quimioattractante y el número de LT que migraron pasivamente en ausencia de agente quimioattractante. **A.** Índice de migración hacia Res o CCL5 de LT de controles previamente activados en presencia o ausencia de Res ( $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 $\pm$ Res). Se utilizó el test ANOVA de medidas repetidas seguido por el test de Tukey de comparaciones múltiples. **B.** Índice de migración hacia Res de LT provenientes de controles (Co, n= 5) y de pacientes con EHGNA (n= 5) previamente activados en ausencia de Res. Para comparar el número de LT que migraron en presencia o ausencia de Res dentro de cada grupo experimental se utilizó el test t pareado. El índice de migración entre ambos grupos experimentales se comparó mediante el test t de Student. Se presenta la media  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  vs. migración en ausencia de quimioattractante; ns: no significativo.

Se realizaron correlaciones con el fin de investigar posibles asociaciones entre el compromiso hepático de los individuos incluidos en el estudio y la capacidad de los LT de responder a Res. Para ello, se utilizaron índices que indican la magnitud del efecto ejercido por Res sobre los LT de cada individuo. Estos índices se calcularon como el cociente entre los valores obtenidos en los cultivos en presencia de Res y los valores obtenidos en su ausencia. Por lo tanto, estos índices fueron mayores a 1 si Res ejerció una modulación positiva; menores a 1 si la modulación fue negativa; y cercanos a 1 cuando no se observó ningún efecto asociado a Res. Este análisis arrojó una correlación negativa entre la producción de AMPc inducida por Res y el NAS (Tabla 7), indicando que cuanto mayor es la severidad de la hepatopatía, menor es la capacidad de Res de inducir la producción de AMPc. A su vez, la frecuencia relativa de LT activados en estadios tempranos y tardíos (LT CD69<sup>+</sup> y LT CD25<sup>+</sup>) correlacionó positivamente con el NAS y el grado de fibrosis (Tabla 7), lo que sugiere que el efecto inhibitorio de Res sobre la activación de LT se reduce cuanto mayor es el compromiso hepático.

**Tabla 7. Correlaciones entre parámetros histológicos y la magnitud del efecto modulador que ejerce Res sobre las características funcionales estudiadas en LT.**

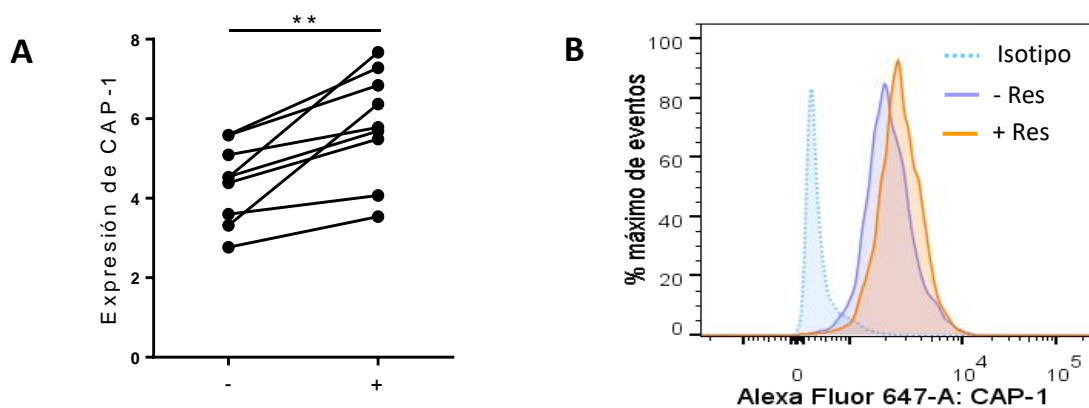
Parámetro en estudio	Población celular	Parámetro clínico			
		NAS		Fibrosis	
		r	p	r	p
Producción de AMPc	LT total	-0,581	0,020	-0,225	ns
Frecuencia relativa de LT CD69 <sup>+</sup>	LT CD4 <sup>+</sup>	0,648	0,034	0,638	0,035
	LT CD8 <sup>+</sup>	0,861	0,0005	0,857	0,003
Frecuencia relativa de LT CD25 <sup>+</sup>	LT CD4 <sup>+</sup>	0,826	0,0003	0,833	0,001
	LT CD8 <sup>+</sup>	0,616	0,021	0,573	0,030

La tabla muestra el coeficiente de Spearman (r) y el valor p para cada correlación realizada entre los parámetros histológicos en estudio y la magnitud del efecto modulador de Res sobre los aspectos funcionales evaluados. Las correlaciones se llevaron a cabo mediante el test de Spearman. Valores de p < 0,05 fueron considerados significativos. ns: no significativo; NAS: *NAFLD Activity Score*.

### 1.3. Influencia de Res sobre características funcionales de Mo

#### 1.3.1. Modulación de CAP-1 por Res

Al igual que para LT, se estudió el efecto que ejerce Res sobre la expresión de su receptor en Mo provenientes de controles. La Res indujo un aumento promedio del 33,8% en la expresión proteica de CAP-1 ( $p=0,002$ ) (Figura 23).

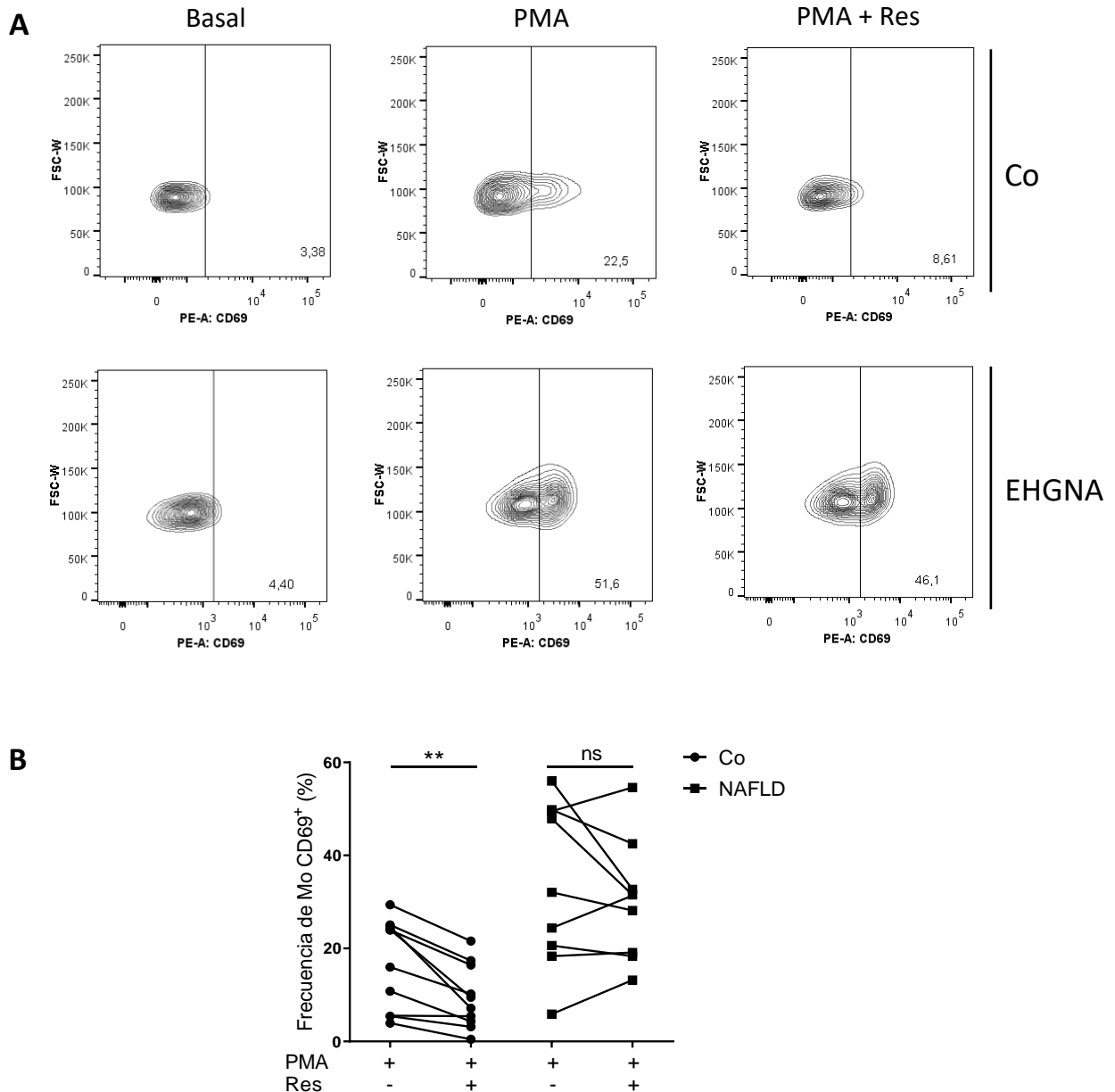


**Figura 23. Modulación de la expresión proteica de CAP-1 inducida por Res.** CMSP provenientes de controles fueron cultivadas en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 72 h. **A.** Expresión de CAP-1 en Mo ( $n=9$ ). Los datos se presentan relativizados al control de isotipo. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la expresión de CAP-1 en presencia (+) o ausencia (-) de Res para el mismo individuo. **B.** Histogramas representativos de la expresión de CAP-1. Se muestra la fluorescencia emitida por el control de isotipo (celeste) y por CAP-1 en ausencia (azul) y presencia de Res (naranja). \*\*  $p < 0,01$ .

#### 1.3.2. Modulación de la activación celular por Res

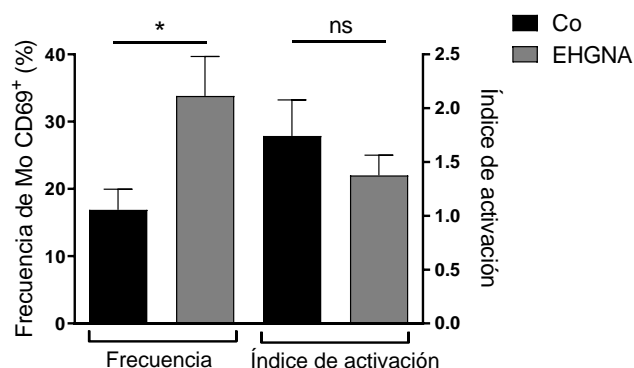
Con el fin de evaluar si la Res modula la activación de Mo, se activaron CMSP con PMA en presencia o ausencia de Res durante 24 h y se determinó la expresión de la molécula CD69 como marcador de activación. La Res previno en un 43,4% el aumento de la frecuencia de Mo CD69<sup>+</sup> inducido por la estimulación con PMA en CMSP de controles ( $p=0,002$ ), mientras que en los pacientes con EHGNA no se observaron diferencias en la frecuencia de Mo CD69<sup>+</sup> entre los tratamientos (Figura 24 A-B).

Por otro lado, el análisis del índice de activación demostró que Res no induce cambios en los niveles de expresión de CD69 en Mo (datos no mostrados).



**Figura 24. Modulación de la activación de Mo inducida por Res.** CMSP fueron activadas con PMA (10 ng/ml) en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 24 h. **A.** Dot Plots representativos de la frecuencia de Mo CD69<sup>+</sup> provenientes de un control (Co) y de un paciente con EHGNA luego de los distintos tratamientos. **B.** Frecuencia de Mo que expresan CD69 en Co (círculos, n= 10) y EHGNA (cuadrados, n= 9). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la frecuencia de Mo CD69<sup>+</sup> en ausencia o presencia de Res para el mismo individuo. \*\* p < 0,01; ns: no significativo.

En respuesta al estímulo de activación con PMA en ausencia de Res, los Mo de pacientes con EHGNA presentaron una frecuencia de células CD69<sup>+</sup> significativamente mayor que los controles ( $p= 0,010$ ). Por otro lado, el análisis del índice de activación mostró que no hay diferencias en los niveles de expresión de CD69 en respuesta a la activación con PMA entre controles y pacientes con EHGNA (Figura 25).

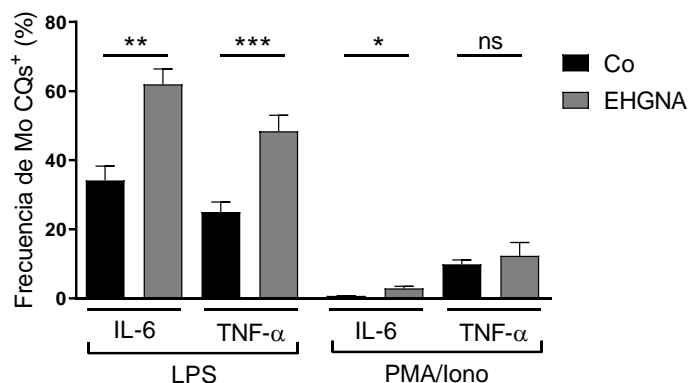


**Figura 25. Activación de Mo en respuesta al estímulo con PMA.** CMSP se activaron con PMA (10 ng/ml) durante 24 h. Se muestra el índice de activación y la frecuencia de Mo CD69<sup>+</sup> provenientes de controles (n= 10) y pacientes con EHGNA (n= 9). El índice de activación se obtuvo de relativizar el IMF para CD69 en Mo activados respecto del IMF en Mo no activados. La comparación se realizó mediante el test t de Student. Se presenta la media ± SEM. \*  $p < 0,05$ ; ns: no significativo.

### 1.3.3. Modulación de la producción de citoquinas por Res

Teniendo en consideración que los Mo provenientes de pacientes con EHGNA activados en ausencia de Res mostraron mayor frecuencia de células CD69<sup>+</sup> que su contraparte en controles, se hipotetizó que la producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a un estímulo activador también sería mayor. Para comprobarlo, se cuantificó la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en respuesta a los estímulos con LPS o con PMA e ionomicina. Frente al LPS, los pacientes con EHGNA presentaron mayores frecuencias de Mo productores de IL-6 y TNF- $\alpha$  que los Mo de controles ( $p= 0,0013$  y  $p= 0,0006$ ). La producción de citoquinas frente al estímulo con PMA e ionomicina fue considerablemente menor que la obtenida frente al LPS. Sin embargo, a pesar de las bajas frecuencias observadas, los Mo

de pacientes con EHGNA también respondieron a este estímulo con una mayor producción de IL-6 respecto de los Mo de controles ( $p= 0,011$ ) (Figura 26).

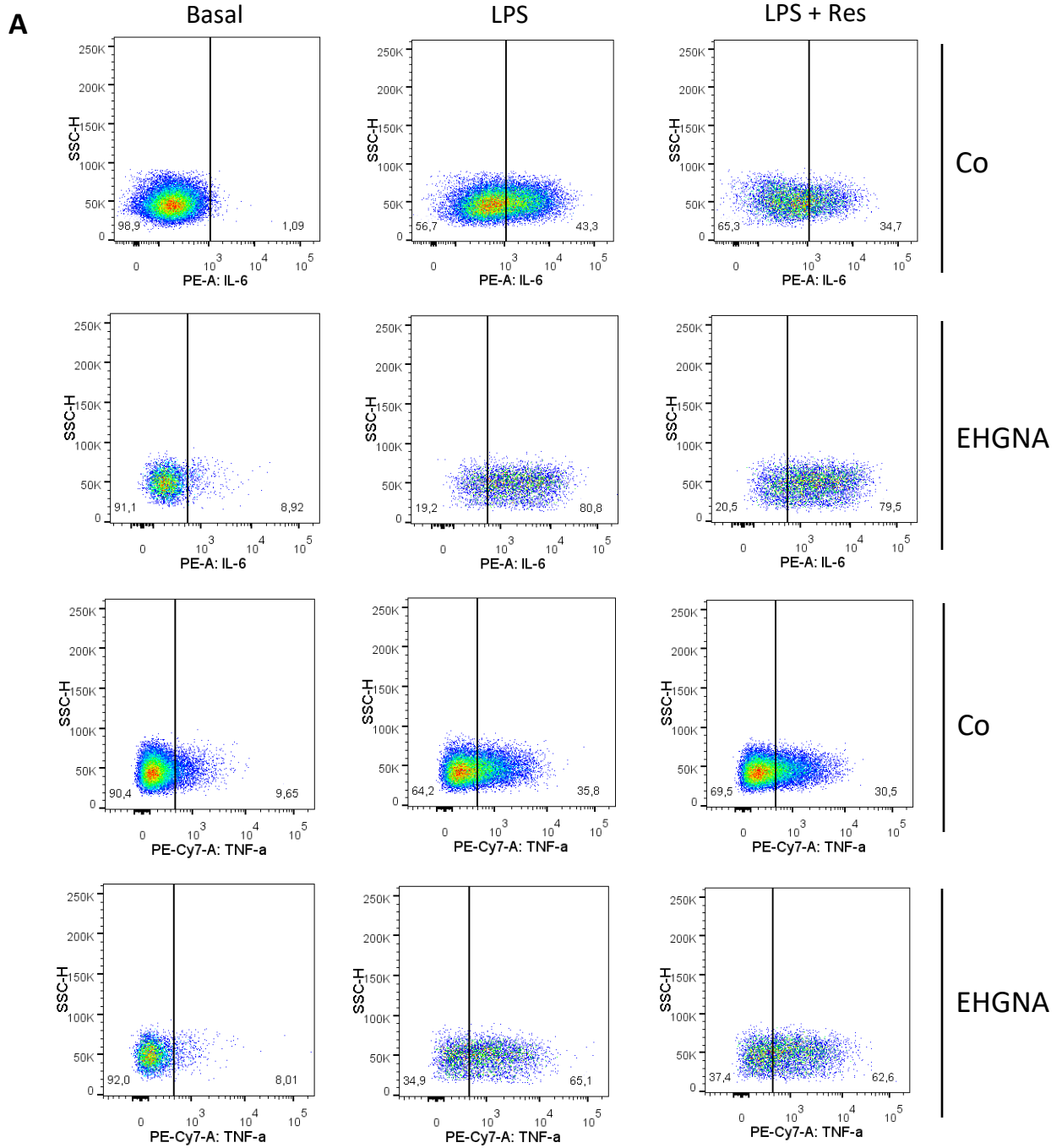


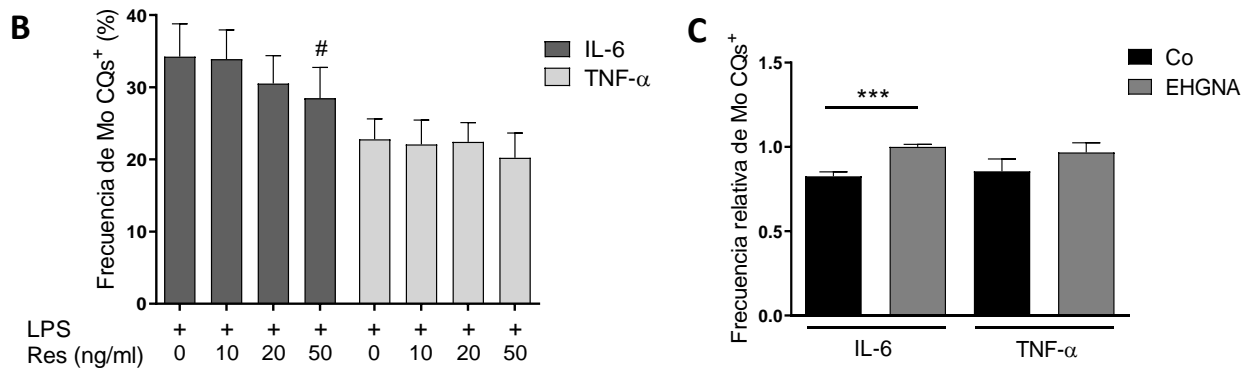
**Figura 26. Producción de citoquinas en respuesta al estímulo con LPS o PMA/ionomicina.** Se indujo la producción de citoquinas (CQs) con LPS (20 ng/ml) o PMA (50 ng/ml)/ionomicina (1  $\mu$ g/ml) en CMSP durante 16 h. Se muestra la frecuencia de Mo productores de IL-6 y TNF- $\alpha$  provenientes de controles (Co, n= 11) y de pacientes con EHGNA (n= 5). La comparación entre ambos grupos experimentales se realizó mediante el test t de Student. Se presenta la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns: no significativo.

Con el objetivo de evaluar el efecto de Res sobre la producción de citoquinas en Mo, se cultivaron CMSP con LPS en presencia o ausencia de Res y se cuantificó la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$ . En este caso, la producción de citoquinas se indujo sólo con LPS debido a la baja frecuencia de Mo productores de citoquinas observada con PMA e ionomicina.

En controles, la Res previno en un 13% el aumento en la frecuencia de Mo productores de IL-6 inducido por LPS ( $p= 0,025$ ). Sin embargo, la Res no moduló la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 27 A-C). En Mo de pacientes con EHGNA no se observaron cambios en la frecuencia de células productoras de citoquinas en respuesta a Res (Figura 27 A,C).





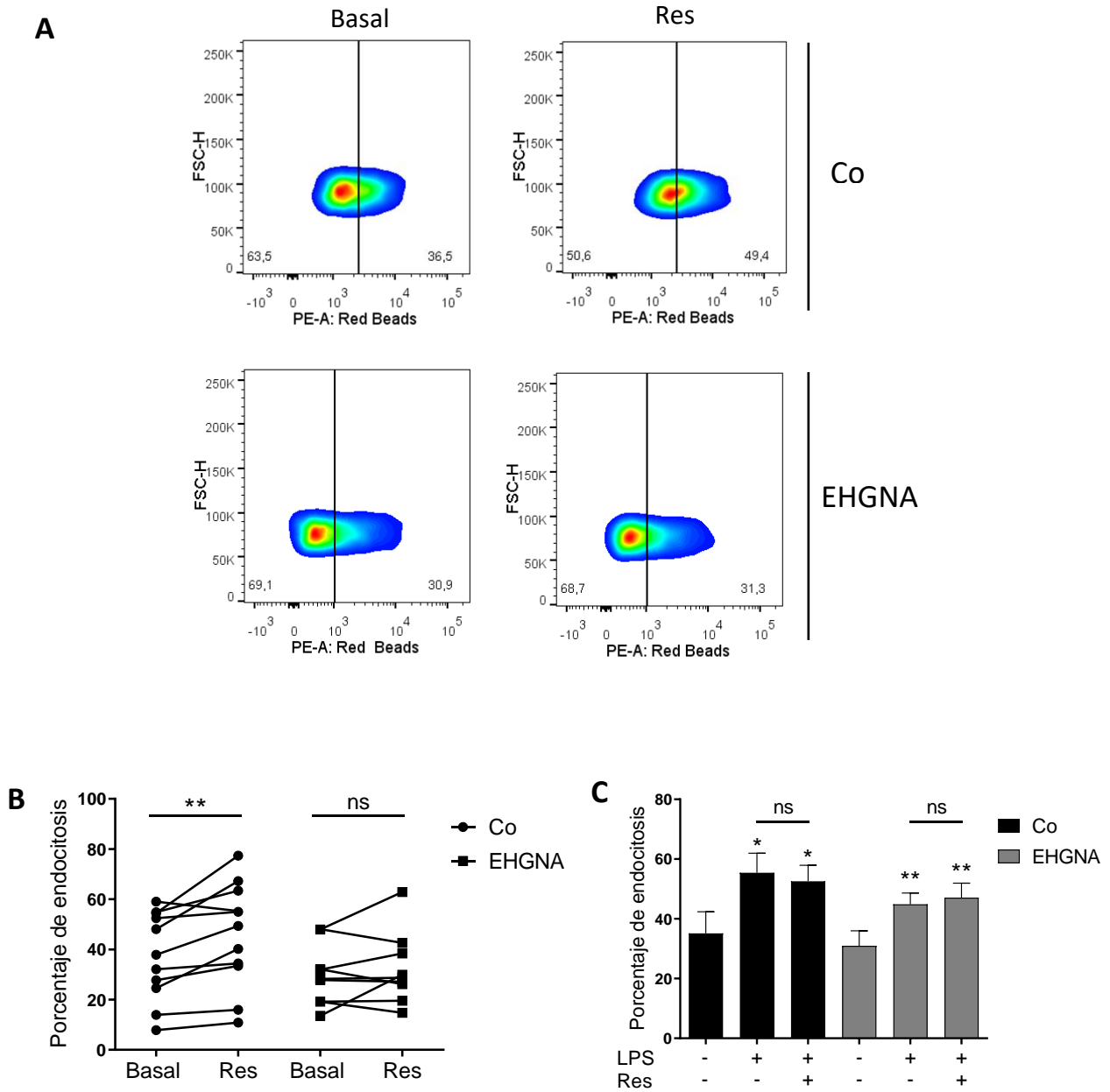


**Figura 27. Modulación de la producción de citoquinas inducida por Res.** Se indujo la producción de citoquinas (CQs) con LPS (20 ng/ml) en presencia o ausencia de Res (10-50 ng/ml) durante 16 h. **A.** Dot Plots representativos de la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en Mo provenientes de un control (Co) y de un paciente con EHGNA. **B.** Frecuencia de Mo productores de IL-6 y TNF- $\alpha$  provenientes de controles (n= 11). La comparación se realizó usando el test de Friedman seguido por el post-test de Dunn. **C.** Frecuencia relativa de Mo productores de IL-6 y TNF- $\alpha$  de Co (n= 11) o pacientes con EHGNA (n= 5). La frecuencia relativa se obtuvo a partir del cociente entre la frecuencia de Mo CQs<sup>+</sup> estimulados con LPS en presencia de Res (50 ng/ml) y la frecuencia de Mo CQs<sup>+</sup> estimulados con LPS en ausencia de Res. La comparación entre ambos grupos se realizó mediante el test de Mann-Whitney. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. # p < 0,05 vs. Mo estimulados con LPS en ausencia de Res; \*\*\* p < 0,001.

