

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Relación entre IL-10 y moléculas asociadas a la apoptosis en un
modelo *in vitro* de esteatosis hepática**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADO(A) EN:

CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

PABLO FERNANDO PINEDA PÉREZ

DIRECTORA

DRA. HELENA SOLLEIRO VILLAVICENCIO

CODIRECTORA

DRA. LUCIA ANGÉLICA MÉNDEZ GARCÍA

Ciudad de México, Marzo, 2026

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Universidad Autónoma de la Ciudad de México Plantel Del
Valle

Integración de Jurado

Presidente	Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM
Secretario	Dra. Helena Solleiro Villavicencio Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM
Vocal	Dra. Lucia Angélica Méndez García Investigadora del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

DIRECTORA

Dra. Helena Solleiro Villavicencio
Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas

CODIRECTORA

Dra. Lucia Angélica Méndez García
Investigadora del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a mi familia, en especial a mi madre Claudia María, a mi padre Ramón Pineda y a mi hermana Galilea Pineda, por apoyarme incondicionalmente durante toda mi formación académica. Gracias por cada sacrificio, por levantarse temprano, por brindarme apoyo económico, por acompañarme todos los días a tomar el transporte y, sobre todo cuando el cansancio se hacía presente, continuaban dando todo por mí. Nada de esto habría sido posible sin su amor, paciencia y esfuerzo constante.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) y al Posgrado en Ciencias Genómicas por brindarme la oportunidad de recibir una formación académica. De manera especial, quiero agradecer a los y las doctoras que confiaron en mí desde el inicio y me motivaron a dar lo mejor de mí, incluso en los mejores momentos en los que dudé. En particular, a la Dra. Elisa Azuara, quien representó mi primer acercamiento con la carrera; a la Dra. Lilia Lopez Cánovas, por acompañarme en gran parte de mi formación, al Dr. Máximo Martínez, que aunque no compartí gran parte de mi formación, el último semestre fue muy importante para mí; y por último, a la Dra. Minerva Camacho, por aceptarme en el trabajo de investigación I y II.

Agradezco al laboratorio de Inmunometabolismo de la Dirección General de Investigación del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, por proporcionarme un espacio donde pude realizar mi servicio social y desarrollar los experimentos de este proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. Helena, le agradezco por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis. Gracias por su guía, paciencia y compromiso, por compartir sus conocimientos y experiencia, y por acompañarme durante todo este proceso, incluso en los momentos más retadores. Su confianza y apoyo fueron fundamentales para mi formación académica y para la culminación de este trabajo.

Agradezco a mi codirectora, la Dra. Angélica Méndez, y a su mano. Aun cuando llegué en un momento difícil para ella, me recibió de la mejor manera, invirtiendo tiempo, paciencia conocimiento y dedicación. Gracias por permitirme realizar mi servicio social, por enseñarme las técnicas de laboratorio, por apoyarme en cada experimento de mi tesis y por sacrificar incluso sus vacaciones para poder concluir este proyecto.

Agradezco a Itzel Baltazar por enseñarme las técnicas de laboratorio, por su infinita paciencia y por apoyarme en todo momento. Gracias por ayudarme a realizar mis experimentos, aún cuando estaba llena de pendientes, por su disposición constante, su compañerismo y por enseñarme hacerle carotas a la gente.

Agradezco a mis mejores amigos, Maciel Mercedes, Daniel Aldo y Alicia Pinzón, por acompañarme a lo largo de toda la carrera, por cada momento compartido, las experiencias vividas y su apoyo constante en cada etapa de este camino. A Elizabeth Falcón, por ser una gran persona, por todos los chismecitos compartidos, por escucharme siempre y por estar presente cuando más lo necesitaba. A Alejandro Gibrán, por enseñarme a ser paciente y a comprender el verdadero significado de la traición. A Roy y a sus “chinos falsos”, por enseñarme a no rendirme antes de tiempo y a Alfonso Arreola, por su supervisión y apoyo en cada experimento.

También agradezco a mi equipo de fútbol Caballeros F.C., por convertirse en una segunda familia.

Por último, agradezco a mis hámsters Flakk, Canelo e Ignacio Esteban Bolillo Primero; a mis gatos Gasper, Gatuchina y Cuquito; a mis perros Ariel, Jogar, Balú y Daisy, aunque algunos ya no nos acompañan, todos ocupan y ocuparán un lugar especial en mi corazón. Gracias por la compañía, el cariño y los momentos de calma que hicieron este camino más llevadero. Y a un nuevo amigo que llegó a mi vida el año pasado y que hoy ya corre en el mundo perruno, el señor Príncipe, gracias por el amor que me dejó.

Gracias a los proyectos: UACM-CCTY-2025-CON-02 y SECTEI/108/2024, por financiar mi tesis, ya que sin ellos no hubiera sido posible este logro.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mi familia, a mis mascotas y a todos mis amigos, por el apoyo brindado a lo largo de este proceso. También al posgrado de Ciencias Genómicas , al hospital general y a la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI) y al Colegio de Ciencia y Tecnología de la UACM por financiar los reactivos de mi proyecto.

Asimismo, dedico este trabajo a mi directora y codirectora de tesis, así como a todas las personas que contribuyeron de manera directa o indirecta al logro de este objetivo. También a la escarcha de hielo del refrigerador de las muestras de las embarazadas, ya que cuando no tenía hielo el 23/12/2025 fue mi salvación para hacer mi cDNA y RT-qPCR. Lo que me dejó una lección de que siempre se deben hacer los experimentos en hielo. Por último a las células HepG2 que dieron su vida para sacar mis experimentos.

ÍNDICE

Índice tablas	I
Índice figuras	II
Abreviaturas.....	III
Resumen.....	VI
I. Introducción.....	1
1.1 Características generales y funciones del hígado	1
1.1.1 Fisiología y organización celular hepática.....	1
1.2 Panorama general de las enfermedades hepáticas	3
1.3 Generalidades de la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD).....	4
1.4 Patogénesis de la MASLD y la hipótesis de los múltiples golpes	6
1.5 Avances farmacológicos y perspectivas terapéuticas en la MASLD	7
1.6 La obesidad y su impacto en el desarrollo de la MASLD	8
1.7 Inflamación en obesidad y su papel en la patogénesis de MASLD.....	10
1.8 Modelos in vitro e in vivo de estudio de MASLD.....	12
1.9 La interleucina-10: estructura y función.....	14
1.10 Vía de señalización de IL-10	15
1.11 Muerte celular regulada	16
II. Antecedentes particulares	18
2.1 Apoptosis	18
2.1.1 Vía intrínseca (interna o mitocondrial)	19
2.1.2 Vía extrínseca (externa o de receptor)	21
2.1.3 Terminación de la apoptosis	22
2.2 Función biológica y fisiológica de la apoptosis.....	23
2.3 Apoptosis en el hígado.....	25
2.4 MASLD y apoptosis	25
3 Moléculas de estudio relacionadas en la apoptosis.....	26
3.1 Características generales del antígeno tumoral celular p53.....	26
3.1.1 Relación de p53 con MASLD y apoptosis.....	28
3.2 Características generales de BCL-2	29
3.2.1 Relación de BCL2 con MASLD y apoptosis.....	30
3.3 Características generales del citocromo C	31
3.3.1 Relación de citocromo c con MASLD y apoptosis.....	32
3.4 Características generales de la CASPASA 3	33
3.4.1 Relación de la caspasa 3 con MASLD y apoptosis	35
3.5 Características generales de PARP escindida.....	36

3.5.1 Relación de PARP escindida con MASLD y apoptosis	38
3.6 Relación IL-10, apoptosis y MASLD	39
3.7 Expresión diferencial de genes de apoptosis en biopsias hepáticas humanas: reanálisis transcriptómico de datos públicos.....	40
III. Justificación	43
IV. Hipótesis	44
V. Objetivo.....	45
VI. Estrategia experimental	46
VII. Materiales y Métodos.....	47
1. Cultivo celular.....	47
2. Viabilidad celular del modelo in vitro de esteatosis	47
3. Modelo in vitro de esteatosis	49
4. Extracción de RNA.....	50
5. Síntesis de cDNA.....	51
6. Estandarización de las condiciones de amplificación de primers para los genes <i>TP53</i> , <i>CASP3</i> , <i>CYCS</i> , <i>PARP1</i> , <i>BCL2</i> , <i>18s</i> e <i>IL10</i>	51
7. Evaluación de la expresión de <i>TP53</i> , <i>CASP3</i> , <i>CYCS</i> , <i>PARP1</i> y <i>BCL2</i> mediante RT-qPCR.....	53
8. Análisis de resultados de RT-qPCR.....	54
9. Tratamiento con IL-10 exógena.....	55
VIII. Resultados	57
1. Ensayo de viabilidad celular	57
2. Modelo in vitro de esteatosis hepática en células HepG2	58
3. Cobertura porcentual de gotas lipídicas en células HepG2 tratadas por AO:AP.....	58
4. Evaluación de la expresión génica de los genes <i>BCL2</i> , <i>PARP1</i> , <i>TP53</i> , <i>CASP3</i> , <i>CYCS</i> e <i>IL10</i> por RT-qPCR, en la línea celular HepG2 tratadas a concentraciones crecientes de AO:AP.	59
5. Viabilidad con tratamiento IL-10	62
6. Evaluación de la expresión de <i>BCL2</i> , <i>TP53</i> , <i>CYCS</i> , <i>CASP3</i> , <i>PARP</i> e <i>IL10</i> en células HepG2 tratadas con concentraciones crecientes de AO:AP e IL-10 exógena.	63
IX. Discusión.....	68
X. Conclusiones	80
XI. Bibliografía.....	81

Índice tablas

Tabla 1. Estudios realizados en diferentes modelos de MASLD	13
Tabla 2. La apoptosis como mecanismo fisiopatológico	24
Tabla 3. Análisis de expresión génica diferencial de genes relacionados con la apoptosis del conjunto de datos GSE126848.....	42
Tabla 4. Secuencias de los primers utilizados	52

Índice figuras

Figura 1. Organización estructural y funcional del lobulillo hepático..	3
Figura 2. Progresión de la enfermedad hepática metabólicamente asociada (MASLD)..	6
Figura 3. Mecanismos proinflamatorios implicados en la patogénesis de la MASH...	12
Figura 4. Mecanismo de señalización inmunomoduladora de la IL-10 en células presentadoras de antígeno (CPA)..	16
Figura 5. Principales subrutinas de muerte celular regulada (RCD) y cronología de su descubrimiento..	17
Figura 6. La apoptosis se activa por dos vías principales.....	23
Figura 7. Localización cromosómica y dominios funcionales de p53.....	27
Figura 8. Localización cromosómica y dominios funcionales de BCL-2.....	30
Figura 9. Localización y único dominio funcional de citocromo c..	32
Figura 10. Localización cromosómica y dominios funcionales de la CASPASA 3.....	34
Figura 11. Localización cromosómica y dominios funcionales de PARP.....	38
Figura 12. Distribución del tratamiento con AO:AP en concentraciones crecientes.....	48
Figura. 13. Condiciones de amplificación para <i>TP53</i> , <i>CASP3</i> , <i>CYCS</i> , <i>PARP1</i> , <i>BCL2</i> , <i>18s</i> e <i>IL10</i> y como gen endógeno RNAr18S.	53
Figura 14. Diseño de grupos experimentales y viabilidad.....	57
Figura 15. Modelo de esteatosis en células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones de AO:AP en una proporción 2:1.....	58
Figura 16. Cuantificación del área de cobertura de gotas lipídicas en células HepG2..	59
Figura 17. Expresión relativa de genes relacionados a la apoptosis e IL10 en células HepG2 tratadas en concentraciones crecientes de AO:AP..	61
Figura 18. Viabilidad celular tras la exposición de AO:AP por 24 horas e IL-10 exógena por 4 horas..	62
Figura 19. Expresión relativa de genes antiapoptóticos y <i>TP53</i> en células HepG2 tratadas con AO:AP en concentraciones crecientes de AO:AP e IL-10 exógenas.....	64
Figura 20. Expresión relativa de genes proapoptóticos en células HepG2 tratadas con AO:AP en concentraciones crecientes de AO:AP e IL-10 exógena.....	66
Figura 21. Expresión relativa del gen <i>IL10</i> en células HepG2 tratadas con AO:AP en concentraciones crecientes de AO:AP e IL-10 exógena.....	67
Figura 22. Resumen del efecto dosis-dependiente del tratamiento AO:AP (proporción 2:1; por 24 h) sobre el destino celular y los marcadores moleculares..	78
Figura 23. Resumen del efecto citoprotector del tratamiento con IL-10 exógena frente al daño celular inducido por AO:AP..	79

Abreviaturas

AGL: Ácidos grasos libres

AL: Ácido asiático de *Potentilla chinensis*

ALD: Enfermedad hepática asociada al alcohol

ALEH: Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado

AO: Ácido oleico

AP: Ácido palmítico

ApoEVs: Vesículas extracelulares apoptóticas

mRNA: ARN mensajero

BAX: Proteína X asociada a BCL-2

BCL2: Gen que codifica a la proteína de la *B-cell lymphoma 2*

CASP3: Gen de la caspasa-3

cDNA: ADN complementario

Ct / Cq: *Cycle threshold* / *Quantification cycle*

CYCS: Gen del citocromo c

DILI: Lesión hepática inducida por fármacos

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecc

DRs: Receptores de muerte

EASL: Asociación Europea para el Estudio del Hígado

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (México)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

HCC: Carcinoma hepatocelular

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etanosulfónico

HepG2: Línea celular de hepatocarcinoma humano

HFD: Dieta alta en grasas (*High-Fat Diet*)

IL-10: Interleucina 10

IL10: Gen que codifica a la IL-10

IL10RA (IL-10R α): Subunidad alfa del receptor de interleucina 10

IL10RB (IL-10R β): Subunidad beta del receptor de interleucina 10

IMC: Índice de masa corporal

kDa: Kilodalton

Kg: Kilogramos

LPS: Lipopolisacárido

MASH: Esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica

MASL: Esteatosis hepática asociada a disfunción metabólica

MASLD: Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica

MCD: Dieta deficiente en metionina y colina

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORO: Oil Red O (Tinción)

PARP1: Gen que codifica a la proteína PARP-1

PBS: Solución salina amortiguada con fosfatos

RCD: Muerte celular regulada

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa y cuantificación en tiempo real

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

SEM: Error estándar de la media

STAT3: Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 3

TP53: Gen de la proteína tumoral p53

VHC: Virus de la hepatitis C

Δ : Delta

Resumen

La MASLD se define como un exceso de almacenamiento de triglicéridos en el hígado en presencia de al menos un factor de riesgo cardiometabólico. Esta enfermedad constituye la causa más común de enfermedad hepática crónica y se encuentra entre los principales factores asociados a un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad por enfermedades hepáticas. Su prevalencia está en aumento en paralelo con la obesidad y DM2, que afecta al 38% de la población adulta y el 7–14% de los niños y adolescentes. A nivel celular, la esteatosis hepática se caracteriza por la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos que supera el 5% del contenido celular y se asocia con disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y alteraciones en los mecanismos de muerte celular.

Una de las principales limitaciones en el tratamiento de las enfermedades cardiometabólicas, es la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas eficientes. La IL-10, tiene efectos antiinflamatorios y citoprotectores, ha sido considerada como una molécula que podría reducir el daño hepático.

Los resultados obtenidos demuestran que la relación ácido oleico:ácido palmítico (AO:AP, 2:1), induce un efecto citotóxico (dosis-dependiente). Activando el mecanismo de la apoptosis en concentraciones bajas, y en concentraciones altas se sugiere la activación de vías alternas de muerte celular. El tratamiento con IL-10 exógena, en dosis crecientes se bloquea la muerte celular y se potencia la expresión de productos génicos relacionados con la reparación del ADN, supervivencia celular y disminuyendo la expresión de genes proapoptóticos como *CASP3* y *CYCS*.

I. Introducción

1.1 Características generales y funciones del hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo humano, está ubicado en la región superior derecha del abdomen, pesa entre 1.3 y 1.5 kilogramos (kg) y representa el 2-3 por ciento (%) del peso corporal (Dayana., *et al.*, 2020). El hígado tiene una capacidad regenerativa única y exclusiva entre todos los órganos. La sangre que recibe proviene del intestino, páncreas, bazo y arteria hepática, la cual circula por los sinusoides hacia las venas centrales (Treyer., *et al.*, 2013).

El hígado sintetiza y metaboliza proteínas plasmáticas, carbohidratos, lípidos y vitaminas, almacena glucógeno, produce glucosa, elimina patógenos, oxida lípidos, sintetiza *de novo* ácidos grasos y elimina residuos nitrogenados como la urea (Trefts *et al.*, 2017). También participa en la síntesis y secreción de la bilis que se canaliza a través del árbol biliar hasta el duodeno, facilitando la digestión y absorción de las grasas. Aunque posee alta capacidad regenerativa, puede inflamarse por agentes químicos o microbianos, causando complicaciones (Hundt M., *et al.*, 2022).

1.1.1 Fisiología y organización celular hepática

Los hepatocitos son células parenquimatosas y la principal población epitelial del hígado y representan la mayor parte del volumen hepático y llevan a cabo funciones metabólicas esenciales como la síntesis de proteínas plasmáticas, metabolismo de macromoléculas y fármacos, así como la producción de bilis (Gárate, R., M., 2023).

Los colangiocitos también pertenecen a las células parenquimatosas del hígado, son la segunda población epitelial más abundante. La principal función de estas células es revestir el lumen de los conductos biliares, formando parte esencial del sistema biliar, encargados de modificar y transportar la bilis producida por los hepatocitos hacia la vesícula biliar y el intestino (Benítez, R. R., 2022). Las células estrelladas hepáticas, son consideradas dinámicas por naturaleza y pueden estar en estado quiescente, almacenando vitamina A, o activarse en respuesta a daño hepático mediante señalización proinflamatoria, por citocinas como el Factor de Necrosis

Tumoral alfa (TNF- α), proliferando como miofibroblastos que contribuyen a la fibrosis y cicatrización, procesos que pueden derivar en cirrosis (Vázquez, O., 2024).

Las células de Kupffer o macrófagos M1 residentes ubicados en el lado luminal del endotelio sinusoidal del hígado, actúan como centinelas inmunológicas fagocitando patógenos y restos celulares. Además, modulan respuestas inflamatorias mediante la secreción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 β) y TNF- α , las cuales pueden perpetuar daño parenquimatoso al inducir apoptosis (Cuenca Hernández., 2023). También reclutan macrófagos periféricos, células T y neutrófilos, desempeñando un papel importante en la regulación de la hepatotoxicidad (Michalopoulos., *et al.*, 2021; Sun, L., *et al.*, 2020)

Las células endoteliales sinusoidales presentan fenestraciones, lo que facilita un intercambio eficiente de sustancias entre la sangre y los hepatocitos. Estas células carecen de una membrana basal continua, lo que incrementa su permeabilidad y permite el paso libre de moléculas y nutrientes. Los sinusoides hepáticos están constituidos por estas células endoteliales, macrófagos residentes y células estrelladas hepáticas, contribuyendo a la función y homeostasis hepática (Ballester Ferré, 2021).

