



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS FRENTE A LA
ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA: EMPLEO
DEL RESVERATROL**

Autor: Irene Hiniesto Iñigo

Tutor: Dra. Elvira Lopez-Oliva Muñoz

Convocatoria: Febrero 2018

ÍNDICE

RESUMEN	- 3 -
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	- 4 -
OBJETIVOS.....	- 8 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 8 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 8 -
¿Qué es el resveratrol?	- 8 -
Mecanismos de acción del resveratrol	- 9 -
Mecanismos a través de AMPK.....	- 9 -
Mecanismos mediados por SIRT1	- 11 -
Resveratrol como antioxidante	- 12 -
Resveratrol como antiinflamatorio	- 12 -
Estudios que demuestran el efecto del resveratrol.....	- 13 -
In vivo	- 13 -
In vitro	- 15 -
Ensayos clínicos.....	- 16 -
CONCLUSIONES	- 18 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 19 -

RESUMEN

La enfermedad hepática del hígado graso no alcohólica es considerada como el componente hepático del síndrome metabólico y su prevalencia está aumentando rápidamente debido a su asociación con la obesidad y la resistencia a la insulina. Es necesario buscar tratamientos alternativos ya que los tratamientos actuales son limitados. Estudios recientes han demostrado que el resveratrol tiene gran efecto terapéutico frente a las alteraciones hepáticas, siendo capaz de mejorarlas a través de la activación del AMPK, SIRT1 y disminución del SREBP-1c. Los mecanismos a través de los que actúa el resveratrol aumentan la beta-oxidación y disminuyen la lipogénesis *de novo*. El resveratrol tiene además un efecto antioxidante y antiinflamatorio que contribuyen a una mejora en el pronóstico junto con una adecuada prevención de la enfermedad. De acuerdo a los estudios *in vivo* e *in vitro* realizados, el resveratrol puede disminuir la cantidad de lípidos acumulados en hígado, disminuir la resistencia a la insulina e incluso se ha visto que disminuye la masa corporal. Los ensayos clínicos realizados con el resveratrol son escasos y es necesario que en un futuro se lleven a cabo con pacientes apropiados para aclarar el verdadero impacto del tratamiento con resveratrol en aquellos que tienen diagnosticada una enfermedad hepática.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease is considered as the hepatic component of the metabolic disorder and its prevalence is increasing rapidly owing to its association with obesity and insulin resistance. It is necessary to look for alternative treatments since the current treatments are limited. Recent studies have shown that resveratrol has a great therapeutic effect against liver disorders, being able to improve them through the activation of AMPK, SIRT1 and decrease in SREBP-1c. Through its mechanisms of action, resveratrol is capable of increase beta-oxidation and decrease *de novo* lipogenesis. Resveratrol also has an antioxidant and anti-inflammatory effect that contributes to an improvement in prognosis along with an adequate prevention of the disease. According to *in vivo* and *in vitro* studies, resveratrol can decrease the accumulation of lipids in the liver, decrease insulin resistance and even decrease body mass. Clinical trials conducted with resveratrol are scarce and it is necessary that in the future they are carried out with appropriate patients to clarify the true impact of resveratrol treatment in those who have been diagnosed with liver disease.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La enfermedad grasa del hígado no alcohólica (HGNA) fue descrita por *Ludwig y col* en 1980 como un espectro continuo que va incrementando su gravedad, desde una esteatosis simple macrovesicular, de curso clínico favorable, hasta una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) caracterizada por la existencia de necroinflamación, apoptosis de los hepatocitos, fibrosis, cirrosis y eventualmente carcinoma hepatocelular¹.

Aunque quedan muchas incógnitas por resolver, se ha avanzado bastante en el conocimiento acerca de la epidemiología, patogénesis y pronóstico desde la descripción inicial de esta entidad.

Incidencia y epidemiología.

El HGNA es considerado como la manifestación del síndrome metabólico, ya que la enfermedad está caracterizada por un aumento de la acumulación de lípidos en el hígado³, lo que se encuentra asociado a un estado de resistencia a la insulina.

Los principales factores de riesgo del HGNA, y que son las manifestaciones clínicas del síndrome metabólico, son la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. También se encuentran implicadas la dislipemia, hipertensión y aterosclerosis.

El HGNA está convirtiéndose rápidamente en la enfermedad hepática más común en todo el mundo. La prevalencia de la población general en los países occidentales es del 20-30%. Se estima que alrededor de un 2-3% de la población tiene esteatosis hepática no alcohólica. Aunque la incidencia del HGNA es alta entre la población, según cifras de EEUU extrapolables a Europa y a España, la obesidad (80-90%) y la diabetes tipo 2 (30-50%) acentúan el problema, pudiendo desarrollar HGNA hasta en el 35% de los casos⁴. Así pues, el predominio de los hábitos sedentarios, la ingesta hipercalórica y la prevalencia de la obesidad en la población occidental han aumentado el riesgo de padecer EHNA configurándose como un importante problema económico, ya que los pacientes con enfermedad hepática aumentan en un 26% los costes de salud pública⁵.

Cabe destacar que la prevalencia de la HGNA probablemente está infravalorada debido a que una gran parte de los pacientes permanecen asintomáticos o presentan alteraciones biológicas discretas, a la ausencia de marcadores serológicos precisos y a la necesidad de realizar una biopsia hepática para el diagnóstico definitivo².

Patogenia de HGNA

La patogenia del HGNA es multifactorial y todavía no bien conocida¹. En la mayoría de los casos se asocia a la resistencia a la insulina⁶. El hígado se hace resistente a la acción de la hormona, incrementando la gluconeogenesis, la glucogenolisis y la transcripción de los genes lipogénicos. Se produce hiperglucemia que provoca mayor secreción de insulina, aumentando todavía más la lipogenesis hepática¹.