#### 1.3.4. Modulación de la endocitosis por Res

La endocitosis es un proceso dependiente de la regulación de la dinámica de la actina que, como se mencionó anteriormente, es regulada por CAP-1. Con el objetivo de evaluar el efecto de Res sobre este proceso en Mo, se estudió la endocitosis de partículas de látex en presencia de Res. En Mo procedentes de controles, el porcentaje de endocitosis aumentó en promedio un 22% en presencia de Res (p= 0,008). Sin embargo, no observamos cambios en la endocitosis de Mo provenientes de pacientes con EHGNA (Figura 28 A-B). Por otro lado, el índice de endocitosis, que hace referencia a la cantidad de partículas endocitadas por célula, no fue modulado por Res en ninguno de los dos grupos experimentales (datos no mostrados).

Cuando la endocitosis se llevó a cabo en presencia de LPS, el aumento en el porcentaje de endocitosis fue similar entre controles y pacientes con EHGNA (p= 0,19). En este caso, la Res no modificó el porcentaje de endocitosis inducido por LPS (Figura 28 C).



**Figura 28. Modulación de la endocitosis inducida por Res.** Se estudió la endocitosis de partículas de látex en ausencia o presencia de Res (20 ng/ml) luego de 1 h de cultivo. **A.** Dot Plots representativos de la endocitosis de Mo provenientes de un control (Co) y de un paciente con EHGNA. **B.** Porcentaje de endocitosis en Mo de Co (n= 11) y EHGNA (n= 9). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al porcentaje de Mo que incorporaron partículas de látex en ausencia (Basal) o presencia de Res para el mismo individuo. **C.** Porcentaje de endocitosis en presencia o ausencia de LPS y Res (n= 7). La comparación entre los tratamientos dentro de cada grupo experimental se llevó a cabo con el test de ANOVA de un factor de medidas repetidas seguido por el test de Tukey. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 vs. fagocitosis basal; ns: no significativo.

Se realizaron correlaciones con el fin de estudiar posibles asociaciones entre el compromiso hepático de los individuos incluidos en el estudio y la magnitud del efecto que ejerce Res sobre los parámetros evaluados en Mo. Este análisis evidenció que la frecuencia relativa de Mo CD69<sup>+</sup> y de Mo productores de IL-6 correlaciona positivamente con el NAS (Tabla 8). Este resultado indica que el efecto inhibitorio inducido por Res sobre estas dos características se reduce cuanto mayor es la severidad de las EHGNA.

**Tabla 8. Correlaciones entre parámetros histológicos y la magnitud del efecto modulador que ejerce Res sobre las características funcionales estudiadas en Mo.**

Parámetro en estudio	Parámetro clínico		
	NAS		Fibrosis <sup>(*)</sup>
	r	p	
Frecuencia relativa de Mo CD69 <sup>+</sup>	0,890	0,001	-
Frecuencia relativa de Mo IL-6 <sup>+</sup>	0,719	0,018	-
Porcentaje de endocitosis	-0,226	ns	-

La tabla muestra el coeficiente de Spearman (r) y el valor p para cada correlación realizada entre los parámetros histológicos en estudio y la magnitud del efecto modulador que ejerce Res sobre la frecuencia de Mo CD69<sup>+</sup> (n= 13), la producción de IL-6 (n= 14) y la endocitosis (n= 17). Las correlaciones se llevaron a cabo mediante el test de Spearman. Valores de p < 0,05 fueron considerados significativos. ns: no significativo; NAS: *NAFLD Activity Score*.

<sup>(\*)</sup> No se disponían de los datos histológicos de fibrosis suficientes para realizar las correlaciones.

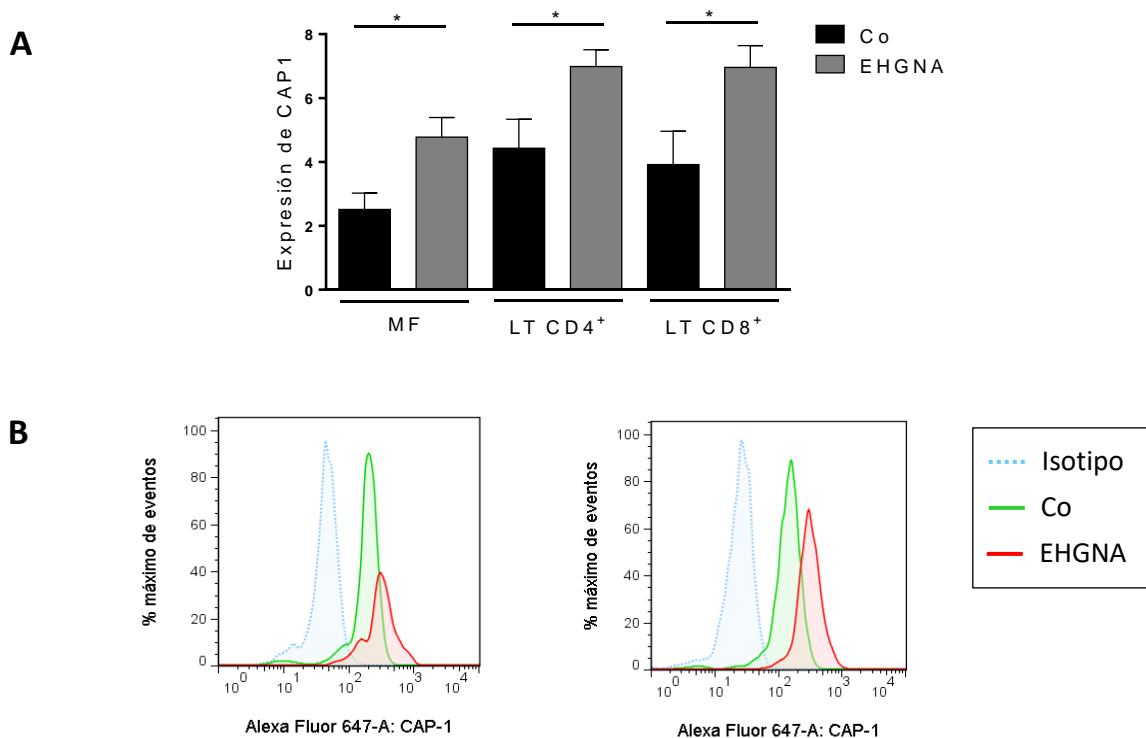
## 2. Células inmunológicas hepáticas: MF y LT

Debido a que el proceso inflamatorio en las EHGNA ocurre principalmente en el hígado, es importante analizar el efecto de Res sobre las células hepáticas. Más aún, el estudio de posibles correspondencias entre la capacidad regulatoria de Res en células periféricas y hepáticas posee gran relevancia clínica, ya que permitiría evaluar indirectamente el hígado de manera más simple y menos invasiva.

2.1. Expresión proteica de CAP-1

MF y LT hepáticos de pacientes con EHGNA presentaron niveles elevados de CAP-1, como se observó en periferia. En MF provenientes de hígado de pacientes con EHGNA, la expresión proteica promedio de CAP-1 resultó ser un 90% mayor que en MF provenientes de hígado control ( $p=0,022$ ). Por su lado, las subpoblaciones de LT  $CD4^+$  y  $CD8^+$  de pacientes exhibieron una expresión promedio de CAP-1 58% ( $p=0,031$ ) y 78% ( $p=0,031$ ) mayor, respectivamente (Figura 29 A-B).

Cabe destacar que la expresión de CAP-1 en MF y LT hepáticos correlacionó positivamente con el NAS, y también con el grado de fibrosis en MF (Tabla 9), indicando que existe una asociación directa entre la expresión proteica del receptor de Res y el daño hepático.



**Figura 29. Expresión proteica de CAP-1 en suspensiones celulares hepáticas.** A. Expresión de CAP-1 en macrófagos (MF,  $n=5$ ) y LT hepáticos ( $n=6$ ) de controles (Co) y de pacientes con EHGNA. La comparación se realizó mediante el test t de Student. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. B. Histogramas representativos de la expresión de CAP-1 en MF (izquierda) y LT (derecha). Se muestra la fluorescencia emitida por el control de isotipo (celestine) y por CAP-1 en Co (verde) y EHGNA (rojo). \*  $p < 0,05$ .

**Tabla 9. Correlaciones entre parámetros histológicos y la expresión de CAP-1 en MF y LT hepáticos.**

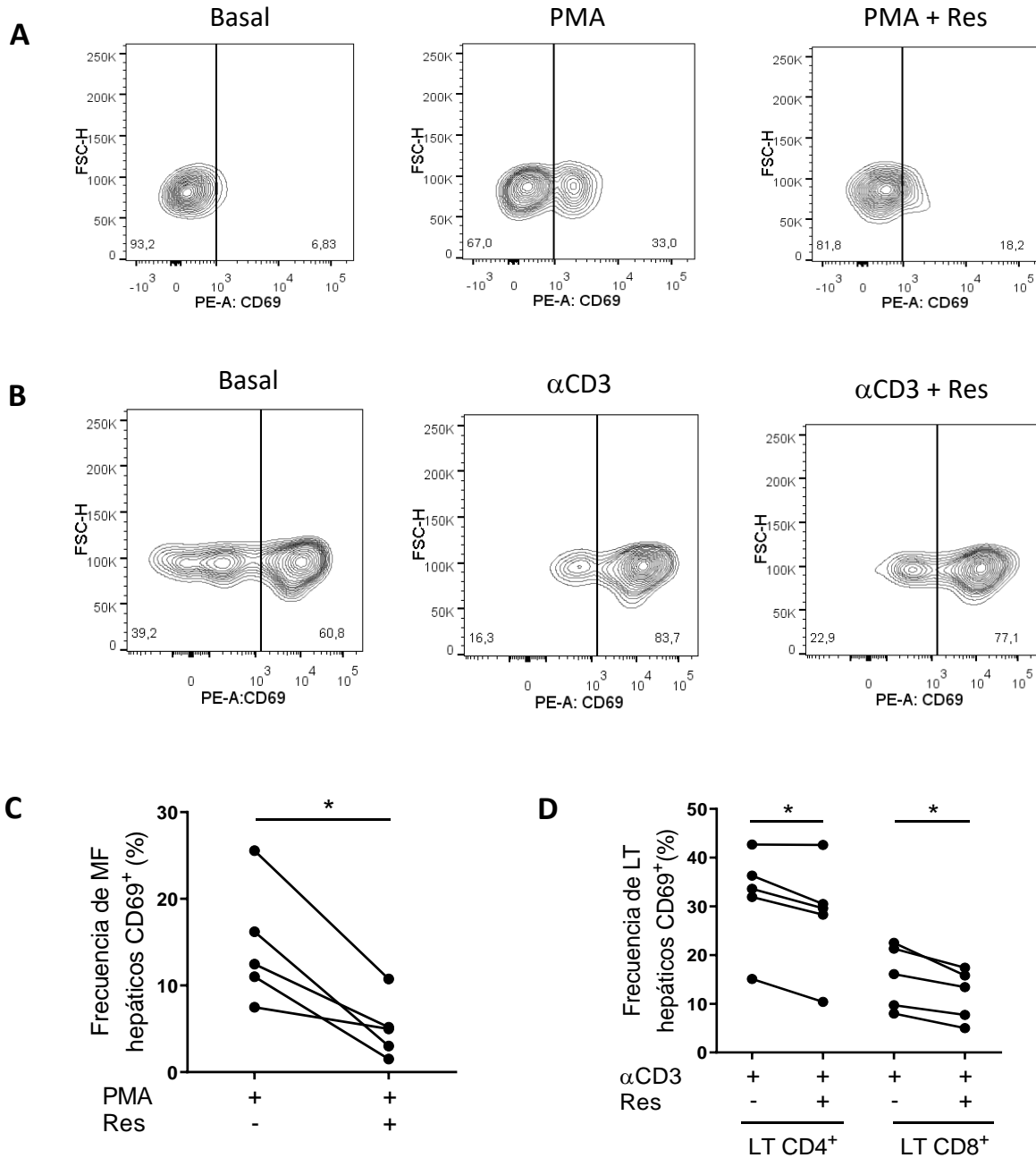
Parámetro en estudio	Población celular	Parámetro clínico			
		NAS		Fibrosis	
		r	p	r	p
Expresión de CAP-1	MF	0,680	0,026	0,637	0,044
	LT CD4 <sup>+</sup>	0,633	0,043	0,459	ns
	LT CD8 <sup>+</sup>	0,616	0,049	0,472	ns

La tabla muestra el coeficiente de Spearman (r) y el valor p para cada correlación realizada entre parámetros histológicos y la expresión proteica de CAP-1 en MF (n= 11) y LT hepáticos (n= 11) provenientes de controles y pacientes con EHGNA. Las correlaciones se llevaron a cabo mediante el test de Spearman. Valores de p < 0,05 fueron considerados significativos. ns: no significativo; NAS: *NAFLD Activity Score*.

## 2.2. Modulación de la activación celular por Res

Para estudiar si la modulación que ejerce Res sobre la activación de células mononucleares periféricas también se produce en las células hepáticas, se activaron suspensiones celulares hepáticas en presencia de Res y se determinó la activación celular utilizando el marcador CD69.

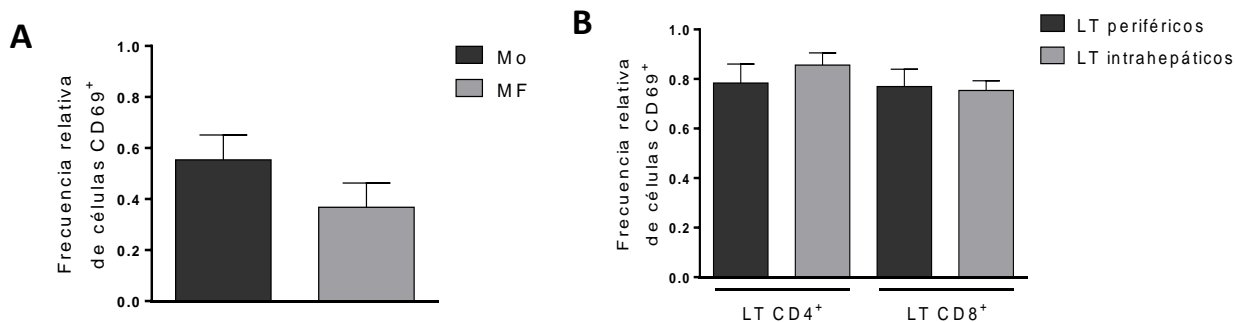
Al igual que sucedió en periferia, la Res previno en un 65% la activación de MF provenientes de hígado control (p= 0,012) (Figura 30 A,C). Lo mismo ocurrió para LT hepáticos, en los que el efecto preventivo de Res sobre la activación inducida por anti-CD3 fue en promedio de 15% en la subpoblación CD4<sup>+</sup> (p= 0,019) y de 25% en la subpoblación CD8<sup>+</sup> (p= 0,011) (Figura 30 B,D).



**Figura 30. Modulación de la activación de MF y LT hepáticos inducida por Res.** Suspensiones celulares hepáticas fueron activadas con PMA (10 ng/ml) o con anti-CD3 (0,5  $\mu$ g/ml) adherido a la placa en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 24 h. **A-B.** Dot Plots representativos de la frecuencia de MF CD69<sup>+</sup> (A) y LT CD69<sup>+</sup> (B) provenientes de un control para los distintos tratamientos. **C-D.** Frecuencia de MF (C) y LT (D) que expresan CD69 provenientes de Co (n = 5). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la frecuencia en ausencia o presencia de Res para el mismo individuo. \* p < 0,05.

2.3. Estudio comparativo del efecto preventivo ejercido por Res sobre la activación temprana entre células mononucleares periféricas y hepáticas

Si bien se observó el efecto preventivo de Res sobre la activación celular tanto en CMSP como en células inmunológicas hepáticas, para evaluar si la magnitud de dicho efecto fue similar, se compararon las frecuencias relativas de células CD69<sup>+</sup> entre el compartimiento periférico y hepático. La frecuencia relativa se obtuvo del cociente entre la frecuencia de células CD69<sup>+</sup> activadas en presencia de Res y la frecuencia de células CD69<sup>+</sup> activadas en ausencia de Res. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia relativa entre células hepáticas y periféricas, lo que indicaría que el efecto preventivo de Res sobre la activación de las células inmunológicas es similar entre ambos compartimientos (Figura 31).



**Figura 31. Análisis comparativo de la magnitud de la modulación de la activación celular inducida por Res entre células inmunológicas periféricas y hepáticas.** CMSP o suspensiones celulares hepáticas provenientes de controles fueron activadas con PMA o con anti-CD3 (0,5 µg/ml) adherido a la placa en presencia o ausencia de Res (10 ng/ml) durante 24 h. Se presenta la frecuencia relativa de Mo y MF hepáticos (A) o de LT periféricos e intrahepáticos (B) que expresan CD69. La frecuencia relativa se obtuvo como el cociente entre la frecuencia de células activadas en presencia de Res y la frecuencia de células activadas en su ausencia. La comparación entre células de ambos compartimientos se realizó mediante el test t de Student para cada población celular.



La inflamación metabólica se caracteriza por ser una inflamación estéril de bajo grado, crónica y persistente, a diferencia de la inflamación aguda desarrollada en sepsis, en la que una fuerte respuesta inmunológica es seguida por su resolución. Si bien diversos factores influyen en el desarrollo de la inflamación metabólica, la obesidad y el síndrome metabólico son patologías clave. En primer lugar, la acumulación ectópica de lípidos no es exclusiva de tejidos metabólicos, sino que también se ha observado en tejidos inmunológicos como la médula ósea y el timo, alterando el desarrollo y la diversidad leucocitaria<sup>213</sup>. Por otro lado, los parámetros asociados al síndrome metabólico tienen funciones inmunomoduladoras, por lo que el estado metabólico del individuo tiene un impacto directo sobre la funcionalidad de las células inmunológicas. Así, por ejemplo el HDL tiene propiedades antiinflamatorias y otorga protección ante la inflamación inducida por LPS, por lo que bajos niveles de HDL favorecen la activación celular<sup>214</sup>. La insulina promueve la diferenciación de LT a un perfil Th2<sup>215</sup>, mientras que la absorción excesiva de glucosa promueve una respuesta hiperreactiva<sup>216</sup>. Las EHGNA son el resultado de la disfunción metabólica y, por lo tanto, son consideradas como la manifestación hepática del síndrome metabólico. De hecho, en el esfuerzo por integrar los conocimientos actuales en el grupo heterogéneo de pacientes incluidos bajo el acrónimo de EHGNA, se ha sugerido el cambio a “enfermedades del hígado graso asociado a la disfunción metabólica” (MAFLD, del inglés *metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease*) como nueva nomenclatura que refleja mejor la patogénesis<sup>217</sup>. Por consiguiente, se asume que la alteración de los parámetros metabólicos asociada a las EHGNA genera cambios funcionales en las células inmunológicas que impactarán sobre la severidad de la patología. Dada la importancia de las células mononucleares en el desarrollo y progresión de las EHGNA, nos enfocamos en el papel de Res sobre la regulación de diversos aspectos funcionales de estas células.

Gracias a la participación de CAP-1 en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, su estudio se focalizó en su participación en distintos tipos de cáncer, en los que CAP-1 está sobreexpresada y favorece la proliferación y migración de células tumorales<sup>218-220</sup>. Con el descubrimiento de CAP-1 como receptor de Res, su estudio se expandió a otros tipos celulares. Dentro de las CMSP, la presencia de CAP-1 sólo fue estudiada en Mo<sup>182</sup>.

Debido a que no se ha estudiado la expresión de CAP-1 en células linfoides, realizamos un *screening* en distintas poblaciones celulares, demostrando por primera vez que la expresión de CAP-1 en células de origen linfoide es mayor que la expresión presente en Mo. Estas observaciones sugieren que las células linfoides, a pesar de ser menores productoras de Res, son blancos potenciales.

Trabajos recientes han reportado una expresión de CAP-1 elevada en CMSP de pacientes con cáncer<sup>221</sup>, enfermedad renal<sup>222</sup> y enfermedad coronaria<sup>223</sup>. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la expresión proteica de CAP-1 se encuentra elevada en Mo y LT de pacientes con EHGNA. La expresión diferencial de CAP-1 entre LT de pacientes con EHGNA y de controles también se refleja a nivel génico. De estos hallazgos surge la posibilidad de que estas células respondan a Res de forma diferente según provengan de controles o de pacientes con EHGNA. Cabe destacar que, similar a lo observado en periferia, MF y LT hepáticos presentaron una elevada expresión proteica de CAP-1. Esto podría ser consecuencia del reclutamiento de las células periféricas al hígado en el contexto de las EHGNA. Sin embargo, dado que no es posible distinguir las células hepáticas residentes de las reclutadas, no podemos descartar que también exista una alteración en la expresión de CAP-1 en las células hepáticas residentes de estos pacientes.

Los análisis de correlaciones con datos clínicos nos permiten detectar asociaciones entre los parámetros estudiados en las células mononucleares y diversos parámetros clínicos característicos de las EHGNA. El IMC y la circunferencia de cintura son parámetros indicadores de obesidad, mientras que el NAS y el grado de fibrosis son indicadores del daño histológico hepático. La correlación positiva entre la expresión de CAP-1 y los parámetros clínicos sugiere que el aumento en los niveles de CAP-1 en CMSP está asociado con la obesidad, el compromiso hepático, y también con algunos factores que definen al síndrome metabólico como la glucemia y los niveles de triglicéridos. A su vez, el aumento de la expresión proteica de CAP-1 en células inmunológicas mononucleares hepáticas se asociaría con la severidad de las EHGNA.

Uno de los mecanismos por los que algunas moléculas regulan su acción es mediante la modulación de la expresión de su receptor. El incremento en la expresión proteica de

CAP-1 inducida por Res en Mo y LT sugiere que es un mecanismo mediante el cual Res aumentaría su acción. Si bien no fue probado en células provenientes de pacientes, teniendo en cuenta que los niveles séricos y la expresión hepática de Res se encuentran elevados en pacientes con EHGNA<sup>224</sup>, éste podría ser un mecanismo que explique la alta expresión de CAP-1 observada. Sin embargo, los mecanismos que regulan la expresión de CAP-1 son desconocidos, por lo que no podemos descartar la influencia de otros factores que contribuyan con la elevada expresión observada en pacientes.

En línea con los estudios de CAP-1 como receptor de Res, diversos autores evaluaron los efectos de Res sobre la respuesta inmunológica de Mo y neutrófilos, dejando rezagados a los estudios en células linfoides. Además, dado que la expresión de Res en los LT es menor que en Mo y neutrófilos, no se le ha prestado suficiente atención a la contribución de los LT al *pool* de Res en contextos patológicos. La alta expresión de Res observada en LT de pacientes con EHGNA en asociación con la severidad de la hepatopatía sugiere que los LT contribuyen activamente al *pool* de Res en el contexto de las EHGNA. Más aún, dada la relevancia del infiltrado linfocitario hepático en la patogénesis de las EHGNA<sup>143</sup>, es posible que los LT contribuyan significativamente a los altos niveles hepáticos de Res observados en estudios anteriores<sup>196,224</sup>. Sin embargo, no se han estudiado los mecanismos inductores de la expresión de Res en LT. Se ha observado que Res induce su propia expresión en CMSP<sup>225</sup> y, en concordancia, nuestros resultados demuestran que Res induce su propia expresión en LT, aunque este mecanismo parece estar alterado en LT de pacientes con EHGNA. En condiciones inflamatorias, factores como LPS y TNF- $\alpha$  inducen la expresión de Res en Mo y neutrófilos<sup>163</sup> que, al infiltrar al hígado inflamado, contribuyen al aumento local de Res. Así, una posibilidad es que la expresión de Res en LT de pacientes sea inducida por estos factores proinflamatorios, que se encuentran aumentados en el contexto de las EHGNA.

Debido a que CAP-1 se encuentra asociada con la enzima adenilato ciclasa, la activación de esta enzima y la consecuente producción de AMPc es una de las primeras respuestas ante la activación de CAP-1<sup>190</sup>. En concordancia con esta evidencia, Res indujo la producción de AMPc en LT de controles. Llamativamente, no observamos cambios en la

concentración de AMPc en respuesta a Res en LT de pacientes con EHGNA, evidenciando una alteración en su respuesta a Res. Esta respuesta deficiente, a pesar de la presencia de altos niveles de CAP-1, sugiere una alteración en la vía de señalización de Res asociada al eje CAP-1/adenilato ciclasa/AMPc.

El AMPc es un segundo mensajero capaz de activar una serie de caminos de señalización que desencadenan diferentes respuestas biológicas. En leucocitos, el AMPc es un reconocido modulador negativo de la respuesta inmunológica a través de la inducción de dos vías, la vía de PKA y la vía de la proteína de intercambio activada directamente por AMPc (EPAC, por sus siglas en inglés *exchange protein directly activated by cAMP*)<sup>226</sup>. Ambas vías juegan un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y, por ende, su regulación es crucial para evitar una respuesta inmunológica excesiva o deficiente.

