

EFFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA CITOARQUITECTURA HEPÁTICA DURANTE LA OBESIDAD

Álvarez Martínez Karla Lorena (1), Alonso Castro Ángel Josabad (2), Solorio Alvarado César Rogelio (2), Zapata Morales Juan Ramón (2), Alba Betancourt Clara (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato] | [kl.alvarezmartinez@ugto.mx]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [c.albabetancourt@ugto.mx]

Resumen

El padecimiento de hígado graso no alcohólico actualmente tiene una incidencia global muy alta, siendo reconocido como el componente hepático del síndrome metabólico. El desarrollo de esta enfermedad está estrechamente relacionado con la obesidad, insulino-resistencia, dislipidemia e hipertensión. En esta experimentación se buscó inducir este padecimiento a partir de una alimentación alta en fructosa, grasa y colesterol (AAFGC) que generó un estado de obesidad en conejos machos Nueva Zelanda, de aproximadamente 2kg, provocando así la acumulación de ácidos grasos en el citoplasma de los hepatocitos. De acuerdo a la asociación que existe entre este padecimiento y la insulino-resistencia, resulta atractivo esperar que el tratamiento farmacológico con metformina provocará la reducción o mejora de las condiciones de fibrosis en el hígado. Con respecto a este trabajo, se observaron diferencias significativas en la citoarquitectura de los tejidos hepáticos entre los animales que recibieron una alimentación AAFGC (acumulación de vacuolas grandes de grasa sobre la superficie de los hepatocitos) con los que recibieron tratamiento con metformina (la cantidad y el tamaño de las vacuolas fueron considerablemente menores), suponiendo que este fármaco es importante para el tratamiento de esta patología.

Abstract

The non-alcoholic fatty liver disease currently has a very high overall incidence, being recognized as the hepatic component of the metabolic syndrome. The development of this disease is closely related to obesity, insulin resistance, dyslipidemia and hypertension. This experiment sought to induce this disease from a high dietary fructose, fat and cholesterol (AAFGC) that generated a state of obesity in male New Zealand rabbits, approximately 2 kg, thus causing the accumulation of fatty acids in the cytoplasm of the hepatocytes. According to the association between this condition and insulin resistance, it is attractive to expect that the pharmacological treatment with metformin will cause the reduction or improvement of fibrosis conditions in the liver. With respect to this work, significant differences were observed in liver cytoarchitecture among animals receiving AAFGC (accumulation of large fat vacuoles on the surface of hepatocytes) with those receiving metformin (the amount and size of the vacuoles were considerably smaller), assuming that this drug is important for the treatment of this pathology.

Palabras Clave

Hígado graso; Insulino-resistencia; Cortes histológicos; Metformina.

INTRODUCCIÓN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) se caracteriza por la acumulación de ácidos grasos libres y triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos, preferentemente en forma de grandes vacuolas de grasa, en pacientes sin consumo tóxico de alcohol y no asociado a otras enfermedades hepáticas [1].

Esta enfermedad tiene la capacidad de desarrollar un amplio espectro de manifestaciones clínicas y patológicas, las cuales van desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis y la cirrosis [2].

Patogénesis

Estos factores se clasifican en primarios, es decir, los más importantes, y están relacionados con los diferentes componentes del síndrome metabólico; diabetes tipo 2, obesidad y dislipidemia [3]. La enfermedad del HGNA sería el componente hepático del síndrome, la resistencia a insulina la alteración determinante de la esteatosis y esta, con el concurso de otros elementos, de los trastornos inflamatorios, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, de la aparición de esteatohepatitis no alcohólica y fibrosis [4]. La prevalencia de la obesidad en diferentes estudios de pacientes con HGNA varía entre el 30 y el 100%, la diabetes tipo 2 entre el 10 y 75% y la dislipidemia entre el 20 y 92% [1].

Los factores secundarios son mucho menos frecuentes, los cuales se relacionan con el consumo de algunos fármacos, cirugía bariátrica, nutrición parenteral, enfermedades metabólicas congénitas y otros tóxicos [4].

Características clínicas

Las manifestaciones clínicas de HGNA dependerán principalmente de tres factores: grado de infiltración grasa en el hígado, velocidad de infiltración y causa de la misma.

Se sospecha de esta enfermedad en pacientes con características de insulino-resistencia y niveles séricos de transaminasas elevadas [5]. La mayoría de los pacientes son asintomáticos, aunque se ha relacionado con malestar en hipocondrio derecho, acantosis nigricans como signo de la insulinoresistencia y hepatomegalia [6].