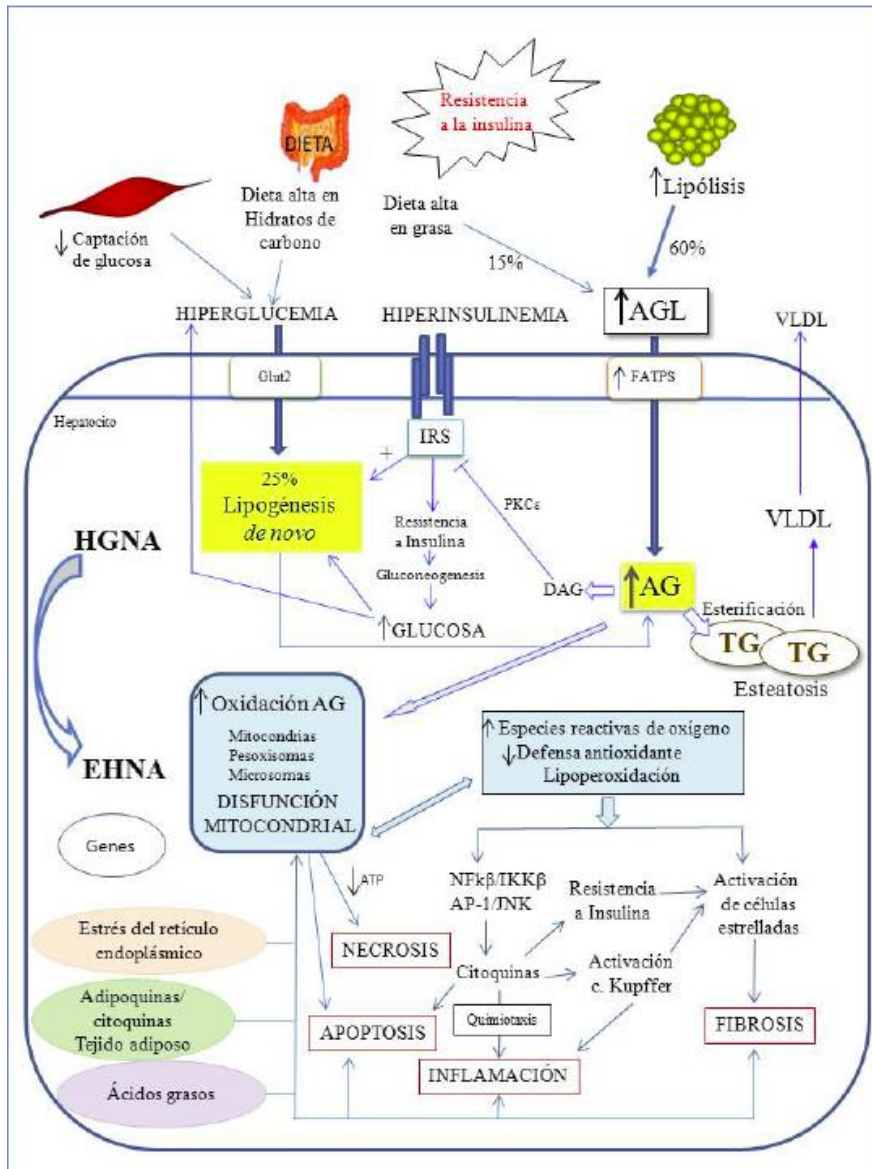


Figura 1: Patogenia hígado graso no alcohólico.

La esteatosis hepática se desarrolla debido a un desequilibrio entre el aporte y la degradación de los lípidos. El aumento de la lipólisis en los adipocitos o la disfunción mitocondrial asociada a la resistencia a la insulina puede causar acumulación lipídica por la incapacidad de realizar la β -oxidación. Además, la lipogénesis *de novo*

contribuye al desarrollo de la esteatosis hepática ya que permite la conversión de carbohidratos excedentes de la dieta en ácidos grasos que a su vez son esterificados en triglicéridos en el hígado. La resistencia periférica a la insulina reduce la acción supresora de la insulina sobre la lipasa sensible a hormona provocando un aumento del flujo de los ácidos grasos libres liberados desde el tejido adiposo blanco al hígado. Por último, el aumento en la expresión de las proteínas de transporte de ácidos grasos (FATPs), la traslocasa de AG (FAT/CD36) y las proteínas ligadoras de AG (FABPs) parecen favorecer la lipotoxicidad³.

El aumento de la glucemia e hiperinsulinemia junto con la lipogénesis *de novo* aumenta las enzimas glucolíticas y lipogénicas mediante la activación de los factores de transcripción, SREBP-1c, ChREBP y LXR. Algunas de las enzimas que se activan, fundamentales en la terapéutica de la enfermedad, son la acetil-CoA-carboxilasa (ACC) que convierte el acetil-CoA en malonil-CoA en la lipogénesis *de novo*¹. El malonil-CoA es un inhibidor de la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) que convierte los acil-CoA grasos en acil-carnitina graso en la membrana exterior de la mitocondria³.

Conversión de esteatosis a esteatohepatitis

Según la teoría de la lipotoxicidad, la esteatohepatitis se desarrolla debido a la interacción de una gran cantidad de determinantes metabólicos, entre ellos, los más destacados son la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la disminución de la capacidad antioxidante. Mecanismos adicionales de la lipotoxicidad hepática incluyen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), anomalías en la membrana de las mitocondrias y alteraciones en la composición del colesterol. La lipotoxicidad es un factor clave en el progreso de la enfermedad hepática por la inducción de la apoptosis, activando a las células de Kupffer y la respuesta inflamatoria⁷.