El hígado está dividido en cuatro lóbulos: derecho, izquierdo, cuadrado y caudado. Desde una perspectiva funcional, se divide en ocho segmentos basados en su irrigación vascular. Estos lóbulos están conformados por células organizadas en unidades funcionales llamadas lobulillos, que presentan una forma hexagonal alrededor de una vena central. En los vértices de estos lobulillos se encuentran las tríadas portales, compuestas por ramas de la arteria hepática, la vena porta y los conductos biliares (Pérez, D. O., *et al.*, 2024).

El funcionamiento del hígado se basa en la zonificación metabólica, un fenómeno que ocurre cuando la sangre (mezcla de la arteria hepática y la vena porta) fluye a través de los sinusoides. Al entrar en contacto con los hepatocitos, se crean gradientes de oxígeno y nutrientes que dividen el lobulillo hepático en tres áreas funcionales:

- **Zona 1 (Periportal):** Es la más cercana a la entrada de sangre. Al ser rica en oxígeno, se especializa en procesos aeróbicos como la oxidación de ácidos grasos, la gluconeogénesis y la síntesis de urea.
- **Zona 2 (Media):** Una región de transición metabólica y reserva funcional que combina características de ambas zonas adyacentes; sus hepatocitos pueden especializarse rápidamente para compensar funciones de la zona 1 y 2. Además es una zona clave para la regeneración hepática.
- **Zona 3 (Pericentral):** La más alejada y pobre en oxígeno. Aquí predomina la glucólisis y el metabolismo de xenobióticos (desintoxicación) (**Figura 1**) (Pérez, D. O., *et al.*, 2024).

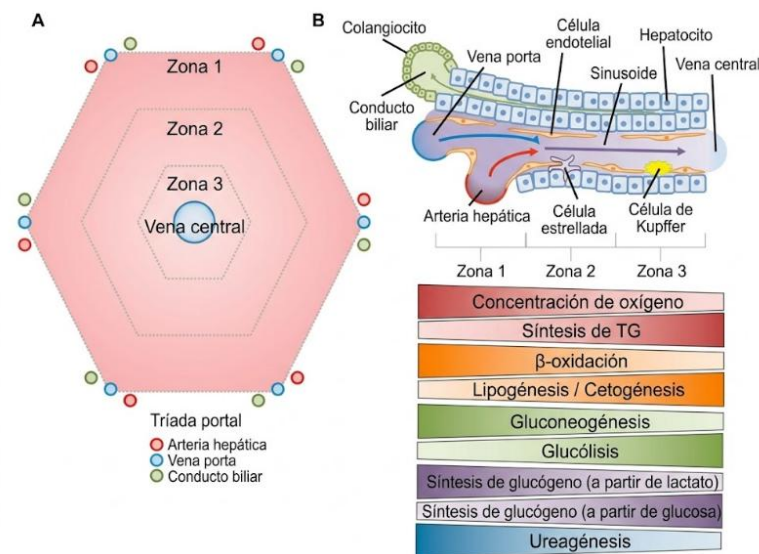


Figura 1. Organización estructural y funcional del lobulillo hepático. A) Lobulillo hepático con tríadas portales en los vértices (arteria hepática, vena porta y conducto biliar) y vena central. El flujo sanguíneo mixto atraviesa los sinusoides, generando gradientes de oxígeno, nutrientes y productos metabólicos. **B)** Esquema del sinusoides mostrando las principales células hepáticas y la zonificación metabólica de procesos clave, la cual se adapta según las condiciones fisiológicas. Modificado de Trefts, E., *et al.*, 2017.

1.2 Panorama general de las enfermedades hepáticas

Actualmente, se han reportado y estudiado múltiples enfermedades que afectan el hígado. Entre ellas, destacan la hepatotoxicidad inducida por ciertos medicamentos, que da lugar a la enfermedad hepática inducida por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés), y la enfermedad hepática asociada al alcohol (ALD), resultado del consumo excesivo y crónico de bebidas

alcohólicas. Además, otras formas de daño hepático pueden derivarse de condiciones metabólicas, como la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD), de la exposición a sustancias tóxicas, como en la enfermedad del hígado graso asociada a tóxicos (TAFLD), o de infecciones virales, como en los distintos tipos de hepatitis viral (Qian, *et al.*, 2021).

Las enfermedades hepáticas destacan por haberse convertido en una de las principales preocupaciones de salud pública a nivel mundial, debido a que existe una tendencia ascendente en su prevalencia, además de su contribución significativa del 4% de las muertes globales anuales (Devarbhavi, H., *et al.*, 2023).

1.3 Generalidades de la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD)

La MASLD se define como la presencia de un exceso de almacenamiento de triglicéridos en el hígado en presencia de al menos un factor de riesgo cardiometabólico. El término con el que actualmente se le denomina fue oficialmente adoptado en el año 2023, por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) y la Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado (ALEH), reemplazando la nomenclatura previa de la enfermedad hepática del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (EASL *et al.*, 2024).

Varias consideraciones impulsaron el cambio en la nomenclatura de la NAFLD, siendo la más importante sus limitaciones conceptuales, derivadas del uso de términos como (" no alcohólico " y " graso "), los cuales generan una confusión excluyentes y el uso de lenguaje potencialmente estigmatizante (Gastaldelli, A., *et al.*, 2025). Por lo que, tras un consenso de expertos internacionales de sociedades científicas internacionales y asociaciones de pacientes, se logró renombrar y redefinir la NAFLD, reflejando de una manera más precisa el origen metabólico de la enfermedad, eliminando la estigmatización y permitiendo mejorar la precisión diagnóstica (Stauffer, K., *et al.*, 2023).

Esta enfermedad constituye la causa más común de enfermedad hepática crónica y se encuentra entre los principales factores asociados a un aumento significativo de la morbilidad y mortalidad hepática. Un metaanálisis, que incluyó a más de 92 estudios y 9 millones de participantes entre 1990 y 2019, se reportó una prevalencia de más del 30% a nivel mundial de personas que padecen MASLD, siendo América Latina la que registró la región con mayor prevalencia, especialmente en adultos mayores (Younossi, Z. M., *et al.*, 2023).

En la población infantil, investigaciones recientes han evidenciado un aumento significativo de MASLD en la población pediátrica, afectando aproximadamente al 10% de niños y adolescentes a nivel mundial (Zhang, *et al.*, 2024). En México, un estudio realizado en 585 voluntarios reportó una prevalencia del 41.3%, una de las más altas a nivel internacional. La enfermedad fue más frecuente en hombres mayores de 50 años con obesidad, síndrome metabólico, hábitos alimenticios inadecuados y estilo de vida sedentario. Asimismo, el 40% de los participantes presentó fibrosis avanzada, lo que refleja una progresión significativa de la enfermedad. Además, se menciona la necesidad de implementar estrategias preventivas y políticas públicas orientadas a reducir el impacto de esta enfermedad en la población mexicana (Bernal, R. R., *et al.*, 2023).

La MASLD se caracteriza por la acumulación de grasa, principalmente triglicéridos, en los hepatocitos. Sin embargo, también involucra lípidos bioactivos como ácidos grasos libres, ceramidas y diacilgliceroles, que contribuyen a la lesión hepática a través de mecanismos de lipotoxicidad e inflamación (Gutiérrez Gómez, M., 2024). Esta condición se presenta en personas con disfunción metabólica y se asocia con factores de riesgo cardiometabólico como lo son el sobrepeso, disglucemia, hipertensión, hipertrigliceridemia o bajos niveles séricos de lipoproteína de alta densidad (HDL), todo esto en ausencia de un consumo significativo de alcohol (Song, *et al.*, 2024). Por lo tanto, el desarrollo y la progresión de la MASLD están mediados por factores como el estilo de vida, los hábitos alimenticios, la resistencia a la insulina, la susceptibilidad genética, la adiposidad, el microbioma intestinal, la hipertensión y diversos efectores endocrinos de la enfermedad (Hutchison, A. L., *et al.*, 2023).

El espectro clínico de MASLD se clasifica en grados de gravedad, que van desde la acumulación de grasa en el hígado (MASL) hasta la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH), una condición inflamatoria que puede progresar a una fibrosis avanzada, cirrosis y, en casos extremos, el carcinoma hepatocelular (HCC) (Wang, W., *et al.*, 2025). Desde un punto de vista fisiopatológico, la esteatosis hepática puede inducir estrés oxidativo, disfunción de organelos celulares, lipotoxicidad y apoptosis, procesos que contribuyen a la lesión y progresión hepática (**Figura 2**) (LeFort, K. R., *et al.*, 2024).

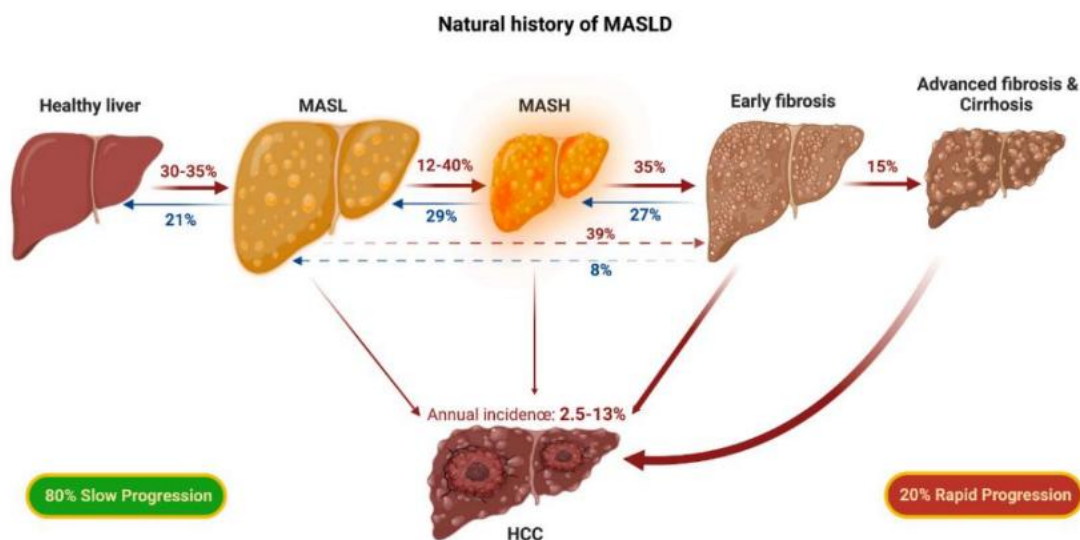


Figura 2. Progresión de la enfermedad hepática metabólicamente asociada (MASLD). La MASLD inicia con un hígado normal que contiene menos del 5 % de grasa en los hepatocitos. Posteriormente, se desarrolla la esteatosis, caracterizada por la acumulación de lípidos en más del 5 % de los hepatocitos. En algunos casos, la enfermedad progresa a MASH, etapa en la que se presenta inflamación y daño celular además de la esteatosis. Si la inflamación persistente conduce al desarrollo de fibrosis temprana, que puede avanzar hacia fibrosis avanzada y cirrosis, produciendo daño hepático irreversible. Una proporción de pacientes puede evolucionar a HCC, con una incidencia anual estimada entre 2.5 % y 13 %. Aproximadamente el 80 % de los casos progresa lentamente, mientras que el 20 % evoluciona rápidamente hacia etapas más graves de la enfermedad. Tomado de Lekakis, V., *et al.*, 2024.

1.4 Patogénesis de la MASLD y la hipótesis de los múltiples golpes

En 1998, los investigadores británicos Day y James propusieron una hipótesis conocida como la del “doble golpe”, donde, el primer golpe es una acumulación de ácidos grasos y triglicéridos que genera esteatosis hepática. El segundo golpe, en el que el hígado ya esteatósico se vuelve más vulnerable al daño y progresa hacia MASH, donde el hígado graso se vuelve más

susceptible al daño e inflamación por estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y citocinas proinflamatorias, generando inflamación y lesión hepatocelular. (Vega, B. J., 2017).

Con los avances logrados en el estudio de esta enfermedad, esta hipótesis ha quedado obsoleta, ya que no integra la complejidad de los mecanismos moleculares y metabólicos que caracterizan a la MASLD. En su lugar, se ha reemplazado por una nueva hipótesis llamada “múltiples golpes” (Buzzetti, E., *et al.*, 2016). Esta hipótesis propone 4 golpes:

1. El primer golpe inicia con la presencia de la resistencia a la insulina, lo que conduce a un aumento en la liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) desde el tejido adiposo, junto con una disminución en la captación de glucosa en músculo y grasa, lo que favorece el incremento de la actividad de la lipogénesis de *novo* y la acumulación de ácidos grasos libres en las células hepáticas.
2. El segundo golpe se relaciona con la inflamación del tejido adiposo, que es característica de la obesidad, lo cual altera la secreción de proteínas de señalización celular como las adipocinas, promoviendo un ambiente proinflamatorio sistémico, afectando el funcionamiento metabólico del hígado.
3. El tercer golpe corresponde a la lipotoxicidad, generada por la entrada excesiva de ácidos grasos al hígado. Este fenómeno desencadena un estado de estrés en el retículo endoplásmico y una evidente disfunción mitocondrial, factores que disparan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y quiebran la homeostasis celular.
4. El último golpe, es cuando la célula pierde su homeostasis a causa de la acumulación lipídica, provoca que los lisosomas colapsen, afectando el mecanismo de la lipofagia, impidiendo la degradación de la grasa acumulada, creando un ambiente inflamatorio y aumenta el daño de organelos que junto con el estrés oxidativo, desencadenan la activación de la muerte celular (Buzzetti, E., *et al.*, 2016).

1.5 Avances farmacológicos y perspectivas terapéuticas en la MASLD

Hasta la fecha, se ha avanzado considerablemente en la comprensión de los procesos biológicos implicados en MASLD, especialmente en los mecanismos relacionados con la lipogénesis, la inflamación y la fibrosis (Sheka, A. C., *et al.*, 2020). En los últimos años, se han desarrollado y

aprobado pocos medicamentos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de MASLD. En marzo de 2024, el Resmetirom, un agonista oral del receptor β de la hormona tiroidea (THR- β), fue aprobado para su uso en combinación con dieta y ejercicio en adultos con MASH no cirrótica y fibrosis hepática moderada a avanzada (estadios F2 y F3 de fibrosis) en Estados Unidos, debido a que su efecto reduce la acumulación lipídica y disminuye la progresión de la fibrosis (Keam, S. J., 2024).

Otro fármaco dirigido como tratamiento para MASH es un agonista de la hormona del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) llamado semaglutida, se une a este receptor e imita los efectos naturales de esta hormona, potenciando los mecanismos metabólicos. Esto favorece la eliminación del exceso de grasa, disminuyendo los niveles de azúcar y mejorando el entorno del hígado (Roehlen, N., *et al.*, 2020).

1.6 La obesidad y su impacto en el desarrollo de la MASLD

La obesidad es una enfermedad crónica y compleja que suele empezar en la infancia o adolescencia (Serra, M. L., *et al.*, 2003). Se produce cuando hay un exceso prolongado de energía que se almacena como triglicéridos en el tejido adiposo. Esto ocurre por la combinación de factores genéticos y el ambiente que rodea al individuo (Bouchard, C., 2021).

El índice de masa corporal (IMC) es la medida más utilizada para diagnosticar la obesidad. Sin embargo, se desconoce en gran medida su precisión diagnóstica para detectar el exceso de adiposidad corporal (Romero-Corral, A., *et al.*, 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó los tipos de obesidad por IMC, en grados I, II y III; posteriormente, en 2007, la Sociedad Española de Obesidad (SEEDO) añadió una categoría adicional: obesidad grado IV o extrema (García, J. E. M., *et al.*, 2008).

La obesidad se asocia con alteraciones en parámetros fisiológicos clave como la presión arterial, la sensibilidad a la insulina y la concentración sérica de lípidos (Whitlock., *et al.*, 2009). Existe una correlación positiva entre el grado de obesidad y trastornos relacionados, tales como hipertensión arterial, dislipidemia e intolerancia a la glucosa (Samanic., *et al.*, 2006). Además, incrementa el riesgo de complicaciones graves, incluyendo la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2),

esteatosis hepática, enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular, problemas biliares, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño y ciertos tipos de cáncer, lo que contribuye a una mayor mortalidad (Purnamasari, D., *et al.*, 2011).

Esta enfermedad nutricional se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Hace aproximadamente cuatro décadas, el peso normal/bajo peso, era más frecuente que la obesidad a nivel mundial; sin embargo, en la actualidad, 1 de cada 8 personas vive con obesidad, consolidándose como uno de los principales problemas de salud pública. En caso de que se mantenga esta tendencia, se esperaría que, en el año 2030, el 40% de la población mundial presenta sobrepeso y una quinta parte será obesa (Malo-Serrano, M., *et al.*, 2017).

La obesidad, en las últimas décadas, se ha convertido en un desafío crítico que está afectando la salud pública en todo el mundo. Estudios hechos por la Secretaría de Salud han reportado que la prevalencia entre 1990 y 2022 se duplicó, teniendo un registro de 16% de la población mundial que padece esta condición. En nuestro país, el panorama es más complejo, donde el 38.9% de los adultos vive con obesidad y el 37.3% con sobrepeso. También se ha visto que la obesidad afecta un 13.2% más a mujeres que a hombres, y el sobrepeso predomina en los hombres con una diferencia del 13.7% (Secretaría de Salud, 2025).

Con los avances del estudio de las enfermedades metabólicas, se ha visto que existe una relación estrecha entre MASLD, obesidad y la RI, que son condiciones que generalmente se presentan juntas en pacientes que padecen DM2 y síndrome metabólico (Targher, G., *et al.*, 2021). La prevalencia de MASLD, ha aumentado en paralelo con la tasa mundial de obesidad. Un metaanálisis registró que un 75.27% de pacientes padecían MASLD acompañada de obesidad (Quek, J., *et al.*, 2023). La mayoría de personas que padecen esta enfermedad son adultos con obesidad, su incidencia en individuos normopeso está en incremento, lo que la lleva su designación como enfermedad del hígado delgado (Jaiswall, A., *et al.*, 2021). Sin embargo, la vulnerabilidad en la población infantil y adolescente resulta de particular significancia, con una tasa de prevalencia entre el 37.3% y el 40.4%.