En LT, la vía AMPc/PKA actúa como un potente inhibidor de la activación celular al interferir en la señalización mediada por el TCR. Luego de la activación del TCR, la PKA se redistribuye y colocaliza con el complejo TCR/CD3. Allí, la forma activa de la PKA fosforila e inhibe la actividad de proteínas intermediarias que promueven la señalización del TCR, modulando negativamente dicha señalización<sup>227</sup>. La molécula CD69 es un receptor de membrana cuya expresión es escasa en LT quiescentes, pero que es rápidamente inducida luego de la activación del complejo TCR/CD3, motivo por el cual es ampliamente usada como marcador temprano de activación<sup>228</sup>. Nuestros resultados sugieren que Res está involucrada en la modulación negativa de la activación de LT mediante la inducción de la producción de AMPc y la consecuente interferencia de la vía de señalización del complejo TCR/CD3. Los resultados obtenidos con LT purificados indican que la Res actúa directamente sobre los LT, modulando la frecuencia de células activadas. Sin embargo, los cultivos de CMSP mostraron que Res es capaz de modular no sólo la frecuencia celular, sino también de la cantidad de moléculas CD69 presentes en la superficie celular. Este hallazgo sugiere que la presencia de otros tipos celulares influye en la regulación de la activación de LT inducida por Res, intensificando su efecto. Otro resultado llamativo es que la regulación de la frecuencia de LT activados sólo se observó a dosis bajas de Res, coincidente con la concentración fisiológica, perdiéndose a dosis altas. Por otro lado, la regulación de la

expresión de CD69 en el contexto de las CMSP no fue suprimida a altas dosis de Res. Tomando estos datos en su conjunto, Res parece tener un efecto antiinflamatorio directo sobre LT a dosis fisiológicas que desaparece a dosis altas, y un efecto influenciado por otros tipos celulares que se mantiene en todas las dosis probadas. La concentración fisiológica de Res en plasma es de 3-20 ng/ml<sup>224,229,230</sup>, observándose concentraciones de hasta 60 ng/ml en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea<sup>231</sup>. Varios trabajos han publicado efectos inflamatorios de Res utilizando dosis suprafisiológicas (100-3000 ng/ml), que no se observan a concentraciones fisiológicas<sup>174,225,232</sup>. Los primeros estudios estructurales de Res revelaron que tiende a agregarse de manera dosis dependiente, formando oligómeros a través de puentes disulfuro<sup>233</sup>. *In vitro*, la Res se encuentra predominantemente en forma de trímeros y oligómeros. El aumento de la concentración de Res favorece la formación de oligómeros, que da lugar a un cambio conformacional en su estructura secundaria de la forma alfa hélice a la forma lámina beta<sup>234</sup>. La forma oligomérica de Res muestra un efecto estimulador de la producción de citoquinas proinflamatorias<sup>234</sup>. Por lo tanto, considerando que la conformación estructural y los efectos de Res pueden variar según su concentración, es imperioso elegir cuidadosamente la dosis a utilizar para aproximarse de forma más precisa a lo que sucede *in vivo*. Cabe destacar que CAP-1 interactúa con el homotrímero de Res<sup>182</sup>, y no hay bibliografía acerca de su interacción con los oligómeros. Esto abre la posibilidad de que Res interactúe con distintos receptores según su grado de oligomerización, determinado por su concentración, induciendo diferentes tipos de respuesta.

El efecto regulatorio negativo ejercido por Res sobre la activación de LT se mantuvo incluso en estadios tardíos de activación, evidenciado por la modulación del marcador CD25. La molécula CD25 es la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 y su expresión es regulada a nivel transcripcional por la señalización a través del TCR. La activación del TCR induce la expresión de IL-2 y de CD25, iniciando la segunda cascada de señalización que culminará con la proliferación celular<sup>235</sup>. La presencia de CD25 regula la magnitud de la proliferación de LT gracias a que aumenta 100 veces la afinidad del receptor de IL-2 por su ligando, permitiendo la expansión clonal a bajas concentraciones de IL-2<sup>236</sup>. Demostramos que la

regulación negativa ejercida por Res sobre la activación de LT es suficiente para modular negativamente su proliferación. La regulación de la expansión clonal es clave para asegurar una respuesta inmunológica eficiente y, simultáneamente, evitar la inmunopatología. Estos resultados demuestran por primera vez que la Res, a concentraciones fisiológicas, es una molécula reguladora de la respuesta de LT.

Lee y col. demostraron que Res aumenta la concentración intracelular de AMPc y activa a la enzima PKA mediante la activación de CAP-1 en Mo<sup>182</sup>. En Mo y MF, el AMPc regula funciones de gran relevancia como la fagocitosis, la producción de citoquinas y la reprogramación celular. La reprogramación es un evento clave en la resolución de la inflamación que consiste en el cambio fenotípico y funcional de MF con un perfil inflamatorio a un perfil antiinflamatorio. Este cambio está acompañado por la elevación de AMPc<sup>237</sup>. Por lo tanto, la inducción de la producción de AMPc por Res podría ser responsable de la modulación negativa de la activación celular observada en Mo.

Un evento importante en la progresión de las EHGNA es la activación de los TLR en Mo y MF. En este contexto, el TLR4 toma especial relevancia debido a la traslocación de endotoxinas como LPS desde el intestino<sup>238</sup>. La activación del TLR4 induce una cascada de señalización que culmina con la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citoquinas proinflamatorias, entre ellas IL-6 y TNF- $\alpha$ <sup>239</sup>. Nuestros resultados muestran que Res disminuye la producción de IL-6 inducida por LPS. Este resultado coincide con lo observado en un trabajo previo, en el que se propone que Res se une al TLR4 inhibiendo la producción de citoquinas inducida por LPS<sup>181</sup>. En línea con estas observaciones, otro trabajo mostró que Res interactúa con el monómero de TLR4 generando un bloqueo estérico que impide la unión del complejo LPS/MD2 al TLR4, inhibiendo de esta forma el efecto inflamatorio del LPS y protegiendo de un shock endotóxico. Según los autores, la Res también inhibe la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por LPS e induce la producción de IL-10 mediante un mecanismo dependiente de STAT3 a través de TLR4<sup>240</sup>. En contraposición con el posible rol de TLR4 como receptor de Res, Lee y col. manifestaron que los efectos de Res se deben exclusivamente a su unión a CAP-1, excluyendo posibles efectos a través de TLR4<sup>182</sup>. Por lo tanto, este punto aún permanece controversial. Sin embargo, considerando

que CAP-1 es una proteína citosólica y que no se conoce cómo la Res ingresaría a la célula para interactuar con ella, no descartamos la posibilidad de que su ingreso sea a través de su unión con TLR4. Por otro lado, un bloqueo del TLR4 llevaría a la disminución de la producción tanto de IL-6 como de TNF- $\alpha$  y, considerando que no observamos una disminución de la producción de TNF- $\alpha$ , el efecto de Res en nuestro sistema parecería estar dado por la activación de vías de señalización que generan una modulación negativa selectiva sobre la producción de IL-6.

El control de las vías activadas por el TLR4 es crítico, ya que su activación excesiva puede llevar a desordenes inflamatorios crónicos. Las moléculas que regulan negativamente la señalización activada por el TLR suelen ser inducidas por el ligando, sirviendo como mecanismo de retroalimentación negativa para mantener la homeostasis y prevenir la activación excesiva<sup>241</sup>. El AMPc es uno de los mediadores involucrados en esta regulación negativa. El AMPc inhibe la producción de TNF- $\alpha$ <sup>242-245</sup> e IL-6<sup>245</sup> inducida por LPS e induce la producción de IL-10<sup>244,245</sup> a través de la activación de la vía de PKA. La activación de esta vía inhibe la acción de NF- $\kappa$ B de varias formas. Por un lado, evita la degradación de I $\kappa$ B, inhibiendo su traslocación al núcleo. Por otro lado, favorece la formación de homodímeros que actúan como represores de la transcripción génica mediada por NF- $\kappa$ B<sup>244</sup>. Esta acción regulatoria del AMPc es específica para genes inflamatorios, y no afecta la transcripción de otros genes<sup>244</sup>. Por lo tanto, el aumento de AMPc y la activación de la vía de PKA son posibles mecanismos que podrían estar involucrados en la regulación negativa de la respuesta inflamatoria inducida por Res.

Teniendo en cuenta que el microambiente hepático es diferente al periférico y, por lo tanto, que la respuesta de las células hepáticas puede variar respecto de lo observado en periferia, evaluamos el efecto de Res sobre la activación celular a nivel local. Lamentablemente, no se realizaron los ensayos con muestras hepáticas de pacientes con EHGNA debido a la dificultad de obtener la cantidad de células mononucleares necesarias para realizar los cultivos. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de las muestras de hígado control nos aportan información sobre el efecto de Res en células provenientes de un contexto hepático fisiológico. La modulación negativa de la activación de MF y LT

hepáticos inducida por Res, de magnitud comparable a la observada en Mo y LT periféricos, le aporta relevancia clínica a nuestro estudio en la búsqueda de potenciales marcadores de EHGNA cuya detección no sea invasiva.

Los pacientes con EHGNA presentan alteraciones en la distribución y fenotipo de las células inmunológicas circulantes. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la alteración en la distribución de la población de LT se caracteriza por un aumento en la frecuencia de células de memoria en detrimento de la población de células vírgenes, lo que pone en evidencia la presencia de un proceso inflamatorio sistémico<sup>246</sup>. En la población de Mo, la alteración se caracteriza por el aumento de la frecuencia de Mo CD16<sup>+</sup> (intermedios y no clásicos), en concomitancia con la disminución de la subpoblación de Mo clásicos<sup>247</sup>. Nuestros resultados mostraron que LT y Mo de pacientes con EHGNA presentan una activación exacerbada respecto a su contraparte en controles. Además, presentaron una disminución de la respuesta a Res, lo que llevó a una escasa inducción de la producción de AMPc y a una deficiencia en la regulación negativa de la activación celular. Una inadecuada modulación negativa de la activación celular da lugar a un estado de hiperactivación que, en última instancia, genera daño tisular. De hecho, la correlación positiva entre la disminución del efecto inhibitorio de Res sobre la activación celular y la severidad de la hepatopatía sugiere que la falta de respuesta a Res en Mo y LT contribuye con la progresión de las EHGNA. Como consecuencia de esta regulación deficiente de la activación celular, los LT de pacientes con EHGNA presentaron una alta tasa de proliferación en presencia de Res. La expansión clonal excesiva en un contexto inflamatorio como el de las EHGNA posiblemente da lugar a linfocitos efectores con un perfil inflamatorio, capaces de contribuir con el mantenimiento de la inflamación crónica.

En el caso de los Mo, la elevada producción de citoquinas inflamatorias en respuesta al LPS evidencia una hiperreactividad en las células de pacientes con EHGNA. La hipersensibilidad al LPS en Mo y MF de pacientes con EHGNA fue descrita previamente. Uno de estos estudios la atribuyó al aumento de la expresión de TLR4 y a la influencia de algunos ácidos grasos saturados<sup>248</sup>. La hiperreactividad de las células de Kupffer frente al LPS también fue adjudicada al aumento de CD14 inducido por leptina<sup>249</sup>.



Como se mencionó, en las EHGNA las endotoxinas llegan a la circulación y al hígado como parte del mecanismo patológico y agravan aún más los efectos inflamatorios de una respuesta ya exacerbada. Teniendo en cuenta que la IL-6 es una de las citoquinas producidas durante este proceso, la incapacidad de Res de ejercer su efecto inhibitorio sobre la producción de IL-6 contribuiría con el estado inflamatorio. La hipersensibilidad al LPS descrita anteriormente podría ser una de las causas por las que Res falla en regular negativamente la producción de IL-6 en Mo de pacientes con EHGNA. En LT, la IL-6 promueve la proliferación celular<sup>250</sup>, inhibe apoptosis de células activadas<sup>251</sup>, y posee un rol crítico en la regulación del balance entre las células Th17 y las células T regulatorias. Respecto a este último punto, la IL-6 induce la diferenciación de LT vírgenes al perfil Th17, mientras que inhibe la diferenciación de células T regulatorias inducida por TGF- $\beta$ <sup>252</sup>. Por lo tanto, sumada a la elevada proliferación de LT de pacientes debida a la disminución de la respuesta a Res en estas células, la falta de inhibición de la producción de IL-6 en Mo actuaría parácrinamente sobre los LT favoreciendo aún más su proliferación y, a su vez, su diferenciación al perfil Th17. Las células Th17 están presentes en alto número en hígado y sangre periférica de pacientes con EHGNA, y participan activamente en el desarrollo de esteatosis e inflamación<sup>253</sup>, y también en el proceso de fibrosis<sup>254,255</sup>.

La migración celular es un proceso de suma importancia inmunológica, ya que los leucocitos deben estar en el momento y lugar adecuados para cumplir su función correctamente. La presencia de quimioquinas induce la polarización celular formando un lamelipodio en el borde celular, dependiente de la dinámica de actina. La señalización ejercida por las quimioquinas activa a la cofilina en el lamelipodio<sup>256</sup>, cuya regulación espacio-temporal es necesaria para asegurar el movimiento y la direccionalidad adecuados durante la migración celular<sup>257</sup>. CAP-1 secuestra monómeros de actina y coopera activamente con cofilina acelerando la despolimerización de los filamentos de actina durante la migración celular. La depleción de CAP-1 en células de mamíferos lleva a una formación excesiva de filamentos de actina, posiblemente debida a la mayor disponibilidad de monómeros de actina, y a la alteración en la localización y activación de cofilina<sup>258</sup>, demostrando la importancia de CAP-1 en el proceso de migración celular. Se ha demostrado

que Res tiene propiedades quimioattractantes sobre Mo, dependiente de la capacidad de CAP-1 de unirse a la actina, pero independiente de su capacidad de unión a la enzima adenilato ciclasa<sup>182</sup>. Nuestros resultados muestran que Res induce la migración de LT actuando como quimioquina, en concordancia con un estudio previo<sup>259</sup>. Los LT de pacientes con EHGNA respondieron normalmente a Res, migrando de forma comparable con los LT de controles. Por lo tanto, la alteración en la respuesta a Res observada en células de pacientes con EHGNA parece no afectar la regulación de la dinámica de actina. Este hallazgo deja en evidencia la presencia de al menos dos vías de señalización a través de las cuales Res ejercería su acción. Por un lado, una vía que regula la migración celular y que no se encuentra afectada en el contexto de las EHGNA y, por otro lado, una vía que regula la activación y proliferación celular mediante la modulación de la señalización a través del TCR y el eje adenilato ciclasa/AMPC, y que se encuentra alterada en las EHGNA. Estos resultados coinciden con la independencia entre la propiedad quimioattractante de Res y el eje CAP-1/adenilato ciclasa demostrada previamente en Mo<sup>182</sup>. Dicha independencia entre ambas vías también explicaría que la presencia de Res durante la activación de LT previa al ensayo de migración no haya afectado su capacidad migratoria.

La endocitosis es un proceso a través del cual las células toman nutrientes, internalizan receptores y regulan la señalización celular. Este proceso está estrechamente vinculado con la dinámica de actina. Dada la asociación de CAP-1 con este proceso, evaluamos la influencia de Res sobre la endocitosis de partículas de látex. La Res indujo la incorporación de las partículas en Mo de controles, pero no en Mo de EHGNA. Esta escasa incorporación de partículas en Mo de pacientes no se debe a una alteración en el mecanismo de endocitosis, ya que tanto la internalización basal de las partículas como la inducida por LPS fueron comparables con las observadas en controles. Se reportó que Res induce la endocitosis del receptor de LDL en hepatocitos mediante la inducción de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9, por sus siglas en inglés *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*)<sup>260</sup>. Esta proteína se une al receptor de LDL e induce su degradación luego de ser endocitado. Llamativamente, el dominio rico en cisteínas de la proteína PCSK9 es estructuralmente homólogo al dominio C-terminal de Res a través del

cual se une a CAP-1, indicando que podrían compartir el mismo receptor<sup>261</sup>. Posteriormente, se reportó que la proteína PCSK9 se une a CAP-1 e induce la endocitosis del receptor de LDL mediada por caveolina 1, vía endocítica que lleva a su degradación<sup>262</sup>. Por lo tanto, es posible que Res induzca la endocitosis de las partículas de látex a través de su unión a CAP-1. Estas observaciones abren un nuevo panorama sobre el papel de Res en la regulación de la señalización a través de este mecanismo.

Dada la elevada expresión de Res y de CAP-1 en células de pacientes con EHGNA, se esperaría que el impacto de Res sobre estas células fuera mayor que en las células de controles. Al contrario, observamos una disminución en la respuesta a Res en las células de pacientes con EHGNA debida, posiblemente, a una alteración en la vía de señalización de CAP-1, especialmente aquella asociada a la enzima adenilato ciclasa/AMPC. La disminución en la respuesta a Res dio lugar a una ineficiente regulación negativa de la activación celular, la proliferación, y la producción de citoquinas inflamatorias que, sumada a la hiperreactividad celular preexistente en el contexto de las EHGNA, determinaría un nivel de activación aún mayor y, a su vez, favorecería el estado de hiperreactividad celular, perpetuaría la inflamación y contribuiría con la progresión de las EHGNA.

# Capítulo II

---

El papel de Res en la regulación de la homeostasis redox de células inmunológicas mononucleares y su implicancia en

las EHGNA

El estrés oxidativo tiene un papel central en el desarrollo y progresión de las EHGNA. La acumulación excesiva de lípidos en el hígado causa estrés del metabolismo hepático, la sobreproducción de oxidantes y la acumulación de daño oxidativo en biomoléculas. Como consecuencia, se produce la activación de vías inflamatorias en células inmunológicas.

En el presente capítulo se exhibirán los resultados obtenidos respecto del estado oxidativo que presentan las células mononucleares periféricas y hepáticas de pacientes con EHGNA. También se mostrarán los efectos moduladores que ejerce Res sobre características asociadas a la homeostasis redox en células mononucleares, en relación con el contexto fisiopatológico del cual estas células provienen.

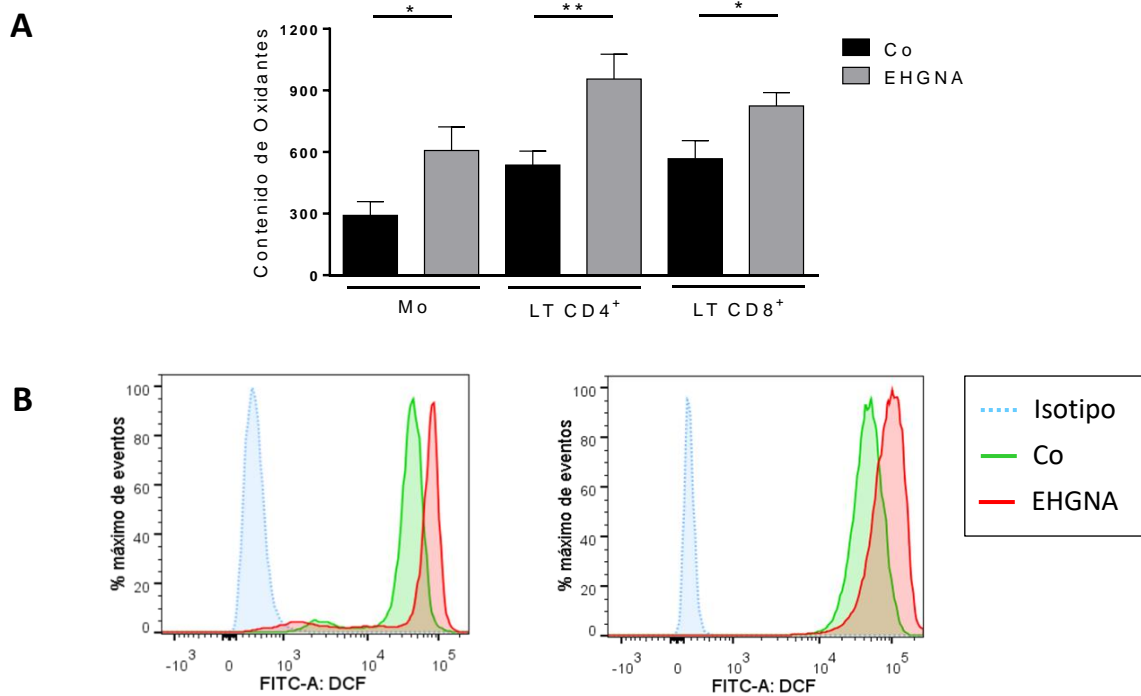
## 1. Células mononucleares de sangre periférica: Mo y LT

### 1.1. Estado oxidativo basal en CMSP de pacientes con EHGNA

Con el fin de estudiar el estado oxidativo que presentan las CMSP provenientes de pacientes con EHGNA, se evaluó el contenido de oxidantes y las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.

#### 1.1.1. Contenido de oxidantes

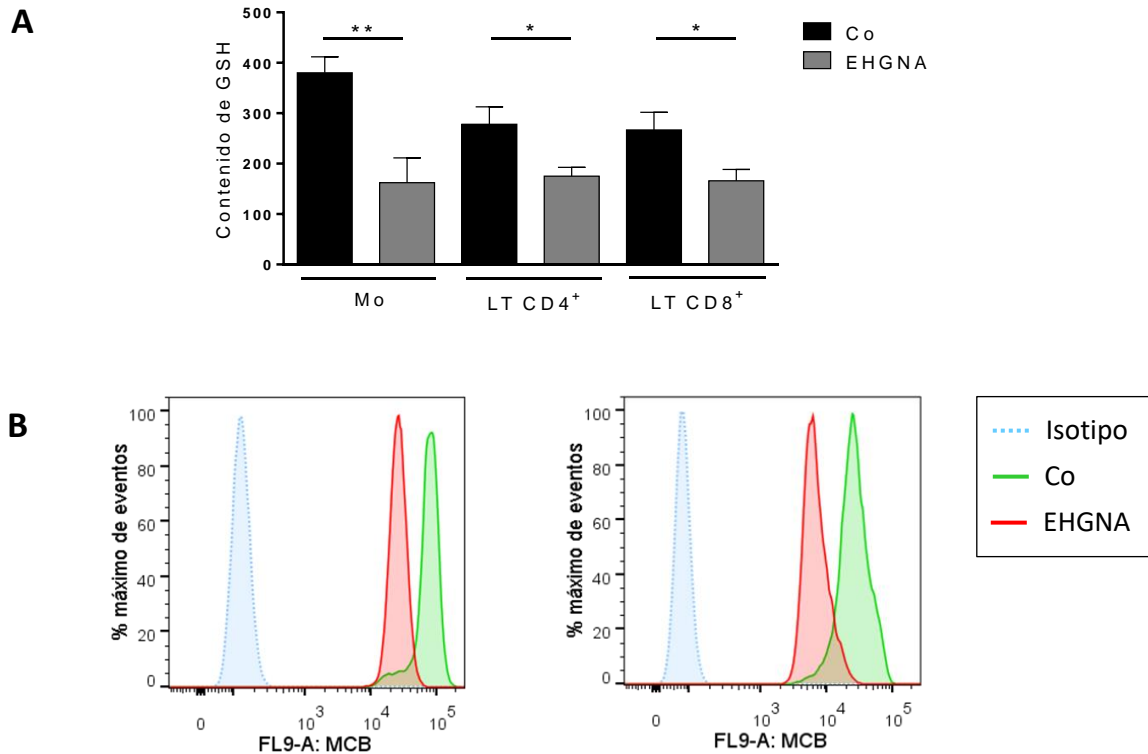
Para detectar el nivel de oxidantes presente en las células, se utilizó la sonda DCFH-DA que, al ser oxidada, origina un derivado cuya fluorescencia puede ser cuantificada por citometría de flujo. Mo y LT de pacientes con EHGNA presentaron mayores niveles de oxidantes en comparación con las respectivas poblaciones celulares provenientes de controles (Mo:  $p=0,024$ ; LT CD4<sup>+</sup>:  $p=0,006$ ; LT CD8<sup>+</sup>:  $p=0,039$ ) (Figura 32 A-B).



**Figura 32. Contenido de oxidantes en CMSP. A.** Contenido de oxidantes en Mo y LT de controles (n= 10) y de pacientes con EHGNA (Mo: n= 8; LT: n= 9). Los datos se presentan relativizados al FMO. La comparación se realizó mediante el test t de Student. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. **B.** Histogramas representativos de la fluorescencia emitida por el FMO (celeste) y por el DCF en Co (verde) y EHGNA (rojo) para Mo (izquierda) y LT (derecha). \*  $p < 0,05$ .

### 1.1.2. Contenido de glutatión reducido (GSH)

Dado que el sistema GSH-GSSG es el principal mecanismo de defensa antioxidante no enzimática capaz de mantener la homeostasis redox intracelular, se determinó el contenido de GSH en CMSP de pacientes con EHGNA. Para ello se utilizó la sonda MCB, que forma aductos fluorescentes con el GSH cuantificables mediante citometría de flujo. Como se esperaba, el contenido de GSH resultó ser menor en Mo y LT procedentes de pacientes con EHGNA respecto de su contraparte en controles (Mo:  $p = 0,002$ ; LT CD4<sup>+</sup>:  $p = 0,012$ ; LT CD8<sup>+</sup>:  $p = 0,029$ ) (Figura 33 A-B).