La acumulación de ácidos grasos libres aumenta la expresión del CYP450, una enzima implicada en la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga. Si este proceso se ve aumentado, como en él se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), estas se van a encontrar en mayor cantidad. Por otro lado, algunos ácidos grasos de cadena larga se metabolizan en la beta-oxidación peroxisomal. Esta oxidación produce peróxido de hidrogeno en presencia de hierro y causa radicales hidroxilo, que son también especies reactivas de oxígeno. El exceso de ROS consume moléculas antioxidantes como el glutatión o la vitamina E del hígado, lo que genera estrés oxidativo dando lugar a

peroxidación lipídica. Esta peroxidación causa lesiones en algunas membranas y órganos del tejido hepático, incluyendo las mitocondrias. Provoca así, una disfunción mitocondrial y altera la cadena de fosforilación en la respiración celular lo que genera aún más cantidad de especies reactivas de oxígeno, generando de nuevo estrés oxidativo. Los productos finales de la peroxidación como el malonilaldehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal son capaces de activar citoquinas proinflamatorias (TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-8)⁸ a través de la activación de las vías del factor nuclear Kappa β /I Kappa β quinasa (NF- $\kappa\beta$ /IKK β) y de la proteína activadora 1/c-Jun N-terminal quinasa 1 (AP-1/JNK1) propiciando la activación de las células de Kupffer¹.

Debido a que las células Kupffer median la respuesta inflamatoria en el hígado, se sospecha que estas células juegan un papel importante en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis. Mediante la vía de producción de citoquinas específicas, las células Kupffer pueden influenciar el metabolismo lipídico. Se ha descubierto que los productos de las células Kupffer, específicamente la IL-1 β estimulan la apolipoproteína B de baja densidad (VLDL-apoB)⁹ que se secreta a los tejidos periféricos y son convertidos en lipoproteínas de baja densidad (LDL) e intermedia densidad (IDL), provocando una alteración en la composición del colesterol. La IL-1 β estimula también las células estrelladas, que proliferan y se activan, induciendo su transformación en miofibroblastos lo que conduce a fibrosis.

Además de la secreción de citoquinas proinflamatorias, se produce una alteración en las adipoquinas que inducen la β -oxidación. Las adiponectinas son un nexo de unión entre el tejido adiposo y el metabolismo de la glucosa de todo el cuerpo lo que puede afectar a la sensibilidad hepática de la insulina¹⁰. El aumento de la beta-oxidación y la sensibilidad a la insulina se produce porque las adiponectinas activan PPAR α y la fosforilación de la quinasa activada por AMP (AMPK). Además, es capaz de modular la inflamación al suprimir la activación de IKK β inducida por TNF α ¹.

Opciones farmacoterapéuticas.

La prioridad de la farmacoterapia del HGNA es prevenir su transformación en EHNA y mejorar la fisiopatología de la enfermedad. Por ello, en teoría, los antioxidantes, antiinflamatorios y agentes antifibroticos constituyen la primera línea de tratamiento para el HGNA¹¹.

Uno de los principios activos que actualmente se está investigando como opción terapéutica tanto para prevenir como para tratar la enfermedad es el resveratrol. Se ha demostrado que el resveratrol tiene efectos en el hígado contra el desorden metabólico lipídico inducido por una dieta alta en grasas. Además, algunos estudios han reportado el efecto anti-esteatosis en varios modelos de roedores con esteatosis hepática¹².

OBJETIVOS

Se ha realizado una revisión en la que se definen los mecanismos implicados en la enfermedad del hígado graso no alcohólico y su progreso a esteatosis hepática no alcohólica. En particular, nos centramos en el resveratrol como posible estrategia terapéutica para prevenir y tratar la enfermedad. Se desarrolla qué es el resveratrol, cuáles son sus principales mecanismos de acción y dianas frente a la esteatosis hepática y se comprende como el resveratrol puede resultar efectivo a partir de estudios realizados en diversos modelos animales, tanto *in vitro* como *in vivo* y en ensayos clínicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la elaboración de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica mediante la búsqueda con las palabras clave “resveratrol”, “esteatosis hepática no alcohólica”, “enfermedad hígado graso no alcohólico” en las bases de datos Pubmed, Elsevier y Google Académico, con el objetivo de acceder a los estudios y revisiones más recientes en inglés y en castellano.

Las referencias bibliográficas fueron ordenadas y clasificadas mediante el programa Mendeley Desktop 1.17 para crear listados bibliográficos en Microsoft Office™ Word 2010 y poder acceder a PDFs a través del navegador de forma sencilla.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

¿Qué es el resveratrol?

El resveratrol es una fitoalexina presente en numerosas especies de plantas, como las uvas, bayas o cacahuets. Se produce en las plantas como defensa ante daño microbiano, infecciones fúngicas o estrés medioambiental. También se encuentra en el vino tinto lo cual prueba “la paradoja francesa” en la que se ve la baja incidencia de

enfermedad cardiovascular en la población francesa a pesar de su dieta rica en grasas, y puede ser el responsable de los beneficios descritos en el consumo del vino tinto.

Diversos estudios demuestran que el resveratrol puede prevenir o decelerar la progresión de múltiples enfermedades. Se ha demostrado que mejora la salud y la supervivencia de ratones obesos y enfermedades del hígado crónicas. Estos descubrimientos sugieren que el resveratrol puede intervenir en el daño hepático y los alimentos ricos en polifenoles pueden servir como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades crónicas del hígado. Sus efectos beneficiosos no están totalmente resueltos pero se han relacionado principalmente con su actividad antioxidante que ha demostrado proteger tejidos como el hígado ya que es capaz de disminuir las citoquinas proinflamatorias, incluyendo el TNF- α . Actúa frente al estrés oxidativo que ocurre en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis aumentando la expresión de las enzimas CPT-1 y acil-coenzima A oxidasa. Es además capaz de potenciar la fosforilación del AMPK¹³.