En nuestro país, este escenario entre MASLD y obesidad no solo posiciona al país como un punto crítico a nivel global, sino que proyecta un incremento en el índice de comorbilidades crónicas, tales como DM2 y MASLD. Lo que demuestra la necesidad de reestructurar las políticas de salud pública y nutrición (Campo, P. A. F., 2023).

A medida que las tasas de obesidad y DM2, siguen aumentando a nivel mundial, también lo hace la prevalencia de MASLD. Actualmente, el 38% de todos los adultos y el 7–14% de los niños y adolescentes padecen MASLD (Paik, J. M., *et al.*, 2022). Las proyecciones para el año 2040 sugieren un panorama crítico, estimando que la prevalencia de MASLD en la población adulta superará el 55% (Younossi, Z. M., *et al.*, 2023).

Cada vez hay más evidencia que sugiere que el primer paso en la patogénesis de MASLD es la disfunción del tejido adiposo. La mayor parte de los triglicéridos hepatocelulares en personas que padecen obesidad y MASLD no se deriva de ácidos grasos no esterificados proporcionados por los lípidos de la dieta, sino de ácidos grasos libres del tejido adiposo (Donnelly, K. L., *et al.*, 2005).

1.7 Inflamación en obesidad y su papel en la patogénesis de MASLD

La inflamación es una respuesta natural del sistema inmunitario ante infecciones o daño tisular. Cuando esta respuesta se vuelve persistente y de bajo grado, se denomina inflamación crónica, y desempeña un papel importante en enfermedades metabólicas como la obesidad y la MASLD (Kawai, T., *et al.*, 2021). En la obesidad, el crecimiento excesivo del tejido adiposo genera hipoxia, estrés oxidativo y muerte celular, lo que activa células inmunes (macrófagos y linfocitos) y promueve la liberación constante de citocinas proinflamatorias, iniciando un estado inflamatorio sistémico (Khanna, D., *et al.*, 2022).

Las citocinas inflamatorias más estudiadas en enfermedades metabólicas incluyen a TNF- α , la interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β , las cuales desempeñan un papel central en la resistencia a la insulina y en la inflamación hepática (Ye, J., *et al.*, 2013). Por su parte, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) interviene en la activación de las células estrelladas hepáticas,

promoviendo la fibrogénesis y el desarrollo de fibrosis (Marušić, M., *et al.*, 2021). Al mismo tiempo, se produce una disminución de los niveles de la hormona adiponectina, disminuyendo la acción de la insulina, mientras que aumentan los niveles de leptina, favoreciendo la inflamación (Polyzos, S. A., *et al.*, 2016).

La MASLD y su progresión a MASH se caracterizan por la activación de múltiples vías inflamatorias que tienen su origen en distintos tejidos y sistemas. En la obesidad, el tejido adiposo visceral sufre hipertrofia y disfunción, lo que conduce a una mayor liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6, leptina, resistina y la visfatina, junto con una disminución de la adiponectina, una adipocitoquina con efectos antiinflamatorios y sensibilizadores a la insulina. El aumento de la permeabilidad intestinal permite que componentes bacterianos, principalmente los polisacáridos (LPS), atraviesen la pared del intestino y lleguen al torrente sanguíneo, activando una respuesta del sistema inmune que genera un estado de inflamación con impacto directo en el eje intestino-hígado. Estos productos activan al receptor tipo Toll 4 (TLR4), tanto en macrófagos de Kupffer como en hepatocitos, desencadenando una señalización de factores proinflamatorios como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y el inflamasoma con dominio de pirina, unión a nucleótidos y repetición rica en leucina (NLRP3). Como resultado, la liberación masiva de citocinas y quimiocinas como (IL-1 β , IL-6, interleucina 8 (IL-8), TNF- α y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Bessone., *et al.*, 2019).

Estos mediadores no sólo reclutan células inmunes, sino que inducen apoptosis y aceleran la transición de esteatosis hacia MASH. Simultáneamente, el exceso de ácidos grasos libres genera un estrés oxidativo persistente que exacerba la lesión. En este contexto, el TGF- β resulta crucial para la activación de las células estrelladas hepáticas, las cuales, al depositar colágeno en el espacio de Disse, dan inicio a la fibrosis. Este proceso se perpetúa mediante bucles autocrinos y paracrinos que consolidan la progresión del daño tisular (**Figura 3**) (Bessone, F., *et al.*, 2019).

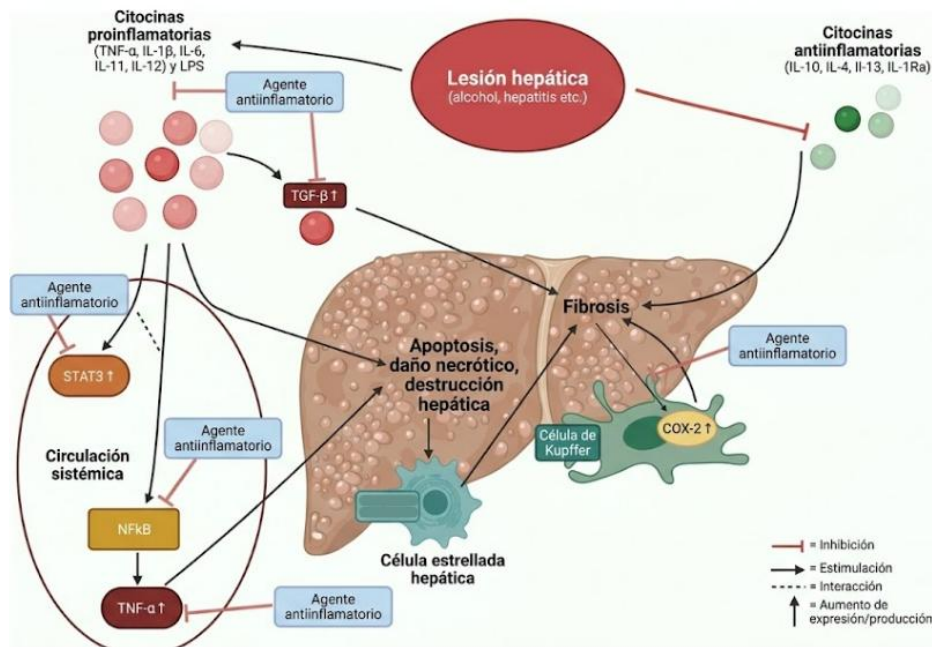


Figura 3. Mecanismos proinflamatorios implicados en la patogénesis de la MASH. Relación entre la inflamación del tejido adiposo, la resistencia a la insulina y el eje adiposo–hepático, que favorece el aumento del flujo de ácidos grasos libres al hígado, la activación de células de Kupffer y células estrelladas hepáticas, y la progresión de MASLD a MASH, tomado de Isabel C., *et al.*, 2021.

1.8 Modelos *in vitro* e *in vivo* de estudio de MASLD

La MASLD ha sido ampliamente estudiada mediante diversos modelos experimentales y clínicos. Los modelos *in vitro*, como líneas celulares hepáticas, hepatocitos primarios y organoides, han permitido el análisis de mecanismos moleculares específicos, incluyendo la lipotoxicidad y el estrés celular. Por su parte, los modelos *in vivo*, especialmente ratones sometidos a dietas hiperlipídicas, ricas en azúcares o combinadas con alteraciones genéticas, han sido fundamentales para estudiar la progresión de la esteatosis hacia inflamación y fibrosis. Sin embargo, ninguno de estos modelos reproduce por completo la complejidad de la enfermedad (Colomer, M. L. M., *et al.*, 2022).

En pacientes que padecen MASLD, la técnica considerada es el estándar de oro para el diagnóstico y estudio es la biopsia hepática, debido a que es el mejor modelo para evaluar esta enfermedad. Actualmente es difícil obtener y procesar estas muestras, debido a cuestiones bioéticas, ideologías y otros factores, por lo que se ha tenido que buscar otras herramientas

ómicas, que simulen con alta fidelidad esta fisiopatología. Paralelamente, el desarrollo de sistemas *ex vivo* se consolida como una transición metodológica clave. Esta innovación permite minimizar la dependencia de modelos *in vivo*, cumpliendo estrictamente con los marcos legales y las recomendaciones de los comités de bioética que, en años recientes, han impulsado la búsqueda de métodos alternativos (**Tabla 1**). (Colomer Merino, L. M., *et al.*, 2022).

Tabla 1. Estudios realizados en diferentes modelos de MASLD

Modelos <i>in vitro</i>	En un estudio se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano (HepG2), a las cuales se les hizo una exposición de ácido oleico para inducir esteatosis, donde se demuestra que la epicatequina, un flavonoide antioxidante, tiene beneficios para la salud cardiovascular, muscular y cognitiva, actuando como agente antiinflamatorio, reduce la acumulación lipídica y mejora el metabolismo celular, sugiriendo un potencial efecto hepatoprotector (Hefer, M., <i>et al.</i> , 2024). En otra investigación se analiza el efecto de la sobrecarga lipídica en la línea celular HepG2 y la línea celular de células estrelladas hepáticas humanas (LX-2), donde se observó que el exceso de lípidos altera la proliferación celular y promueve apoptosis y senescencia, procesos relevantes en la progresión de la enfermedad hepática (Campos, E. A., <i>et al.</i> , 2024).
Modelos <i>in vivo</i>	Principalmente, los modelos murinos, son ampliamente utilizados para estudiar la progresión de la MASLD hacia esteatohepatitis y fibrosis, consiste en alimentar ratones con una dieta alta en grasas, azúcares y colesterol tipo occidental durante varias semanas (Zhang, Q., <i>et al.</i> ,2023). El empleo de ratones C57BL/6 alimentados con HFD constituye un estándar para inducir MASLD experimental. Este protocolo de varias semanas desencadena esteatosis hepática, aumento de masa corporal y RI, ofreciendo un escenario biológico que reproduce fielmente los cambios histológicos humanos y facilita el análisis de vías metabólicas clave. (Recena, A. L., <i>et al.</i> , 2011).
Modelos bioinformáticos	En una base de datos de microarreglos, se observó que la MASLD está estrechamente asociada con procesos inflamatorios e inmunitarios clave, identificando a <i>IL1B</i> , <i>TLR2</i> , <i>TLR4</i> , <i>CCL2</i> e <i>ICAM1</i> como genes centrales en su patogénesis. Mediante análisis bioinformáticos integrados, se demostró que las vías reguladoras hsa-miR-21-5p–TLR2 y hsa-miR-34a–IL1B desempeñan un papel crítico en el desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere que estos genes, podrían servir como biomarcadores diagnósticos y potenciales dianas terapéuticas para la MASLD (Yu, S., <i>et al.</i> , 2025).

1.9 La interleucina-10: estructura y función

Las citocinas son las moléculas mensajeras más importantes producidas por los leucocitos para regular las funciones biológicas de las células diana mediante mecanismos autocrinos o paracrinos, pueden clasificarse en proinflamatorias, responsables de activar y potenciar la respuesta inmunológica e antiinflamatoria, que regulan y limitan dicha respuesta para evitar daños al tejido (Gutiérrez, G. M., 2024).

La interleucina-10 (IL-10), también denominada factor inhibidor de la síntesis de citocinas humanas (CSIF), es un polipéptido homodímero de aproximadamente 17 kilodaltons (kDa). En humanos, está codificada por el gen *IL10*, ubicado en el cromosoma 1, el cual consta de cinco exones. Cada monómero está compuesto por 160 aminoácidos (Eskdale, J., *et al.*, 1997). IL-10 es una citocina inmunorreguladora que posee propiedades tanto antiinflamatorias como inmunoestimulantes, y su expresión suele estar alterada en diversas enfermedades humanas (Saxton, R. A., *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que es secretada por casi todos los leucocitos (Saraiva, M., *et al.*, 2009).

La IL-10 actúa principalmente sobre las células presentadoras de antígenos (APC), como macrófagos y monocitos, inhibiendo su activación y reduciendo la liberación de citocinas proinflamatorias, tales como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocito (G-CSF), interleucina-1-alfa (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Hashimoto, S. I., *et al.*, 2001; Willems, F., *et al.*, 1994). Además, la IL-10 es un potente inhibidor de la presentación de antígenos, ya que disminuye la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y las moléculas coestimuladoras CD80 en macrófagos y CD86 en células dendríticas (Waal, M. R., *et al.*, 1991).

La IL-10 se ha visto que favorece la proliferación de células B. Además de participar en la producción de anticuerpos, contribuyendo a la respuesta inmune adaptativa. Esta citocina tiene un papel importante, cuando hay un efecto inflamatorio principalmente por TNF- α , aumenta la liberación de receptores de TNF solubles, modulando la respuesta inflamatoria de manera efectiva (Batista, M. L., *et al.*, 2009).

Por otro lado, la IL-10 favorece la proliferación de células B y estimula la producción de anticuerpos, contribuyendo a la respuesta inmunitaria adaptativa. También inhibe la generación de ROS y aumenta la liberación de receptores de TNF, lo que antagoniza los efectos del TNF- α , modulando así la inflamación de manera efectiva.

1.10 Vía de señalización de IL-10

Esta citocina se une a su receptor heterotetramérico formado por la subunidad alfa del receptor de interleucina 10 (IL-10R α) e subunidad beta del receptor de interleucina (IL-10R β) que son miembros de la familia del receptor de interferón (IFNR) (Yoon, S. I., *et al.*, 2006). La subunidad IL-10R α es una proteína de membrana con un solo dominio transmembranal que se une a la IL-10 con alta afinidad. La cadena de la segunda subunidad IL-10R β se expresa de forma ubicua en casi todos los tipos celulares y recluta Janus cinasa (JAK) y tirosina cinasa 2 (TYK), que son necesarias para activar la señalización intracelular (Kotenko, S. V., 1997).

Al unirse IL-10 a su receptor, se desencadena una cascada de señalización intracelular. Esta interacción provoca la activación de la vía de señalización Janus cinasa 1, tirosina cinasa 2 y transductor de señales y activador de la transcripción 3 (Jak1/Tyk2/STAT3), que es la mejor caracterizada de esta citocina (Schülke S., 2018). En esta vía, STAT3 es fosforilado, se dimeriza y transloca al núcleo de la célula, donde induce la expresión de genes que codifican mediadores antiinflamatorios, que incluyen el supresor de la señalización por citocinas-3 (SOCS3), antagonista del receptor de interleucina-1 (IL1RN), proteína 3 inducida por el TNF- α (TNFAIP3 (A20)), proteína del linfoma de células B 3 (BCL3) y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), contribuyendo así a la supresión de vías proinflamatorias y la regulación de la respuesta inmune excesiva (**Figura 4**) (Kasmi, K. C., *et al.*, 2007).

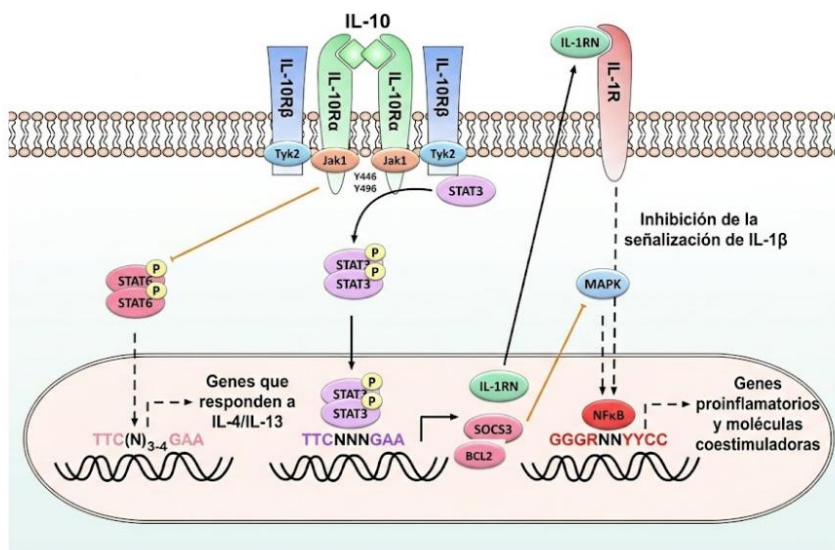


Figura 4. Mecanismo de señalización inmunomoduladora de la IL-10 en células presentadoras de antígeno (CPA). La unión de IL-10 a su receptor (IL-10R) activa el eje JAK1/Tyk2, induciendo la fosforilación y translocación nuclear de homodímeros de STAT3. Este factor promueve la expresión de genes antiinflamatorios como SOCS-3, que inhibe las vías de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y NFκB, y de IL-1RN, que antagoniza la señalización de IL-1β. Asimismo, la activación de STAT3 bloquea al transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6), reduciendo la respuesta a la interleucina-4 y 13 (IL-4/IL-13). En conjunto, estos eventos disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-1β) y la expresión de moléculas de superficie claves para la presentación antigénica (MHC-II, CD80, CD83, CD86). Simbología: Flechas negras (activación), flechas naranjas (inhibición), flechas discontinuas (vías bloqueadas por STAT3). Tomado de Schülke S. (2018).

1.11 Muerte celular regulada

La muerte celular regulada (RCD por sus siglas en inglés), es un proceso esencial y dinámico, debido a que no ocurre al azar, sino que es controlado por mecanismos que permiten mantener la homeostasis tisular y eliminar células que podrían representar un riesgo para el organismo (Lossi, L., 2022). En el caso del hígado, la RCD resulta clave para medir la gravedad y el pronóstico de la lesión hepática.

Actualmente, se han caracterizado diferentes tipos de RCD, cada una con mecanismos particulares como la necrosis impulsada por pérdida repentina de impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna (MPT), necroptosis, piroptosis, parthanatos, muerte celular por: entotica, nenotica, dependiente de lisosoma, dependiente de autofagia, inmunogénica y

apoptosis (Tang, D., *et al.*, 2019). La muerte celular se divide en procesos programados, que ocurren de forma ordenada sin dañar el entorno, y en procesos inflamatorios, donde la célula pierde su integridad y libera sustancias que activan el sistema inmune, provocando inflamación en el tejido circundante (Galluzzi, L., *et al.*, 2018).

Dentro de los tipos de RCD, la apoptosis es la forma más estudiada descrita de muerte celular regulada y está altamente conservada en todo el reino animal. Se trata de un mecanismo regulado, que requiere energía y debe activarse mediante señales específicas. Además, puede desencadenarse de dos formas: intrínseca o extrínseca. En ambas vías se ha visto que conduce la activación de las caspasas ejecutoras 3/7, lo que resulta en la proteólisis, fragmentación nuclear y muerte celular apoptótica (**Figura 5**) (Czabotar, P. E., *et al.*, 2014).