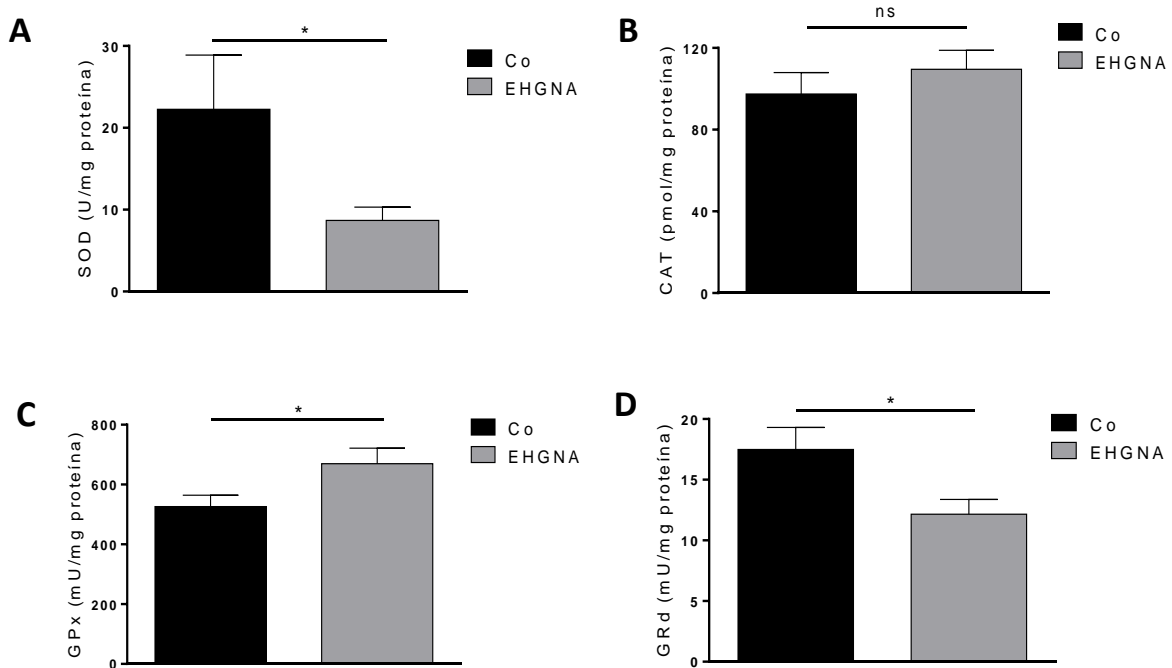


**Figura 33. Contenido de GSH en CMSP. A.** Contenido de glutatión reducido (GSH) en Mo y LT de controles (n= 10) y de pacientes con EHGNA (n= 5). Los datos se presentan relativizados al FMO. La comparación entre ambos grupos se realizó mediante el test t de Student (Mo) o el test de Mann-Whitney (LT). Las barras representan la media ± SEM. **B.** Histogramas representativos de la fluorescencia emitida por el FMO (celestes) y por el MCB-GSH en Co (verde) y EHGNA (rojo) para Mo (izquierda) y LT (derecha). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

### 1.1.3. Actividad enzimática antioxidante

Dentro de las defensas antioxidantes de tipo enzimáticas, se cuantificó la actividad de las principales enzimas encargadas de la neutralización de radicales libres mediante el método espectrofotométrico. Estas enzimas fueron la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd).

Las CMSP de pacientes con EHGNA presentaron menor actividad SOD (p= 0,034) (Figura 34 A) y GRd (p= 0,020) (Figura 34 D) que las células de controles. Por el contrario, la actividad GPx se encontró aumentada en CMSP de pacientes (p= 0,034) (Figura 34 C). No se encontraron diferencias en la actividad CAT entre ambos grupos (Figura 34 B).



**Figura 34. Actividad enzimática antioxidante en CMSP.** Se estudió la actividad superóxido dismutasa (SOD) (A), catalasa (CAT) (B), glutatión peroxidasa (GPx) (c) y glutatión reductasa (GRd) (D) en CMSP de controles (SOD: n= 7; CAT: n= 11; GPx: n= 12; GRd: n= 10) y de pacientes con EHGNA (SOD: n= 10; CAT: n= 13; GPx: n= 12; GRd: n= 12). La comparación entre ambos grupos experimentales se realizó mediante el test t de Student. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .

Para estudiar si existe una asociación entre los factores asociados a la homeostasis redox evaluados y parámetros antropométricos e histológicos de relevancia clínica, se realizaron correlaciones con el IMC, la circunferencia de cintura, el NAS y el grado de fibrosis. Los niveles de oxidantes en LT de pacientes con EHGNA correlacionaron positivamente con ambos parámetros antropométricos y con el NAS (Tabla 10). Por lo tanto, el alto contenido de oxidantes observado en LT de pacientes con EHGNA estaría asociado con el grado de obesidad, la obesidad central y con el compromiso hepático.

Respecto a las enzimas antioxidantes, la actividad GPx correlacionó positivamente con el IMC, mientras que la actividad GRd correlacionó negativamente con dicho parámetro antropométrico. A su vez, se observó una correlación negativa entre el NAS y las actividades SOD y GRd (Tabla 10). Estos análisis indican que la elevada actividad GPx y la baja actividad SOD observadas en CMSP de pacientes estarían asociadas al grado de obesidad y al



compromiso hepático, respectivamente, mientras que la reducida actividad GRd observada se asociaría con ambos factores.

**Tabla 10. Correlaciones entre parámetros de relevancia clínica y parámetros asociados a la homeostasis redox en CMSP.**

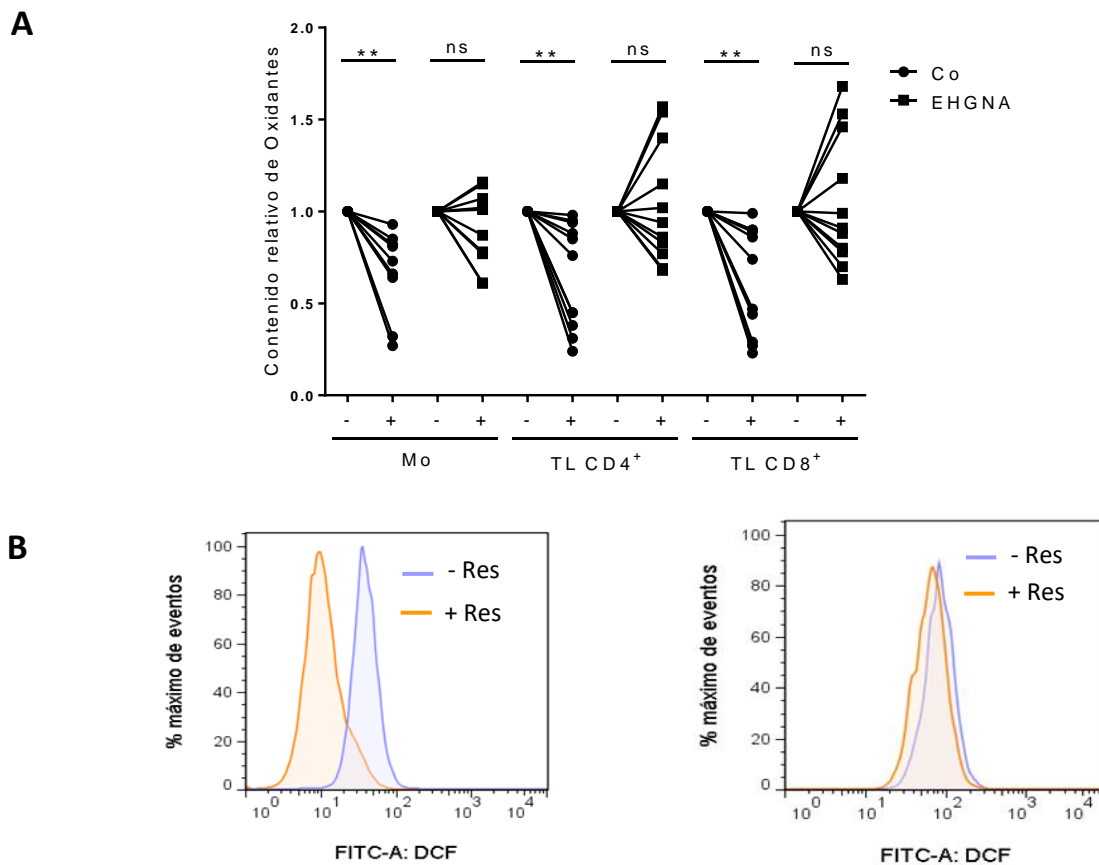
Parámetro en estudio	Población celular	Parámetro clínico							
		IMC		Circunferencia de cintura		NAS		Fibrosis	
		r	p	r	p	r	p	r	p
Contenido de oxidantes	Mo	0,300	ns	0,345	ns	0,131	ns	0,393	ns
	LT CD4 <sup>+</sup>	0,886	0,033	0,867	0,012	0,733	0,003	0,300	ns
	LT CD8 <sup>+</sup>	0,943	0,017	0,868	0,011	0,619	0,032	0,174	ns
Actividad SOD	CMSP	-0,133	ns	-0,072	ns	-0,623	0,026	-0,380	ns
Actividad CAT	CMSP	0,576	ns	0,594	ns	0,334	ns	0,179	ns
Actividad GPx	CMSP	0,612	0,046	0,336	ns	0,301	ns	0,232	ns
Actividad GRd	CMSP	-0,786	0,028	-0,386	ns	-0,501	0,042	-0,393	ns

La tabla muestra el coeficiente de Spearman (r) y el valor p para cada correlación realizada entre parámetros antropométricos e histológicos de relevancia clínica y los parámetros asociados a la homeostasis redox estudiados en condición basal. Las correlaciones se llevaron a cabo mediante el test de Spearman. Valores de p < 0,05 fueron considerados significativos. ns: no significativo; IMC: índice de masa corporal; NAS: *NAFLD Activity Score*.

## 1.2. Influencia de Res sobre parámetros asociados a la homeostasis redox

### 1.2.1. Modulación de los niveles de oxidantes por Res

Con el fin de estudiar si Res está involucrada en la modulación del contenido intracelular de oxidantes, se cultivaron CMSP en presencia o ausencia de Res durante 24 h y se cuantificaron los niveles de oxidantes mediante citometría de flujo. En controles, la Res indujo una disminución promedio del 33%, 35% y 37% en el contenido de oxidantes en Mo (p= 0,003), LT CD4<sup>+</sup> (p= 0,003), y LT CD8<sup>+</sup> (p= 0,002), respectivamente. En contraposición, no se observaron cambios inducidos por Res en el contenido de oxidantes en ninguna de las tres subpoblaciones celulares procedentes de pacientes con EHGNA (Figura 35 A-C).



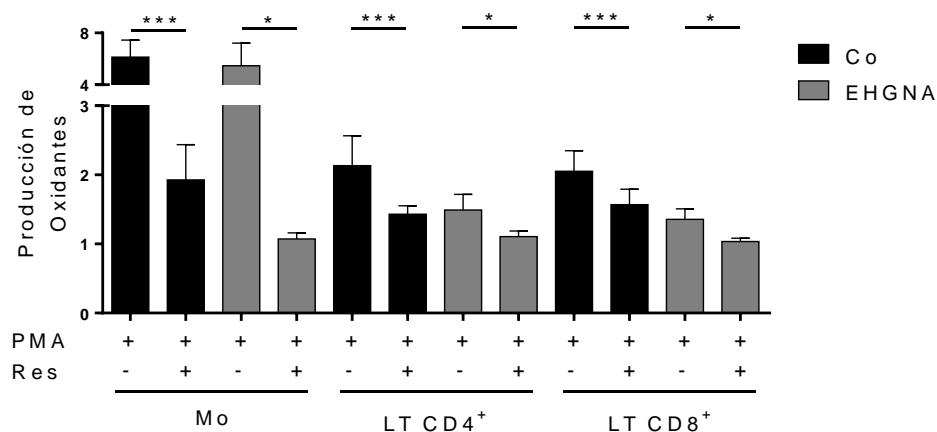
**Figura 35. Modulación del contenido intracelular de oxidantes inducida por Res.** CMSP fueron cultivadas en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. **A.** Contenido relativo de oxidantes en Mo y LT de controles (Mo: n= 9; LT: n= 11) y de pacientes con EHGNA (Mo: n= 10; LT: n= 11). Los datos se presentan relativizados al contenido de oxidantes en ausencia de Res. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al contenido de oxidantes en ausencia (-) o presencia (+) de Res para el mismo individuo. **B.** Histogramas representativos de la fluorescencia emitida por el DCF en ausencia (azul) y presencia de Res (naranja) en un control (izquierda) y en un paciente con EHGNA (derecha). \*\* p < 0,01; ns: no significativo.

Teniendo en cuenta que Res fue capaz de modular los niveles de oxidantes en las células provenientes de individuos del grupo control, especulamos que Res también podría ser capaz de regular el estallido respiratorio. Para corroborarlo, se indujo la producción de oxidantes con un inductor conocido, el PMA, y tres ácidos grasos cuyos niveles séricos se encuentran alterados en pacientes con EHGNA y que son, por lo tanto, de importancia en estas patologías. Uno de estos ácidos grasos es el ácido palmítico (AP), un ácido graso

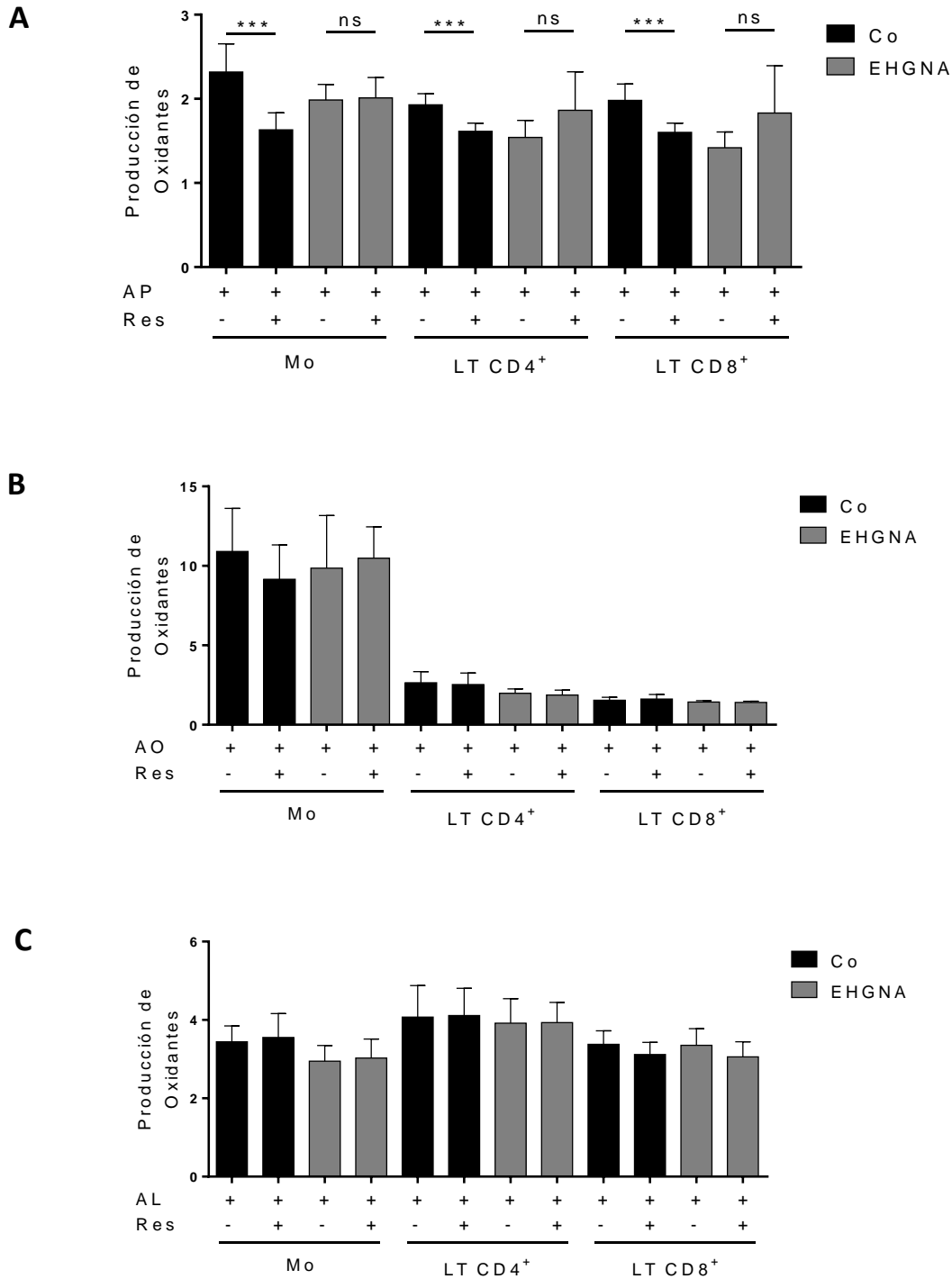
saturado de cadena larga. Los dos restantes, el ácido oleico (AO) y el ácido linoleico (AL), son ácidos grasos insaturados de la serie omega 9 y omega 6, respectivamente.

La Res previno la producción de oxidantes inducida por PMA en Mo y LT de controles (Mo:  $p=0,001$ ; LT CD4<sup>+</sup>:  $p=0,0005$ ; LT CD8<sup>+</sup>:  $p=0,001$ ) y de pacientes con EHGNA (Mo:  $p=0,031$ ; LT CD4<sup>+</sup>:  $p=0,016$ ; LT CD8<sup>+</sup>:  $p=0,016$ ) (Figura 36). En este caso, el efecto ejercido por Res sobre la inducción del estallido respiratorio fue similar entre las células de ambos grupos experimentales.

Por otro lado, la Res previno el estallido respiratorio inducido por el AP en células de controles (Mo:  $p=0,001$ ; LT CD4<sup>+</sup>:  $p=0,0005$ ; LT CD8<sup>+</sup>:  $p=0,001$ ), mientras que en células de pacientes con EHGNA no se observó dicha modulación sobre la producción de oxidantes (Figura 37 A). Cuando el estallido respiratorio fue inducido por AO o AL, no se observó el efecto modulador de Res en ninguno de los dos grupos experimentales (Figura 37 B-C).



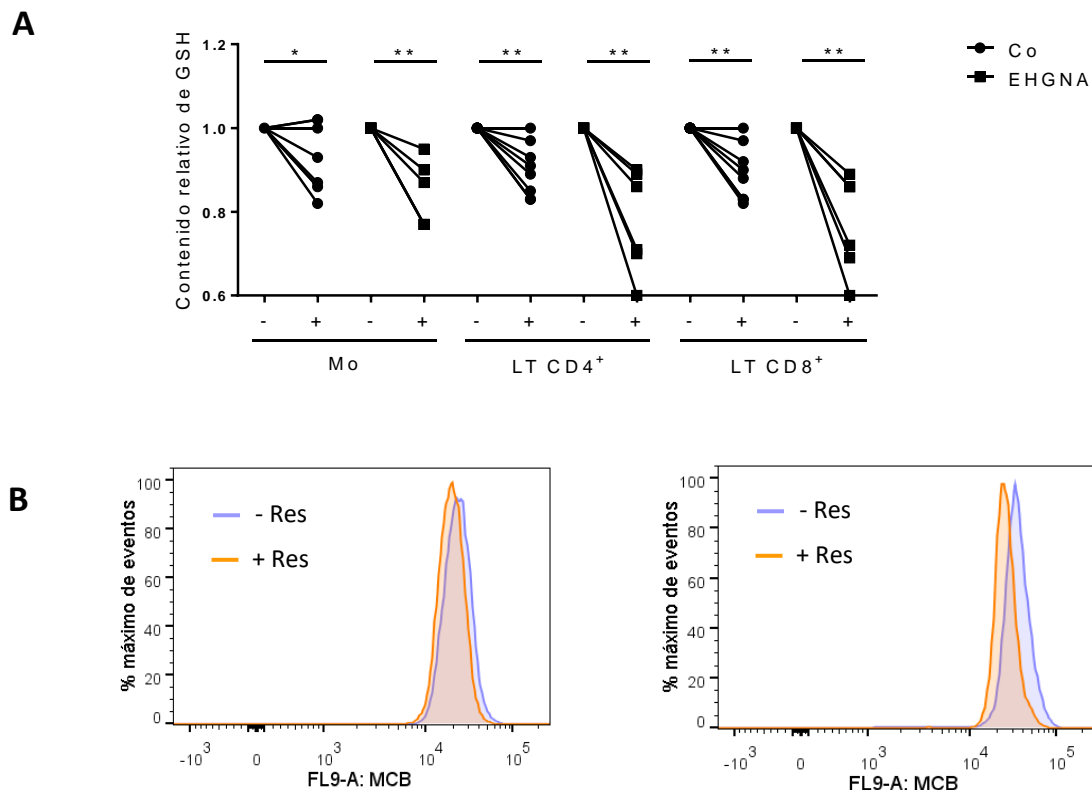
**Figura 36. Efecto modulador de Res sobre el estallido respiratorio inducido por PMA.** Se indujo el estallido respiratorio en CMSP con PMA en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 1 h. Se muestra la producción de oxidantes en Mo y LT de controles (Mo:  $n=11$ ; LT:  $n=12$ ) y de pacientes con EHGNA (Mo:  $n=6$ ; LT:  $n=8$ ). Los datos se presentan relativizados al contenido de oxidantes en ausencia de estímulo. La comparación se realizó mediante el test de Wilcoxon. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

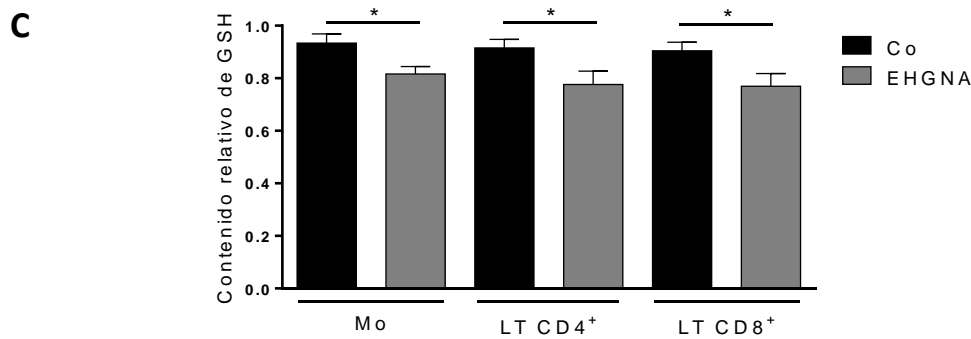


**Figura 37. Efecto modulador de Res sobre el estallido respiratorio inducido por ácidos grasos.** Se indujo el estallido respiratorio en CMSP con ácido palmítico (AP) (A), ácido oleico (AO) (B) o ácido linoleico (AL) (C) en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 30 min (AL) o 60 min (AP y AO). Se muestra la producción de oxidantes en Mo y LT de controles (n= 14) y de pacientes con EHGNA (n= 8). Los datos se presentan relativizados al contenido de oxidantes en ausencia de estímulo. La comparación se realizó mediante el test de Wilcoxon. Las barras representan la media ± SEM. \*\*\* p < 0,001; ns: no significativo.

1.2.2. Modulación de los niveles de GSH por Res

Como se mencionó anteriormente, el sistema GSH-GSSG es uno de los principales mecanismos regulatorios del contenido intracelular de oxidantes, motivo por el cual se estudió si la disminución de los niveles de oxidantes inducida por Res se presentaba en asociación con la acción antioxidante de este sistema. Para esclarecerlo, se cuantificó el contenido de GSH en presencia o ausencia de Res. La presencia de Res indujo una disminución promedio del 7% en el contenido de GSH en Mo de controles ( $p= 0,031$ ) y del 18% en Mo de pacientes con EHGNA ( $p= 0,004$ ). De manera similar, en LT de controles se observó una disminución promedio del 9% en el contenido de GSH ( $CD4^+$ :  $p= 0,003$ ;  $CD8^+$ :  $p= 0,003$ ), mientras que LT provenientes de pacientes con EHGNA presentaron una disminución promedio del 23% en su contenido ( $CD4^+$ :  $p= 0,007$ ;  $CD8^+$ :  $p= 0,005$ ) (Figura 38 A-B). La disminución del contenido de GSH fue significativamente mayor en Mo y LT de pacientes con EHGNA, respecto de su contraparte en controles (Mo:  $p= 0,037$ ; LT  $CD4^+$ :  $p= 0,034$ ; LT  $CD8^+$ :  $p= 0,031$ ) (Figura 38 C).