Mecanismos de acción del resveratrol

El resveratrol actúa a diferentes niveles: disminuye la lipogénesis *de novo*, disminuye la síntesis de triglicéridos y aumenta la beta-oxidación de los ácidos grasos⁸. Se conoce que es un activador del AMPK y SIRT1. Además, tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias¹⁴.

Mecanismos a través de AMPK.

El AMPK es un heterotrímero compuesto por una subunidad α, β e γ . La subunidad α contiene un sitio catalítico. La subunidad α de AMPK contiene un sitio de fosforilación catalítica en su extremo NH₂, mientras que la subunidad β tiene un extremo COOH. La subunidad γ se conoce como una subunidad reguladora debido a sus propiedades de unión a nucleótidos que modulan el control alostérico de AMPK, con inhibición de ATP y AMP y ADP activando la quinasa. En el hígado la quinasa principal que modula el AMPK es LKB1. Su efecto se consigue mediante la unión de un nucleótido a la subunidad γ .

A pesar de que en los pacientes con HGNA tienen menor concentración de ATP en el hígado, la actividad del AMPK se encuentra reducida, esto se puede deber a los factores inflamatorios como el TNF- α o LPS.

El AMPk tiene un papel fundamental en la aparición del HGNA mediante la regulación tres mecanismos. Si se aumenta la actividad del AMPk con el resveratrol se producen tres situaciones que previenen la aparición de HGNA:

1. Supresión de la lipogénesis *de novo*. La activación del AMPk puede aliviar los efectos del HGNA gracias a su habilidad para suprimir la lipogénesis *de novo*. El AMPk es capaz de fosforilar un residuo Ser⁷⁹ de la ACC1 (citoplasmática) y Ser²²¹ de la ACC2 (mitocondrial) e impide la dimerización de ACC, provocando una disminución de la actividad de la enzima que disminuye la formación de malonil-CoA, producto que es capaz de entrar en la vía de síntesis de ácidos grasos y es esterificado a triglicéridos que se acumulan provocando HGNA. Por ello, la inhibición de ACC conlleva la inhibición de la lipogénesis *de novo*¹⁵. Gracias al AMPk también se ven disminuidos ciertos factores de transcripción como la proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides (SREBP-1c)¹⁶. El SREBP-1c es miembro de una familia con dominio N-terminal que presenta estructura básica/hélice-bucle-hélice/cremallera de leucina. Este factor regula la síntesis de los ácidos grasos y de los triglicéridos preferentemente en el hígado y en el tejido adiposo blanco. En respuesta a insulina, el SREBP-1c induce la expresión de los genes que codifican las enzimas lipogénicas ACL, ACC, FAS, ELOVL6, SCD1, GPAT y lipin1, por su capacidad de interacción con los elementos de respuesta al esteroide, ubicados en su promotor¹.
2. Aumento de la beta-oxidación de los ácidos grasos en el hígado. Debido a que el AMPk inactiva la enzima ACC mediante su fosforilación, se reduce el malonil-CoA que es inhibidor de la enzima CPT-1. Por ello, la activación de AMPk aumenta la beta-oxidación incrementando el flujo de CPT-1 y como consecuencia aumenta el suministro de ácidos grasos a la mitocondria donde se lleva a cabo la oxidación de estos¹⁵.
3. Aumento de la función/integridad mitocondrial en el tejido adiposo. Debido al estado de resistencia a la insulina que se produce durante el HGNA, la insulina no puede suprimir la lipólisis que se lleva a cabo en el tejido adiposo blanco, dando lugar a que los ácidos grasos libres circulen por el organismo. Los ácidos grasos libres entran en el hígado donde son esterificados y aumenta el depósito de triglicéridos en el órgano. Según un estudio realizado en ratones sin AMPk en los adipocitos con una dieta rica en hidratos de carbono, durante 12 semanas, el

estado de resistencia a la insulina se puede relacionar con niveles de AMPk bajos tanto en el tejido adiposo blanco como marrón aunque el AMPk no inhibe el proceso directamente. En los ratones también se observó una disminución de la función mitocondrial asociada a un reducido proceso de mitofagia¹⁷. La mitofagia permite que las mitocondrias dañadas puedan ser captadas en un autofagosoma y sean degradadas por la fusión con un lisosoma. El AMPk aumenta la mitofagia gracias a la inhibición de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR1) y la directa activación de ULK1. Si se activa el AMPk se puede mantener la función mitocondrial en el tejido adiposo blanco y marrón evitando que los ácidos grasos sean liberados a otros tejidos como el hepático ya que una disfunción de dichos tejidos evita que los ácidos grasos sean oxidados y se da lugar a un exceso que va al resto de tejidos.

Mecanismos mediados por SIRT1

SIRT1 pertenece a la familia de las sirtulinas y es una deacetilasa NAD⁺- dependiente. Es capaz de adaptar la expresión genética y el metabolismo al estado energético intracelular. Se encuentra principalmente en el núcleo, donde funciona como un represor transcripcional a través de una histona, factor transcripción, un co-factor y la enzima deacetilasa.

En el hígado, SIRT1 aumenta la estabilidad genómica y la resistencia al estrés regular, y regula el metabolismo energético y la senescencia celular al deacetilar algunas proteínas, como el p53, PGC-1 α y PPAR-1 α . Mantiene la oxidación de los ácidos grasos y unas concentraciones de glucosa bajas. En conjunto con AMPk, SIRT1 deacetila y regula SREPB-1c y el receptor hepático X (LXR). SIRT1 es también un inhibidor de la inflamación al reprimir la transcripción y activación de NF- κ β . Esta proteína modula la transcripción de ADN en los procesos inflamatorios, infecciosos y apoptóticos. SIRT1 deacetila la subunidad RelA/p65 y por ello inhibe la señal de NF- κ β ¹⁸.