Diagnóstico

Su diagnóstico se basa fundamentalmente en un estudio histológico, por lo que resulta necesario la práctica de una biopsia, gold standard, esta se caracteriza por incluir: esteatosis, infiltrado inflamatorio celular mixto, degeneración balonzante de los hepatocitos, necrosis, depósito hialino de Mallory y fibrosis [6]. Histológicamente, el depósito de grasa es macrovesicular y la inflamación de la esteatohepatitis es lobular [7].

En el laboratorio se debe encontrar una relación AST (aspartatoamiontransferasa)/ ALT (alaninaaminotransferasa) mayor a 1, hipoalbuminemia, tiempo de protrombina prolongado e hiperbilirrubinemia [6].

Como parte del diagnóstico se realizan pruebas de imagen convencionales, ecografía, tomografía computarizada y resonancia magnética, lo cual permite visualizar los cambios morfológicos, como la acumulación de grasa en el hígado y permite evidenciar los cambios relacionados con cirrosis [8].

Tratamiento

Los progresos en el desarrollo de terapias en años recientes para el hígado graso no alcohólico se basan principalmente en la lucha contra la resistencia a la insulina tanto periférica como intrahepática [9].

La terapia consiste fundamentalmente en cambios dietéticos, ejercicio, pérdida de peso y farmacoterapia. Adicionalmente se usan agentes para reducir el estrés oxidativo y/o apoptosis o con propiedades cito protectoras [10]. Se sugiere que se de tratamiento a la obesidad, resistencia a la insulina, la hipertensión arterial, dislipidemia y diabetes mellitus [11].

Debido a la asociación que existe entre la esteatohepatitis no alcohólica y la insulino-resistencia, resulta atractivo pensar en el uso de agentes farmacológicos para tratamiento de este problema en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica [12].

La metformina es una biguanida ampliamente utilizada en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 [13]. Su diana se localiza en la mitocondria donde se estimula la β oxidación y la actividad piruvato-cinasa, suprimiendo además la expresión de enzimas lipogénicas [14].

La metformina mejora la insulino-resistencia, disminuye la gluconeogénesis a nivel hepático y la producción de triacilglicerol [15].

En algunos estudios realizados se ha demostrado que la metformina tiene la capacidad de reducir hepatomegalia, aminotransaminasas y la esteatosis [16]. En otra investigación se demostró cómo un grupo de pacientes con HGNA presentaron cambios significativos en la grasa hepática, procesos necroinflamatorios y fibrosis al ser tratados con 2000mg de metformina por un período de 12 meses [17].

En esta investigación se pretende, primeramente inducir obesidad en los animales de experimentación lo que a su vez podría generar alteraciones en la citoarquitectura del hígado, principalmente un aumento significativo de grasa en las células hepáticas.

Por medio de técnicas histológicas se evaluarán dichas alteraciones en la arquitectura de los hepatocitos y en su caso, la reducción o mejora de las condiciones de fibrosis en el hígado ocasionados por el tratamiento con metformina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo durante 21 semanas, empleando conejos machos Nueva Zelanda, de 2kg de peso aproximadamente, los cuales se mantuvieron en el bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato.

El estudio de la citoarquitectura hepática se realizó en un total de 12 conejos, los cuales se dividieron en 4 grupos. El primer grupo fueron conejos basales, los cuales no recibieron tratamiento alguno, siendo sacrificados al comienzo de la experimentación. El segundo grupo fue el control, los conejos fueron alimentados de manera normal, restringiendo su alimentación a únicamente 150g de conejina turbo al día. El tercer grupo recibió una formulación alimenticia alta en fructosa, grasa y colesterol (AAFGC) compuesta por 10% de grasa animal, 5% yema de huevo y 30% fructosa comercial, adicionalmente se les dio un tratamiento vía oral de metformina (75 mg/ kg peso) por un período de 6 semanas. En el último grupo fue inducida la obesidad al igual que el tercer grupo, sólo que estos conejos recibieron un tratamiento

con agua por el mismo período. En estos dos grupos se monitoreó semanalmente el incremento de peso.

Una vez finalizada la inducción de la obesidad y el tratamiento con metformina, se obtuvieron los hígados de los conejos en experimentación, los cuales fueron fijados en paraformaldehído al 4%.

Los tejidos obtenidos fueron sometidos a un tratamiento (Tabla 1. Proceso de deshidratación y preparación de tejido hepático), el cual se realizó mediante la utilización de un deshidratador de tejidos y un incluidor de parafina, para de esta manera preparar el tejido y poder realizar los cortes histológicos necesarios.