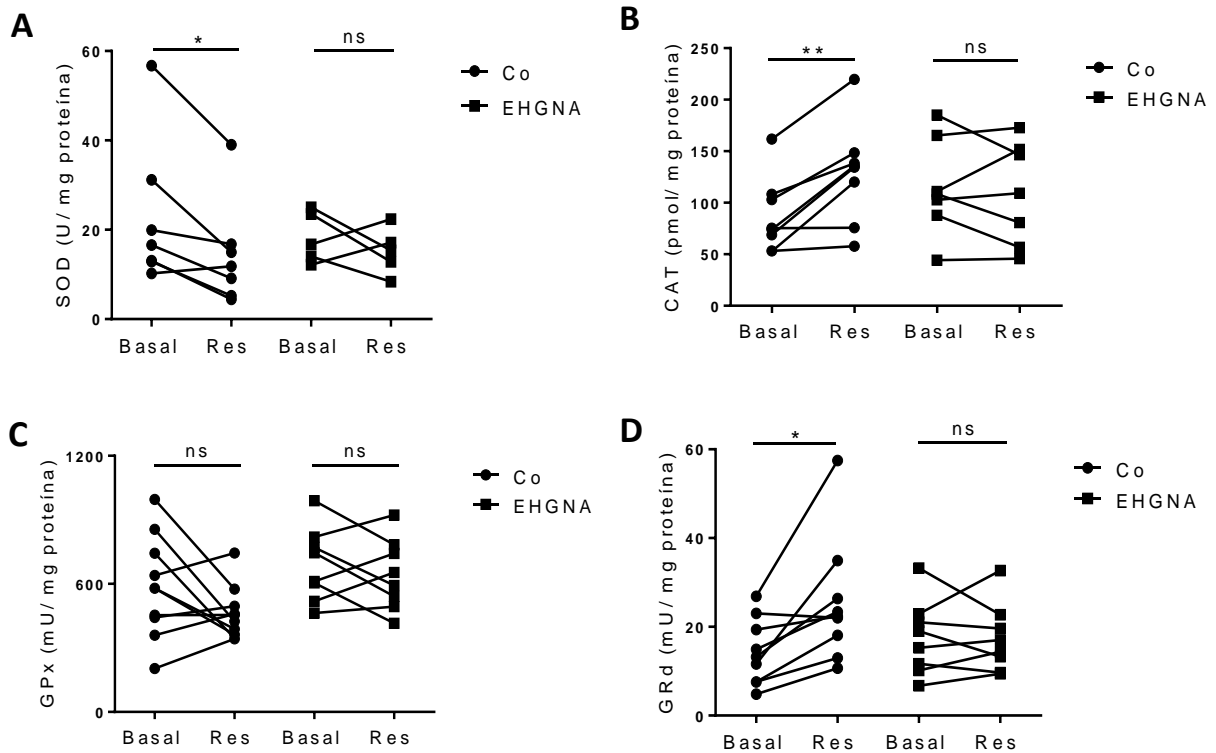




**Figura 38. Modulación de los niveles intracelulares de GSH inducida por Res.** CMSP fueron cultivadas en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. **A-C.** Contenido relativo de GSH en Mo y LT de controles (Co, n= 8) y de pacientes con EHGNA (n= 6). Los datos se presentan relativizados al contenido de GSH en ausencia de Res. **A.** La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al contenido de GSH en ausencia (-) o presencia (+) de Res para el mismo individuo. **B.** Histogramas representativos de la fluorescencia emitida por el MCB-GSH en ausencia (azul) y presencia de Res (naranja) en un control (izquierda) y en un paciente con EHGNA (derecha). **C.** La comparación entre el grupo control y el de EHGNA se realizó mediante el test t de Student. Se presenta la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ;

### 1.2.3. Modulación de la actividad enzimática antioxidante por Res

Otros mecanismos de gran relevancia en la regulación del contenido intracelular de oxidantes son aquellos que involucran a las enzimas antioxidantes. Para evaluar la implicancia de estas enzimas en la modulación del contenido de oxidantes mediado por Res, se cultivaron CMSP en presencia o ausencia de Res y se determinó la actividad de las principales enzimas antioxidantes. En células provenientes de individuos control, Res indujo un aumento de la actividad CAT ( $p= 0,003$ ) y GRd ( $p= 0,011$ ), y una disminución de la actividad SOD ( $p= 0,016$ ). Contrariamente, en CMSP de pacientes con EHGNA no se observaron cambios en las actividades enzimáticas inducidos por Res (Figura 39).



**Figura 39. Modulación de la actividad de enzimas antioxidantes inducida por Res.** CMSP fueron cultivadas en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. Se cuantificó la actividad superóxido dismutasa (SOD) (A), catalasa (CAT) (B), glutatión peroxidasa (GPx) (C) y glutatión reductasa (GRd) (D) en CMSP de controles (SOD: n= 7; CAT: n= 8; GPx: n= 10; GRd: n= 9) y de pacientes con EHGNA (SOD: n= 5; CAT: n= 7; GPx: n= 8; GRd: n= 8). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la actividad enzimática en ausencia (Basal) o presencia de Res para el mismo individuo. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; ns: no significativo.

Nuevamente, se realizaron correlaciones con el fin de investigar posibles asociaciones entre el compromiso hepático de los individuos incluidos en el estudio y la capacidad de las CMSP de responder a Res. Como se explicó en el capítulo anterior, las correlaciones se llevaron a cabo utilizando los índices que nos permiten comparar la magnitud del efecto ejercido por Res. El contenido relativo de oxidantes correlacionó positivamente con el NAS y el grado de fibrosis en las tres poblaciones celulares, y también con el IMC en el caso de los LT (Tabla 11). Estos resultados indican que la capacidad de Res de modular negativamente los niveles de oxidantes disminuye en asociación con la severidad de la hepatopatía, el grado de fibrosis, y también con el grado de obesidad en el caso de los LT.

Por otro lado, se encontraron correlaciones negativas entre el contenido relativo de GSH y el NAS. Asimismo, los índices calculados para las actividades CAT y GRd correlacionaron negativamente con ambos parámetros histológicos (Tabla 11). Por lo tanto, la disminución en el contenido de GSH es mayor cuanto más severa es la hepatopatía. En cambio, el aumento de las actividades CAT y GRd inducido por Res se reduce cuanto mayor es el compromiso hepático.

**Tabla 11. Correlaciones entre parámetros de relevancia clínica y la magnitud del efecto modulador que ejerce Res sobre los parámetros asociados a la homeostasis redox.**

	Población celular	Parámetro clínico							
		IMC <sup>(*)</sup>		Circunferencia de cintura <sup>(*)</sup>		NAS		Fibrosis <sup>(*)</sup>	
		r	p	r	p	r	p	r	p
Contenido relativo de oxidantes	Mo	0,200	ns	0,441	ns	0,636	0,024	0,677	0,019
	LT CD4 <sup>+</sup>	0,857	0,024	0,415	ns	0,652	0,020	0,669	0,011
	LT CD8 <sup>+</sup>	0,786	0,048	0,488	ns	0,651	0,019	0,667	0,011
Contenido relativo de GSH	Mo	-	-	-	-	-0,224	ns	-	-
	LT CD4 <sup>+</sup>	-	-	-	-	-0,656	0,025	-	-
	LT CD8 <sup>+</sup>	-	-	-	-	-0,656	0,025	-	-
Actividad SOD	CMSP	0,200	ns	0,302	ns	0,453	ns	0,478	ns
Actividad CAT	CMSP	0,005	ns	0,257	ns	-0,703	0,014	-0,768	0,008
Actividad GPx	CMSP	-0,559	ns	-0,459	ns	0,118	ns	0,118	ns
Actividad GRd	CMSP	0,519	ns	0,739	ns	-0,584	0,040	-0,624	0,034

La tabla muestra el coeficiente de Spearman (r) y el valor p para cada correlación realizada entre los parámetros antropométricos e histológicos de relevancia clínica y la magnitud del efecto modulador que ejerce Res sobre los parámetros asociados a la homeostasis redox estudiados. Las correlaciones se llevaron a cabo mediante el test de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos. ns: no significativo; IMC: índice de masa corporal; NAS: *NAFLD Activity Score*.

(\*) En algunos casos, no disponíamos de los datos clínicos suficientes para realizar las correlaciones.



## 2. Células inmunológicas hepáticas: MF y LT

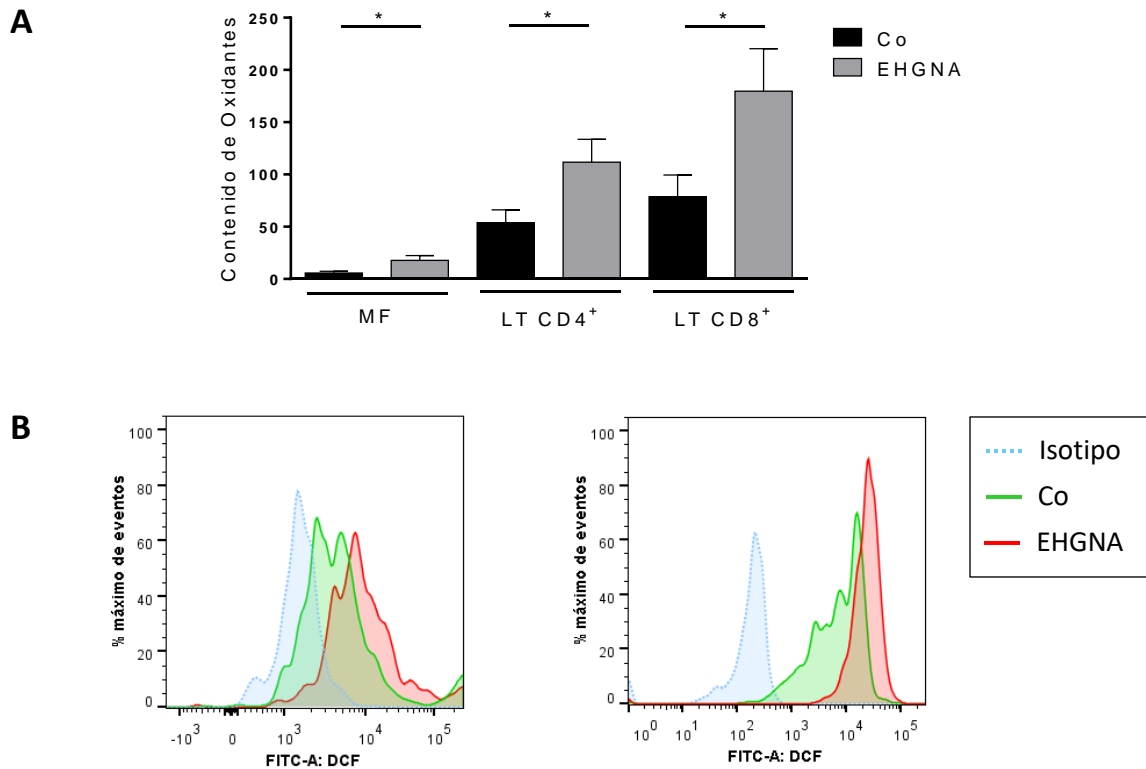
La sobreproducción de ERO es uno de los factores de mayor importancia en el desarrollo y progresión de las EHGNA. Las células inmunológicas hepáticas, principalmente las células de Kupffer y los macrófagos infiltrantes, se encuentran involucradas en estos procesos. Una vez expuestas a estímulos dañinos, estas las células responden no sólo mediante la activación de vías inflamatorias, sino también mediante la producción de oxidantes y la transcripción de enzimas involucradas en el equilibrio redox.

Como se mencionó anteriormente, la búsqueda de correlaciones entre las respuestas de células periféricas y hepáticas resulta de gran interés clínico debido al beneficio de contar con parámetros de fácil medición que permitan revelar de manera indirecta y simple lo que sucede en el hígado.

### 2.1. Contenido basal de oxidantes

Similar a lo observado en periferia, MF y LT hepáticos de pacientes con EHGNA mostraron un elevado contenido de oxidantes respecto a su contraparte en controles (MF:  $p=0,025$ ; LT CD4<sup>+</sup>:  $p=0,036$ ; LT CD8<sup>+</sup>:  $p=0,041$ ) (Figura 40 A-B).

El contenido de oxidantes en LT hepáticos correlacionó positivamente con el NAS y con el grado de fibrosis (Tabla 12), indicando que los niveles de oxidantes aumentan en asociación con la severidad de la hepatopatía.



**Figura 40. Contenido intracelular de oxidantes en células inmunológicas hepáticas.** **A.** Contenido de oxidantes en MF y LT hepáticos de controles (n= 6) y de pacientes con EHGNA (MF: n= 3; LT: n= 4). Los datos se presentan relativizados al control negativo en ausencia de sonda (FMO). La comparación se realizó mediante el test t de Student. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. **B.** Histogramas representativos de la fluorescencia emitida por el FMO (celeste) y por el DCF en Co (verde) y EHGNA (rojo) en MF (izquierda) y LT (derecha). \* p < 0,05.

**Tabla 12. Correlaciones entre parámetros histológicos y el contenido de oxidantes en LT hepáticos.**

Parámetro en estudio	Población celular	Parámetro clínico			
		NAS		Fibrosis	
		r	p	r	p
Contenido de oxidantes	MF	0,541	ns	0,252	ns
	LT CD4 <sup>+</sup>	0,836	0,004	0,853	0,009
	LT CD8 <sup>+</sup>	0,706	0,028	0,822	0,024

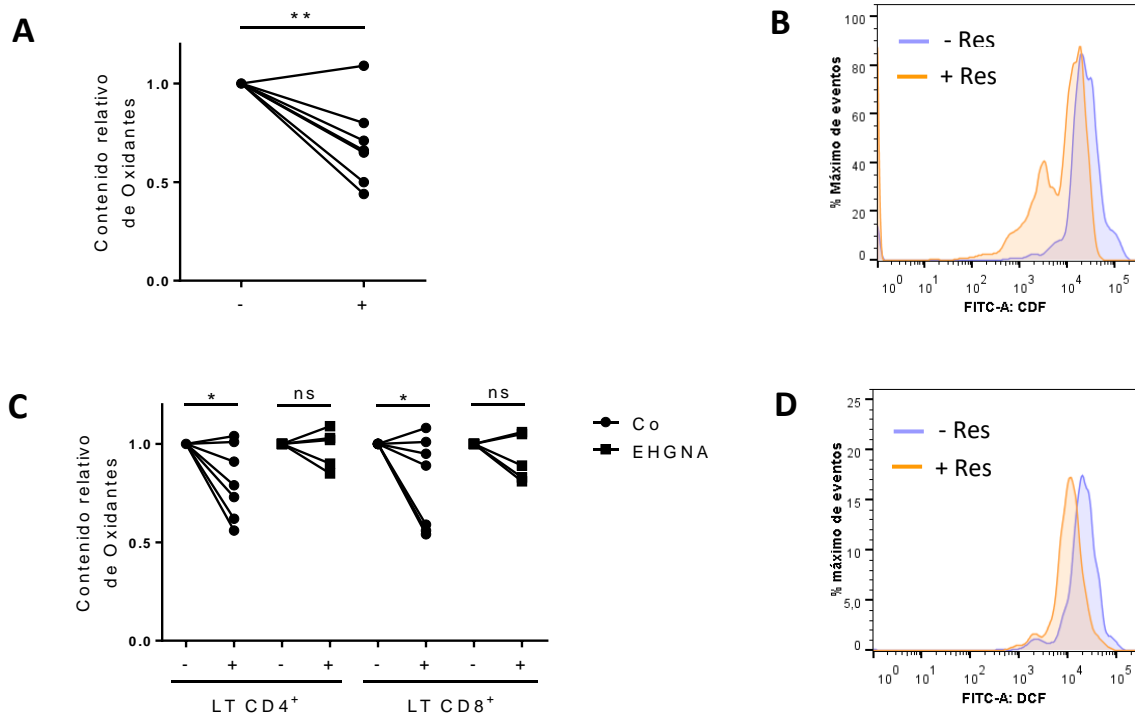
La tabla muestra el coeficiente de Spearman (r) y el valor p para cada correlación realizada entre los parámetros histológicos y los niveles de oxidantes presentes en MF (n= 9) y LT (n= 10) hepáticos provenientes de controles y pacientes con EHGNA. Las correlaciones se llevaron a cabo mediante el test de Spearman. Valores de p < 0,05 fueron considerados significativos. ns: no significativo; NAS: *NAFLD Activity Score*.

2.2. Modulación del contenido de oxidantes por Res

Con el fin de investigar si el efecto modulador que ejerce Res sobre el contenido intracelular de oxidantes en CMSP también ocurre a nivel local sobre células inmunológicas hepáticas, se cultivaron suspensiones celulares hepáticas en presencia de Res y se cuantificaron los niveles intracelulares de oxidantes presentes en dichas células.

En MF hepáticos de controles, la presencia de Res indujo una disminución promedio del 31% en el contenido de oxidantes ( $p= 0,009$ ) (Figura 41 A-B). Lamentablemente, no contamos con material suficiente para realizar este ensayo en muestras de pacientes.

En LT provenientes de hígado control, la Res indujo una disminución promedio del 23% y 29% en los niveles de oxidantes en las subpoblaciones  $CD4^+$  ( $p= 0,035$ ) y  $CD8^+$  ( $p= 0,040$ ), respectivamente. En LT hepáticos de pacientes con EHGNA, la Res no indujo diferencias en el contenido de oxidantes (Figura 41 C-D).

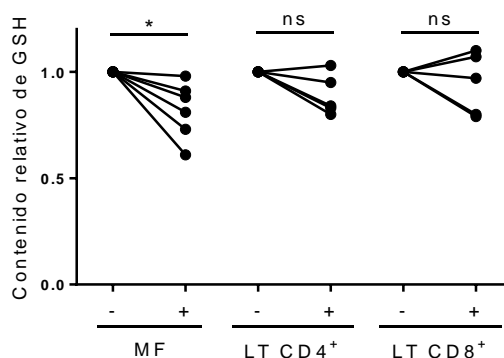


**Figura 41. Modulación del contenido de oxidantes inducido por Res en células inmunológicas hepáticas.** Suspensiones de células hepáticas fueron cultivadas en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. **A.** Contenido relativo de oxidantes en MF (n= 7) de controles. **C.** Contenido relativo de oxidantes en LT hepáticos de controles (n= 7) y de pacientes con EHGNA (n= 5). Los datos se presentan relativizados al contenido de oxidantes en ausencia de Res. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al contenido de oxidantes en ausencia (-) o presencia (+) de Res para el mismo individuo. **B,** **D.** Histogramas representativos de la fluorescencia emitida por el DCF en ausencia (azul) y presencia de Res (naranja) en MF (B) o LT (D) de control. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ns: no significativo.

### 2.3. Modulación del contenido de GSH por Res

Para estudiar si el contenido intracelular de GSH es modulado por Res en células hepáticas como sucede en periferia, se realizaron cultivos con suspensiones celulares hepáticas en presencia o ausencia de Res. Este ensayo sólo pudo ser realizado con muestras hepáticas de controles debido a la carencia de muestra de pacientes.

La presencia de Res indujo una disminución promedio de 18% en el contenido de GSH en MF hepáticos ( $p = 0,022$ ). No se observaron diferencias significativas en el contenido de GSH de LT hepáticos en respuesta a Res (Figura 42).

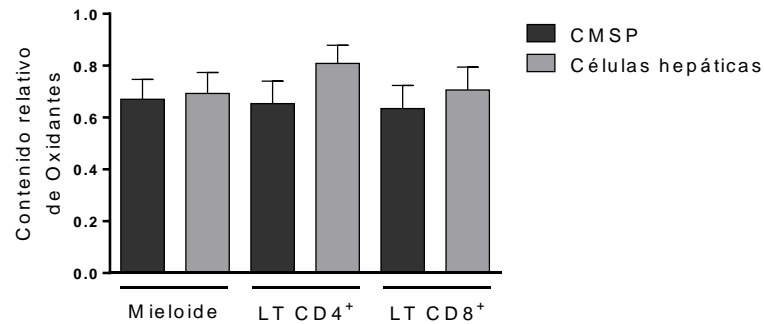


**Figura 42. Modulación del contenido de GSH inducido por Res en células inmunológicas hepáticas.** Suspensiones de células hepáticas fueron cultivadas en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. Se muestra el contenido relativo de GSH en MF (n= 6) y LT (n= 5) hepáticos procedentes de controles. Los datos se presentan relativizados a los niveles de GSH en ausencia de Res. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al contenido de GSH en ausencia (-) o presencia (+) de Res para el mismo individuo. \*  $p < 0,05$ ; ns: no significativo.

### 2.4. Estudio comparativo del efecto de Res sobre el contenido de oxidantes entre células mononucleares periféricas y hepáticas

Para evaluar si la magnitud del efecto modulador que ejerció Res sobre el contenido de oxidantes en células inmunológicas periféricas y hepáticas fue similar, se comparó el contenido relativo de oxidantes entre las células de ambos compartimientos en respuesta a la estimulación con Res. No se observaron diferencias significativas en la magnitud del efecto que ejerció Res sobre el contenido de oxidantes entre células hepáticas y periféricas

de controles, indicando que las células mononucleares de ambos compartimientos responden a Res de manera similar (Figura 43).



**Figura 43. Análisis comparativo de la magnitud de la modulación del contenido de oxidantes inducida por Res entre células inmunológicas periféricas y hepáticas.** CMSP o suspensiones celulares hepáticas provenientes de controles fueron incubadas en presencia o ausencia de Res (20 ng/ml) durante 24 h. Se presenta el contenido relativo de oxidantes en Mo y MF (Mieloide) y en LT periféricos y hepáticos. El contenido relativo se obtuvo como el cociente entre los niveles de oxidantes en presencia de Res y los niveles en su ausencia. La comparación estadística entre células de ambos compartimientos se realizó utilizando el test t de Student para cada población celular.

El estrés oxidativo se asocia con muchas patologías crónicas, especialmente aquellas caracterizadas por la presencia de inflamación crónica de bajo grado, como la obesidad, la diabetes de tipo 2 y las EHGNA. El desbalance redox y el desarrollo de estrés oxidativo son eventos clave durante la progresión de las EHGNA. Incluso se ha sugerido al estrés oxidativo como el mecanismo que conecta las EHGNA con las enfermedades cardiovasculares<sup>263</sup>.

El hígado de pacientes con EHGNA presenta daño oxidativo en proteínas<sup>264</sup>, lípidos y ADN<sup>265,266</sup>, indicando la presencia de estrés oxidativo. Además, se han detectado altos niveles séricos de metabolitos reactivos de oxígeno, un marcador de las ERO circulantes, en correlación con la inflamación hepática<sup>267</sup>. También se han observado altos niveles séricos de malondialdehído<sup>268-270</sup> y proteínas carboniladas<sup>270</sup>, ambos indicadores de daño oxidativo a biomoléculas. Respecto a las defensas antioxidantes, existen evidencias contrapuestas. Se ha reportado alta actividad SOD, CAT y GPx en hígado de pacientes con EHGNA<sup>271</sup>, así como niveles disminuidos de GSH y baja actividad SOD y CAT<sup>264</sup>. De forma similar, en suero de pacientes con EHGNA fueron reportados bajos niveles de GSH y baja actividad SOD y GPx<sup>268</sup>, como también altos niveles de GSH y elevada actividad SOD, GPx y GRd<sup>269</sup>.

El desbalance redox tiene un gran impacto en la funcionalidad de las células inmunológicas. A pesar de ello, el estado redox en estas células fue poco estudiado. Demostramos que los niveles de oxidantes se encuentran elevados en células mononucleares periféricas y hepáticas de pacientes con EHGNA. La correlación positiva entre los niveles de oxidantes en LT periféricos y hepáticos y la severidad de la hepatopatía sugiere que el desbalance redox en LT está asociado con la progresión de las EHGNA. Los niveles de oxidantes aumentan debido a la sobreproducción patológica de oxidantes y/o a la disminución de la capacidad antioxidante que impide su correcta eliminación. En este sentido, las CMSP de pacientes con EHGNA mostraron un perfil alterado de la actividad de enzimas antioxidantes. Lamentablemente, la cantidad de células necesarias para medir la actividad de las enzimas antioxidantes no nos permitió evaluarlo en Mo y LT purificados. Sin embargo, el uso de CMSP permite obtener una estimación del estado general en estas células.

La SOD es la primera línea de defensa contra los radicales libres. El déficit de SOD se ha asociado con diversas patologías, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, y cáncer<sup>31</sup>. En este trabajo demostramos que CMSP de pacientes con EHGNA presentan una actividad SOD disminuida en comparación con células de controles, en oposición a lo reportado previamente en CMSP de pacientes obesos<sup>272</sup>. La baja actividad SOD observada favorecería la acumulación del anión superóxido en estas células. El anión superóxido puede oxidar los grupos sulfuro-hierro de algunas enzimas, lo que resulta en su degradación y en la pérdida de la actividad enzimática<sup>273</sup>. Además, el anión superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico y generar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), cuya descomposición resulta en la formación de especies muy reactivas, tales como los radicales OH<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup> y CO<sub>3</sub><sup>•-</sup><sup>274</sup>. Dado que la SOD es la única enzima capaz de remover el anión superóxido y prevenir así la formación de ONOO<sup>-</sup>, la pérdida de actividad SOD se asocia con el daño oxidativo a macromoléculas.