A su vez, la proteína PPAR-1 α activa PPAR γ e induce la transcripción de genes relevantes en el metabolismo de la oxidación de ácidos grasos.

El resveratrol al activar SIRT1, favorece que su acción tenga lugar y por lo tanto se lleven a cabo estos procesos que ayudan a mejorar la enfermedad del hígado graso no alcohólico y su progresión a esteatohepatitis.

Resveratrol como antioxidante

Se sabe que el resveratrol es un componente antioxidante y se ha demostrado que reduce el estrés oxidativo a través de la disminución en la vía Keap1/Nrf2, llevando a la regulación a la alza de las enzimas antioxidantes (SOD, glutatión, catalasa)¹⁴. El factor Nrf2 es el factor transcripcional principal que mantiene el estatus redox de las células.

Resveratrol como antiinflamatorio

Algunos estudios en animales demuestran que el resveratrol reduce la infiltración hepática de los macrófagos y los niveles de TNF α ¹⁴. También hay estudios que sugieren que el resveratrol consigue un efecto antiinflamatorio gracias a la represión de la translocación o la expresión génica de NF- κ B así como la disminución de los niveles de fosforilación de algunas proteínas a través de la quinasa JNK. La adiponectina está implicada también en la respuesta antiinflamatoria. La mejora en la secreción de la adiponectina y la expresión génica pueden contribuir a una mejora de la esteatohepatitis hepática¹⁹.

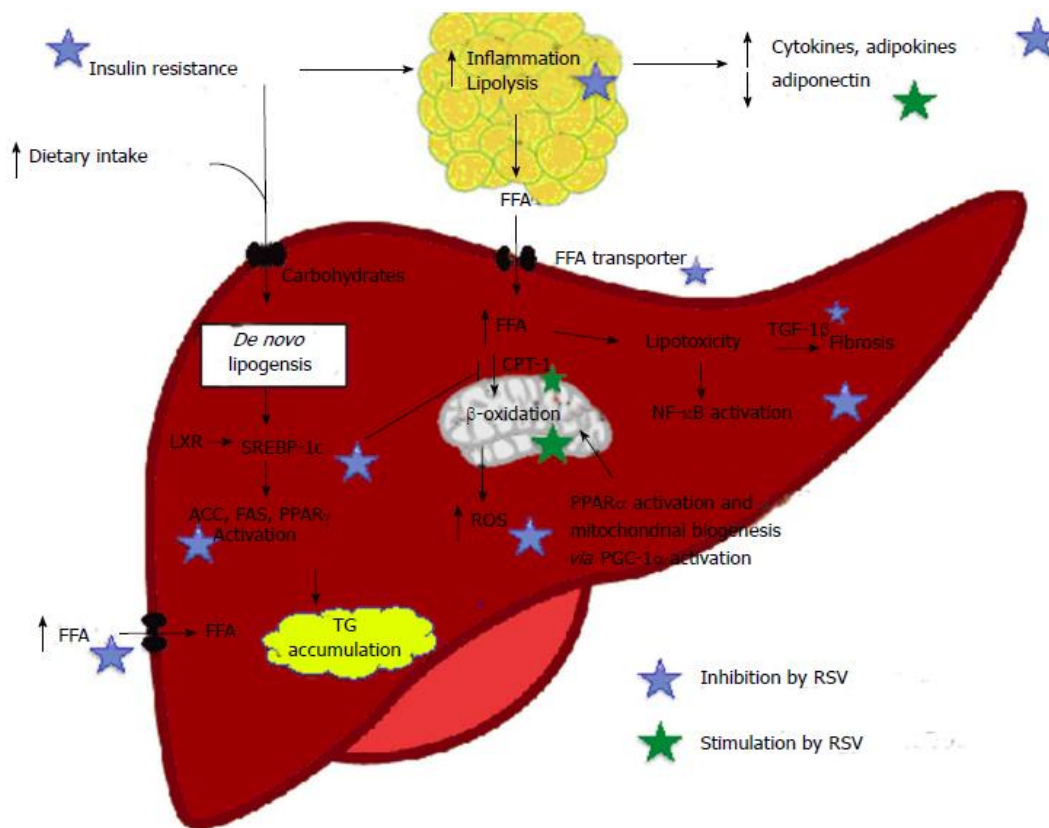


Figura 2: mecanismos resveratrol

Estudios que demuestran el efecto del resveratrol.

Los estudios que demuestran el efecto del resveratrol en la esteatosis hepática son numerosos y abarcan una amplia variedad de modelos, periodos de intervención y dosis de resveratrol¹⁴.

In vivo

Estos estudios se pueden dividir en los que emplean una dosis baja de resveratrol (7,5 mg/Kg al día) y los que emplean una dosis alta (45-300 mg/kg al día). Algunos estudios tienen la esteatosis hepática como punto principal, otros como secundaria. El tratamiento con resveratrol normalmente empieza desde el principio del estudio por lo que muchos de los estudios se centran en los efectos preventivos del resveratrol y no en los efectos terapéuticos que pueda tener. De manera prácticamente uniforme, muchos estudios han reportado efectos beneficiosos del tratamiento con resveratrol en la esteatosis hepática. Además, normalmente el tratamiento con resveratrol es capaz de reducir los niveles de insulina y glucosa en sangre y en algunas circunstancias, el peso, las transaminasas y los lípidos¹⁴.