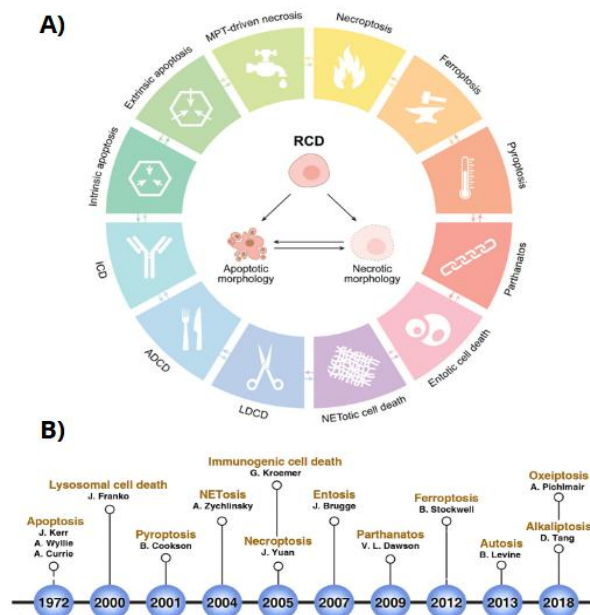


Figura 5. Principales subrutinas de muerte celular regulada (RCD) y cronología de su descubrimiento. A) Las células mamíferas activan diversas vías de RCD en respuesta a daños irreversibles o cambios en el microambiente. Cada tipo de RCD tiene mecanismos moleculares específicos, interconectados, que generan rasgos morfológicos desde apoptosis hasta necrosis, y respuestas inmunológicas que varían de antiinflamatorias a altamente inmunogénicas. B) Cronología del descubrimiento de los principales tipos de muerte celular, desde la descripción de la apoptosis en 1972 hasta la identificación de modalidades más recientes como la oxeiptosis y la alkaliptosis, reflejando la expansión progresiva del conocimiento sobre los mecanismos que regulan la muerte celular. Tomado de Czabotar, P. E., *et al.*, 2014.

II. Antecedentes particulares

2.1 Apoptosis

La apoptosis es un término que fue introducido por primera vez en 1972, por los científicos Kerr, Wyllie y Currie, quienes describieron una forma de muerte celular con características morfológicas muy distintivas de otros tipos de RCD, ya que desempeña un papel importante en el control del crecimiento y la eliminación de células innecesarias (Kerr, J. F., *et al.*, 1972).

Es un proceso natural, ordenado y controlado, en donde la célula se autodestruye de manera silenciosa, sin afectar a las células vecinas, para mantener el desarrollo, mantenimiento y equilibrio de los organismos multicelulares (Elmore, S., 2007). Las células que experimentan el proceso de apoptosis, sufren una serie de cambios morfológicos característicos de este tipo de RCD, que incluyen la condensación de la cromatina, reducción del tamaño celular, fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos. Estos últimos son reconocidos y fagocitados por macrófagos principalmente o células vecinas, lo que evita la liberación del contenido intracelular y la presencia de inflamación (Wong, R. S., 2011).

La apoptosis implica una activación de enzimas específicas, características de este tipo de muerte celular. Su función principal es la degradación de proteínas estructurales y componentes nucleares. Estas se encuentran inactivas en una condición normal, pero cuando se activan, desencadenan una cascada irreversible que lleva al desmantelamiento ordenado de la célula. Además, se ha visto que diversas proteínas que involucran a la familia BCL-2, regulan la capacidad de las células para evitar la apoptosis y promover la supervivencia celular, actuando como un sistema de control que determina su destino (Reed J. C. 1998).

Existen dos vías principales por las cuales la apoptosis se puede desencadenar:

- Vía intrínseca o mitocondrial: dependiente del equilibrio entre proteínas pro y antiapoptóticas.

- Vía extrínseca o mediada por receptores de muerte: iniciada por señales externas que activan caspasas específicas (Nössing, C., *et al.*, 2023).

2.1.1 Vía intrínseca (interna o mitocondrial)

La apoptosis intrínseca es un proceso que inicia en el interior de la célula y se activa como respuesta a diversas alteraciones en el entorno celular. Entre estas se incluyen la falta de factores de crecimiento, el daño en el ADN, el estrés en el retículo endoplasmático (RE), el aumento excesivo de ROS, problemas durante la replicación del ADN, alteraciones en los microtúbulos o errores en la mitosis (Shojaie, L., *et al.*, 2020).

Este proceso inicia con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), permitiendo la liberación del citocromo c al citosol. Lo que provoca un punto de no retorno en la muerte celular apoptótica (Bertheloot, D., *et al.*, 2021).

La liberación del citocromo c, ocasionada por proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2 (BH3), como la proteína X asociada a BCL-2 (BAX), la proteína destructora del antagonista homólogo BCL-2 (BAK) y el modulador de la apoptosis regulado por incremento de p53 (PUMA). Esta familia de proteínas se divide en activadoras: Proteína similar a BCL-2 11 (BIM), agonista de muerte con dominio de interacción BH3 (BID) y PUMA y en sensibilizadoras: (agonista de muerte asociado a BCL-2 (BAD), proteína pro apoptótica inducida por p53 (NOXA) y la proteína asesina interactuante con BCL-2(BIK)). Las activadoras se unen directamente a BAX y BAK, provocando un cambio conformacional que permite su oligomerización. BAX y BAK oligomerizados forman poros en la membrana mitocondrial, causando la MOMP (Kuwana, T., *et al.*, 2002).

Las proteínas sensibilizadoras favorecen la apoptosis al inhibir proteínas antiapoptóticas o al regular la localización de los monómeros de BAX y BAK. Por otro lado, las proteínas antiapoptóticas, como la proteína 2 del linfoma/leucemia de Células B (BCL-2) y la proteína antiapoptótica linfoma de células B extra grande (BCL-XL), bloquean la apoptosis al secuestrar activadoras, sensibilizadoras o complejos de BAX y BAK mediante un surco de unión formado por sus dominios BH3 (Cheng, E. H., *et al.*, 2001).

El equilibrio entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas permite definir el destino celular. Este equilibrio se ve afectado por modificaciones postraduccionales, localización subcelular y regulación transcripcional. El control de este proceso recae en gran medida en las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y en el factor de transcripción p53. Cuando el ADN se daña, se producen proteínas de la familia Bcl-2 que fuerzan a la célula a morir. No obstante, las proteínas CDK pueden bloquear este proceso estabilizando la proteína Leucemia mieloide celular 1 (Mcl-1), una proteína que favorece la supervivencia. Esta capacidad de las CDK para mantener activa a Mcl-1 es, en gran medida, lo que permite que ciertas células logren resistir la apoptosis.

Después de la formación de poros de la membrana mitocondrial, se libera el citocromo c al citoplasma, donde se une principalmente al factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1) y procaspasa-9 en presencia de desoxiadenosina trifosfato (dATP) para formar el complejo denominado apoptosoma. Una vez formado, se encarga de activar la caspasa-9, que permite que la señal de muerte celular se intensifique y propague de manera efectiva. La caspasa-9 activa las caspasas efectoras 3/7, que son las encargadas de ejecutar la apoptosis (Li, P., et al., 1997).

La familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) puede inhibir a las caspasas 3/7/9, regulando el proceso apoptótico (Li, P., *et al.*, 1997). Durante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), proteínas como el segundo activador mitocondrial de caspasas proteína derivada de mitocondria antagonista de IAP (Smac/DIABLO) y la proteasa serina mitocondrial (HTRA2) son liberadas y actúan inhibiendo la proteína inhibidora de apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP), lo que facilita la activación de las caspasas.

XIAP no solo se une a la caspasa-3, sino también a las caspasas 7/9 ejerciendo así un control regulador sobre el proceso apoptótico (Srinivasula, S. M., *et al.*, 1997).

Además, la caspasa-3 puede procesar a la caspasa-9, cortando el fragmento p10. Una vez cortada la caspasa-9, carece del dominio de unión a XIAP, evadiendo así su inhibición y amplificando la señal apoptótica.

Finalmente, las caspasas-3 y -7 amplifican la señal apoptótica al activar a las caspasas 2/6/8/10 (Slee, E. A., *et al.*, 1997), consolidando la muerte celular programada. Además de su función en

la apoptosis, las proteínas de la familia IAP también participan en la inhibición de otras formas de muerte celular programada, como la necroptosis dependiente, mediada por la cinasa de interacción con receptor 1 y 3 (RIPK1/RIPK3) (Newton, K., *et al.*, 2019).

2.1.2 Vía extrínseca (externa o de receptor)

La vía extrínseca de la apoptosis inicia principalmente por perturbaciones del microambiente extracelular y es impulsada principalmente por la estimulación de receptores transmembrana como los receptores de muerte (DRs) o los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Galluzzi, L., *et al.*, 2018).

Este proceso inicia cuando los ligandos específicos como TNF α , FasL o TRAIL se unen a sus receptores de muerte en la membrana celular (TNFR1/2, Fas, Receptores DR4 y DR5). Esta unión provoca la oligomerización de los receptores (Walczak, H., *et al.*, 1997).

La oligomerización permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras como la proteína adaptadora asociada al dominio de muerte del TNF (TRADD) y la proteína adaptadora asociada a Fas con dominio de muerte (FADD), y de las procaspasas iniciadoras 8/10, formando el complejo de señalización inductora de muerte (DISC). La proteína inhibidora tipo FLICE (FLIP), que se ha reportado que es similar a una caspasa, también se incorpora al DISC y regula negativamente la activación de las caspasas iniciadoras (Medema, J. P., *et al.*, 1997).

La proteína RIPK1 es reclutada al complejo DISC al interactuar con las proteínas TRADD y FADD mediante sus dominios de muerte. Además, a través de modificaciones postraduccionales, puede modular su función principalmente por ubiquitinación. Dependiendo de la condición de la célula, RIPK1 puede favorecer la supervivencia celular activando la vía NF- κ B o promover la muerte celular por apoptosis o, en ausencia de caspasa-8 activa, por necroptosis (Schneider, P., *et al.*, 1997).

En las etapas tempranas, la unión de TRADD, procaspasa-8, FLIP y RIPK1 ubiquitinadas al DISC inhibe la actividad proapoptótica de caspasa-8 y promueve una señal de supervivencia e inflamación vía NF κ B. Este conjunto se denomina complejo I. La integridad del complejo I y la ubiquitinación de RIPK1 son claves para sostener las señales de supervivencia celular.

Cuando TRADD se inhibe mediante pequeñas moléculas, se bloquea la apoptosis y se activa la autofagia dependiente de beclin-1, lo que pone de relieve la estrecha relación entre ambos procesos (Xu, D., *et al.*, 2020).

Cuando el complejo I se internaliza o se separa del receptor, puede convertirse en el complejo II. Esta transición sucede al desaparecer las señales de supervivencia, lo que permite la activación de las caspasas. En el complejo II, las procaspasas 8/10 se activan automáticamente, iniciando así la cascada que conduce a la apoptosis (Medema, J. P., *et al.*, 1997).

Las caspasas 8/10 activadas procesan directamente a las caspasas efectoras 3/6/7 que ejecutan la apoptosis al degradar proteínas celulares esenciales. Además, caspasa-8 también puede activar a la proteína BID, un miembro de la familia BCL-2. BID truncada (tBID) se transloca a las mitocondrias, induce MOMP y conecta la vía extrínseca con la vía intrínseca, amplificando la señal apoptótica (Mandic, A., *et al.*, 2002).

2.1.3 Terminación de la apoptosis

La apoptosis es un proceso antiinflamatorio activo en el que las células moribundas liberan señales para su eliminación, como nucleosomas y fragmentos de proteínas de membrana mediante metaloproteinasas como la desintegrina y metaloproteinasa 10/17 (ADAM10/17), lo que facilita su desprendimiento y reduce la inflamación (Suzuki, J., *et al.*, 2013). Durante la fase final de la apoptosis, las vesículas extracelulares apoptóticas (ApoEVs) exponen fosfatidilserina (PS) en su superficie, lo que facilita su reconocimiento y eliminación, por fagocitosis, además de inducir la liberación de factores antiinflamatorios como el factor antiinflamatorio TGF- β . Estas vesículas, también pueden contribuir en la presentación de antígenos. De manera paralela, las células que entran en apoptosis liberan metabolitos con efectos antiinflamatorios a través de los canales de panexina 1 (PANX1, los cuales actúan sobre las células vecinas promoviendo la reparación del tejido y la inhibición de la respuesta inflamatoria (**Figura 6**) (Farinacci, M., *et al.*, 2012).

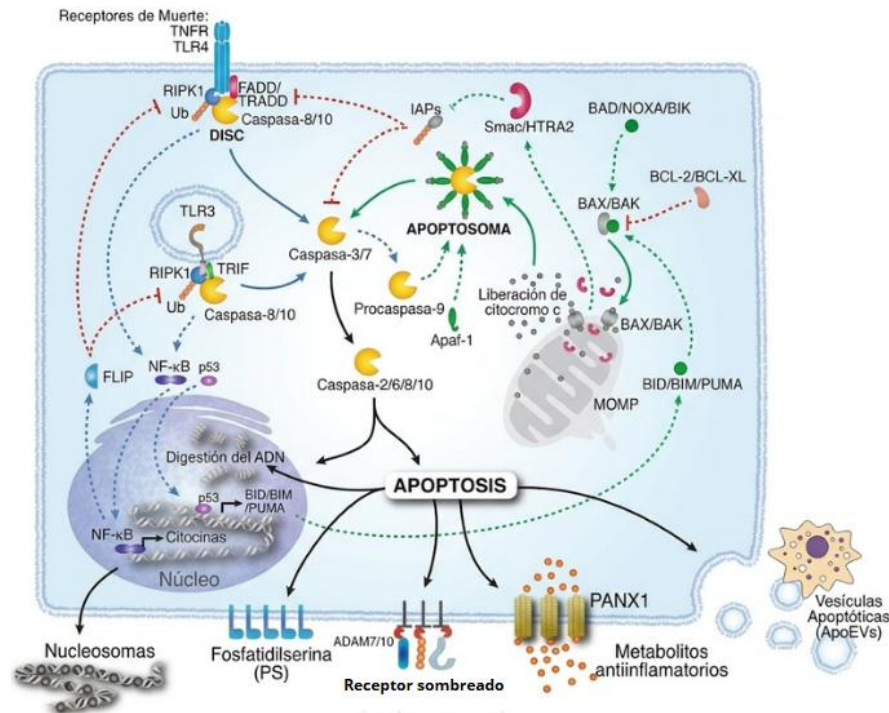


Figura 6. La apoptosis se activa por dos vías principales. En la vía intrínseca, las proteínas BAK/BAX forman poros en la membrana mitocondrial liberando citocromo c, que junto con Apaf-1 y procaspasa-9 forma el apoptosoma que activa la caspasa-9 y desencadena la cascada de caspasas; y la extrínseca, iniciada por la unión a receptores de muerte (como TNFR1) que forman complejos con TRADD, FADD, RIPK1 y procaspasa-8, activando caspasas 8 y 10 para inducir la apoptosis. La ubiquitinación de RIPK1 y la presencia de FLIP regulan la señalización y supervivencia celular. Las células apoptóticas exponen fosfatidilserina en su membrana, señalando su eliminación mediante fagocitosis. Tomado de Bertheloot, D., *et al.*, 2021.

2.2 Función biológica y fisiológica de la apoptosis

Durante el desarrollo embrionario, la apoptosis es un proceso indispensable en la formación de órganos y tejidos. En esta etapa, se generan más células de las necesarias, por lo que la apoptosis elimina aquellas que son transitorias o que han cumplido una función temporal. (Jacobson, M. D., *et al.*, 1997). La apoptosis también funciona como un mecanismo inmunológico, las células infectadas por virus o las células con daño genético irreversible activan su propio proceso apoptótico para prevenir su replicación o transformación maligna. En el sistema inmunitario, los linfocitos T autorreactivos que podrían atacar tejidos propios son eliminados por apoptosis durante su maduración en el timo, lo que previene el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Wong, R. S., 2011) (Tabla 2).

Tabla 2. La apoptosis como mecanismo fisiopatológico

Condiciones fisiológicas	La apoptosis también ha sido estudiado en el desarrollo animal, donde se ha visto que cumple múltiples funciones como la eliminación de células no deseadas, modelar estructuras, eliminar estructuras innecesarias, controlar el número de células, eliminar células anormales, mal ubicadas, no funcionales o dañinas, producir células diferenciadas sin orgánulos (Glucksmann, A; 1951).
	También la apoptosis participa en la destrucción celular programada en el desarrollo embrionario con el fin de esculpir tejido. Este mecanismo se activa en etapas tempranas del desarrollo, permitiendo la eliminación del tejido interdigital, lo que permite la separación de los dedos de las manos y pies para su separación en vertebrados. Se ha visto que, si la muerte celular se inhibe mediante el tratamiento con un inhibidor de la caspasa peptídica, se bloquea la formación normal de los dedos (Jacobson, M.D., <i>et al.</i>, 1996).
Condiciones patológicas o terapéuticos	En la quimioterapia para tratar el cáncer, la irradiación y fármacos antineoplásicos son utilizados. Se ha visto que inducen un daño en el ADN en ciertas células, lo que puede desencadenar la muerte apoptótica a través de una vía dependiente de p53. También, algunas hormonas, como los corticosteroides, pueden conducir a la muerte apoptótica en algunas células como los timocitos, aunque otras células no se ven afectadas o incluso se estimulan, provocando una disminución o evasión de la apoptosis. Esta resistencia a la apoptosis, favorece la resistencia a quimioterapia y el crecimiento tumoral (Norbury, C.J; 2001).
	La apoptosis se ha implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. Este proceso se asocia principalmente a la acumulación de proteínas como la beta-amiloide (Aβ), Alfa-sinucleína (α-sin), las cuales se localizan en el interior de la mitocondria y puede provocar disfunción mitocondrial activando la vía intrínseca de la apoptosis. Estudios dirigidos a las caspasas, como la administración de inhibidores de caspasas, se ha visto que pueden interferir significativamente en la progresión de la enfermedad, retrasando la muerte neuronal y la posterior aparición de síntomas en ratones con esclerosis lateral amiotrófica, prolongando así su supervivencia (Erekat, N. S; 2022).

2.3 Apoptosis en el hígado

La apoptosis participa en la regulación de la respuesta inmune hepática. Durante una infección o inflamación, el hígado recibe linfocitos activados que combaten al agente patógeno. Una vez controlada la infección, estos linfocitos son eliminados mediante apoptosis para evitar una respuesta inmune prolongada que pueda dañar el tejido hepático (Wang, H., *et al.*, 2021). Un exceso de apoptosis de hepatocitos contribuye al daño progresivo del hígado en enfermedades como la hepatitis viral, MASLD y MASH. En estos casos, los hepatocitos dañados activan vías apoptóticas que liberan señales proinflamatorias, atrayendo células inmunitarias y estimulando la fibrogénesis (Kanda, T., *et al.*, 2018).