Los cortes se realizaron en un microtomo de parafina, de 4 a 6 micrómetros de grosor, se colocaron en un baño de flotación de 2g de grenetina en 2,5L de agua, a 42°C.

Tabla 1: °

Deshidratación		
Número	Proceso	Tiempo
1	Enjuague en agua corriente.	5 minutos
2	Inmersión en alcohol etílico al 60%	2 horas
3	Inmersión en alcohol etílico al 70%	2 horas
4	Inmersión en alcohol etílico al 80%	2 horas
5	Inmersión en alcohol etílico al 100% (x4)	2 horas
Aclaramiento		
6	Inmersión en xilol (x3)	2 horas
Impregnación en parafina		
7	Inmersión en parafina líquida (x2)	2 horas

Los cortes obtenidos se colocaron en una cubeta para tinción, donde primeramente se realizó una inmersión en citrisolv, esto con la finalidad de desparafinar y posteriormente someterlos a un proceso de rehidratación.

Tabla 1: Proceso de rehidratación y tinción de tejido hepático.

Rehidratación		
Número	Proceso	Tiempo
1	Inmersión en Crisolv.(x2)	5 minutos
2	Inmersión en alcohol etílico al 96% (x2)	5 minutos
3	Inmersión en alcohol etílico al 80%(x2)	5 minutos
4	Inmersión en alcohol etílico al 70%(x2)	5 minutos
5	Inmersión en alcohol etílico al 60%	5 minutos
6	Inmersión en alcohol etílico al 50%	5 minutos
7	Inmersión en agua corriente	5 minutos
Tinción		
6	Inmersión en hematoxilina de Harris activada con ácido acético	5 minutos
7	Inmersión en agua corriente	5 minutos
8	Inmersión en alcohol ácido	5 minutos
9	Inmersión en agua corriente	5 minutos
10	Inmersión en eosina amarillenta	5 minutos
11	Inmersión en agua corriente	5 minutos
12	Inmersión en alcohol ácido	5 minutos
13	Inmersión en agua corriente	5 minutos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferencias macroscópicas observadas en el tejido hepático de los animales de experimentación fueron significativas, en el caso de los conejos control se observa un tejido completamente normal (IMAGEN 1: Observación macroscópica de a) hígado de conejo control), sin embargo, las anomalías en los conejos que recibieron una alimentación AAFGC fueron muy notorias, observándose ligeramente depósitos de grasa y por lo tanto aumento de tamaño, así como cambio de color a un café muy claro (IMAGEN 1: Observación macroscópica de b) hígado de conejo con 21 semanas de alimentación AAFGC).



IMAGEN 1: Observación macroscópica de; a) hígado de conejo control y b) hígado de conejo con 21 semanas de alimentación AAFGC.

El examen microscópico también mostró diferencias importantes en los conejos de alimentación AAFGC en comparación con basales y los de control, lo cual demuestra que la AAFGC provocó la obesidad en los animales de experimentación.

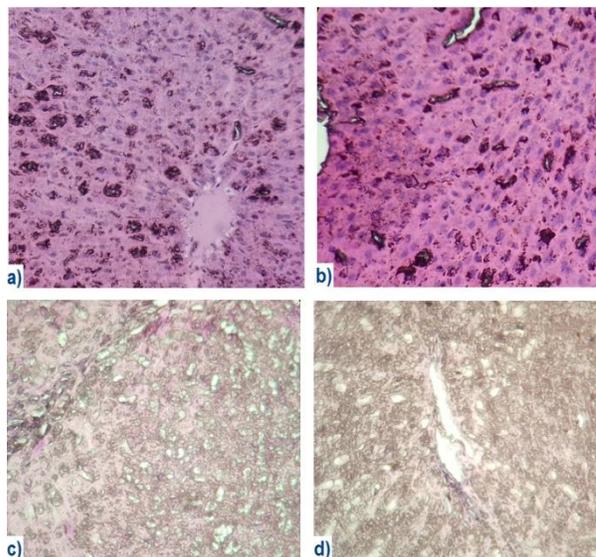


IMAGEN 2: Observación microscópica del tejido hepático bajo condiciones basales (a), control (b), alimentación AAFGC sin tratamiento con metformina (c) y alimentación AAFGC con tratamiento con metformina (75mg/kg) (d). (40X).

En las observaciones de los conejos basales y en los de control se muestra una citoarquitectura normal de los hepatocitos, en donde no se distinguen diferencias significativas (IMAGEN 2: Observación microscópica del tejido hepático bajo condiciones basales (a) y control (b)).