1. El primer estudio fue llevado a cabo por *Baur et al* en modelos de roedores. Los ratones C57BL/6NIA fueron tratados con 22,4 mg de resveratrol/Kg de peso corporal por día durante 6 semanas. Los hallazgos en este estudio muestran que el resveratrol cambia la fisiología de los ratones que consumen calorías excesivas en comparación con los ratones en una dieta estándar, modula las vías de longevidad conocidas y mejora la salud. . En cualquier caso, este estudio muestra que una molécula pequeña disponible por vía oral en dosis alcanzables en humanos puede reducir de forma segura muchas de las consecuencias negativas del exceso de ingesta calórica, con una mejora general en la salud y la supervivencia²⁰.
2. El efecto a largo plazo, se pudo observar en una evaluación realizada por *Kopec et al* en diferentes tejidos de ratas. Durante 4 meses, se administró resveratrol con una dieta alta en fructosa (63%). La concentración de lípidos fue significativamente más baja en el hígado de los animales alimentados con una dieta alta en fructosa (HFD) en conjunto con un 0,04% o 0,06% de resveratrol¹³.
3. Para analizar la influencia del resveratrol en el metabolismo hepático de los triglicéridos, *Alberdi et al*, dieron 30 mg/Kg de peso corporal al día de resveratrol a ratas Sprague-Dawaley durante 6 meses. En este caso, se vio que el resveratrol

- disminuye la acumulación lipídica hepática, incrementa la actividad de la carnitina palmitoil transferasa-I y de la acil-CoA oxidasa y disminuye la de la enzima ACC.
4. En el estudio realizado por *Cho et al.* los ratones macho C57BL/6J eran alimentados con una nieta normal o una dieta HFS combinado con 0,005% o 0,02% de resveratrol durante 10 semanas. El resveratrol redujo significativamente los triacilgliceridos y el colesterol, así como el número de gotas lipídicas y su tamaño. Una dosis baja de resveratrol (0,005%) aparentemente es más efectiva que una dosis alta (0,02%) ya que es capaz de suprimir el desarrollo de la esteatosis hepática con una disminución del volumen corporal, niveles de triacilgliceridos plasmáticos y de colesterol totales. Estos cambios se atribuyeron a la supresión de la enzima ácido graso sintasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la activación de la beta-oxidación en el hígado y en el tejido adiposo. La administración crónica de resveratrol estimula la fosforilación de AMPK y disminuye el factor SREBP-1c²¹. En el estudio de *Shang et al* se demostró que el resveratrol actúa por ese mismo mecanismo de acción. Estos investigadores administraron una dosis de 100 mg/kg de peso corporal al día por vía oral durante 10 semanas. Descubrieron que el resveratrol disminuye también la expresión de los genes de la enzima ácido graso sintasa²⁴.
 5. El efecto antioxidante del resveratrol fue determinado por *Zhu et al* en ratas alimentadas con colesterol. Los resultados de ese estudio demostraron que el resveratrol aumenta la actividad de las enzimas SOD, GSH-Px y CAT en las ratas alimentadas con dieta alta en grasas en comparación con las del grupo control²².
 6. En el estudio de *Ahn et al* se hizo un análisis histológico de ciertas secciones del hígado que demostraron que el resveratrol puede disminuir la peroxidación lipídica, el número total de lípidos y triglicéridos en hígado y la necroinflamación que se produce en esta enfermedad. Los cambios ocurren gracias a que el resveratrol aumenta la expresión hepática de SIRT1. Por ello este estudio concluye que el resveratrol tiene un efecto beneficioso a través de la activación de SIRT1. Este estudio se llevó a cabo en ratones macho C57BL/6J alimentados con una dieta aterogénica (rica en colesterol) junto con 0,0125% de resveratrol durante 8 semanas⁸.
 7. El mecanismo del resveratrol a través del aumento de la fosforilación de AMPK y ACC se demostró en el estudio de *Rivera et al.* Se realizó una administración de resveratrol con una dosis de 10 mg/kg de peso corporal por día durante 8 semanas. Se puede ver que el resveratrol inducía una disminución de la acumulación de los triacilgliceridos en el hígado²³.

8. El resveratrol es capaz de aumentar la proteína descoplante 2 (UCP2) que se encuentra en muchos tejidos con función protectora de la función celular ya que preserva el potencial de la membrana cuando es afectado por el superóxido. *Poulsen et al* usando una dosis de 10 mg/kg peso corporal por día de resveratrol fueron capaces de observar este efecto después de 8 semanas de tratamiento. Este descubrimiento fue demostrado a través de una extracción química de lípidos hepáticos y el contenido de TG era significativamente menor en las ratas tratadas con resveratrol que en el grupo control. Este efecto se relacionó, además, con un aumento de mitocondrias en el hígado⁸.
9. *Shibin et al* realizaron un estudio en el que dividieron en 4 grupos a ratas Wistar. Las mantuvieron durante 18 semanas en distintas condiciones. Uno de los grupos estaba alimentado con dieta alta en fructosa, otro con una dieta estándar, el tercero con dieta alta en fructosa junto con resveratrol y el último junto con una restricción calórica. Se observó que el resveratrol (300 mg/kg peso corporal) previene la esteatosis hepática, aumentando la expresión de SIRT1 y los marcadores autofágicos mientras que reduce el estrés oxidativo en el hígado y alivia el desorden metabólico lipídico¹².
10. *Bujanda et al* analizaron los efectos del resveratrol en un modelo obtenido al alimentar a ratas con alimentación normal durante cuatro días a la semana y luego con una dieta alta en grasas durante los tres días restantes. El ciclo se repitió 4 veces. Después de 4 semanas de tratamiento, el resveratrol, administrado por vía oral por un catéter orogástrico, con una dosis de 10 mg/kg de peso corporal por día, redujo el infiltrado lipídico en el hígado significativamente. El estrés oxidativo también lo redujo significativamente. Por último se vio que se disminuyeron las concentraciones de alanintransferasa en las ratas tratadas y hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa en sangre entre el grupo control y el tratado con resveratrol²⁵.