2.4 MASLD y apoptosis

La apoptosis desempeña un papel central en la progresión de la MASLD. En hepatocitos primarios de rata y en la línea celular H4IIEC3 tratados con palmitato y quelantes de calcio, se ha observado disfunción mitocondrial, alteración de la homeostasis del calcio y aumento de ROS, condiciones que favorecen la activación de la apoptosis clásica (Egnatchik, R. A., *et al.*, 2014).

Entre las vías apoptóticas implicadas se destaca DR5, inducido por la proteína homóloga C/EBP (CHOP) o la cinasa JNK. Esta activación estimula proteínas proapoptóticas como Bim (BCL2L11) y PUMA, culminando en la activación de la caspasa-3 (Akazawa Y., *et al.*, 2016). La cinasa JNK desempeña un papel importante en la señalización asociada al estrés del retículo endoplásmico (RE), la inflamación y la apoptosis, modulando proteínas de la familia Bcl-2 (Johnson G. L., *et al.*, 2007).

La proteína JNK fosforilada interactúa con la proteína asociada a SH3 de la mitocondria (Sab), lo que afecta negativamente la respiración celular, eleva la producción de ROS y mantiene activa a la propia JNK, lo que establece un bucle de retroalimentación conocido como JNK–SAB–ROS loop, que perpetúa el estrés oxidativo, promueve la disfunción mitocondrial e induce

apoptosis en hepatocitos expuestos a lipotoxicidad. Como resultado, esta vía contribuye al avance de MASLD hacia MASH (Min, R. W., *et al.*, 2022).

Se ha demostrado en modelos *in vitro* que el tratamiento conjunto con LPS y ácidos grasos libres (AGL) altera el equilibrio proteico de la familia Bcl-2. Esta exposición de ácidos grasos provoca una disminución de BCL-2, tanto a nivel transcripcional como proteico, junto con un incremento de los niveles de BAX, generando un desbalance en la protección de la membrana de la mitocondria, activando las caspasas 3 y 8, conduciendo a un estado proapoptótico mediado por la vía del TNF- α (Li, Y., *et al.*, 2009).

Finalmente, el uso de compuestos como el ácido asiático de *Potentilla chinensis* (AAPC) ha mostrado beneficios significativos en modelos de estudio de MASLD. Al reducir simultáneamente la acumulación de lípidos, el estrés del retículo endoplásmico y la activación de vías inflamatorias y apoptóticas, el AAPC se perfila como una intervención prometedora para preservar la integridad funcional de los hepatocitos (Wang, D., *et al.*, 2018).

3 Moléculas de estudio relacionadas en la apoptosis

3.1 Características generales del antígeno tumoral celular p53

El gen de la proteína tumoral p53 (*TP53*) se localiza en el cromosoma 17p13.1 y codifica para la proteína p53, conocida como el “guardián del genoma”, mantiene la estabilidad genética y previene la formación de tumores. Esta proteína, compuesta por 393 aminoácidos y un peso molecular de 53 kDa, actúa como factor de transcripción que regula el ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN y el metabolismo celular, evitando que las células con daño genético continúen dividiéndose (Butera, A., *et al.*, 2025). Cuando el daño es irreparable, p53 induce la muerte celular programada. Estructuralmente, p53 está conformada por cinco dominios funcionales: un dominio de transactivación (TAD) en el extremo N-terminal, una región rica en prolina (PRO), un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio de oligomerización/tetramerización (TD) y un dominio regulador (RD) en el extremo C-terminal (**Figura 7**) (Flores, L., *et al.*, 2024).

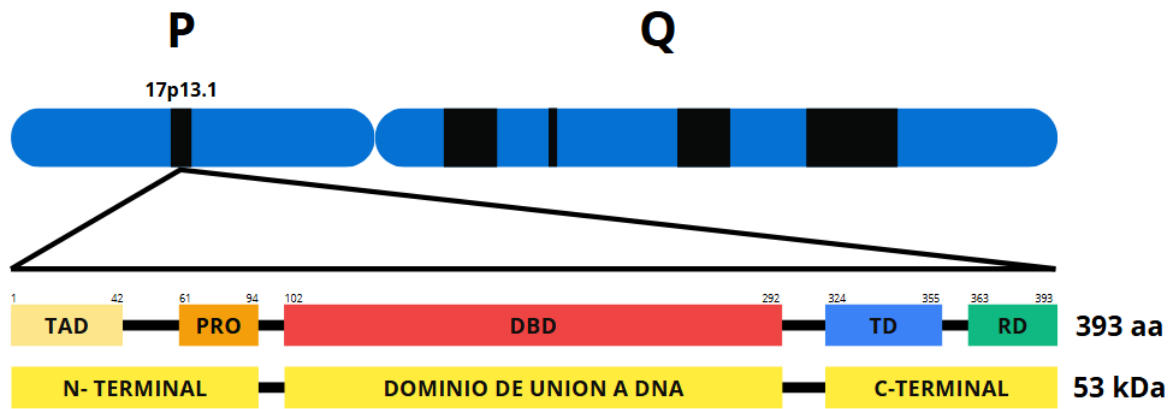


Figura 7. Localización cromosómica y dominios funcionales de p53. El gen TP53, se encuentra localizado en 17p13,1 del brazo corto; está organizado estructuralmente por varios dominios funcionales que incluye: Dominio de activación transcripcional (TAD), el dominio rico en prolina (PRO), el dominio de unión al ADN (DBD), el dominio de tetramerización (TD) y el dominio regulador (RD). La proteína p53, tiene una secuencia de 393 aminoácidos y un peso molecular de 53 kDa.

P53 depende estrechamente del homólogo murino de doble minuto (MDM2), que es una ligasa de ubiquitina que dirige su degradación proteosomal, manteniéndolo en concentraciones basales mínimas en condiciones fisiológicas (Shi, D., *et al.*, 2012).

No obstante, ante estímulos de estrés como la hipoxia, el daño genómico o la señalización oncogénica, las cinasas de ataxia telangiectasia mutada (ATM) y la cinasa relacionada con ATMATR orquestan la fosforilación de este complejo. Este cambio postraducciona interrumpe la interacción p53-MDM2, facilitando la estabilización y translocación nuclear de p53, donde actúa como factor de transcripción para genes vinculados a la reparación del ADN, la detención del ciclo celular y la apoptosis (García, C. J., *et al.*, 2019).

Además de su función clásica en el control del ciclo celular, p53 participa en la senescencia celular, la autofagia y la regulación del metabolismo energético, promoviendo la oxidación mitocondrial y reprimiendo la glucólisis (Berkers, C. R., *et al.*, 2013). Se han identificado varias isoformas de p53 (como $\Delta 40p53$ y $\Delta 133p53$) que modulan su actividad transcripcional y pueden influir en procesos metabólicos y de estrés celular hepático (Lee, S. Y., *et al.*, 2025).

Las mutaciones en *TP53* son algunas de las más comunes en el cáncer humano y están asociadas con pérdida de función y, en ciertos casos, ganancia de función oncogénica que promueve la proliferación tumoral y la inestabilidad genómica (Hertel, A., *et al.*, 2025).

3.1.1 Relación de p53 con MASLD y apoptosis

En estudios hechos en ratones macho de la cepa C57BL/6J alimentados con una dieta occidental rica en grasas y azúcares, se evidenció que dicha dieta induce MASLD y activa de forma persistente la respuesta al daño del ADN y la vía de p53, incluso después de revertir la dieta. Los niveles elevados de p53 se asociaron con un aumento de la apoptosis y la balonización hepatocelular. Además, la inhibición del gen *TP53* redujo la señalización apoptótica (Zou, Z. Y., *et al.*, 2024).

En tejidos hepáticos de pacientes con distintos estadios de MASLD, el incremento de la esteatosis hepática se asocia con una mayor expresión de la proteína proapoptótica p53, junto con una disminución del marcador antiapoptótico BCL-2 y una leve reducción de BAX, lo que demuestra que la progresión de MASLD favorece la apoptosis de los hepatocitos, impulsada por la activación de p53 y la inhibición de BCL-2, lo que contribuye al daño y avance de la enfermedad hepática (Panasiuk, A., *et al.*, 2006).

En una investigación hecha en ratones reporteros para estudiar la expresión de p53, la acumulación de ácidos grasos y el efecto de ROS. Se observó la activación de p53 como parte de una respuesta adaptativa temprana frente al estrés metabólico inducido por una acumulación de ácidos grasos. El resultado demostró que la activación de p53, cuando es un daño bajo o moderado, este factor induce la expresión de genes protectores. relacionados a reguladores de la glucólisis, y la apoptosis inducida por TP53 (TIGAR), disminuyendo el daño oxidativo, y potenciando genes relacionados con la supervivencia celular, como *SOCS3* (Zou, Z. Y., *et al.*, 2024). En modelos experimentales de MASH, principalmente roedores a los que se les indujo una dieta alta en grasa y fructosa, se ha observado una reducción de la actividad de p53 en el hígado, incrementando la peroxidación lipídica, inflamación y fibrosis, lo que demuestra su función protectora inicial (Wittke, C. I., *et al.*, 2025).

La proteína p53, en el hígado, se ha visto que puede llegar a tener una función dual dependiendo del contexto. En etapas tempranas de daño hepático, actúa como un mecanismo de defensa, manteniendo la estabilidad en general. Sin embargo, cuando el daño es crónico o hay una sobreestimulación sobre *TP53/p53*, promueve la apoptosis prolongada de la vía intrínseca. Cuando el citocromo c es liberado y se ejecutan las caspasas 3/7, no solo reduce la masa funcional del hígado, sino que también orquestan un entorno inflamatorio que activa a las células estrelladas, acelerando la progresión hacia un estado fibrótico. (Zhao, J., *et al.*, 2021)

3.2 Características generales de BCL-2

El gen *BCL2* fue identificado en un linfoma de células B, se considera un protooncogen y codifica para la proteína BCL-2, que es fundamental para la regulación de la apoptosis y la supervivencia celular, debido a que su función característica es evitar la muerte celular programada mediante el bloqueo o inhibición de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Tsujimoto, Y., *et al.*, 1986). En humanos, esta proteína tiene un tamaño de 239 aa y un peso de 26 kDa (Haldar, S., *et al.*, 1994) . Pertenece a la familia homónima de proteínas antiapoptóticas que comparten una arquitectura α -helicoidal altamente conservada.

Estudios anteriores han demostrado que BCL-2 presenta siete hélices α , las cuales forman un núcleo hidrofóbico compacto con un surco hidrofóbico superficial capaz de reconocer y unirse a los dominios BH3 de proteínas proapoptóticas como BAX, BAK o BID. Este surco es el centro funcional de la proteína, ya que regula las interacciones que determinan si la célula sobrevivirá o iniciará el proceso apoptótico. (Petros, A. M., *et al.*, 2004).

Esta proteína contiene cinco dominios conservados, denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, que median su estructura y su capacidad de interacción. Los tres primeros (BH1–BH3) conforman el surco hidrofóbico característico, mientras que el dominio BH4, localizado en el extremo N-terminal, es crítico para su función antiapoptótica y para estabilizar la conformación de la proteína, mientras que su dominio de anclaje a la membrana (TM) es una hélice alfa hidrofóbica que ancla la proteína a la membrana mitocondrial externa. Este anclaje permite que BCL-2

interactúe con otras proteínas y bloquee la apoptosis al evitar la liberación de citocromo C (**Figura. 8**) (Kvansakul, M., *et al.*, 2015).

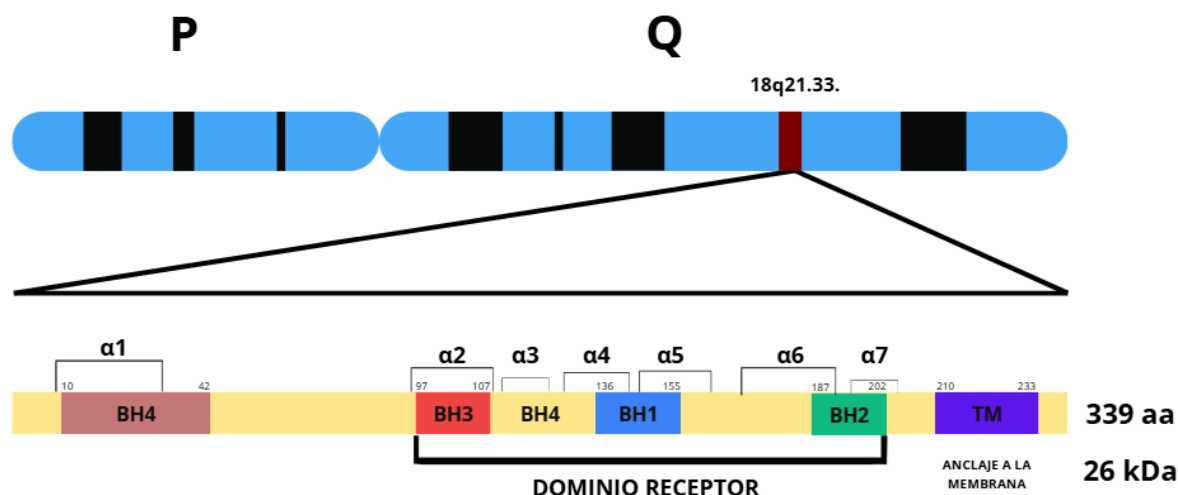


Figura 8. Localización cromosómica y dominios funcionales de BCL-2. El gen *BCL2* se encuentra en el brazo largo (Q), del cromosoma 18 (18q21.33). La organización estructural de la proteína BCL-2, se dividen en 4 dominios funcionales: Destacan sus cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH1-4) y el dominio transmembrana (TM) carboxi-terminal, responsable de su anclaje a membranas intracelulares. Se señalan las hélices alfa (α1-α7) y la región que conforma el dominio receptor. La proteína consta de una secuencia de 239 aa y un peso molecular de 26 kDa.

En 2023 se reveló un nuevo mecanismo por el cual la proteína supresora de tumores p53 puede antagonizar la actividad antiapoptótica de BCL2 al unirse directamente a su surco hidrofóbico, desplazando proteínas proapoptóticas y debilitando su función protectora (Wei, H., *et al.*, 2023). Por otro lado, se ha descrito que la proteína BCL-2 se encuentra regulada postraduccionalmente por la vía ubiquitina-proteasoma, lo cual determina su estabilidad y su degradación en respuesta al estrés celular o al tratamiento con fármacos dirigidos (Singh, A., *et al.*, 2024).

3.2.1 Relación de BCL2 con MASLD y apoptosis

Estudios hechos en pacientes que padecen MASH, se ha visto que la lesión hepática se asocia con apoptosis y activación del factor de transcripción NF-κB. Estos procesos están relacionados con la despolarización de la membrana mitocondrial por BAX y bim, la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa, para terminar el proceso de la apoptosis. La proteína BCL-2, al tener un papel antiapoptótico, se debe compensar con la expresión de BAX. En pacientes con

MASH, se ha observado una disminución significativa de BCL-2, correlacionado inversamente con el grado de apoptosis; a menor nivel de BCL-2, aumenta BAX, incrementando la apoptosis hepatocelular (Kanda, T., *et al.*, 2018).

Asimismo, BCL2 y sus homólogos se ven afectados por el estrés lipotóxico, la acumulación de ácidos grasos libres, el estrés del retículo endoplásmico y la activación de la vía JNK, lo que aumenta proteínas proapoptóticas (BAX, PUMA) y reduce la expresión de BCL2, disminuyendo la resistencia de los hepatocitos a la apoptosis. Adicionalmente, en modelos experimentales se ha observado que al incrementar la expresión de BCL2 se reduce la apoptosis de hepatocitos y se atenúan lesiones hepáticas asociadas a esteatosis (Li, X., *et al.*, 2020).

Un estudio hecho en ratas con hígado graso, mostró que tanto Bcl-2 como Bax aumentaron su expresión de manera dependiente de la dieta y del tiempo. La relación Bcl-2/Bax disminuyó conforme avanzaba la enfermedad, lo que indica una pérdida de la capacidad protectora y un desplazamiento del equilibrio hacia la apoptosis, favoreciendo la actividad de moléculas proapoptóticas (Li, C., *et al.*, 2014). Mientras que en otro estudio hecho en humanos con esteatosis hepática, se encontró que la expresión de BCL2 se redujo mientras que BAX aumentó, correlacionando con mayor daño hepático (Panasiuk, A., *et al.*, 2006).

3.3 Características generales del citocromo C

El citocromo c, codificado por el gen *CYCS*, es una hemoproteína mitocondrial pequeña y altamente conservada que participa en procesos esenciales para la vida celular. Está compuesta por una cadena única de 105 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 12.3 kDa (Margoliash, E. 1963). El citocromo c pertenece al grupo del citocromo c y posee un grupo llamado hemo c, único que forma enlaces covalentes con los residuos de cisteína de la estructura proteica (**Figura 9**) (Reedy, C. J., *et al.*, 2006).

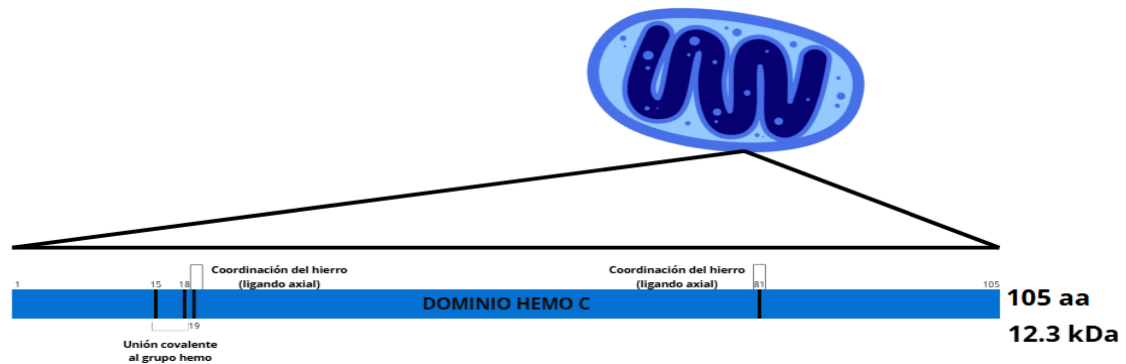


Figura 9. Localización y único dominio funcional de citocromo c. El gen *CYCS*, no tiene localización cromosómica, se encuentra entre la membrana externa/interna de este organelo. Esta proteína tiene una secuencia de 105 aa y un peso molecular de 12.3 kDa, con un único dominio: Dominio Hemo c. Además, se especifican los sitios de unión covalente al hemo y los ligandos axiales para el hierro, los cuales permiten la transferencia de electrones en el metabolismo energético y la señalización de muerte celular programada tras su liberación al citosol.