En concordancia con los altos niveles de oxidantes, Mo y LT de pacientes con EHGNA presentaron bajos niveles de GSH. El GSH es el antioxidante hidrofílico más abundante y posee un importante rol en la protección de la célula frente a las ERO. Las especies radicalarias son eliminadas a través de la reducción no enzimática con el GSH, mientras que la remoción de los hidroperóxidos requiere la reacción enzimática mediada por GPx<sup>275</sup>. Teniendo en cuenta la baja actividad SOD observada en pacientes, es posible que la presencia de un alto contenido de especies radicalarias favorezca la disminución del contenido de GSH mediante su oxidación no enzimática. A su vez, la alta actividad GPx favorecería la eliminación de peróxidos mediante la oxidación del GSH y contribuiría con su disminución. La alta actividad GPx posiblemente sea el resultado de una respuesta adaptativa a la acumulación de oxidantes, como un intento de mantener la homeostasis redox, aunque resulta insuficiente para mantener los niveles de oxidantes adecuados. Teniendo en cuenta que la GRd es la enzima encargada de reducir el GSSG, la baja actividad GRd observada en CMSP de pacientes con EHGNA llevaría a una renovación insuficiente del *pool* de GSH. Por lo tanto, la excesiva oxidación del GSH como consecuencia del alto contenido de oxidantes y de la elevada actividad GPx sumada a la escasa renovación del

*pool* de GSH debida a la baja actividad GRd, resultaría en la disminución de la capacidad antioxidante de la célula que, a su vez, favorecería la acumulación de oxidantes.

Demostramos por primera vez que Res modula negativamente el contenido de oxidantes en Mo y LT provenientes de individuos control. Dicha disminución se debe, al menos en parte, al aumento de la actividad CAT inducida por Res y a la oxidación del GSH, que favorecen la eliminación de peróxido de hidrógeno y de especies radicalarias, respectivamente. Adicionalmente, la inducción de la actividad GRd por Res favorecería la renovación del *pool* de GSH, contribuyendo con la homeostasis redox. La disminución de la actividad SOD en presencia de Res podría ser consecuencia de la disminución en el contenido de oxidantes. El efecto regulatorio de Res sobre las ERO fue demostrado previamente en células neuronales, a las que Res protege de la citotoxicidad inducida por el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial<sup>276</sup>. Por otro lado, se ha reportado que Res induce la producción de ERO en células endoteliales<sup>277,278</sup>. Estas evidencias contrapuestas dejan de manifiesto que los efectos ejercidos por Res varían según el tipo celular en estudio.

Cabe destacar que la fosforilación oxidativa es regulada por el AMPc mitocondrial. La activación del eje adenilato ciclasa mitocondrial/ PKA aumenta la actividad y la eficiencia de la fosforilación oxidativa, limitando la producción de ERO. Además, la activación de los caminos de señalización del AMPc extra-mitocondrial induce genes mitocondriales e impacta en la funcionalidad mitocondrial<sup>279</sup>. Por lo tanto, el aumento de los niveles de AMPc inducido por Res también podría contribuir con la disminución del contenido de oxidantes observada.

En MF y LT hepáticos de controles, Res indujo una disminución en el contenido de oxidantes de magnitud comparable con la inducida en periferia. A su vez, la disminución del contenido de GSH en presencia de Res sólo se observó en MF hepáticos. Debido a que la disminución del GSH en células de controles es pequeña, el bajo número de muestras hepáticas analizadas pudo no haber sido suficiente para evidenciar la disminución del GSH en LT hepáticos. Es posible que, al igual que en periferia, la disminución del contenido de oxidantes se relacione con la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes, las cuales no fueron evaluadas en el contexto hepático.



En las células de pacientes con EHGNA, la disminución de la respuesta a Res se tradujo en la falta de inducción de la actividad CAT y GRd acompañada por un marcado descenso en los niveles de GSH. Como resultado, la eliminación incompleta de oxidantes daría lugar a su acumulación. Estas alteraciones, junto con el alto contenido basal de oxidantes, contribuirían con el marcado descenso de los niveles de GSH observado. La correlación positiva entre la actividad histológica hepática y la disminución de la capacidad reguladora de Res sobre los niveles de oxidantes y de GSH, y sobre las actividades CAT y GRd sugiere que la alteración en la respuesta a Res en CMSP está asociada con la progresión de las EHGNA. En LT hepáticos de pacientes con EHGNA, al igual que en periferia, no se observó la modulación de los niveles de oxidantes en respuesta a Res. En su conjunto, estos resultados indican que los LT hepáticos responden a Res de forma similar a los LT periféricos, incluso en células de pacientes, en las que la alteración en la respuesta a Res se manifiesta de forma similar en ambos compartimientos.

El adecuado funcionamiento del sistema inmunológico está íntimamente asociado con el estado energético general y, en particular, con la disponibilidad de nutrientes como los ácidos grasos. El AP (C16:0), AO (C18:1  $\omega$ -9) y AL (C18:2  $\omega$ -6) son los ácidos grasos más abundantes en el suero humano y sus niveles se encuentran aumentados en pacientes con EHGNA<sup>280</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, la ingesta crónica de una dieta rica en ácidos grasos resulta en una elevada tasa de oxidación de estas moléculas que lleva a la sobreproducción de ERO. Tanto el AP como el AL disminuyen el potencial de membrana mitocondrial, induciendo una sobreproducción de ERO sostenida en el tiempo que finalmente genera la disrupción de la homeostasis redox<sup>281,282</sup>. En contraposición con AP y AL, el AO induce una producción transitoria de ERO que no altera la homeostasis redox<sup>281</sup>.

Los ácidos grasos son reconocidos por las células inmunológicas, en las que ejercen funciones inmunomoduladoras. Tanto el AP como el AL, y en menor medida el AO, activan la enzima NOX en Mo y LT mediante la activación de la PKC, dando lugar al estallido respiratorio<sup>283-285</sup>. La activación de la enzima NOX es considerada una de las fuentes más importantes de estrés oxidativo en las EHGNA y se la ha asociado con el desarrollo de daño hepático. Del Ben y col. demostraron que pacientes con EHGNA presentan elevados niveles

séricos del péptido soluble derivado de Nox2, un indicador de la activación de la enzima NOX2 en células periféricas, en correlación con la severidad de la esteatosis<sup>286</sup>.

Dado que el efecto de Res sobre el contenido de oxidantes se observó en un tiempo relativamente largo, evaluamos si Res también era capaz de regular la producción de oxidantes en forma aguda. Como era de esperar, observamos que tanto el PMA, un reconocido activador de la NOX a través de la PKC, como los tres ácidos grasos indujeron el estallido respiratorio en Mo y LT. De los tres ácidos grasos utilizados, Res sólo previno el estallido respiratorio inducido por AP en Mo y LT. El receptor de los ácidos grasos de cadena larga es el receptor de ácidos grasos libres 1 (FFAR1, del inglés *free fatty acid receptor 1*). Dentro de las células inmunológicas, se ha comprobado la activación de este receptor por AO y AL en neutrófilos, pero su activación en Mo y LT aún no ha sido probada<sup>287</sup>. Sin embargo, una particularidad de los ácidos grasos saturados en general, y del AP en particular, es que se une al complejo TLR4 monomérico/MD2, induciendo la producción de ERO<sup>285</sup>. Por lo tanto, si bien no se conoce con exactitud las vías involucradas en la señalización de estos ácidos grasos, es evidente que la activación de la vía de TLR4 por AP diferencia el mecanismo de acción de este ácido graso de aquel inducido por AO y AL y, por ende, podría ser la vía blanco de Res. Cabe aclarar que no observamos cambios inducidos por Res sobre la actividad de las enzimas antioxidantes a tiempos cortos (datos no mostrados) y, dado que la inducción de las defensas antioxidantes contrarrestaría la producción de oxidantes independientemente del estímulo inductor, consideramos más probable que la inhibición del estallido respiratorio ejercida por Res se deba a la modulación negativa de la vía de señalización de AP que a la modulación de la actividad antioxidante. Por otro lado, el efecto inhibitorio de Res sobre el estallido respiratorio inducido por AP no se observó en células de pacientes, poniendo nuevamente de manifiesto la disminución de la respuesta a Res presente en estas células.

Llamativamente, Res previno el estallido respiratorio inducido por PMA tanto en células de individuos control como de pacientes. Estos resultados sugieren que la Res actúa mediante dos mecanismos, uno a través del cual modula el efecto del PMA, y otro que regula el efecto del AP y que se encuentra alterado en pacientes con EHGNA. La capacidad

de Res de inhibir el estallido respiratorio fue ampliamente estudiada en neutrófilos<sup>178,288</sup>. En estos estudios se demostró que Res disminuye la capacidad de neutrófilos de eliminar patógenos mediante la inhibición de la producción de ERO. En el caso de las EHGNA, la inducción excesiva del estallido respiratorio por moléculas como los ácidos grasos posee un impacto negativo y contribuye con el daño tisular. Por lo tanto, la disminución de la capacidad de Res de inhibir el estallido respiratorio podría contribuir con el daño oxidativo en células de pacientes EHGNA.

Los ácidos grasos también tienen influencia en el desarrollo de la inflamación. En líneas generales, los ácidos grasos saturados, entre ellos el AP, son capaces de inducir la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de marcadores inflamatorios, mientras que los ácidos grasos insaturados inhiben el efecto inflamatorio inducido por los ácidos grasos saturados<sup>289</sup>. El AP se ha asociado con la activación de LT, la producción de citoquinas inflamatorias<sup>290</sup>, y la inducción del perfil Th17<sup>281</sup>. En MF y Mo, el AP induce la producción de citoquinas inflamatorias e incrementa el efecto inflamatorio del LPS mediante la activación de la vía de TLR4<sup>291</sup>. Al contrario, el AO disminuye la proliferación celular y la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  en LT<sup>292</sup>, y restaura la función supresora de LT regulatorios de pacientes con esclerosis múltiple<sup>293</sup>. En MF, el AO induce el perfil antiinflamatorio M2<sup>294</sup>, disminuye la producción de IL-1 $\beta$ <sup>295</sup> y la apoptosis<sup>296</sup> inducida por AP. Los efectos del AL sobre estas células no son tan claros. En LT, el AL inhibiría la diferenciación de perfiles Th1 y Th17 y la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$ <sup>297</sup>. En MF, se ha sugerido un efecto inflamatorio temprano de AL ya que induce la expresión génica de citoquinas inflamatorias, aunque a tiempos posteriores dicho efecto es revertido como resultado de su transformación metabólica<sup>298</sup>. Otro trabajo sugirió que AL ejerce un efecto antiinflamatorio en MF al reducir la producción de IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>299</sup>.

Teniendo en cuenta que Res moduló negativamente el estallido respiratorio inducido por AP, el cual posee una clara acción inflamatoria, inferimos que Res también podría modular negativamente su acción inflamatoria. Cabe destacar que Res no moduló el estallido respiratorio inducido por AO y AL que, al contrario de AP, parecen tener efectos antiinflamatorios.

En conclusión, la Res regula negativamente los niveles de oxidantes en Mo y LT mediante la modulación de las defensas antioxidantes, y también el estallido respiratorio inducido por ácidos grasos inflamatorios. La alteración en la respuesta a Res presente en las células de pacientes con EHGNA impide la modulación de la actividad de las enzimas antioxidantes, dando como resultado la depleción del *pool* de GSH y un elevado contenido de oxidantes que no puede ser eliminado de forma eficaz. Adicionalmente, la sobreproducción de oxidantes que ocurre en el contexto de las EHGNA sumado a la incapacidad de Res de modular negativamente el estallido respiratorio inducido por AP, agravaría aún más estas alteraciones, dando lugar a un círculo vicioso que lleva al daño a biomoléculas y contribuye con la progresión de la hepatopatía.

### **Relación entre la señalización redox y la inflamación**

La señalización redox contribuye con la regulación de diversos procesos biológicos, tales como el metabolismo, la diferenciación celular, la migración, y el adecuado montaje de la respuesta inmunológica. Las ERO requeridas para mantener los procesos fisiológicos deben ser producidas en concentración, compartimentalización celular y momento adecuados para la activación de vías de señalización redox específicas. Una alteración en cualquiera de estos factores puede llevar al desbalance redox y al estrés oxidativo. El estrés oxidativo y la inflamación están íntimamente relacionados, presentándose simultáneamente e interactuando entre sí en un círculo vicioso que agrava la enfermedad hepática. Más aún, el estrés oxidativo persistente promueve el establecimiento de la inflamación crónica, y juntos establecen la conexión entre la enfermedad hepática y sus complicaciones sistémicas.

La correcta activación, proliferación, diferenciación y supervivencia de células inmunológicas requiere la producción moderada de ERO, tanto de origen mitocondrial como citosólicas derivadas principalmente de la activación de NOX. El aumento fisiológico de ERO en respuesta a estímulos inflamatorios induce la oxidación reversible de proteínas específicas, alterando su actividad, localización e interacciones. Estas modificaciones son las responsables de orquestar la activación celular y los procesos celulares fisiológicos necesarios para lograr una respuesta inmunológica eficiente. Durante la respuesta inflamatoria, las células inmunológicas sufren un cambio metabólico en el que su fuente de energía deja de ser la fosforilación oxidativa para utilizar la glicólisis aeróbica, lo que les permite mantener la activación celular y adoptar las funciones efectoras. Esta reprogramación metabólica está asociada con un aumento en la producción de ERO mitocondriales<sup>300</sup>. El proceso de activación celular también lleva a la activación de la NOX, induciendo la producción de ERO citosólicas.

Las ERO mitocondriales son necesarias para la activación y proliferación de LT<sup>301</sup>. Gill y Levine propusieron que las mitocondrias translocan al lugar de la sinapsis inmunológica durante la activación del TCR, proveyendo la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesaria para la señalización redox y activación celular<sup>302</sup>. Por otro lado, LT deficientes en NOX2 presentan

una producción de IL-4 disminuida concomitante con una elevada producción de IL-17<sup>303</sup>. Sin embargo, la deficiencia de NOX no tiene efecto sobre la expresión de CD69 y CD25, ni tampoco sobre la producción de IL-2 y la proliferación<sup>303,304</sup>. Estos datos indican que las ERO derivadas de la activación de la NOX2 no son necesarias para la activación y proliferación de LT, pero sí para su correcta diferenciación.

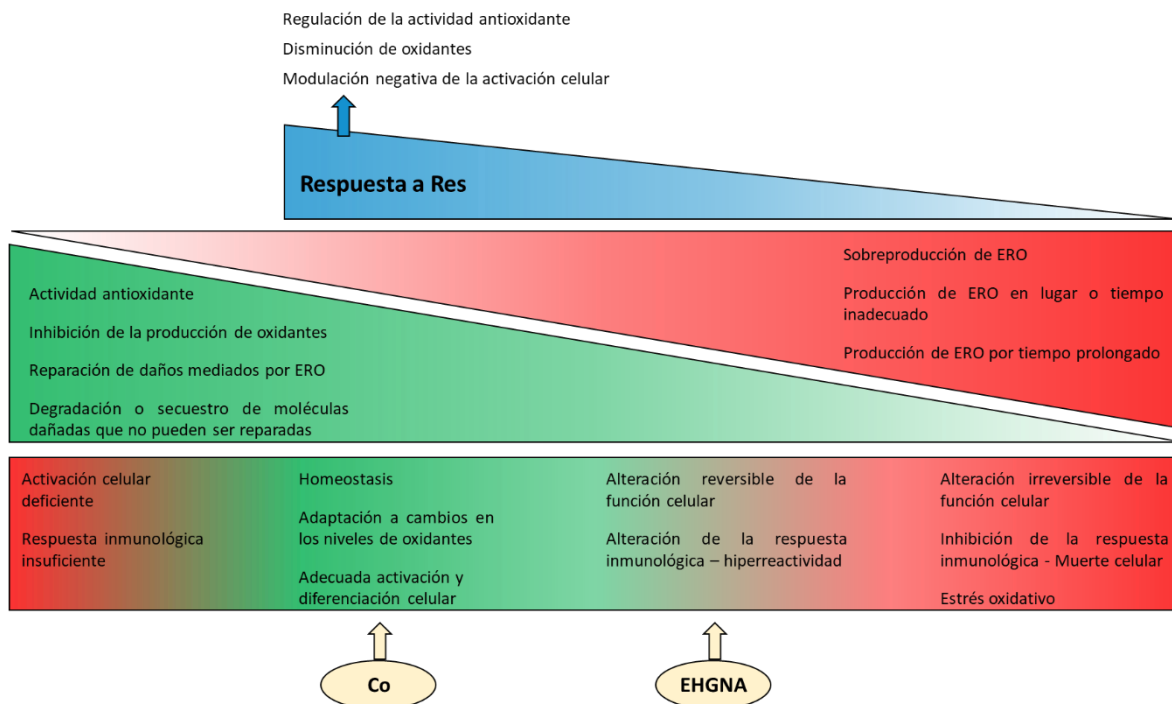
Respecto a Mo y MF, las ERO derivadas de la NOX2 son críticas para la remoción de patógenos mediante el estallido respiratorio<sup>305</sup>. Además, la señalización inducida por las ERO derivadas de la NOX1/2 cumplen un papel crítico en la diferenciación de Mo a MF y en la polarización de MF de tipo M2<sup>306</sup>. Asimismo, las ERO son inductoras de la activación del inflammasoma NLRP3, que en última instancia lleva a la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18<sup>307</sup>.

Las ERO mitocondriales y derivadas de la NOX producidas en respuesta a estímulos inflamatorios activan la vía de NF- $\kappa$ B. La activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B por las ERO involucra la fosforilación del residuo 42 de tirosina y del dominio PEST C-terminal de I $\kappa$ B $\alpha$ , proceso independiente de la quinasa de I $\kappa$ B (IKK) que resulta en su degradación<sup>308,309</sup>. Este mecanismo es diferente al inducido por las citoquinas inflamatorias y por PMA, en el que I $\kappa$ B $\alpha$  es fosforilado en residuos serina por IKK. Sin embargo, se ha observado que en MF las ERO mitocondriales también activan el complejo IKK mediante la formación de un puente disulfuro en la subunidad reguladora, resultando en la activación de NF- $\kappa$ B<sup>310</sup>. La activación de NF- $\kappa$ B mediada por las ERO induce la expresión de genes inflamatorios, antiapoptóticos y antioxidantes.

Bajos niveles de ERO dan lugar a una activación celular insuficiente, una baja tasa de proliferación de LT, y deficiencia en la fagocitosis y estallido respiratorio en Mo y MF. Por el contrario, niveles elevados de ERO inducen la oxidación no específica de macromoléculas, causando una alteración de la función celular, una respuesta inflamatoria exacerbada, y la activación de mecanismos de respuesta al estrés. Sin embargo, niveles de ERO muy altos producen la inhibición de la respuesta inmunológica y la muerte celular (Figura 44).

Dada la relevancia de la señalización redox en el proceso de activación de células inmunológicas, la disminución de los niveles de oxidantes totales inducida por Res podría contribuir con la modulación negativa de la activación celular observada. Durante la

activación celular, el anión superóxido producido en las mitocondrias es dismutado a  $H_2O_2$ , que difunde a través de las membranas hacia el citosol y contribuye con la señalización redox. Por lo tanto, la inducción de la actividad CAT podría ser uno de los mecanismos involucrados en la regulación de la activación celular inducida por Res. Adicionalmente, la oxidación del GSH junto con la inducción de la actividad GRd ayudarían con la remoción del  $H_2O_2$  y otras especies radicalarias, contribuyendo también con la regulación de la respuesta inflamatoria. Por otro lado, la elevada concentración de oxidantes presente en células de pacientes con EHGNA favorecería la desregulación de la señalización redox, y daría lugar a un estado de mayor activación celular y a una respuesta inflamatoria exacerbada.



**Figura 44.** La señalización redox está influenciada por el balance entre la producción de ERO y su catabolismo. La producción de ERO en concentración, momento, compartimentalización celular y duración adecuada contribuye con la homeostasis y la activación celular. Baja concentración de ERO lleva a una señalización redox inadecuada y, por ende, a una pobre activación celular. Cuando la producción de ERO es excesiva o prolongada, se produce daño a macromoléculas. Este daño es reversible si puede ser reparado, pero cuando el daño excede la capacidad de reparación de la célula, genera la alteración irreversible de la función celular, la inhibición de la respuesta inmunológica, y la muerte celular. Las células de individuos control presentan adaptabilidad a los cambios en la producción de ERO y responden a Res modulando la actividad antioxidante, los niveles de ERO, y la activación celular. Las células de pacientes con EHGNA presentan una alteración de la función celular y una respuesta a Res disminuida, lo que impide la correcta modulación de los niveles de ERO y de la activación celular.

# Conclusiones

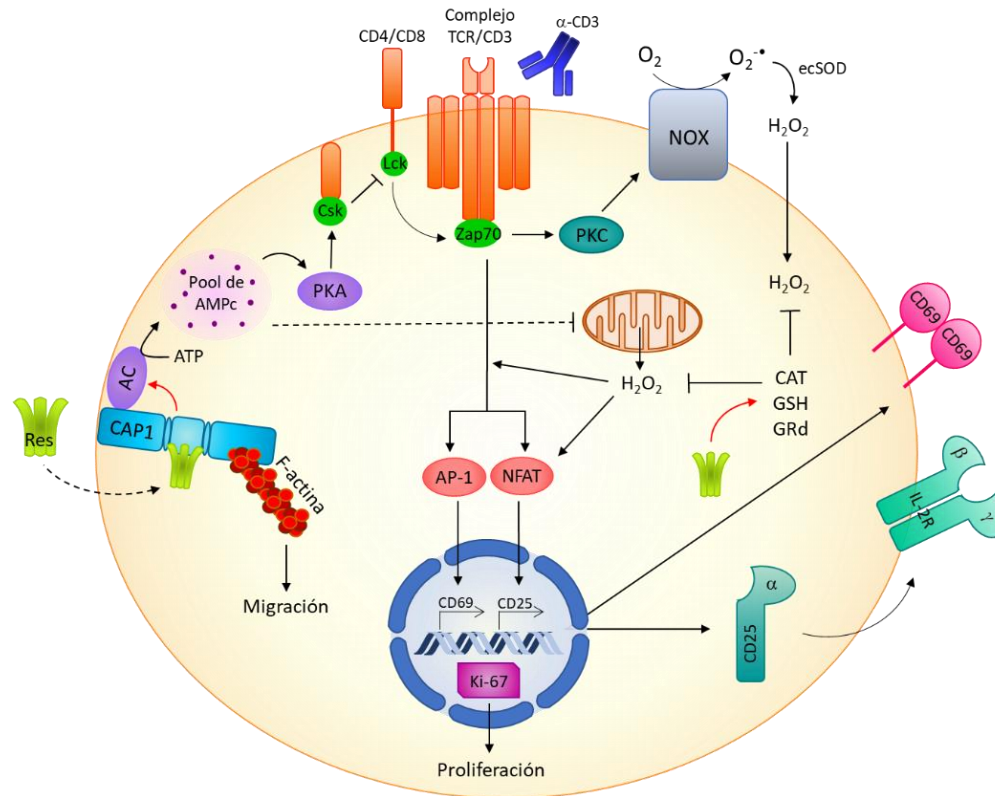
---



Demostramos que Res posee una acción regulatoria sobre las células inmunológicas mononucleares mediante diversos mecanismos. Por un lado, Res ejerce una modulación negativa sobre la activación celular, la proliferación de LT, y la producción de IL-6 en Mo a través de la inducción de la producción del AMPc y de la disminución del contenido de oxidantes. Por otro lado, Res actúa como quimioquina induciendo la migración de LT, e induce un aumento de la endocitosis en Mo posiblemente mediado por CAP-1 (Figuras 45 y 46). Estos resultados sugieren que la Res actúa como una molécula reguladora de la inflamación. Como muchas otras moléculas reguladoras, es posible que Res sea inducida en un contexto inflamatorio para controlar la respuesta inmunológica.

Los pacientes con EHGNA se caracterizan por tener una respuesta inmunológica alterada. En este sentido, demostramos que las células inmunológicas de pacientes con EHGNA presentan una activación celular exacerbada y un alto contenido de oxidantes. Si bien la elevación moderada de la concentración de oxidantes favorece la respuesta inmunológica, su adecuada modulación es clave para evitar una respuesta inflamatoria exacerbada. La falta de respuesta a Res en estas células impide la correcta regulación de la función celular, contribuyendo así con la sobreactivación y con el incremento del contenido de oxidantes. De esta forma, la falta de respuesta a Res en células inmunológicas mononucleares de pacientes con EHGNA favorecería y perpetuaría la respuesta inflamatoria, contribuyendo con la progresión de las EHGNA.