In vitro

Son menos los estudios in vitro realizado pero las conclusiones que muestran con respecto a los estudios in vivo son similares. En estos estudios se emplean diferentes modelos celulares. Por ejemplo, en hepatocitos aislados del hígado de rata incubados con 25 µmol/L de resveratrol durante 30 min.

1. *Gnoni y Paglialonga*, observaron una reducción en un 40% de los triacilgliceroles y una disminución de la actividad de la ACC, sin cambios en la ácido graso sintasa (FAS). Basándose en estos resultados, se sugiere que el resveratrol reduce la lipogenesis *de novo*, por lo tanto, disminuye la disponibilidad de los ácidos grasos y consecuentemente la síntesis de triacilgliceridos⁸.
2. *Wang et al* usaron un modelo de esteatosis inducida con tratamiento de palmitato. Este tratamiento induce una sobreacumulación con una citotoxicidad mínima. La inclusión de 40 $\mu\text{mol/L}$ de resveratrol durante 24h en un medio de incubación, redujo la acumulación de TG debido a una disminución de SREBP-1c⁸.
3. *Zang et al* incubaron de células humanas HepG2 expuestas a altas concentraciones de glucosa, con 10 $\mu\text{mol/L}$ de resveratrol, una concentración menor que la usada en otros estudios realizados en hepatocitos de rata, durante 24h fue capaz de prevenir la acumulación de lípidos. Los autores descubrieron además una disminución de la actividad de la ACC. Vieron también una activación de AMPK y concluyeron que esta activación era requerida para que el efecto del resveratrol disminuyera los lípidos²⁶.
4. *Shang et al* además de estudios *in vivo*, realizaron uno *in vitro* en el que expusieron a células HepG2 a altas concentraciones de glucosa e insulina para conseguir un modelo celular con esteatosis. Una dosis de 50 $\mu\text{mol/L}$ de resveratrol reducía la acumulación de TG²⁴.

Ensayos clínicos

Hasta la fecha, son pocos los estudios en humanos publicados que demuestren la eficacia del resveratrol. Además, ninguno de estos estudios se ha centrado en la enfermedad hepática *per se*¹⁴.

Se conocen cinco ensayos clínicos que se centran en los polifenoles y la enfermedad hepática. De estos ensayos, tres se hicieron con dosis de 500-600mg de resveratrol durante 12 semanas o 3000 mg durante 8 semanas. De los dos ensayos clínicos que usaron la dosis similar de 500-600 mg, solo en uno de ellos se observó la reducción en las medidas antropométricas. Esta diferencia se pudo deber a que en uno de los ensayos el empleo del resveratrol se acompañó a un cambio en el estilo de vida, los pacientes fueron avisados que tenían que seguir una guía de actividad física. En cuanto a la actividad hepática, ambos ensayos demostraron una reducción del 15% de la

concentración de la alanina transaminasa en plasma. Además, una de las intervenciones demostró una reducción del colesterol LDL. Fue también descrita una importante reducción en el índice de resistencia a la insulina al evaluar un modelo de homeostasis asociado a valores de glucosa plasmática bajos después de la administración de resveratrol. Los ensayos clínicos que usaron resveratrol presentaron efectos antiinflamatorios, con una reducción de las citoquinas, TNF α , IL-6 e IL-8 y un aumento de la adiponectina. Uno de los ensayos demostró también la reducción de la actividad de NF- κ β en las células mononucleares. Por último, el ensayo clínico realizado con dosis de 3000 mg no mostro efecto beneficioso, posiblemente debido al fenómeno de “hormesis”, es decir, las dosis bajas de resveratrol son capaces de producir efecto pero las dosis altas pueden tener un efecto perjudicial¹⁹.

Resveratrol	500 mg/d	Randomised double-blind placebo-controlled study, 12 weeks intervention, with a change in lifestyle	Patients > 18 years with evidence of NAFLD defined by ultrasonographic and fibroscan examination and high ALT levels	fragment ↓Body weight ↓BMI ↓Waist circumference ↓ALT ↓Steatosis ↓IL-6 ↓TNF α ↓CRP ↓NF-KB ↓Cytokeratin-18 fragment
	600 mg/d	Randomised double-blind, placebo-controlled trial, 12 weeks	Adult NAFLD patients confirmed by ultrasound examination, aged 20–60 years	=Anthropometric characteristics =Steatosis ↓ALT and AST ↓Glucose ↓HOMA-IR ↓Total and LDL cholesterol ↓TNF α ↑Adiponectin ↓Cytokeratin-18 fragment
	3000 mg/d	Double-blind randomised placebo-controlled, parallel study, 8 weeks	Males with BMI \geq 25 kg/m ² and waist circumference \geq 90 cm and evidence of steatosis by ultrasound examination	=Anthropometric characteristics =Steatosis =HOMA-IR ↑ALT and AST

Figura 3: Ensayos clínicos con resveratrol.

CONCLUSIONES

1. Actualmente la enfermedad del hígado graso está ampliamente extendida entre la población. Es importante conocer los mecanismos de acción implicados para poder investigar nuevas opciones terapéuticas. Los antioxidantes, antiinflamatorios y agentes antifibróticos constituyen la primera línea de tratamiento para el HGNA y su progresión a EHNA.
2. El resveratrol es un antioxidante natural presente en numerosas especies de plantas. Su mecanismo de acción se basa en suprimir la lipogénesis *de novo* mediante la reducción de SREBP-1c y la activación del AMPk y SIRT1, promoviendo, además, un incremento de la beta-oxidación. Aumenta los niveles de adiponectina y mejora la resistencia a la insulina. También tiene una acción antioxidante a través de la modulación del factor de transcripción Nrf₂ y una actividad antiinflamatoria por disminución de las citoquinas inflamatorias y respuesta inmune.
3. El resveratrol muestra una eficacia significativa frente a la prevención y el tratamiento de la HGNA. Su efecto es dosis dependiente, por un proceso denominado “hormesis”. El tratamiento crónico a bajas dosis de resveratrol es más efectivo que una única dosis alta que puede ser perjudicial.
4. Aunque existen numerosos estudios *in vivo* e *in vitro*, los ensayos clínicos realizados en humanos con resveratrol son escasos. Ninguno de los estudios ha incluido pacientes con enfermedad de HGNA verificados con datos histológicos.