En condiciones fisiológicas, el citocromo *c* reside principalmente en las mitocondrias, donde actúa como transportador de electrones en la cadena de transporte de electrones. Facilita la transferencia de electrones desde la coenzima Q-citocromo *c* reductasa (complejo III) a la citocromo *c* oxidasa (complejo IV), contribuyendo a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, el cual se utiliza para la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) (Li, K., *et al.*, 2000).

Además de su función metabólica, el citocromo *c* participa activamente en la apoptosis. Bajo estímulos de daño celular o estrés, se libera al citosol y se une a Apaf-1 y ATP/dATP para formar el apoptosoma, activando la caspasa-9 e iniciando la cascada de muerte celular programada (Liu, X., *et al.*, 1996). Este proceso está regulado por proteínas de la familia Bcl-2 y por modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y acetilaciones, que modulan su papel tanto en la respiración mitocondrial como en la apoptosis (Morse, P. T., *et al.*, 2024).

3.3.1 Relación de citocromo c con MASLD y apoptosis

La acumulación de lípidos en los hepatocitos provoca estrés mitocondrial, aumento de ROS y disfunción de la cadena respiratoria, lo que compromete el potencial de membrana mitocondrial y desencadena la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Este proceso permite

la liberación de citocromo c al citosol, un paso clave para la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en las células hepáticas afectadas (Prasun, P., *et al.*, 2021).

En un estudio realizado en pacientes con distintas hepatopatías, se observó que el citocromo c soluble se encuentra significativamente elevado, con concentraciones más altas en hígado y bilis que en sangre portal, lo que sugiere su origen hepático. Además, estos niveles se correlacionan con el índice apoptótico y con parámetros de daño hepático, disminuyendo tras el tratamiento antiviral; por ello, se propone como un marcador sérico de apoptosis en enfermedad hepática (Ben, A., *et al.*, 2003).

Otra investigación hecha en ratas macho, se demostró que la acumulación de palmitato y palmitoil-CoA (Pal-CoA) induce la liberación mitocondrial de citocromo c, activando la apoptosis de hepatocitos. Este mecanismo de transición de permeabilidad mitocondrial (mMPT) podría contribuir a la progresión de MASLD hacia fibrosis, cirrosis o carcinoma hepatocelular (Barrios, M., *et al.*, 2021).

En cultivos celulares con palmitato como tratamiento, se demostró que la sobreexpresión de sustancia estimuladora hepática (HSS) redujo la apoptosis, mientras que su inhibición la incrementó, indicando que la pérdida de HSS favorece la apoptosis mediada por citocromo c durante la progresión de MASH (Jiang., *et al.*, 2011).

3.4 Características generales de la CASPASA 3

El gen *CASP3* codifica la caspasa-3, se localiza en la posición 4q35.1, tiene un tamaño de 277 aminoácidos, es una proteasa tipo cisteína-ácido aspártico esencial en la fase final de la vía apoptótica intrínseca. Esta enzima escinde proteínas diana dentro de la célula, induciendo la muerte celular programada. La caspasa-3 se activa mediante la escisión proteolítica del conector interdominio y el prodominio N-terminal (Ponder, K. G., *et al.*, 2019). La procaspasa-3, su forma inactiva, tiene un peso molecular de aproximadamente 32 kDa; tras la activación, se divide en dos subunidades de 17 kDa y 12 kDa que se ensamblan formando un heterotetrámero activo (dos subunidades grandes y dos pequeñas) (**Figura 10**) (Asadi, M., *et al.*, 2022).

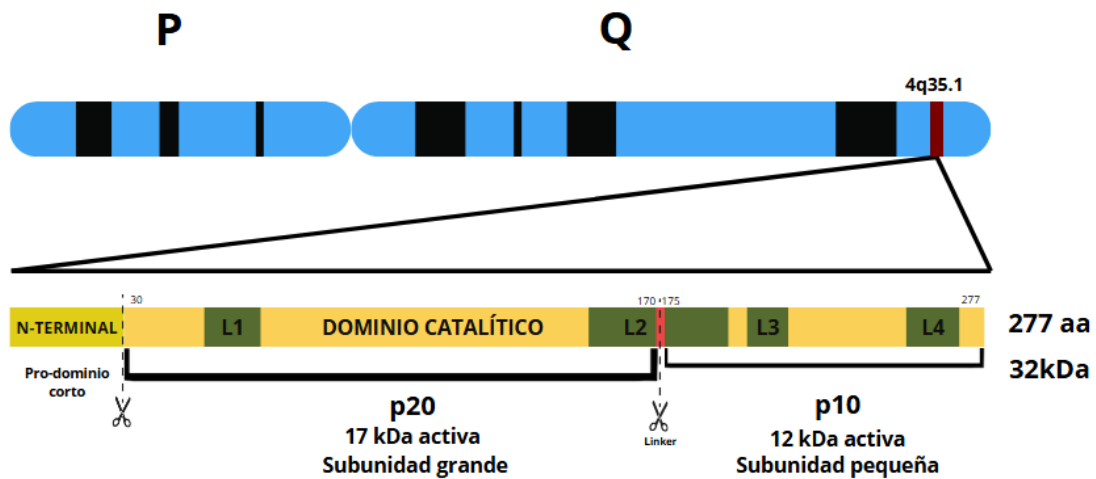


Figura 10. Localización cromosómica y dominios funcionales de la CASPASA 3. El gen *CASP3* se encuentra en el brazo largo (Q), del cromosoma 4(4q35). La organización estructural de la proteína CASPASA 3, se divide en el pro-dominio N-terminal, la subunidad mayor (p20/p17) y la subunidad menor (p12/p10). Las flechas señalan los sitios de escisión proteolítica específicos en el péptido conector, cuya ruptura es indispensable para la maduración de la enzima y su ensamblaje en el heterotetrámero catalíticamente activo. Además, su secuencia tiene un tamaño de 277 aa y un peso molecular de 32 kDa.

La caspasa-3 pertenece a la familia de peptidasas C14, y su sitio catalítico activo está formado por un residuo de cisteína (Cys-163) y un residuo de histidina (His-121), ambos cruciales para su actividad proteolítica. El gen *CASP3* se expresa en casi todos los tejidos humanos, aunque en niveles variables según el tipo de tejido (Asadi, M., *et al.*, 2022).

Las caspasas se ha visto que han sido conservadas desde modelos como *Caenorhabditis elegans* hasta humanos, son una familia conservada de proteasas que funcionan como mediadoras clave de la apoptosis, un proceso vital para el desarrollo y la homeostasis tisular. Todas las caspasas usan una cisteína nucleofílica para cortar enlaces peptídicos después de residuos de ácido aspártico. Se sintetizan como procaspasas inactivas que se activan por escisión proteolítica, formando enzimas tetraméricas activas (Asadi, M., *et al.*, 2022).

Las caspasas se clasifican en dos grupos principales: Iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras se conocen por su papel en activar a las caspasas efectoras en respuesta a señales de muerte celular, a su vez, las caspasas efectoras se encargan de degradar proteínas celulares para

ejecutar la apoptosis. La activación de procaspasas iniciadoras ocurre mediante un proceso de oligomerización mediada por proteínas adaptadoras, lo que permite regular las vías apoptóticas desencadenadas tanto por la vía de receptores de muerte en la membrana como por la vía del complejo citocromo c-Apaf-1 mitocondrial (Ponder, K. G., *et al.*, 2019).

Además, se han identificado vías de activación de la caspasa-3 que dependen o no de la liberación de citocromo c mitocondrial y de la función de la caspasa-9. La caspasa-3 es esencial para el desarrollo normal del cerebro y es importante o esencial en otros escenarios apoptóticos de una manera notablemente específica del tejido, el tipo celular o el estímulo de muerte. Así, la caspasa-3 es esencial para ciertos procesos asociados con el desmantelamiento de la célula y la formación de cuerpos apoptóticos, pero también puede funcionar antes o en la etapa en que se produce el compromiso con la pérdida de viabilidad celular (Porter, A. G., *et al.*, 1999).

3.4.1 Relación de la caspasa 3 con MASLD y apoptosis

La activación de la caspasa-3 es clave en la MASLD, especialmente en hepatocitos con acumulación lipídica y estrés metabólico. En MASH, se ha observado un incremento en los niveles de la caspasa-3 activa, vinculado a la apoptosis hepática, lo que confirma la activación de mecanismos apoptóticos en esta enfermedad (Kanda, T., *et al.*, 2018).

En un modelo experimental de MASH inducido por dieta deficiente en metionina y colina (MCD), ratones de la cepa C57BL/6 con delección del gen de la caspasa-3 (*Casp3*^{-/-}) presentaron una disminución de apoptosis hepática, menor expresión de genes pro fibróticos y una reducción significativa en el depósito de colágeno en el hígado, en comparación con ratones salvajes (WT) sometidos a la misma dieta. Lo que indica que la caspasa-3 juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de MASLD (Thapaliya, S., *et al.*, 2014).

Además, más allá de su papel en la apoptosis clásica, la caspasa-3 está emergiendo como un punto de acercamiento entre la apoptosis y otras formas de muerte celular relacionadas con la inflamación en la MASLD. Debido a que un estudio reciente indica que la caspasa-3 puede

mediar, además de la apoptosis, la activación de la gasdermina E (GSDME) para inducir piroptosis (Cao, S., *et al.*, 2025).

En un estudio realizado en pacientes con diferentes grados de MASLD, se encontró que la expresión de caspasa-3 fue mayor en pacientes con hepatitis B crónica (57.1%), hepatitis C crónica (72.0%) y esteatohepatitis no alcohólica (82.0%) en comparación con tejido hepático normal (18.8%). Además, la expresión de caspasa-3 aumentó progresivamente con la gravedad del daño patológico, lo que sugiere que esta enzima participa en la apoptosis de los hepatocitos y en la patogénesis de estas enfermedades hepáticas crónicas (Hainfeng, Y., *et al.*, 2012).

En muestras de hígado de pacientes, se evaluó distintas progresiones de la enfermedad como MASH, esteatosis simple, hepatitis alcohólica y controles sin enfermedad hepática utilizando el ensayo de marcaje de extremos de ADN mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) e inmunohistoquímica dirigida para evaluar las caspasas 3/7 activadas. Los resultados obtenidos fueron que la apoptosis aumenta significativamente en pacientes con MASH y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, lo que sugiere que una terapia antiapoptótica puede ser útil para tratar esta enfermedad (Feldstein., *et al.*, 2003)

3.5 Características generales de PARP escindida

La poli (ADP-ribosa) polimerasa es una enzima codificada por el gen *PARP1*, que se localiza en 1q42.12, que cataliza la ADP-ribosilación (modificación postraducciona) de diversas proteínas nucleares utilizando nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD^+) como sustrato. La familia PARP comprende 17 proteínas, y la PARP-1 representa entre el 85 % y el 90 % de la actividad total de PARP (Vida, A, *et al.*, 2016).

Esta enzima se activa al unirse a los extremos del ADN o a roturas en la cadena, lo que ha llevado a sugerir que la PARP contribuye a la muerte celular mediante el agotamiento de las reservas celulares de NAD^+ y ATP, diversas respuestas celulares al daño genotóxico y reparación del ADN (Berger, N. A., *et al.*, 1985).

PARP-1, antes de ser escindida, tiene un tamaño de 1014 aminoácidos, se fragmenta en dos fragmentos de aproximadamente 89 kDa y 24 kDa. Estos fragmentos contienen, respectivamente, el sitio activo y el dominio de unión al ADN de la enzima (3-5). Esta escisión inactiva esencialmente la enzima, ya que destruye su capacidad para responder a las roturas de las cadenas de ADN, facilitando así el avance del proceso apoptótico (Kaufmann, S. H., *et al.*, 1987).

La caspasa-3 es la principal responsable de la escisión de PARP durante la muerte celular. La secuencia específica donde la caspasa-3 corta a PARP, conocida como DEVD, que incluye los aminoácidos de aspartato, glutamato, valina y aspartato, está altamente conservada en la proteína PARP a lo largo de especies muy distantes, lo que resalta la importancia funcional y evolutiva de esta escisión en el proceso de apoptosis (Le, R. Y., *et al.*, 1998).

La proteína PARP-1 se divide funcionalmente en tres dominios principales y estructuralmente en seis (A a F). El dominio A, ubicado en el extremo amino terminal, es responsable de la unión al ADN mediante dos dedos de zinc (FI y FII), estimulando la actividad catalítica; dentro de este dominio está el dominio B, que contiene la señal de localización nuclear (NLS) y la secuencia diana de caspasa-3 para la proteólisis de PARP-1. El dominio D, de automodificación, contiene la mayoría de los residuos de ácido glutámico que se poli-ADP-ribosilan, además de motivos importantes como la cremallera de leucina para dimerización y el motivo del dominio C-terminal de BRCA1 (BRCT) para interacción con factores de transcripción y proteínas de reparación del ADN (Martin, O., *et al.*, 2016).

Finalmente, el dominio catalítico F, altamente conservado, posee la estructura para la unión de NAD⁺ y comparte homología con otras ADP-ribosil transferasas, formando la base para la superfamilia PARP, implicada en diversas funciones celulares a través de la poli-ADP-ribosilación (**Figura 11**) (Martin O., *et al.*, 2016).

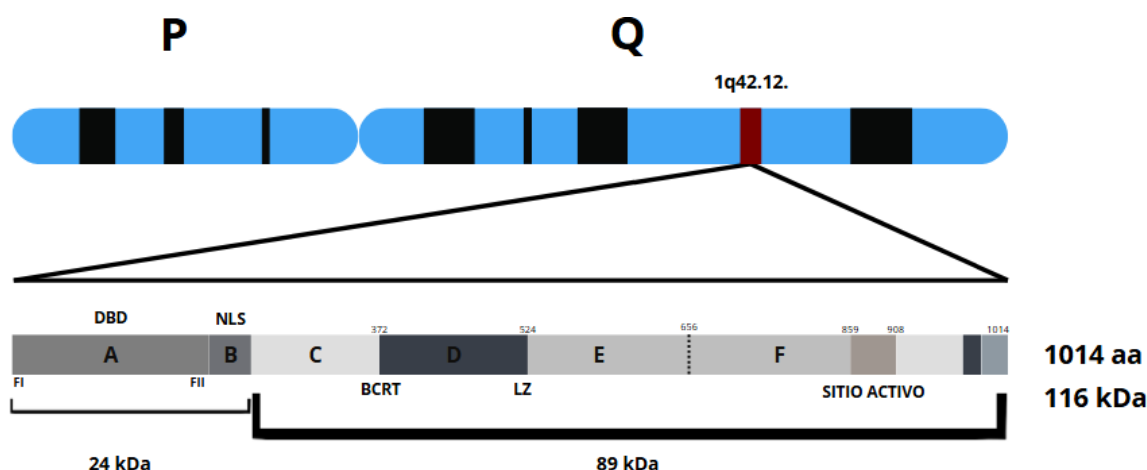


Figura 11. Localización cromosómica y dominios funcionales de PARP. El gen *PARP1* se encuentra en el brazo largo (Q), del cromosoma 1 (1q42.12). La organización estructural de la proteína PARP escindida. Se identifican el dominio de unión a DNA (DBD) con sus dos dedos de zinc (FI, FII) en el fragmento de 24 kDa, la Señal de Localización Nuclear (NLS), el dominio BRCT, el Leucine Zipper (LZ) y el Sitio Activo catalítico en el fragmento de 89 kDa. La línea punteada alrededor del aa 656 representa una región conectora flexible. Ambos fragmentos son producto de la escisión de PARP-1 por caspasas durante la apoptosis. Además, su secuencia tiene un tamaño de 1014 aa y un peso molecular de 116 kDa.

3.5.1 Relación de PARP escindida con MASLD y apoptosis

La implicación de PARP-1 en el avance de distintas enfermedades hepáticas como MASH, la enfermedad hepática alcohólica (ALD) y el carcinoma hepatocelular, indica que podría ser una diana terapéutica prometedora (Younossi, Z. M., *et al.*, 2018).

La PARP-1 desempeña un papel crucial en la apoptosis de los hepatocitos al inducir la muerte celular y aumentar la producción de mediadores proinflamatorios cuando se sobreactiva en respuesta a ROS y nitrógeno. Este proceso afecta directamente la capacidad del hígado para autorrepararse (Mukhopadhyay P., *et al.*, 2014).

Actualmente, se han hecho estudios directos sobre la proteína PARP-1 en tejido hepático infectado por el virus de la hepatitis C (VHC), aunque son limitados. Sin embargo, las funciones bien establecidas de esta enzima en la respuesta al daño del ADN (DDR) y en la regulación de la inflamación sugieren que PARP-1 podría activarse bajo condiciones de estrés inducido por el

VHC. Esta activación podría contribuir potencialmente a la fibrosis hepática y a la progresión hacia el cáncer (Smirnova, O.A., *et al.*, 2023).

En ALD, la sobreactivación de PARP-1 causa necrosis de hepatocitos y muerte de monocitos, mientras que los niveles elevados de la quimiocina CCL2 en hepatocitos y macrófagos hepáticos contribuyen al daño (Ma, X. Y., *et al.*, 2021). Estudios en ratones muestran que bloquear los receptores de quimiocinas CC tipo 2 y 5 puede prevenir o revertir este daño (Yin, F., *et al.*, 2022).

En las fases iniciales de MASLD, la disfunción de la barrera intestinal aumenta la translocación de LPS al hígado, desencadenando piroptosis. LPS activa PARP-1, que potencia la señalización de NF- κ B mediante su interacción con coactivadores como p300, elevando la expresión de citocinas proinflamatorias y mediadores como óxido nítrico sintasa inducible y ciclooxigenasa-2, lo que intensifica la inflamación hepática (Pazzaglia, S., *et al.*, 2019).

3.6 Relación IL-10, apoptosis y MASLD

Anteriormente, no se había investigado específicamente el papel que tiene la IL-10 con respecto a la protección del hígado frente a la apoptosis. Se consideraba que esta protección se debía principalmente a la regulación negativa de las citocinas proinflamatorias, las cuales pueden ser perjudiciales para el hígado al aumentar el estrés oxidativo, inducir apoptosis y la difusión mitocondrial, lo que puede llevar a necrosis (Zhong, J., *et al.*, 2006).

La IL-10 se ha identificado como un posible regulador de estos procesos (Iyer, S. S., *et al.*, 2012). La IL-10 es una citocina inmunorreguladora que posee propiedades tanto antiinflamatorias como inmunoestimulantes, y su expresión suele estar alterada en diversas enfermedades humanas (Saxton, R. A., *et al.*, 2021). Algunas investigaciones sugieren que la IL-10, tiene un papel protector en diversas enfermedades hepáticas, que involucran afecciones virales, autoinmunes e inducidas por el consumo de alcohol (Solleiro, V. H., *et al.*, 2024).