Los animales que recibieron una alimentación AAFGC se caracterizaron por la acumulación de vacuolas grandes de grasa sobre la superficie de los hepatocitos, cambiando por completo su

citoarquitectura. En el grupo de animales que recibieron tratamiento con metformina (IMAGEN 2: Observación microscópica del tejido hepático bajo alimentación AAFGC sin tratamiento con metformina (c) y alimentación AAFGC con tratamiento con metformina (75mg/kg) (d)) se logró distinguir la acumulación de grasa, sin embargo la cantidad y el tamaño de las vacuolas encontradas fue considerablemente menor en comparación con el grupo de conejos que no recibieron tratamiento.

CONCLUSIONES

Mediante una alimentación alta en fructosa, grasa, y colesterol fue posible inducir la obesidad, siendo esta un factor determinante para el desarrollo de hígado graso en los animales de la experimentación. La evaluación de la citoarquitectura hepática por medio de técnicas histológicas permitió distinguir el efecto que causó el tratamiento con metformina, lo que da una pauta muy importante para ampliar y mejorar la investigación con la única finalidad de asegurar la eficacia de esta droga en el tratamiento farmacológico del hígado graso.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de Ma. de los Ángeles Rodríguez Salazar, técnico académico, Juan Pedro Galván Chía, auxiliar del bioterio, Elsa Nydia Hernández Ríos, Maarten Werdler, de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología, UNAM.

REFERENCIAS

Artículo:

- [1] Angulo P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.*, 346, 1221-31
- [2] Bellentani S., Brandi G., Croce L.S., Masutti F., Saccoccio G. & Sasso F. (2000). Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*, 132, 112-7.
- [3] Brunt E.M., Chalasani N., Cusi K., Diehl A.M., Lavine J.E., Younossi Z., et al. (2012). The diagnosis and management of non-alcohol fatty liver disease: Practice guideline by American Association for the study of the Liver Diseases, American College of gastroenterology, and the American Gastroenterological association. *Hepatology*. 55, 2005-23.
- [4] Day C.P. (2011). Non-alcoholic fatty liver disease: A massive problem. *Clin Med.*, 11, 176-8.
- [5] Campbell-Sargent C., Mirshahi F., Sanyal A.J., et al. (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120(5), 1183-1192.
- [6] Negro F. (2005). Fatty liver disease: NASH and related disorders. *N Engl J Med.*, 353, 2200-2201.
- [7] Barisio M.G., Actis A. M. & Outomuro D. (2009). Hígado Graso no Alcohólico: una entidad cada vez más frecuente y de pronóstico incierto. *The American Journal Gastroenterol.* 29(1), 44-50.
- [8] Berzigotti A., Caballeria L., Caballeria J., Huertas C., Huertas C., Planas R., Saló J., Torres M., Torán P. & Vila C. (2014). Non-alcoholic fatty liver: Position document of the Catalan Society of Gastroenterology. *Gastroenterol Hepatol.* 37(6), 372-383.
- [8] Ebbeling C.B., Kartashov A.I. & Pereira M. A. (2005). Fast food habits, weight gain, and insulin resistance: 15-year prospective analysis. *Lancet*. 365, 36-42.
- [9] Bianchi G., Marchesini G., Melchionda N., Tomassetti S. & Zoli M. (2001). Metformin in non- alcoholic steatohepatitis *The lancet*. 358, 893-894.
- [9] Cobo M., Crespo J. & Fernández P. (2008). Tratamiento de la enfermedad hepática por depósito de grasa. *Gastroenterología y hepatología*. 31 (4), 229-238.
- [10] Arrospe M.T. (2003). Hígado graso no alcohólico. *Gastroenterol.* 23(1), 49-57.
- [11] Duseja A., Murlidharan R., Bhansali A et al (2004). Assessment of insulin resistance and effect of metformin in non-alcoholic steatohepatitis- a preliminary report. *Indian Gastroenterol.* 23, 12-5.
- [12] Akcam M., Boyaci A., Pirgon O., Kaya S., Uysal S. & Dunder B.N. (2011). Therapeutic effect of metformin and vitamin E versus prescriptive diet in obese adolescents with fatty liver. *Int J Vitam Nutr Res.* 81, 398-406.
- [13] Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, et al (2004). Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 19, 537-544.
- [14] Lin H.Z., Yang S.Q., Chuckaree C., Kuhajda F., Ronnet G. & Diehl A.M. (2000). Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med.* 6, 998-1003.
- [15] Bugianesi E., Gentilecore E. & Manini R. (2005). A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 100, 1082-1090.