Aún queda mucho por descubrir acerca del resveratrol y su implicación en la enfermedad hepática. Futuros estudios en roedores y en humanos podrán determinar las dosis exactas de resveratrol que se necesitan para su eficacia como único fármaco o en combinación con otros, tanto en la prevención como en el tratamiento de la HGNA y su progresión a EHNA.

BIBLIOGRAFÍA

1. López Oliva Muñoz, E., Muñoz Martínez, E. SREB-1c, ChREBP y LRX: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. An. Real Acad. Farm. 2014. Vol 80, Nº1, 14 -48
2. Caballería, L., Torán, P., Antonia, M., Llorens, A., 2008. Esteatosis hepática no alcohólica. Puesta al día.
3. Koo S. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. Clinical and molecular hepatology. 2013. Vol 19, Nº9, 210-215
4. Bellentán, S., Scaglioni, F., Marino, M y col. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Digestive disease. 2010. Vol 28. Nº1, 155-161
5. Baumeister, S., Völzke, H., Marschall, P y col., Impact of fatty liver disease on health care utilization and cost in a general population: a 5-year observation. Gastroenterology 134, 85-94.
6. Solís Herruzo, J., García Ruiz, I., Pérez Carreras y col. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. Revista Española de enfermedades digestivas: órgano oficial de la Sociedad Española de Patología digestiva. 2006. Vol 98. Nº18, 884-874
7. Trauner, M., Arrese, M., Wagner, M. Fatty liver and lipotoxicity. Biochimica et biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell biology of lipids. 2010. Vol. 1801. Nº3, 299-310.
8. Aguirre, L., Portillo, M., Hijona, E y col. Effects of resveratrol and other polyphenol in hepatic steatosis. World Journal of Gastroenterology. 2014. Vol 20. Nº23. 7366-7380
9. Stienstra, R., Saudale, F., Duval, C y col. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor activity. Hepatology. 2010. Vol 51. Nº2, 511-522
10. Chen, G., Ni, Y., Nagata, N., Xu, L., Ota, T y col. 2016. Micronutrient antioxidants and nonalcoholic fatty liver disease. Vol 17. Nº9.
11. Nakajima, K. Multidisciplinary pharmacotherapeutic options for non-alcoholic fatty liver disease. International Journal of Hepatology. 2012. Vol 2012.
12. Ding, S., Jian, J., Zhang, G., Bu, Y., Zhao, X y col. Resveratrol and caloric restriction prevent hepatitis steatosis by regulating SIRT1-autophagy pathway and

- alleviating endoplasmic reticulum stress in high-fat diet-fed rats. *Plos one*. 2017. Vol 12. N°8.
13. Faghihzadeh, D., Hekmatdoost, A., Adibi, P. Resveratrol and liver: A systematic review. *Journal of Reseach in Medical Sciences*. 2015. Vol 20. N°8. 797-810.
 14. Heebøll, S., Thomsen, K., Pedersen, S., Vilstrup, H., George, J., Grønbæk, H. Effects of resveratrol in experimental and clinical non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*. 2014. Vol 6. N°4. 188-198.
 15. Smith, B., Marcinko, K., Desjardins, E., Lally, J., Ford, R., Steinberg, G. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *American Journal of Physiology-Endocrinology and metabolism*. 2016. Vol 311. N°4. E730-740.
 16. Miranda, N., Tovar, A., Palacios, B., Torres, N y col. La AMPK como un sensor de energía celular y su función en el organismo. *Revista de investigación clínica*. 2007. Vol 57. N°6. 458-469
 17. Mottillo, E., Desjardins, E., Crane, J y col. Lack of adipocyte AMPK exacerbates insulin resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose tissue function. *Cell metabolism*. 2016. Vol 24. N°1. 118-129
 18. Guo, Y., Li, J., Mao, T., Zhao, W., Liu, L., Wang, Y. Targeting SIRT1 in a rat model of high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease: Comparision of Gegen Qinlian decoction and resveratrol. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017. Vol 14. N°5. 4297-4287
 19. Rodriguez-Ramiro, I., Vaouzour, D., Minihane, A. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2016. Vol. 75. N°1, 47-60
 20. Baur, J., Pearson, K., Price, N y col. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. Vol. 444. 337-342.
 21. Cho, S., Jung, U., Choi, M. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*. 2012. Vol 108. N°12. 2166-2175.
 22. Zhu, L., Luo, X y Jin, Z. Effect of Resveratrol on Serum and Liver Lipid Profile and Antioxidant Activity in Hyperlipidemia Rats. *Asian-Australian journal of animal sciences*. 2008. Vol. 21. N°6. 890-895
 23. Rivera, L., Morón, R., Zarzuelo, A., Galisteo, M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol*. 2009. Vol. **77**. 1053-1063.

24. Shang, J., Chen, L., Xiao, F y col. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin.*
25. Bujanda, L., Hijona, E., Larzabal, M., Beraza, M y col. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC gastroenterol.* 2008. Vol. 8. N°40.
26. Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K y col. Polyphenols Stimulate AMP-Activated Protein Kinase, Lower Lipids and Inhibit Accelerated Atherosclerosis in Diabetic LDL Receptor-Deficient Mice. *Diabetes.* 2006. Vol 55. N°8. 2180-2191.