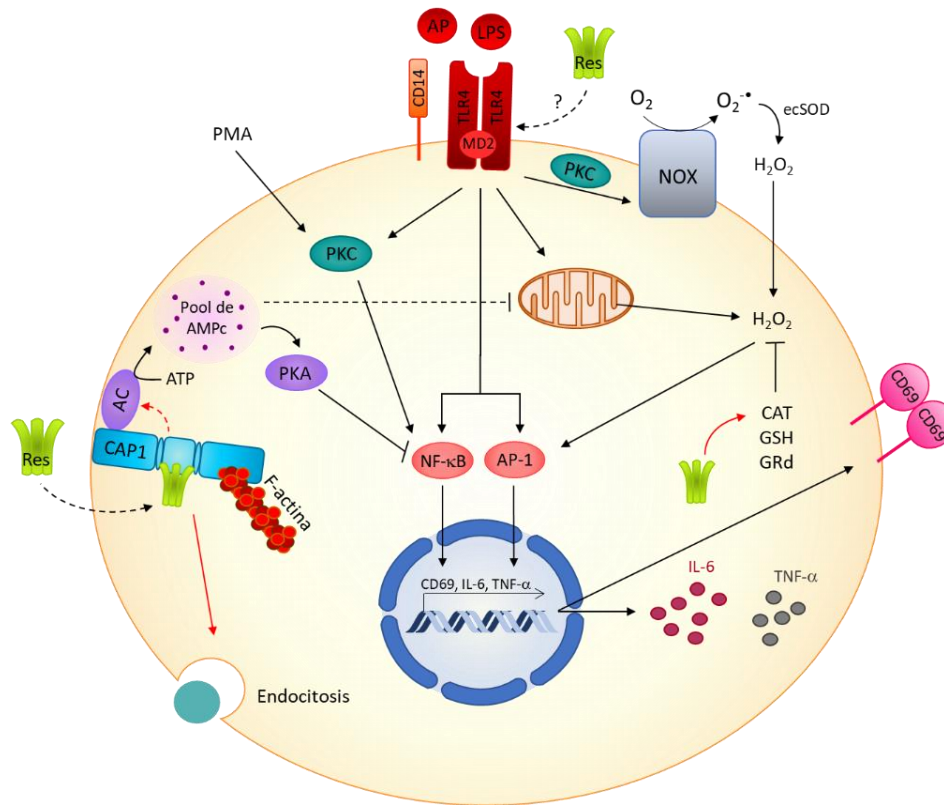
Considerando la constante búsqueda de marcadores no invasivos para el diagnóstico y tratamiento de las EHGNA, la evaluación del comportamiento de las células inmunológicas en el contexto hepático es de suma importancia. La observación de una respuesta a Res similar entre las células hepáticas y periféricas permite sentar las bases para futuros estudios que contribuyan al diagnóstico y elección de tratamientos terapéuticos mediante el uso de células periféricas.



**Figura 45. Esquema de los mecanismos de acción de Res propuestos en LT.** La Res ingresa a la célula y se une a su receptor, CAP-1, activándolo. CAP-1 activa a AC, que cataliza la formación de AMPc. El aumento de AMPc activa a la enzima PKA. La activación celular lleva a la activación de Lck, que activa a Zap70. Éste activa a los factores de transcripción AP-1 y NFAT, induciendo la transcripción de CD69 y CD25, respectivamente. La activación celular también induce la expresión de la proteína nuclear Ki-67, indicadora del proceso de proliferación celular. En respuesta a Res, la PKA activa a Csk, que inhibe a Lck. La inhibición de Lck previene la activación y la proliferación celular. Res también actúa como quimioquina induciendo la migración celular. En LT de pacientes con EHGNA, la alteración en la respuesta a Res impediría la activación de AC por CAP-1, inhibiendo la producción de AMPc y la regulación negativa de la activación y la proliferación celular. Como consecuencia, LT de pacientes con EHGNA presentan mayor activación y proliferación celular, evidenciado por una mayor expresión de CD69, CD25 y Ki-67, respectivamente.

La activación celular vía TCR induce la producción de  $O_2^-$  en mitocondrias, que es dismutado a  $H_2O_2$ , el cual difunde al citosol. Además, la vía TCR activa a la enzima PKC, que induce la producción de  $H_2O_2$  mediante la activación de la NOX. El  $H_2O_2$  refuerza la activación celular y contribuye con la activación de NFAT y AP-1. El efecto de Res sobre las actividades CAT y GRd y sobre el contenido de GSH favorece la remoción de oxidantes, contribuyendo con la modulación negativa de la activación celular. Adicionalmente, el aumento de la producción de AMPc inducido por Res contribuiría con la reducción de la producción de ERO mitocondrial. La falta de respuesta a Res en LT de pacientes con EHGNA impide la modulación de las defensas antioxidantes, lo que resulta en altos niveles de oxidantes y en una activación celular exacerbada.

Las flechas punteadas hacen referencia a mecanismos aún no comprobados. Las flechas de color rojo indican los mecanismos alterados en LT de pacientes con EHGNA. AC: adenilato ciclasa; IL-2R: receptor de IL-2; Csk: quinasas c-src; Lck: tirosina quinasa específica de leucocitos; Zap70: proteína quinasa asociada a cadena zeta 70; AP-1: proteína activadora 1; NFAT: factor nuclear de células T activadas.



**Figura 46. Esquema de los mecanismos de acción de Res propuestos en Mo.** La Res ingresa a la célula y se une a su receptor, CAP-1, activándolo. CAP-1 activa a AC, que cataliza la formación de AMPc. El aumento de AMPc activa a la enzima PKA. El LPS activa la vía de TLR4, que resulta en la activación de los factores de transcripción NF-κB y AP-1 con la consecuente inducción de CD69 y de la producción de citoquinas inflamatorias. La activación de TLR4 o la presencia de PMA inducen la activación de PKC, que refuerza la activación de los factores de transcripción NF-κB y AP-1. En respuesta a Res, la PKA inhibe a NF-κB, modulando negativamente la activación celular y la producción de IL-6. La presencia de Res también induce la endocitosis de partículas de látex. En Mo de pacientes con EHGNA, la alteración en la respuesta a Res impediría la activación de AC por CAP-1, afectando la regulación negativa de la activación celular y de la producción de IL-6. La alteración en la respuesta a Res también impacta sobre la regulación de la endocitosis. Como consecuencia, Mo de pacientes con EHGNA presentan mayor activación celular y producción de IL-6, y menor endocitosis.

La activación de la vía de TLR4 induce la producción de  $O_2^-$  en mitocondrias, que es dismutado a  $H_2O_2$ , el cual difunde al citosol. Además, la activación de la vía de TLR4 activa a la PKC, que induce la producción de  $H_2O_2$  mediante la activación de la NOX. El  $H_2O_2$  refuerza la activación celular y contribuye con la activación de AP-1 y NF-κB. El efecto de Res sobre la actividad CAT y GRd y sobre el contenido de GSH favorece la remoción de oxidantes, contribuyendo con la modulación negativa de la activación celular. Adicionalmente, el aumento de la producción de AMPc inducido por Res contribuiría con la reducción de la producción de ERO mitocondrial. La falta de respuesta a Res en Mo de pacientes con EHGNA impide la modulación de las defensas antioxidantes, lo que resulta en altos niveles de oxidantes y en una activación celular exacerbada.

Las flechas punteadas hacen referencia a mecanismos aún no comprobados. Las flechas de color rojo indican los mecanismos alterados en Mo de pacientes con EHGNA. AC: adenilato ciclasa; AP-1: proteína activadora 1.

# Bibliografía

---

1. Sattler S. The role of the immune system beyond the fight against infection. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1003. Springer New York LLC; 2017:3-14. doi:10.1007/978-3-319-57613-8\_1
2. Abbas, Abul; Lichtman, Andrew; Pillai S. *Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System - Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai - Google Libros*. Sixth edit. Elsevier Inc.; 2016. Accessed May 25, 2020. [https://books.google.com.br/books?hl=es&lr=&id=bSuFDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=PgHMdKiX2B&sig=haA17KsgFNuZ5xtJuf8tC8R2Vi8&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=es&lr=&id=bSuFDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=PgHMdKiX2B&sig=haA17KsgFNuZ5xtJuf8tC8R2Vi8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
3. Hato T, Dagher PC. How the innate immune system senses trouble and causes trouble. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(8):1459-1469. doi:10.2215/CJN.04680514
4. Bortolotti P, Faure E, Kipnis E. Inflammasomes in tissue damages and immune disorders after trauma. *Front Immunol*. 2018;9(AUG). doi:10.3389/fimmu.2018.01900
5. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-837. doi:10.1038/nri2873
6. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-774. doi:10.1038/nri3070
7. Parihar A, Eubank TD, Doseff AI. Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death. *J Innate Immun*. 2010;2(3):204-215. doi:10.1159/000296507
8. Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, Myśliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw*. 2015;69:496-502. doi:10.5604/17322693.1150133
9. Ricardo SD, Van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3522-3530. doi:10.1172/JCI36150
10. Grudzien M, Rapak A. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. *J Immunol Res*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/4868417
11. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. 2006;124(4):815-822. doi:10.1016/j.cell.2006.02.001
12. Kumar B V., Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48(2):202-213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007
13. Zhu J. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(10). doi:10.1101/cshperspect.a030338
14. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126(1):32-41. doi:10.1038/sj.jid.5700001
15. Slauenwhite D, Johnston B. Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. *Front Immunol*. 2015;6(MAY). doi:10.3389/fimmu.2015.00255
16. Cortesi F, Delfanti G, Casorati G, Dellabona P. The pathophysiological relevance of the iNKT cell/mononuclear phagocyte crosstalk in tissues. *Front Immunol*. 2018;9(OCT). doi:10.3389/fimmu.2018.02375
17. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002

18. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
19. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiol Rev.* 2019;99(1):311-379. doi:10.1152/physrev.00036.2017
20. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0
21. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239-247. doi:10.1038/35041687
22. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2006;1763(12):1755-1766. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.006
23. Meo S Di, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/1245049
24. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
25. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol.* 2015;12(1):5-23. doi:10.1038/cmi.2014.89
26. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018;13:757-772. doi:10.2147/CIA.S158513
27. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(5):3143-3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008
28. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):1-12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
29. Giustarini D, Tsikas D, Colombo G, et al. Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1019:21-28. doi:10.1016/j.jchromb.2016.02.015
30. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009;390(3):191-214. doi:10.1515/BC.2009.033
31. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915-1928. doi:10.1083/jcb.201708007
32. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):344-356. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018
33. Glorieux C, Buc Calderon P. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach in: *Biological Chemistry Volume 398 Issue 10 (2017)*. doi:10.1515/hsz-2017-0131
34. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - An

- evolutionary overview. *FEBS J.* 2008;275(15):3959-3970. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x
35. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal.* 2011;15(7):1957-1997. doi:10.1089/ars.2010.3586
  36. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016;95:27-42. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028
  37. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(5):3217-3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018
  38. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
  39. Sun L, Yang X, Yuan Z, Wang H. Metabolic reprogramming in immune response and tissue inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(9):1990. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314037
  40. Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/1580967
  41. Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol.* 2020;37:101759. doi:10.1016/J.REDOX.2020.101759
  42. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7(APR):1. doi:10.3389/fendo.2016.00030
  43. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014;156(1-2):20-44. doi:10.1016/j.cell.2013.12.012
  44. Sacks H, Symonds ME. Anatomical locations of human brown adipose tissue: Functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2013;62(6):1783-1790. doi:10.2337/db12-1430
  45. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:22. doi:10.3389/fcvm.2020.00022
  46. Vegiopoulos A, Rohm M, Herzig S. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* 2017;36(14):1999-2017. doi:10.15252/embj.201696206
  47. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3. doi:10.1038/nrdp.2017.34
  48. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Arch Med Sci.* 2013;9(2):191-200. doi:10.5114/aoms.2013.33181
  49. Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism.* 2015;64(1):13-23. doi:10.1016/j.metabol.2014.09.010

50. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*. 2015;64(1):24-34. doi:10.1016/j.metabol.2014.08.004
51. Wróblewski A, Strycharz J, Świdarska E, et al. Molecular insight into the interaction between epigenetics and leptin in metabolic disorders. *Nutrients*. 2019;11(8). doi:10.3390/nu11081872
52. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316(2):129-139. doi:10.1016/j.mce.2009.08.018
53. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):101-109. doi:10.1093/jmcb/mjw014
54. Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/658913
55. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*. 2007;380(1-2):24-30. doi:10.1016/j.cca.2007.01.026
56. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-1062. doi:10.1016/S0140-6736(05)67402-8
57. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2017;22(4):365-367. doi:10.1177/1074248416686187
58. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: Underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*. 2013;3(1):1-58. doi:10.1002/cphy.c110062
59. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133-2223. doi:10.1152/physrev.00063.2017
60. Cersosimo E, Triplitt C, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus ncbi. Published online May 28, 2015. Accessed August 26, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/>
61. White MF. Insulin Signaling in Health and Disease. *Science (80- )*. 2003;302(5651):1710-1711. doi:10.1126/science.1092952
62. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012;55(10):2565-2582. doi:10.1007/s00125-012-2644-8
63. Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):753-762. doi:10.1016/j.coph.2009.07.004
64. Engin A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 960. Springer New York LLC; 2017:1-17. doi:10.1007/978-3-319-48382-5\_1
65. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep*. 2015;4(3):363-370. doi:10.1007/s13679-015-0169-4
66. Aronne LJ, Nelinson DS, Lillo JL. Obesity as a disease state: A new paradigm for diagnosis



- and treatment. *Clin Cornerstone*. 2009;9(4):9-29. doi:10.1016/S1098-3597(09)80002-1
67. Mandviwala T, Khalid U, Deswal A. Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? *Curr Atheroscler Rep*. 2016;18(5):1-10. doi:10.1007/s11883-016-0575-4
68. Boles A, Kandimalla R, Reddy PH. Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1026-1036. doi:10.1016/j.bbadis.2017.01.016
69. Iyengar NM, Gucaip A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and cancer mechanisms: Tumor microenvironment and inflammation. *J Clin Oncol*. 2016;34(35):4270-4276. doi:10.1200/JCO.2016.67.4283
70. Lu F Bin, Hu E De, Xu LM, et al. The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;12(5):491-502. doi:10.1080/17474124.2018.1460202
71. Obesity and overweight. Accessed July 23, 2020. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
72. En Argentina aumentó el sobrepeso, la obesidad, la diabetes y el sedentarismo | Argentina.gob.ar. Accessed July 22, 2020. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/en-argentina-aumento-el-sobrepeso-la-obesidad-la-diabetes-y-el-sedentarismo>
73. Wright SM, Aronne LJ. Causes of obesity. *Abdom Imaging*. 2012;37(5):730-732. doi:10.1007/s00261-012-9862-x
74. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(2):163-177. doi:10.1016/j.beem.2013.02.005
75. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*. 2016;59(6):1075-1088. doi:10.1007/s00125-016-3933-4
76. Haczeyni F, Bell-Anderson KS, Farrell GC. Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. *Obes Rev*. 2018;19(3):406-420. doi:10.1111/obr.12646
77. Maquoi E, Munaut C, Colige A, Collen D, Roger Lijnen H. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes*. 2002;51(4):1093-1101. doi:10.2337/diabetes.51.4.1093
78. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*. 2013;18(4):470-477. doi:10.1016/j.cmet.2013.06.016
79. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev*. 2013;93(1):1-21. doi:10.1152/PHYSREV.00017.2012
80. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: Time for a reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-2449. doi:10.2337/db11-0425
81. Byrne C, Olufadi R, Bruce K, Cagampang F, Ahmed M. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(7):539-564. doi:10.1042/CS20080253
82. Mittendorfer B, Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(10):1872. doi:10.1038/OBY.2009.224

83. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and Development of the Liver. *Dev Cell*. 2010;18(2):175-189. doi:10.1016/j.devcel.2010.01.011
84. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21):R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
85. Kubes P, Jenne C. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol*. 2018;36(1):247-277. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052415
86. Hines IN, Son G, Kremer M. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol Res Pract*. Published online 2010. doi:10.1155/2010/453563
87. Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. *Compr Physiol*. 2013;3(2):567-598. doi:10.1002/cphy.c120011
88. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43(2 SUPPL. 1):S54-S62. doi:10.1002/hep.21060
89. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DYR. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(5):1902-1910. doi:10.1172/JCI66369
90. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2009;1791(6):467-473. doi:10.1016/j.bbalip.2008.11.001
91. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):195-206. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.005
92. Sørensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrød B. Liver sinusoidal endothelial cells. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1751-1774. doi:10.1002/cphy.c140078
93. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1294. doi:10.1007/S10620-016-4049-X
94. Chen Y, Tian Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(1):57. doi:10.1038/S41423-020-00561-Z
95. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 2018;24(30):3361. doi:10.3748/WJG.V24.I30.3361
96. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials*. 2014;9(3):126-133. doi:10.2174/1574887109666141216111143
97. Younossi ZM, Koenig A, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84. doi:10.1002/HEP.28431
98. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109
99. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(47):8263-8276. doi:10.3748/wjg.v23.i47.8263

100. Wong V, Wong G, Choi P, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*. 2010;59(7):969-974. doi:10.1136/GUT.2009.205088
101. McPherson S, Hardy T, Henderson H, Burt A, Day C, Anstee Q. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol*. 2015;62(5):1148-1155. doi:10.1016/J.JHEP.2014.11.034
102. Sheka A, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford P, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 2020;323(12):1175-1183. doi:10.1001/JAMA.2020.2298
103. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology*. 2016;63(3):827-838. doi:10.1002/HEP.28368
104. Cai X, Sun L, Liu X, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with increased risk of chronic kidney disease. *Ther Adv Chronic Dis*. 2021;12. doi:10.1177/20406223211024361
105. Hadi H El, Vincenzo A Di, Vettor R, Rossato M. Cardio-Metabolic Disorders in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9). doi:10.3390/IJMS20092215
106. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S47-S64. doi:10.1016/J.JHEP.2014.12.012
107. Rosato V, Masarone M, Dallio M, Federico A, Aglitti A, Persico M. NAFLD and Extra-Hepatic Comorbidities: Current Evidence on a Multi-Organ Metabolic Syndrome. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(18). doi:10.3390/IJERPH16183415
108. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9330-9337. doi:10.3748/wjg.v20.i28.9330
109. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388-1402. doi:10.1016/J.JHEP.2015.11.004
110. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*. 2020;9(4). doi:10.3390/CELLS9041005
111. Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1264. doi:10.1053/J.GASTRO.2018.12.036
112. Kleiner DE, Makhlof HR. Histology of NAFLD and NASH in Adults and Children. *Clin Liver Dis*. 2016;20(2):293. doi:10.1016/J.CLD.2015.10.011
113. Mundim M, Velapati S, Patel J, Kellogg T, Abu Dayyeh D, Hurt R. Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutr Clin Pract*. 2020;35(1):72-84. doi:10.1002/NCP.10449
114. Sumida Y, Yoneda M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *J Gastroenterol*. 2018;53(3):362. doi:10.1007/S00535-017-1415-1
115. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. 2009;103(2):71-83. doi:10.1093/qjmed/hcp158
116. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908. doi:10.1038/S41591-

018-0104-9

117. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048. doi:10.1016/J.METABOL.2015.12.012
118. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science*. 2011;332(6037):1519. doi:10.1126/SCIENCE.1204265
119. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2013;48(4):434. doi:10.1007/S00535-013-0758-5
120. Koo S-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013;19(3):210. doi:10.3350/CMH.2013.19.3.210
121. Choi SH, Ginsberg HN. Increased Very Low Density Lipoprotein Secretion, Hepatic Steatosis, and Insulin Resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(9):353. doi:10.1016/J.TEM.2011.04.007
122. Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis*. 2010;9:42. doi:10.1186/1476-511X-9-42
123. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity and Glucotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1049. doi:10.1016/J.METABOL.2016.02.014
124. Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12 Suppl 2(SUPPL. 2):83-92. doi:10.1111/J.1463-1326.2010.01275.X
125. Kubota N, Kubota T, Kajiwara E, et al. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/NCOMMS12977
126. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343. doi:10.1172/JCI23621
127. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie*. 2017;136:75-84. doi:10.1016/J.BIOCHI.2016.12.019
128. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(18):3313. doi:10.1007/S00018-018-2860-6
129. Mato JM, Alonso C, Nouredin M, Lu SC. Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2019;25(24):3009. doi:10.3748/WJG.V25.I24.3009
130. Nassir F, Ibdah JA. Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8713. doi:10.3390/IJMS15058713
131. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular Trafficking and Secretion of Very Low Density Lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1079. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241471

132. Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res.* 2009;50(Suppl):S162. doi:10.1194/JLR.R800090-JLR200
133. Schwarz J, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(1):43-50. doi:10.1093/AJCN/77.1.43
134. Carr RM, Oranu A, Khungar V. Non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016;45(4):639. doi:10.1016/J.GTC.2016.07.003
135. Duwaerts CC, Maher JJ. Mechanisms of Liver Injury in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Curr Hepatol reports.* 2014;13(2):119. doi:10.1007/S11901-014-0224-8
136. Vonghia L, Michielsen P, Francque S. Immunological Mechanisms in the Pathophysiology of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):19867. doi:10.3390/IJMS141019867
137. Kim SY, Jeong JM, Kim SJ, et al. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4-MD2 complex. *Nat Commun.* 2017;8(1):1-15. doi:10.1038/s41467-017-02325-2
138. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015;21(29):8787. doi:10.3748/WJG.V21.I29.8787
139. Zamparelli MS, Compare D, Coccoli P, et al. The Metabolic Role of Gut Microbiota in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8). doi:10.3390/IJMS17081225
140. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20(4):461. doi:10.1007/S11154-019-09512-0
141. Ma M, Duan R, Zhong H, Liang T, Guo L. The Crosstalk between Fat Homeostasis and Liver Regional Immunity in NAFLD. *J Immunol Res.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/3954890
142. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.* 2013;59(3):583-594. doi:10.1016/j.jhep.2013.03.033
143. Bruzzi S, Sutti S, Giudici G, et al. B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Free Radic Biol Med.* 2018;124:249-259. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.06.015
144. Sutti S, Albano E. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(2):81. doi:10.1038/S41575-019-0210-2
145. Narayanan S, Surette FA, Hahn YS. The Immune Landscape in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immune Netw.* 2016;16(3):147. doi:10.4110/IN.2016.16.3.147
146. Ghazarian M, Revelo XS, Nøhr MK, et al. Type I Interferon Responses Drive Intrahepatic T cells to Promote Metabolic Syndrome. *Sci Immunol.* 2017;2(10). doi:10.1126/SCIIMMUNOL.AAI7616
147. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv*

- Drug Deliv Rev.* 2017;121:27. doi:10.1016/J.ADDR.2017.05.007
148. Rotman Y, Sanyal A. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2017;66(1):180-190. doi:10.1136/GUTJNL-2016-312431
  149. Khomich O, Ivanov A V., Bartosch B. Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Cells.* 2020;9(1). doi:10.3390/CELLS9010024
  150. Acquarone E, Monacelli F, Borghi R, Nencioni A, Odetti P. Resistin: A reappraisal. *Mech Ageing Dev.* 2019;178:46-63. doi:10.1016/j.mad.2019.01.004
  151. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001;409(6818):307-312. doi:10.1038/35053000
  152. Li F, He J, Li Z, Luo Z, Yan L, Li Y. Effects of resistin expression on glucose metabolism and hepatic insulin resistance. *Endocrine.* 2009;35(2):243-251. doi:10.1007/S12020-009-9148-4
  153. Rangwala S, Rich A, Rhoades B, et al. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes.* 2004;53(8):1937-1941. doi:10.2337/DIABETES.53.8.1937
  154. Al Hannan F, Culligan KG. Human resistin and the RELM of Inflammation in diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2015;7(1). doi:10.1186/s13098-015-0050-3
  155. Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, et al. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes.* 2002;51(6):1737-1744. doi:10.2337/DIABETES.51.6.1737
  156. Haugen F, Jørgensen A, Drevon C, Trayhurn P. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 2001;507(1):105-108. doi:10.1016/S0014-5793(01)02968-4
  157. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(4):1027-1031. doi:10.1006/BBRC.2001.5874
  158. Park HK, Ahima RS. Resistin in rodents and humans. *Diabetes Metab J.* 2013;37(6):404-414. doi:10.4093/dmj.2013.37.6.404
  159. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, et al. Circulating Resistin Levels Are Not Associated with Obesity or Insulin Resistance in Humans and Are Not Regulated by Fasting or Leptin Administration: Cross-Sectional and Interventional Studies in Normal, Insulin-Resistant, and Diabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4848-4856. doi:10.1210/jc.2003-030519
  160. Filippidis G, Liakopoulos V, Mertens P, et al. Resistin serum levels are increased but not correlated with insulin resistance in chronic hemodialysis patients. *Blood Purif.* 2005;23(6):421-428. doi:10.1159/000088017
  161. Hasegawa G, Ohta M, Ichida Y, et al. Increased serum resistin levels in patients with type 2 diabetes are not linked with markers of insulin resistance and adiposity. *Acta Diabetol.* 2005;42(2):104-109. doi:10.1007/S00592-005-0187-X
  162. Ghosh S, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ehtesham NZ. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: Functional implications. *Gene.* 2003;305(1):27-34. doi:10.1016/S0378-1119(02)01213-1
  163. Kunnari A, Savolainen E, Ukkola O, Kesäniemi Y, Jokela M. The expression of human resistin