En un estudio realizado en ratones deficientes en IL-10, se demostró que la apoptosis hepática inducida por LPS, se incrementa en estos animales. En última instancia, la IL-10 actúa como un freno biológico indispensable para la homeostasis hepática. Sin su intervención, el daño celular

y la apoptosis inducida por componentes bacterianos progresan sin oposición, impulsados por un perfil de citocinas altamente inflamatorio. La evidencia indica que la presencia de IL-10 es suficiente para revertir este fenotipo, demostrando un papel protector robusto al minimizar sustancialmente la muerte celular programada y la lesión tisular (Zhong, J., *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que la IL-10 modula y regula diversos procesos inflamatorios y de supervivencia celular en diversos sistemas celulares. En un estudio realizado en cultivo de condrocitos, se demostró que la IL-10 tiene un efecto protector sobre los condrocitos al inhibir la apoptosis provocada por TNF- α a través de la regulación de Bax y Bcl-2 (John, T., *et al.*, 2007).

En estudios más recientes, hechos a partir de biopsias hepáticas y suero humano de pacientes que presentaban obesidad mórbida y MASLD, se observó que tanto las biopsias como en el suero la concentración de IL-10 disminuye a medida que aumenta la inflamación lobulillar en el hígado. Dichos hallazgos sugieren que el proceso inflamatorio hepático podría derivar de una pérdida en la capacidad inmunomoduladora de la IL-10, lo cual propicia un microambiente proinflamatorio (Solleiro, V. H., *et al.*, 2024). No obstante, la relevancia de la IL-10 en la génesis de la inflamación lobulillar, considerada uno de los estadios iniciales y determinantes en la transición hacia MASH, continúa siendo un área escasamente documentada en estudios clínicos humanos.

La evidencia indica que la IL-10 podría tener un efecto protector sobre la apoptosis hepática al regular citocinas proinflamatorias y vías de señalización de muerte celular (Santiago-Lomelí, *et al.*, 2005). Lo que ayuda a prevenir el daño hepático y la progresión a enfermedades más graves como MASH. Sin embargo, existen estudios en animales que demuestran que la inhibición de la apoptosis protege a los roedores de daños (Iyer, S. S., *et al.*, 2012). Aunque en humanos no se ha logrado demostrar que estos inhibidores sean efectivos (**Figura 12**)(Galluzzi, L., *et al.*, 2018).

3.7 Expresión diferencial de genes de apoptosis en biopsias hepáticas humanas: reanálisis transcriptómico de datos públicos

Con la finalidad de analizar la expresión diferencial de genes asociados con la apoptosis, se

reanalizó el conjunto de datos GSE126848 (RNA-seq de biopsias hepáticas humanas), mediante un flujo de trabajo reproducible en R (v4.4.0) y Bioconductor, diseñado para garantizar la trazabilidad y el control de calidad en todas las etapas del análisis.

Esta base de datos incluye muestras hepáticas clasificadas en cuatro grupos clínicos: individuos con peso normal ($n = 14$), personas con obesidad ($n = 27$), NAFL ($n = 14$) y NASH ($n = 15$), generadas mediante secuenciación en plataforma Illumina HiSeq 2500. Las comparaciones diferenciales se realizaron entre los grupos Obese, NAFL y NASH respecto al control de peso normal, y adicionalmente entre NASH_vs_NAFL para identificar genes modulados a lo largo de la progresión histológica de MASLD.

Los resultados de la **Tabla 3** muestran una tendencia: *BAX* y *CYCS* presentan una reducción significativa ($p \text{ adj} < 0.01$) en NAFL y NASH, indicando una supresión de la apoptosis mitocondrial en las fases inicial y media de MASLD. *PARP1* y *TP53* muestran un aumento moderado en NAFL ($p \text{ adj} < 0.05$), posiblemente reflejando una activación de mecanismos de reparación del ADN y control del ciclo celular como respuesta al estrés celular. *CASP3* presenta una disminución en NAFL ($p \text{ adj} = 0.012$), coherente con una menor ejecución de la apoptosis, mientras que en NASH no se observan cambios significativos. En conjunto, estos resultados sugieren que en el hígado de pacientes con MASLD, la apoptosis está atenuada en las fases iniciales, lo que podría favorecer la acumulación progresiva de hepatocitos disfuncionales y la perpetuación del daño metabólico. Desde un enfoque comparativo, el grupo Obese vs. Normal_Weight no mostró cambios significativos, lo que indica que las alteraciones en estas vías no se explican únicamente por el exceso de peso, sino que son específicas de la progresión de MASLD.

Tabla 3. Análisis de expresión génica diferencial de genes relacionados con la apoptosis del conjunto de datos GSE126848

Gene	Contrast	log2FC	SE	padj	Significance
BAX	NAFL_vs_NormalWeight	-0.821	0.196	1.83e-04	DOWN
BAX	NASH_vs_NAFL	+0.038	0.190	0.946	NS
BAX	NASH_vs_NormalWeight	-0.783	0.193	0.001	DOWN
BAX	Obese_vs_NormalWeight	+0.084	0.208	0.809	NS
BCL2	NAFL_vs_NormalWeight	+0.272	0.224	0.328	NS
BCL2	NASH_vs_NAFL	-0.021	0.212	0.973	NS
BCL2	NASH_vs_NormalWeight	+0.251	0.222	0.436	NS
BCL2	Obese_vs_NormalWeight	+0.220	0.243	0.550	NS
CASP3	NAFL_vs_NormalWeight	-0.306	0.106	0.012	DOWN
CASP3	NASH_vs_NAFL	+0.158	0.101	0.434	NS
CASP3	NASH_vs_NormalWeight	-0.148	0.105	0.314	NS
CASP3	Obese_vs_NormalWeight	-0.097	0.115	0.582	NS
CYCS	NAFL_vs_NormalWeight	-1.248	0.171	5.33e-11	DOWN
CYCS	NASH_vs_NAFL	+0.438	0.166	0.144	NS
CYCS	NASH_vs_NormalWeight	-0.809	0.168	1.16e-04	DOWN
CYCS	Obese_vs_NormalWeight	+0.454	0.181	0.055	NS
PARP1	NAFL_vs_NormalWeight	+0.277	0.085	0.004	UP
PARP1	NASH_vs_NAFL	-0.034	0.081	0.879	NS
PARP1	NASH_vs_NormalWeight	+0.243	0.083	0.023	UP
PARP1	Obese_vs_NormalWeight	-0.223	0.091	0.082	NS
TP53	NAFL_vs_NormalWeight	+0.513	0.097	1.75e-06	UP
TP53	NASH_vs_NAFL	-0.224	0.091	0.179	NS
TP53	NASH_vs_NormalWeight	+0.289	0.096	0.019	UP
TP53	Obese_vs_NormalWeight	+0.149	0.106	0.319	NS

Resultados del análisis de expresión diferencial (DESeq2), que indican los valores de log₂FC, error estándar (SE) y significancia ajustada (*p* adj).

Estos hallazgos, derivados de tejido humano, son particularmente relevantes como antecedente directo del presente trabajo, ya que sugieren que la regulación de la apoptosis en MASLD ocurre en un contexto de adaptación molecular temprana y progresiva. Considerando que IL-10 es un modulador central de la homeostasis inmunometabólica y puede influir sobre señales pro- y antiapoptóticas, resulta pertinente evaluar de manera controlada cómo cambios en el eje de IL-10 se relacionan con la expresión de genes asociados a apoptosis en un modelo in vitro de esteatosis hepática. Con base en esta evidencia, en la siguiente sección se plantea la justificación del estudio y el enfoque experimental propuesto.

III. Justificación

La esteatosis hepática, es una alteración metabólica que se caracteriza por la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos, además de ser una condición que puede progresar hacia formas más graves como la MASLD. Actualmente, esta enfermedad presenta una elevada prevalencia a nivel mundial, estimándose que afecta aproximadamente a un tercio de la población adulta, especialmente en países con alta tasa de obesidad y resistencia a la insulina. Diversos estudios han demostrado que el mecanismo de la apoptosis juega un papel central en la progresión del daño hepático y que la activación de vías apoptóticas puede contribuir al deterioro de la función hepática.

La IL-10, se caracteriza por su naturaleza antiinflamatoria y citoprotector; sin embargo, su participación en la regulación de genes asociados a la apoptosis, en un contexto de esteatosis hepática, aún no se encuentra esclarecida. Por ello, resulta importante investigar el papel de la IL-10, en la modulación de la vía intrínseca de la apoptosis, ya que actualmente esta interacción ha sido poco explorada hasta el momento. El estudio de esta relación podría aportar información valiosa sobre mecanismos moleculares involucrados en la progresión del daño hepático y contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas orientadas a prevenir o limitar la evolución de las enfermedades metabólicas, en sus estadios tempranos, como la esteatosis.

IV. Hipótesis

IL-10 ejerce un efecto citoprotector al modular la expresión de genes involucrados en la vía apoptótica en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática.

V. Objetivo

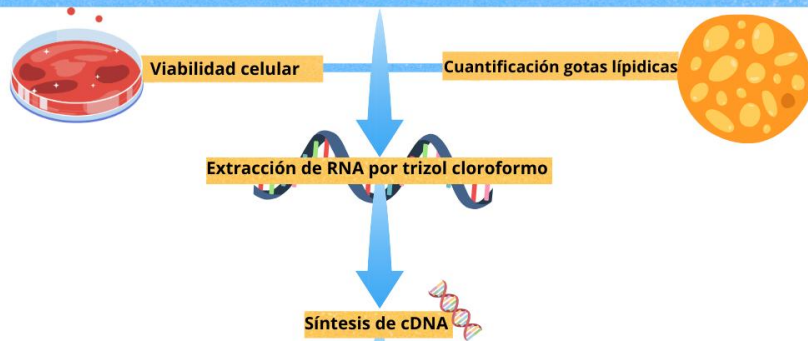
Evaluar la expresión de genes apoptóticos y el efecto de la IL-10 exógena en un modelo *in vitro* de esteatosis inducido en células HepG2.

Objetivos particulares

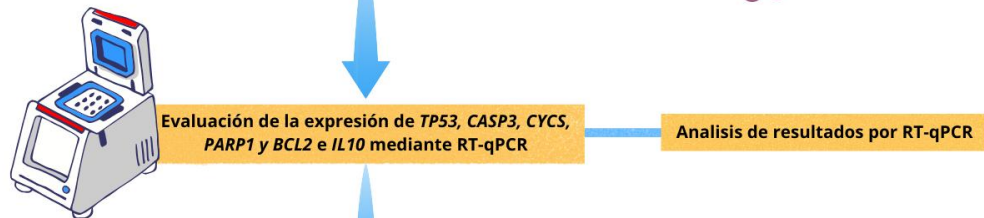
1. Evaluar los niveles de expresión de los genes *TP53*, *CASP3*, *CYCS*, *PARP1*, *BCL2* e *IL10* en un modelo *in vitro* de esteatosis
2. Evaluar los niveles de expresión de moléculas asociadas a la muerte celular programada en un modelo *in vitro* de esteatosis en concentraciones crecientes de la proteína IL-10 exógena.

VI. Estrategia experimental

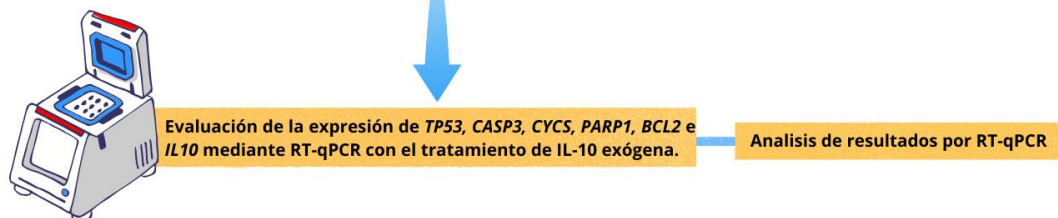
1. Desarrollo y estandarización de un modelo *in vitro* de esteatosis hepática en la línea celular HepG2.



2. Estandarización de los primers de los genes *TP53*, *CASP3*, *CYCS*, *PARP1*, *BCL2*, *18s* e *IL10*



3. Exposición del tratamiento IL-10 exógena en el modelo *in vitro* de esteatosis a concentraciones crecientes



VII. Materiales y Métodos

1. Cultivo celular

La línea celular HepG2 (ATCC, Virginia) derivada de carcinoma hepatocelular originada en un humano de 15 años, fue utilizada para el desarrollo del modelo *in vitro* de esteatosis. Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² de cuello inclinado estériles, añadiendo medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) , 100 U/mL de anti-anti o gentamicina (Gibco) y HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich). y posteriormente incubadas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

El medio se cambió una a dos veces por semana y, tras alcanzar una densidad del 80%, se realizó pase celular. Para el recuento celular y la resiembra, las células se despegaron con 3 mL de tripsina-EDTA 0.2%, y se lavaron con 3 mL de PBS 1X. La cantidad exacta de células se determinó mediante el recuento en cámara de Neubauer y la tinción con azul de tripano para evaluar la viabilidad celular.

La concentración se calculó con la fórmula:

Concentración = (células/mL)= (Número de cuadrantes/ Número total de células contadas) $\times 10 \times 10,000$

donde 10 corresponde al factor de dilución y 10,000 al factor de conversión del volumen de la cámara. De esta manera se determinó el número total de células presentes en la caja de cultivo.

2. Viabilidad celular del modelo *in vitro* de esteatosis

Una vez que las células HepG2 alcanzaron una confluencia del 80%, se procedió a sembrar 5×10^5 células por mililitro de medio DMEM en cada pozo de una placa de cultivo de 12 pozos, por triplicado biológico y técnico. Tras la siembra, las células se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Posteriormente, se añadieron ácido oleico (0.5 mmol/L) (Sigma, St. Louis, MO) y ácido palmítico (Sigma-Aldrich), en una concentración 2:1 (0.06:0.03 mmol/L). Las concentraciones se establecieron según el siguiente esquema experimental (**Figura 12**):

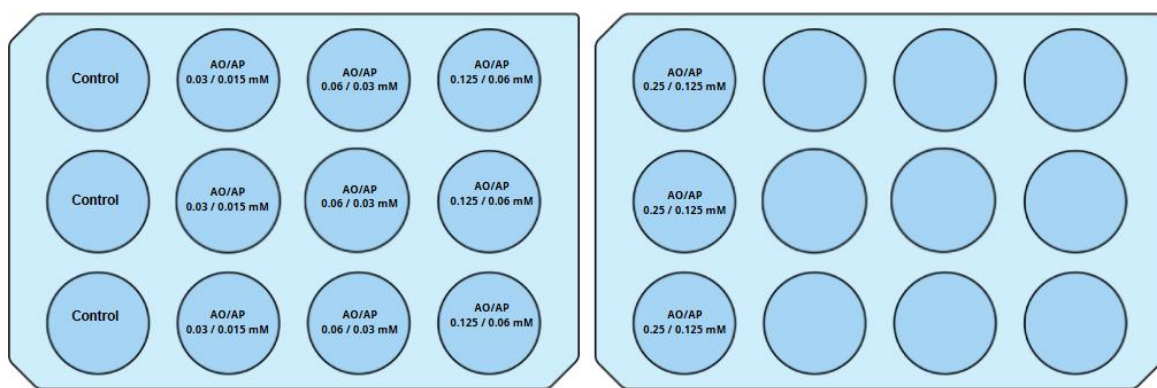


Figura 12. Distribución del tratamiento con AO:AP en concentraciones crecientes. Cada columna representa las 3 curvas independientes de cada concentración analizada.

Tras la exposición por 24 horas, las células se despegaron con 700 μ L tripsina-EDTA 0.2% durante 5 minutos en la incubadora. Después, la tripsina se inactivó mediante la adición de 700 μ L de medio DMEM, y la suspensión celular se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio DMEM.

Para el recuento celular, se mezclaron 15 μ L de azul de tripano con 15 μ L de la suspensión celular en un tubo Eppendorf de 0.6 mL. De la mezcla resultante, se tomaron 10 μ L y se realizó la cuantificación en la cámara de Neubauer.

Por cada cuadrante de la cámara de recuento se contabilizaron las células vivas y muertas correspondientes a cada una de las condiciones experimentales. Posteriormente, se calculó el promedio de células vivas y muertas por separado.

Finalmente, se determinó la viabilidad celular respecto al control, tomando como referencia el 100% de viabilidad, considerando como criterio que las células deben presentar un porcentaje de supervivencia superior al 80 % para ser consideradas viables.

Las células restantes se centrifugaron nuevamente a 5000 rpm durante 5 minutos; se decantó el medio, se añadieron 200 μ L de TRIzol®, y las muestras se suspendieron y almacenaron a -70 °C hasta su posterior análisis. Una vez estandarizada la viabilidad celular, este procedimiento se repitió para la obtención de las muestras correspondientes al modelo *in vitro* de esteatosis, destinadas a la extracción de RNA, síntesis de cDNA y posterior análisis mediante RT-qPCR.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía), utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.3. Para la comparación de dos grupos se utilizará la prueba de t-Student dependiendo la distribución. Después, se realizará un análisis *post hoc*, aplicando la prueba de Tukey. Las diferencias serán consideradas como significativas con una $P < 0.05$.

3. Modelo *in vitro* de esteatosis

El modelo *in vitro* de esteatosis en células HepG2 se estableció en una placa de cultivo de 6 pozos, sembrando 1×10^6 células por pozo. La cantidad exacta de células se determinó mediante el recuento en cámara de Neubauer y la tinción con azul de tripano, anteriormente mencionado. Previo a la siembra, se usaron cubreobjetos que fueron flameados con apoyo de pinzas previamente; posteriormente, cada cubreobjetos se colocó de manera aséptica en el interior de cada pozo de la placa.

Tras la siembra, se dejó incubar las células por 24 horas para la adhesión celular. Una vez adheridas, se añadió ácido oleico y ácido palmítico 2:1 (0.06:0.03 mmol/L) (Sigma-Aldrich), durante 24 horas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

Las concentraciones de ácido oleico y ácido palmítico se establecieron en orden ascendente empleando las siguientes combinaciones: Control (sin tratamiento), 0.06/0.015 mM, 0.06/0.03 mM, 0.125/0.06 mM, 0.25/0.125 mM.

Para corroborar la inducción de esteatosis en este modelo celular, se realizó la técnica Oil Red Oil (ORO). En la cual, una vez expuestas las células al ácido oleico y palmítico por 24 h, se retiró el medio de cultivo y se procedió a lavar con PBS 1X. Posteriormente, se fijó con p-formaldehído al 4% por 30 minutos. Nuevamente, se lavó con PBS 1X y se permeabilizó con Tritón X-100 al 0.1%, PBS 1X suplementado con 0.1 % de BSA durante 10 minutos, seguido por un último lavado con PBS 1X. Las células HepG2 se incubaron con una solución filtrada de (0.25 g de polvo de ORO) disuelto en 50 mL de etanol al 70% durante 30 minutos. Después de la tinción se hizo un lavado final con PBS 1X. Finalmente, se observó las células al microscopio a un aumento de 40X Y 100X, evaluando 5 campos aleatorios por pozo para la visualización de las gotas lipídicas.