- in different leucocyte lineages is modulated by LPS and TNF $\alpha$ . *Regul Pept.* 2009;157(1-3):57-63. doi:10.1016/J.REGPEP.2009.05.002
164. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR $\gamma$  activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(2):472-476. doi:10.1016/S0006-291X(02)02841-3
165. Boström EA, Tarkowski A, Bokarewa M. Resistin is stored in neutrophil granules being released upon challenge with inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2009;1793(12):1894-1900. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.008
166. Lin Q, Price SA, Skinner JT, et al. Systemic evaluation and localization of resistin expression in normal human tissues by a newly developed monoclonal antibody. *PLoS One.* 2020;15(7). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0235546
167. Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med.* 2004;1:161-168. doi:10.1371/journal.pmed.0010045
168. Ramirez JL, Khetani SA, Zahner GJ, et al. Serum Resistin is Associated with Impaired Endothelial Function and a Higher Rate of Adverse Cardiac Events in Patients with Peripheral Artery Disease. *J Vasc Surg.* 2019;69(2):497. doi:10.1016/J.JVS.2018.05.251
169. Axelsson J, Bergsten A, Qureshi A, et al. Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. *Kidney Int.* 2006;69(3):596-604. doi:10.1038/SJ.KI.5000089
170. Zhou L, Li J, He P, Yu X, Tang C. Resistin: Potential biomarker and therapeutic target in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2021;512:84-91. doi:10.1016/J.CCA.2020.11.010
171. Lee S, Kim H. Human resistin in cardiovascular disease. *J Smooth Muscle Res.* 2012;48(1):27-35. doi:10.1540/JSMR.48.27
172. Deb A, Deshmukh B, Ramteke P, Bhati FK, Bhat MK. Resistin: A journey from metabolism to cancer. *Transl Oncol.* 2021;14(10). doi:10.1016/J.TRANON.2021.101178
173. Owecki M, Miczke A, Nikisch E, Pupek-Musialik D, Sowiński J. Serum resistin concentrations are higher in human obesity but independent from insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011;119(2):117-121. doi:10.1055/S-0030-1263111
174. Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-12 in macrophages by NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1092-1101. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.202
175. Jiang S, Park D, Tadie J, Gregoire M, Deshane, Pittet J. Human resistin promotes neutrophil proinflammatory activation and neutrophil extracellular trap formation and increases severity of acute lung injury. *J Immunol.* 2014;192(10):4795-4803.
176. Jang JC, Li J, Gambini L, et al. Human resistin protects against endotoxic shock by blocking LPS-TLR4 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(48):E10399-E10408. doi:10.1073/pnas.1716015114
177. Son Y, Ahn S, Jang M, et al. Immunomodulatory effect of resistin in human dendritic cells stimulated with lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(3):599-604. doi:10.1016/J.BBRC.2008.09.037

178. Cohen G, Ilic D, Raupachova J, Hörl WH. Resistin Inhibits Essential Functions of Polymorphonuclear Leukocytes. *J Immunol.* 2008;181(6):3761-3768. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3761
179. Miller L, Singbartl K, Chronos ZC, Ruiz-Velasco V, Lang CH, Bonavia A. Resistin directly inhibits bacterial killing in neutrophils. *Intensive Care Med Exp.* 2019;7(1). doi:10.1186/s40635-019-0257-y
180. Li Y, Yang Q, Cai D, et al. Resistin, a Novel Host Defense Peptide of Innate Immunity. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.699807
181. Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, Bokarewa MI. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6 B):1419-1431. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00899.x
182. Lee S, Lee HC, Kwon YW, et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab.* 2014;19(3):484-497. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.013
183. Daquinag A, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, Simmons P, Kolonin M. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell Stem Cell.* 2011;9(1):74-86. doi:10.1016/J.STEM.2011.05.017
184. Sánchez-Solana B, Laborda J, Baladrón V. Mouse Resistin Modulates Adipogenesis and Glucose Uptake in 3T3-L1 Preadipocytes Through the ROR1 Receptor. *Mol Endocrinol.* 2012;26(1):110. doi:10.1210/ME.2011-1027
185. Field J, Vojtek A, Ballester R, et al. Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein. *Cell.* 1990;61(2):319-327. doi:10.1016/0092-8674(90)90812-S
186. Hubberstey A, Mottillo E. Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *FASEB J.* 2002;16(6):487-499. doi:10.1096/FJ.01-0659REV
187. Ono S. The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics - more than a monomer-sequestration factor. *J Cell Sci.* 2013;126(15):3249-3258. doi:10.1242/jcs.128231
188. Kakurina G, Kolegova E, Kondakova I. Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1: Structure, Regulation, and Participation in Cellular Processes. *Biochemistry (Mosc).* 2018;83(1):45-53. doi:10.1134/S0006297918010066
189. Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P. Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Promotes Cofilin-induced Actin Dynamics in Mammalian Nonmuscle Cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15(5):2324. doi:10.1091/MBC.E04-01-0048
190. Zhang X, Pizzoni A, Hong K, et al. CAP1 binds and activates adenylyl cyclase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(24). doi:10.1073/PNAS.2024576118
191. Shen C, Zhao CY, Wang W, et al. The relationship between hepatic resistin overexpression and inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol.* 2014;14(1):39. doi:10.1186/1471-230X-14-39
192. Pagano C, Soardo G, Pilon C, et al. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol*



- Metab.* 2006;91(3):1081-1086. doi:10.1210/JC.2005-1056
193. Albracht-Schulte K, Rosairo S, Ramalingam L, et al. Obesity, adipocyte hypertrophy, fasting glucose, and resistin are potential contributors to nonalcoholic fatty liver disease in South Asian women. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2019;12:863. doi:10.2147/DMSO.S203937
194. Jamali R, Razavizade M, Arj A, Aarabi MH. Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(21):5096. doi:10.3748/WJG.V22.I21.5096
195. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, et al. Novel Plasma Biomarkers Associated with Liver Disease Severity in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2017;65(1):65. doi:10.1002/HEP.28776
196. Gierej P, Gierej B, Kalinowski P, et al. Expression of resistin in the liver of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Pol J Pathol.* 2017;68(3):225-233. doi:10.5114/PJP.2017.67583
197. Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, et al. Resistin as an intrahepatic cytokine: Overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol.* 2006;169(6):2042-2053. doi:10.2353/ajpath.2006.060081
198. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-1321. doi:10.1002/hep.20701
199. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996;24(2):289-293. doi:10.1002/hep.510240201
200. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut.* 2008;57(10):1441-1447. doi:10.1136/gut.2007.146019
201. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.* 2006;43(6):1317-1325. doi:10.1002/hep.21178
202. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45(4):846-854. doi:10.1002/hep.21496
203. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
204. Davio CA, Cricco GP, Martin G, Fitzsimons CP, Bergoc RM, Rivera ES. Effect of histamine on growth and differentiation of the rat mammary gland. *Agents Actions.* 1994;41(1 Supplement). doi:10.1007/BF02007792
205. Gilman AG. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970;67(1):305-312. doi:10.1073/pnas.67.1.305
206. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010;594:57-72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1\_4
207. Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ. Monochlorobimane fluorometric method to

- measure tissue glutathione. *Anal Biochem*. 2000;286(1):35-37. doi:10.1006/abio.2000.4765
208. Aebi H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105(C):121-126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
209. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-3175.
210. Gunzler WA, Kremers H, Flohe L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem*. 1974;12(10):444-448. Accessed December 26, 2019. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4154542](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4154542)
211. Carlberg I, Mannervik B. [59] Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113(C):484-490. doi:10.1016/S0076-6879(85)13062-4
212. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275. doi:10.1016/0922-338X(96)89160-4
213. Yang H, Youm Y-H, Vandanmagsar B, et al. Obesity accelerates thymic aging. *Blood*. 2009;114(18):3803. doi:10.1182/BLOOD-2009-03-213595
214. Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Adv Nutr*. 2016;7(1):66. doi:10.3945/AN.115.010207
215. Viardot A, Grey S, Mackay F, Chisholm D. Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. *Endocrinology*. 2007;148(1):346-353. doi:10.1210/EN.2006-0686
216. Maciver N, Jacobs S, Wieman H, Wofford J, Coloff J, JC R. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol*. 2008;84(4):949-957. doi:10.1189/JLB.0108024
217. Eslam M, Sanyal A, George J. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999-2014.e1. doi:10.1053/J.GASTRO.2019.11.312
218. Liu Y, Cui X, Hu B, et al. Upregulated expression of CAP1 is associated with tumor migration and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2014;210(3):169-175. doi:10.1016/J.PRP.2013.11.011
219. Tan M, Song X, Zhang G, et al. Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 is associated with metastasis of lung cancer. *Oncol Rep*. 2013;30(4):1639-1644. doi:10.3892/OR.2013.2607
220. Yu X, Ni Q, Chen J, et al. Knocking down the expression of adenylate cyclase-associated protein 1 inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells. *Exp Mol Pathol*. 2014;96(2):188-194. doi:10.1016/J.YEXMP.2014.02.002
221. Mihajlovic M, Ninic A, Sopic M, et al. Association among resistin, adenylate cyclase-associated protein 1 and high-density lipoprotein cholesterol in patients with colorectal cancer: a multi-marker approach, as a hallmark of innovative predictive, preventive, and personalized medicine. *EPMA J*. 2019;10(3):307. doi:10.1007/S13167-019-00178-X
222. Munjas J, Sopić M, Bogavac-Stanojević N, et al. Serum Resistin, Adenylate Cyclase-

- Associated Protein 1 Gene Expression, and Carotid Intima-Media Thickness in Patients with End-Stage Renal Disease and Healthy Controls. *Cardiorenal Med.* 2020;10(1):51-60. doi:10.1159/000503416
223. Munjas J, Sopić M, Spasojević-Kalimanovska V, Kalimanovska-Oštrić D, Anđelković M, Jelić-Ivanović Z. Association of adenylate cyclase-associated protein 1 with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 2017;47(9):659-666. doi:10.1111/ECI.12787
224. Shen C, Zhao C-Y, Wang W, et al. The relationship between hepatic resistin overexpression and inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol.* 2014;14(1):39. doi:10.1186/1471-230X-14-39
225. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *J Immunol.* 2005;174(9):5789-5795. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5789
226. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP: Master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39(2):127-132. doi:10.1165/rcmb.2008-0091TR
227. Wehbi VL, Taskén K. Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T cells – Role of Anchored Protein Kinase A Signaling Units. *Front Immunol.* 2016;7(JUN):1. doi:10.3389/FIMMU.2016.00222
228. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med.* 2013;19(10):625. doi:10.1016/J.MOLMED.2013.07.006
229. Jiang LJ, Li JL, Hong XF, Li YM, Zhang BL. Patients with nonalcoholic fatty liver disease display increased serum resistin levels and decreased adiponectin levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009;21(6):662-666. doi:10.1097/MEG.0b013e328317f4b5
230. Fujinami A, Obayashi H, Ohta K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2004;339(1-2):57-63. doi:10.1016/J.CCCN.2003.09.009
231. Šenolt L, Housa D, Vernerová Z, et al. Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(4):458. doi:10.1136/ARD.2006.054734
232. Zhang Z, Xing X, Hensley G, et al. Resistin induces expression of proinflammatory cytokines and chemokines in human articular chondrocytes via transcription and messenger RNA stabilization. *Arthritis Rheum.* 2010;62(7):1993-2003. doi:10.1002/art.27473
233. Aruna B, Ghosh S, Singh AK, et al. Human recombinant resistin protein displays a tendency to aggregate by forming intermolecular disulfide linkages. *Biochemistry.* 2003;42(36):10554-10559. doi:10.1021/bi034782v
234. Aruna B, Islam A, Ghosh S, et al. Biophysical analyses of human resistin: Oligomer formation suggests novel biological function. *Biochemistry.* 2008;47(47):12457-12466. doi:10.1021/bi801266k
235. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132706
236. Shatrova AN, Mityushova E V., Vassilieva IO, et al. Time-Dependent Regulation of IL-2R  $\alpha$ -Chain (CD25) Expression by TCR Signal Strength and IL-2-Induced STAT5 Signaling in

- Activated Human Blood T Lymphocytes. *PLoS One*. 2016;11(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0167215
237. Bystrom J, Evans I, Newson J, et al. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*. 2008;112(10):4117. doi:10.1182/BLOOD-2007-12-129767
238. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7381. doi:10.3748/WJG.V20.I23.7381
239. Leifer CA, Medvedev AE. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):927. doi:10.1189/JLB.2MR0316-117RR
240. Jang JC, Li J, Gambini L, et al. Human resistin protects against endotoxic shock by blocking LPS–TLR4 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(48):E10399. doi:10.1073/PNAS.1716015114
241. Kumar V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. *Int Immunopharmacol*. 2020;89:107087. doi:10.1016/J.INTIMP.2020.107087
242. Bryn T, Mahic M, Enserink JM, Schwede F, Aandahl EM, Taskén K. The Cyclic AMP-Epac1-Rap1 Pathway Is Dissociated from Regulation of Effector Functions in Monocytes but Acquires Immunoregulatory Function in Mature Macrophages. *J Immunol*. 2006;176(12):7361-7370. doi:10.4049/JIMMUNOL.176.12.7361
243. Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the Regulation of TNF- $\alpha$  Production in Human Mononuclear Cells: The Effects of Non-Specific Phosphodiesterase Inhibition. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008;63(3):321. doi:10.1590/S1807-59322008000300006
244. Wall EA, Zavzavadjian JR, Chang MS, et al. Suppression of LPS-Induced TNF- $\alpha$  Production in Macrophages by cAMP Is Mediated by PKA-AKAP95-p105. *Sci Signal*. 2009;2(75):ra28. doi:10.1126/SCISIGNAL.2000202
245. Negreiros-Lima GL, Lima KM, Moreira IZ, et al. Cyclic AMP Regulates Key Features of Macrophages via PKA: Recruitment, Reprogramming and Efferocytosis. *Cells*. 2020;9(1). doi:10.3390/CELLS9010128
246. Inzaugarat M, Ferreyra Solari N, Billordo L, Abecasis R, Gadano A, Cherňavsky A. Altered phenotype and functionality of circulating immune cells characterize adult patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Immunol*. 2011;31(6):1120-1130. doi:10.1007/S10875-011-9571-1
247. Gadd VL, Patel PJ, Jose S, Horsfall L, Powell EE, Irvine KM. Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease: Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation. *PLoS One*. 2016;11(6). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0157771
248. Zwolak A, Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Słabczyńska O, Kandefer-Szerszeń M. Hyperreactivity of Blood Leukocytes in Patients with NAFLD to Ex Vivo Lipopolysaccharide Treatment Is Modulated by Metformin and Phosphatidylcholine but Not by Alpha Ketoglutarate. *PLoS One*. 2015;10(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0143851
249. Imajo K, Fujita K, Yoneda M, et al. Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during

- progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab.* 2012;16(1):44-54. doi:10.1016/J.CMET.2012.05.012
250. Li B, Jones LL, Geiger TL. IL-6 promotes T cell proliferation and expansion under inflammatory conditions in association with low-level ROR $\gamma$ t expression. *J Immunol.* 2018;201(10):2934. doi:10.4049/JIMMUNOL.1800016
251. Rochman I, Paul W, Ben-Sasson S. IL-6 increases primed cell expansion and survival. *J Immunol.* 2005;174(8):4761-4767. doi:10.4049/JIMMUNOL.174.8.4761
252. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* 2010;40(7):1830-1835. doi:10.1002/EJI.201040391
253. Herck MA Van, Weyler J, Kwanten WJ, et al. The Differential Roles of T Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity. *Front Immunol.* 2019;10(FEB):82. doi:10.3389/FIMMU.2019.00082
254. Tan Z, Qian X, Jiang R, et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *J Immunol.* 2013;191(4):1835-1844. doi:10.4049/JIMMUNOL.1203013
255. Fabre T, Kared H, Friedman SL, Shoukry NH. IL-17A Enhances the Expression of Pro-fibrotic Genes through Upregulation of the TGF- $\beta$  Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-dependent Manner. *J Immunol.* 2014;193(8):3925. doi:10.4049/JIMMUNOL.1400861
256. Klemke M, Kramer E, Konstandin MH, Wabnitz GH, Samstag Y. An MEK-cofilin signalling module controls migration of human T cells in 3D but not 2D environments. *EMBO J.* 2010;29(17):2915. doi:10.1038/EMBOJ.2010.153
257. Samstag Y, John I, Wabnitz GH. Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol Rev.* 2013;256(1):30. doi:10.1111/IMR.12115
258. Zhang H, Ghai P, Wu H, Wang C, Field J, Zhou G-L. Mammalian Adenylyl Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Regulates Cofilin Function, the Actin Cytoskeleton, and Cell Adhesion. *J Biol Chem.* 2013;288(29):20966. doi:10.1074/JBC.M113.484535
259. Walcher D, Hess K, Berger R, et al. Resistin: A newly identified chemokine for human CD4-positive lymphocytes. *Cardiovasc Res.* 2010;85(1):167-174. doi:10.1093/cvr/cvp278
260. Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, Rashid S. Discovery of a New Role of Human Resistin in Hepatocyte Low-Density Lipoprotein Receptor Suppression Mediated in Part by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(19):1697-1705. doi:10.1016/J.JACC.2011.11.064
261. Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, Spraggon G. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(37):14604. doi:10.1073/PNAS.0703402104
262. Jang H-D, Lee SE, Yang J, et al. Cyclase-associated protein 1 is a binding partner of proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 and is required for the degradation of low-density lipoprotein receptors by proprotein convertase subtilisin/kexin type-9. *Eur Heart J.* 2020;41(2):239. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHZ566
263. Polimeni L, Del Ben M, Baratta F, et al. Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *World J Hepatol.* 2015;7(10):1325-1336. doi:10.4254/WJH.V7.I10.1325

264. Videla L, Rodrigo R, Orellana M, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)*. 2004;106(3):261-268. doi:10.1042/CS20030285
265. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, K W. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol*. 2002;37(1):56-62. doi:10.1016/S0168-8278(02)00073-9
266. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015;21(5):739-746. doi:10.1016/J.CMET.2015.04.004
267. Shimomura Y, Takaki A, Wada N, et al. The Serum Oxidative/Anti-oxidative Stress Balance Becomes Dysregulated in Patients with Non-alcoholic Steatohepatitis Associated with Hepatocellular Carcinoma. *Intern Med*. 2017;56(3):243. doi:10.2169/INTERNALMEDICINE.56.7002
268. Baskol G, Baskol M, Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem*. 2007;40(11):776-780. doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2007.02.006
269. Świdarska M, Maciejczyk M, Zalewska A, Pogorzelska J, Flisiak R, A C. Oxidative stress biomarkers in the serum and plasma of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Can plasma AGE be a marker of NAFLD? Oxidative stress biomarkers in NAFLD patients. *Free Radic Res*. 2019;53(8):841-850. doi:10.1080/10715762.2019.1635691
270. Casoinic F, Sampelean D, Buzoianu A, Hancu N, Baston D. Serum Levels of Oxidative Stress Markers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Non-alcoholic Steatohepatitis. *Rom J Intern Med*. 2016;54(4):228-236. doi:10.1515/RJIM-2016-0035
271. Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, et al. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2005;25(5):946-953. doi:10.1111/J.1478-3231.2005.01126.X
272. Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells Oxidative Stress and Plasma Inflammatory Biomarkers in Adults with Normal Weight, Overweight and Obesity. *Antioxidants*. 2021;10(5). doi:10.3390/ANTIOX10050813
273. Imlay J. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:395-418. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.57.030502.090938
274. PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315. doi:10.1152/PHYSREV.00029.2006
275. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*. 2014;5. doi:10.3389/FPHAR.2014.00196
276. Liu J, Chi N, Chen H, et al. Resistin protection against endogenous A $\beta$  neuronal cytotoxicity from mitochondrial pathway. *Brain Res*. 2013;1523:77-84. doi:10.1016/J.BRAINRES.2013.05.041
277. Lou J, Huang L, Wang A, et al. Resistin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to the Impairment of Insulin Signaling in Endothelium. *Front Pharmacol*. 2018;9(OCT). doi:10.3389/FPHAR.2018.01226

278. Chen C, Jiang J, Lü JM, et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2010;299(1). doi:10.1152/ajpheart.00431.2009
279. Palmeira CM, Teodoro JS, Amorim JA, Steegborn C, Sinclair DA, Rolo AP. Mitohormesis and metabolic health: The interplay between ROS, cAMP and sirtuins. *Free Radic Biol Med*. 2019;141:483. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.07.017
280. Feng R, Luo C, Li C, et al. Free fatty acids profile among lean, overweight and obese non-alcoholic fatty liver disease patients: a case – control study. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1). doi:10.1186/S12944-017-0551-1
281. McCambridge G, Agrawal M, Keady A, et al. Saturated Fatty Acid Activates T Cell Inflammation Through a Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (NNT)-Dependent Mechanism. *Biomolecules*. 2019;9(2). doi:10.3390/BIOM9020079
282. Cury-Boaventura MF, Gorjão R, De Lima TM, Newsholme P, Curi R. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. *Life Sci*. 2006;78(13):1448-1456. doi:10.1016/J.LFS.2005.07.038
283. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(3):231-241. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.04.029
284. Cury-Boaventura MF, Curi R. Regulation of reactive oxygen species (ROS) production by C18 fatty acids in Jurkat and Raji cells. *Clin Sci (Lond)*. 2005;108(3):245-253. doi:10.1042/CS20040281
285. Kim SY, Jeong J-M, Kim SJ, et al. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4–MD2 complex. *Nat Commun*. 2017;8(1). doi:10.1038/S41467-017-02325-2
286. Ben M Del, Polimeni L, Carnevale R, et al. NOX2-generated oxidative stress is associated with severity of ultrasound liver steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2014;14(1):81. doi:10.1186/1471-230X-14-81
287. Hidalgo MA, Carretta MD, Burgos RA. Long Chain Fatty Acids as Modulators of Immune Cells Function: Contribution of FFA1 and FFA4 Receptors. *Front Physiol*. 2021;12:668330. doi:10.3389/FPHYS.2021.668330
288. Miller L, Singbartl K, Chroneos ZC, Ruiz-Velasco V, Lang CH, Bonavia A. Resistin directly inhibits bacterial killing in neutrophils. *Intensive Care Med Exp*. 2019;7(1). doi:10.1186/S40635-019-0257-Y
289. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16683-16689. doi:10.1074/JBC.M011695200
290. Zhou T, Wang G, Lyu Y, et al. Upregulation of SLAMF3 on human T cells is induced by palmitic acid through the STAT5-PI3K/Akt pathway and features the chronic inflammatory profiles of type 2 diabetes. *Cell Death Dis*. 2019;10(8). doi:10.1038/S41419-019-1791-Y
291. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res*. 2019;68(11):915. doi:10.1007/S00011-019-01273-5

292. Verlengia R, Gorjão R, Kanunfre CC, Bordin S, De Lima TM, Curi R. Effect of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells--a comparison with oleic acid. *Life Sci.* 2003;73(23):2939-2951. doi:10.1016/J.LFS.2003.04.003
293. Pompura SL, Wagner A, Kitz A, et al. Oleic acid restores suppressive defects in tissue-resident FOXP3 Tregs from patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2021;131(2). doi:10.1172/JCI138519
294. Camell C, Smith CW. Dietary oleic acid increases m2 macrophages in the mesenteric adipose tissue. *PLoS One.* 2013;8(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0075147
295. Karasawa T, Kawashima A, Usui-Kawanishi F, et al. Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(4):744-756. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310581
296. Kim DH, Cho YM, Lee KH, Jeong SW, Kwon OJ. Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the downregulation of CD36 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;488(3):477-482. doi:10.1016/J.BBRC.2017.05.066
297. Huang X, Yi S, Hu J, et al. Linoleic acid inhibits in vitro function of human and murine dendritic cells, CD4 + T cells and retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021;259(4):987-998. doi:10.1007/S00417-020-04972-6
298. Kain V, Halade G V. Immune responsive resolvin D1 programs peritoneal macrophages and cardiac fibroblast phenotypes in diversified metabolic microenvironment. *J Cell Physiol.* 2019;234(4):3910-3920. doi:10.1002/JCP.27165
299. Magdalon J, Vinolo MAR, Rodrigues HG, et al. Oral administration of oleic or linoleic acids modulates the production of inflammatory mediators by rat macrophages. *Lipids.* 2012;47(8):803-812. doi:10.1007/S11745-012-3687-9
300. Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol.* 2020;37. doi:10.1016/J.REDOX.2020.101759
301. Sena LA, Li S, Jairaman A, et al. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity.* 2013;38(2):225. doi:10.1016/J.IMMUNI.2012.10.020
302. Gill T, Levine AD. Mitochondria-derived Hydrogen Peroxide Selectively Enhances T Cell Receptor-initiated Signal Transduction. *J Biol Chem.* 2013;288(36):26246. doi:10.1074/JBC.M113.476895
303. Shatynski KE, Chen H, Kwon J, Williams MS. Decreased STAT5 phosphorylation and GATA-3 expression in NOX2-deficient T cells: role in T helper development. *Eur J Immunol.* 2012;42(12):3202-3211. doi:10.1002/EJI.201242659
304. Belikov A V., Schraven B, Simeoni L. TCR-triggered extracellular superoxide production is not required for T-cell activation. *Cell Commun Signal.* 2014;12(1):50. doi:10.1186/S12964-014-0050-1
305. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ Res.* 2018;122(6):877-902. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311401
306. Xu Q, Choksi S, Qu J, et al. NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation. *J*



*Biol Chem.* 2016;291(38):20030. doi:10.1074/JBC.M116.731216

307. Meyers AK, Zhu X. The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammation. *Cells.* 2020;9(8). doi:10.3390/CELLS9081808
308. Schoonbroodt S, Ferreira V, Best-Belpomme M, et al. Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol.* 2000;164(8):4292-4300. doi:10.4049/JIMMUNOL.164.8.4292
309. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2003;278(26):24233-24241. doi:10.1074/JBC.M212389200
310. Herb M, Gluschko A, Wiegmann K, et al. Mitochondrial reactive oxygen species enable proinflammatory signaling through disulfide linkage of NEMO. *Sci Signal.* 2019;12(568). doi:10.1126/SCISIGNAL.AAR5926