3.1 Cuantificación gotas lipídicas

La cuantificación de las gotas lipídicas, se realizó con los programas ImageJ V1.0 junto con el programa Java 8 de 64 bits, de las fotografías tomadas previamente con el programa programa ISO camere y el microscopio invertido, utilizando los aumentos 40x y 100x.

Las gotas lipídicas intracelulares en la línea celular HepG2 se cuantificaron mediante la medición del área total de cada imagen y del área positiva correspondiente a las gotas lipídicas. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje del área cubierta por gotas lipídicas respecto al área total del campo visual. El análisis estadístico empleado se realizó mediante ANOVA de una vía y un análisis post hoc, aplicando la prueba de Tukey, mediante el programa Graphpad Prism V8.0.3.

4. Extracción de RNA

Para evaluar la expresión de los genes *TP53*, *IL10*, *CASP3*, *CYCS*, *PARP1* y *BCL2*, relacionados con la apoptosis, en las muestras celulares previamente almacenadas a -70°C , se utilizó el kit de extracción de RNA por Trizol (Ambion by Life Technologies, catálogo 15596018).

Primero, se añadieron 61 μL de cloroformo y se resuspendió el pellet hasta homogeneizar por completo. Posteriormente, se agitó en vórtex durante 30 segundos, hasta que la mezcla adquirió una apariencia lechosa. Inmediatamente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C .

Después, se extrajo la fase acuosa, que contenía el RNA, y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. A esta fase se le añadieron 145 μL de isopropanol y se incubó durante 20 minutos a -20°C ; (las muestras se mantuvieron en refrigeración). Luego, se centrifugaron por 10 minutos a 12 000 rpm, se decantó el sobrenadante y se eliminó el exceso de isopropanol sobre hielo, para evitar la degradación del ARN.

A continuación, se agregaron 280 μL de etanol al 75 %, y se centrifugó nuevamente a 7 500 RCF durante 5 minutos. El etanol se decantó de un golpe y se dejó evaporar el residuo durante 10 minutos, colocando los tubos boca abajo sobre una toalla sanitaria Clinex Kim Wipe. Se limpiaron las paredes del tubo con la sanita, evitando tocar el botón.

Finalmente, se añadieron 20 µL de agua grado molecular y se resuspendió el ARN utilizando una punta. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ARN en el espectrofotómetro y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

5. Síntesis de cDNA

Se ajustaron los volúmenes para contener 1000 ng de RNA. En las muestras con más de 100 ng, el volumen de RNA se calculó dividiendo 1000 ng/concentración obtenida de RNA en ng/µL + 0.5 µL de Oligo dT + y se completa con H₂O hasta tener 10 µL. En las que tenían menos de 100 ng, se usaron 9.5 µL de RNA + 0.5 µL de Oligo dT, para tener un volumen de 10 µL.

Las muestras se colocaron en el equipo MiniAmp Plus Thermal Cycler, para la desnaturalización a 70 °C por 5 min. Mientras tanto, se preparó el mix de reacción con 4 µL de buffer, 1 µL de dNTP Mix, 0.5 µL de inhibidor de RNasa y 4 µL de agua (total 9.5 µL).

Tras la desnaturalización, se añadieron 9.5 µL del mix y 0.5 µL de enzima retrotranscriptasa a cada tubo, obteniendo 20 µL finales. Se realizó la retrotranscripción a 50 °C por 60 min y la inactivación enzimática a 70 °C por 10 min.

Finalmente, se cuantificó el cDNA con 1 µL en el espectrofotómetro y se diluyó según la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, donde C_1 corresponde a la concentración del cDNA obtenido, V_1 al volumen cuantificado (19 µL), C_2 a la concentración deseada (200 ng/µL) y V_2 al volumen final de agua necesario. El cálculo se realizó de la siguiente forma: $V_2 - 19 \mu\text{L} = \text{cantidad de H}_2\text{O a agregar para alcanzar la concentración deseada hasta obtener una concentración de 200 ng/}\mu\text{L}$. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6. Estandarización de las condiciones de amplificación de primers para los genes *TP53*, *CASP3*, *CYCS*, *PARP1*, *BCL2*, *18s* e *IL10*

Se obtuvieron las secuencias de los genes *TP53*, *CASP3*, *CYCS*, *PARP1* y *BCL2* de *Homo sapiens* a partir de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Con dichas secuencias, se diseñaron los oligonucleótidos Forward y Reverse empleando la herramienta Primer-BLAST, y posteriormente fueron solicitados al proveedor T4 Oligo. Las condiciones de la qPCR para el gen endógeno ARN ribosomal *18S*, se utilizaron como control

interno, previamente estandarizado en investigaciones anteriores del grupo de trabajo. El gen *IL10* igualmente fue estandarizado previamente (**Tabla 4**).

Tabla 4. Secuencias de los primers utilizados

Gen	Primer	Secuencia 5' → 3'	Temperatura (TM)
<i>BCL2</i>	Forward	5'-ATTGGATTCTGTGCCGTGGA-3'	60° 30 s
	Reverse	5'-CTGGTTGAGAAGGTTGGCTGA-3'	60° 30 s
<i>CASP3</i>	Forward	5'-TTTGAGATGTGTTGCCGTGC-3'	60° 30 s
	Reverse	5'-AGTAACCCCTGCTTAATCGTCA-3'	60° 30 s
<i>PARP1</i>	Forward	5'-GGAGCACACATCCAAATGCC-3'	60° 30 s
	Reverse	5'-GGTTTCACAAGGCTGATGGC-3'	60° 30 s
<i>CYCS</i>	Forward	5'-AAAAAGAGGTGAGAGCGGGTC-3'	60° 30 s
	Reverse	5'-TCCATAGCCCTTCAGCAACC-3'	60° 30 s
<i>TP53</i>	Forward	5'-TCGAGATGTTCCGAGAGCTG-3'	60° 30 s
	Reverse	5'-ACACTGAGGCAAGAATGTGGT-3'	60° 30 s
<i>IL10</i>	Forward	5'-GAAGCCAGGATCACCAACACT-3''	60° 30 s
	Reverse	5'-AGGTTCCCACACTCTCTCCAA-3'	60° 30 s
<i>18S</i>	Forward	5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'	60° 30 s
	Reverse	5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'	60° 30 s

Los primers se recibieron en forma liofilizada (deshidratada) para su adecuada conservación. Antes de su uso, fueron rehidratados con agua libre de nucleasas hasta alcanzar la concentración de trabajo indicada por el proveedor.

Primero, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos para concentrar el contenido. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, cada tubo presentaba una concentración determinada en mM; a partir de esta, se preparó una dilución a 100 mM utilizando agua de grado molecular. Los tubos se mezclaron por vórtex, se centrifugaron brevemente y se añadieron 90 µL de agua de grado molecular junto con 10 µL del oligo correspondiente, obteniendo un

volumen final de 100 μL . Las soluciones obtenidas se etiquetaron adecuadamente y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación.

Posteriormente, se preparó el mix con 7.5 μL de Sybr Master, 0.6 μL del oligo Forward, 0.6 μL del oligo Reverse y 4.3 μL de agua de grado molecular, obteniendo un volumen final de 13 μL por cada reacción. Finalmente, el mix se mezcló, etiquetó y centrifugó brevemente antes de continuar con el procedimiento.

Se dispensaron 13 μL del mix y 2 μL (200 ng) de cDNA, teniendo un total de 15 μL en cada reacción. En el equipo c1000 touch thermal cycler FOR PCR, se configuraron las siguientes condiciones para todos los genes de estudio incluyendo el *18s* e *IL10*: desnaturalización inicial de cadenas 95°C por 10' en un ciclo; desnaturalización 95°C por 15", alineamiento; 61°C por 30" y extensión 72°C por 30" en 40 ciclos, por último, se realizó una curva de disociación y un paso de extensión por 7 minutos a 72°C (**Figura 13**).

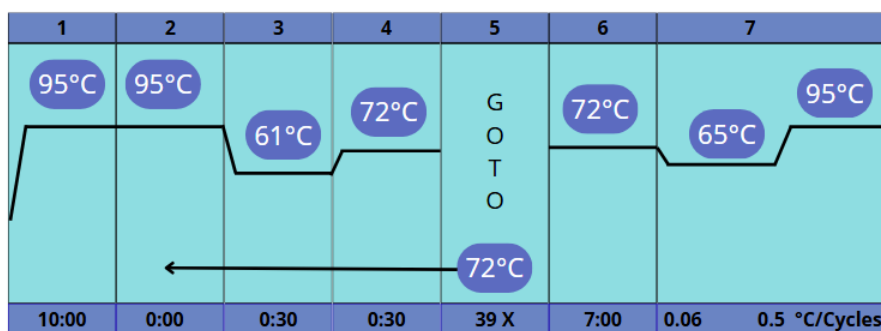


Figura 13. Condiciones de amplificación para *TP53*, *CASP3*, *CYCS*, *PARP1*, *BCL2*, *18s* e *IL10* y como gen endógeno *RNAr18S*.

7. Evaluación de la expresión de *TP53*, *CASP3*, *CYCS*, *PARP1* y *BCL2* mediante RT-qPCR

Posteriormente, se preparó el mix con 7.5 μL de Sybr Master, 0.6 μL del oligo Forward, 0.6 μL del oligo Reverse y 4.3 μL de agua grado molecular, obteniendo un volumen final de 13 μL , por cada reacción.

Se obtuvieron tres curvas de viabilidad correspondientes al tratamiento con la mezcla de ácidos AO:AP, las cuales se emplearon como triplicados biológicos. Para cada curva se realizó un duplicado técnico en cada una de las concentraciones evaluadas, ordenadas de menor a mayor concentración (control, 0.03/0.015 mM, 0.06/0.03 mM, 0.125/0.06 mM y 0.25/0.125 mM), para cada uno de los genes mencionados anteriormente, obteniéndose un total de 30 reacciones por gen.

En cada reacción se dispensaron 13 μ L del mix y 2 μ L, teniendo un total de 15 μ L de cDNA en cada reacción. En el equipo c1000 touch thermal cycler FOR PCR, se configuraron las siguientes condiciones para todos los genes de estudio, incluyendo el *18s* e *IL10*: Apertura de cadenas 95°C por 10' en un ciclo; desnaturalización 95°C por 15", alineamiento; 61°C por 30" y extensión 72°C por 30" en 40 ciclos, por último, se realizó una curva de disociación y un paso de extensión por 7 minutos a 72°C.

8. Análisis de resultados de RT-qPCR

Una vez verificada la correcta amplificación de todas las reacciones de RT-qPCR, los datos obtenidos fueron analizados mediante el método del doble delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct), también conocido como método de Livak, ampliamente utilizado para la cuantificación de la expresión génica relativa en PCR en tiempo real (Peña O; 2025). Este método permite determinar los cambios en la expresión de un gen de interés normalizados frente a un gen de referencia y comparados con una muestra control o calibradora.

El valor Ct (cycle threshold), también conocido como Cq (Quantification cycle), representa el punto en el que la emisión de fluorescencia emerge del ruido de fondo y cruza un umbral de detección preestablecido. Existe una correlación inversa entre el Ct y la concentración inicial de la diana: un valor de Ct reducido refleja una carga inicial más elevada del material genético en la muestra.

Para la normalización de la expresión génica, se calculó el delta Ct (Δ Ct) de cada muestra como la diferencia entre el Ct promedio del gen de interés y el Ct promedio del gen endógeno de

referencia (18S rRNA), lo que permite corregir variaciones en la cantidad inicial de cDNA entre las muestras:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ 18S}$$

Los valores de Ct fueron obtenidos mediante el software Bio-Rad CFX Manager, calculando el promedio correspondiente a los replicados técnicos y biológicos para cada grupo experimental (control y tratamiento).

Posteriormente, el $\Delta\Delta Ct$, permite observar el cambio relativo en la expresión génica entre condiciones experimentales. se determinó comparando el ΔCt de la muestra experimental con el ΔCt del grupo control (calibrador), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra experimental} - \Delta Ct \text{ control}$$

Finalmente, la expresión génica relativa del gen de interés se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Los resultados se expresaron como *fold change* (veces de cambio) en relación con el grupo control, al cual se le asignó un valor relativo de 1. Valores mayores a 1 indican sobreexpresión del gen de interés, mientras que valores menores a 1 indican subexpresión en comparación con el control. El análisis estadístico empleado se realizó mediante ANOVA de una vía, con el programa Graphpad Prism V8.0.3.

9. Tratamiento con IL-10 exógena

Para el tratamiento con la proteína recombinante IL-10 exógena (PeproTech), se procedió a reconstituirla. El vial se centrifugó brevemente antes de su apertura con el fin de llevar todo el contenido al fondo. Posteriormente, se añadió 1 mL de PBS 1X y se ajustó el pH a 7.2 . La proteína reconstituida se distribuyó en alícuotas de trabajo y se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su uso. Una vez hecho esto, se seleccionaron 2 concentraciones de la viabilidad del modelo *in vitro* (Punto 1) una donde la viabilidad no esté comprometida (AO:AP 0.06 / 0.03 mM) y otra concentración donde si se encuentre comprometida (AO:AP 0.125 / 0.06 mM) .

Posteriormente, se cultivaron 5×10^5 células HepG2 (ATCC, Virginia, EE. UU.) por pozo en una placa de 12 pozos, en triplicado biológico, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se añadió la mezcla de AO:AP y se incubó por 24 horas adicionales. Posteriormente, se agregó la proteína IL-10 exógena en el medio a las concentraciones (2, 5 y 10 ng/mL; PeproTech) y se incubó durante 4 horas, tiempo correspondiente al pico máximo de vida media de la IL-10, para evaluar el efecto del tratamiento. Finalizada la incubación, las células se inactivaron mediante tripsinización y adición de medio de cultivo, para posteriormente realizar el conteo de viabilidad celular (Punto 1 de la metodología) y proceder al almacenamiento de las muestras.

Las concentraciones del tratamiento con IL-10 se establecieron en orden ascendente empleando las siguientes combinaciones: Control (sin tratamiento), 0.06/0.03 mM de ácido oleico y palmítico, 0.125/0.06 con 2,5 y 10 ng/mL.

Posteriormente, se repitieron las mismas metodologías de la extracción de RNA (punto 4) y cDNA (punto 5), Se evaluó la expresión por RT-qPCR (punto 7) y análisis de los datos, calculando el $\Delta\Delta C_t$ (punto 8). El análisis estadístico empleado se realizó mediante ANOVA de una vía, con el programa Graphpad Prism V8.0.3.

VIII. Resultados

1. Ensayo de viabilidad celular

Para el desarrollo del modelo *in vitro* de esteatosis hepática, se utilizó la línea celular HepG2, la cual fue expuesta por 24 horas a un tratamiento de diferentes concentraciones de AO:AP, manteniendo una proporción 2:1 capaz de inducir esteatosis sin afectar o comprometer de manera significativa la supervivencia celular. Para evaluar la viabilidad celular, se llevó a cabo un ensayo de exclusión con azul de tripano.

El diseño de los grupos experimentales se puede observar en la (Figura 14 A). El grupo control fue establecido como referencia (100% de viabilidad), para la comparación con el resto de las condiciones. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento a concentraciones crecientes de AO:AP, presenta una menor supervivencia celular. En AO:AP 0.03/0.015 mM presentó una viabilidad de 99.16 %, sin presentar una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad. En AO:AP 0.06/0.03 mM (85.91%), la viabilidad disminuyó parcialmente, aunque no fue estadísticamente significativa.

Sin embargo, en AO:AP 0.125/0.06 mM (82.48%; $p<0.0030$), mostró una disminución estadísticamente significativa. En contraste, la condición de AO:AP 0.25/0.125 mM también mostró una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular (76.11%; $P<0.0308$), situándose por debajo del umbral del 80% considerado como criterio aceptable para modelos celulares, lo que sugiere un efecto citotóxico de esta concentración (Figura. 14B). Por lo que, a mayor concentración de AP:AO, la supervivencia celular disminuye.

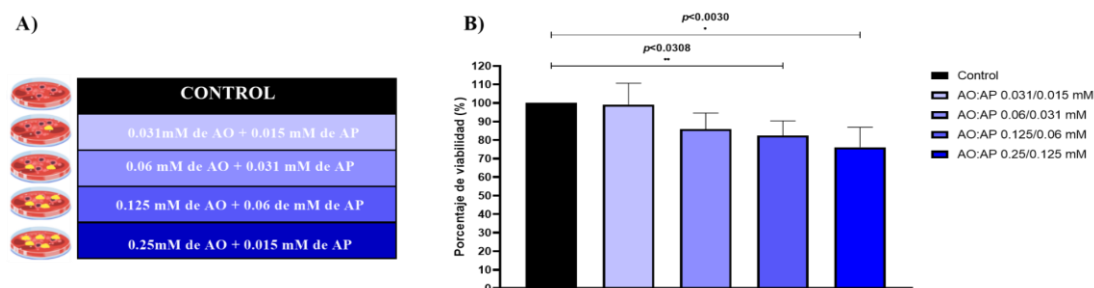


Figura 14. Diseño de grupos experimentales y viabilidad. A) Diagrama de los grupos experimentales y concentraciones utilizadas de ácidos grasos (AO:AP). B) Porcentaje de viabilidad celular (%) en células HepG2

tratadas con diferentes concentraciones mM de ácido oleico y ácido palmítico (AO:AP) durante 24 horas, determinado mediante la exclusión con azul de tripano. Los datos se presentan como valores promedio $\pm$ desviación estándar correspondientes a cinco experimentos independientes para cada condición evaluada ($n=5$). El análisis estadístico empleado se realizó mediante ANOVA de una vía, observándose diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones AP:AO 0.25/0.125 mM ($p<0.0030$) y AP:AO 0.125/0.06 mM ($P<0.0308$) en comparación con el control.

2. Modelo *in vitro* de esteatosis hepática en células HepG2

Una vez confirmadas las diferentes concentraciones de AO:AP que son viables para el establecimiento del modelo *in vitro* de esteatosis hepática, se continuó con su estandarización mediante tinción ORO para la detección de gotas lipídicas presentes en el interior de las células HepG2, utilizando hematoxilina como colorante de contraste. Tal como se observa en la **figura 15**. Los resultados obtenidos demostraron que las células con el tratamiento de AO:AP mostraron la formación de gotas lipídicas, observándose un incremento dosis dependiente de la concentración de ácidos grasos. Lo que demuestra que la exposición de AO:AP en una proporción 2:1 indujo la esteatosis en células HepG2, validando el establecimiento del modelo *in vitro* (**Figura 15**).

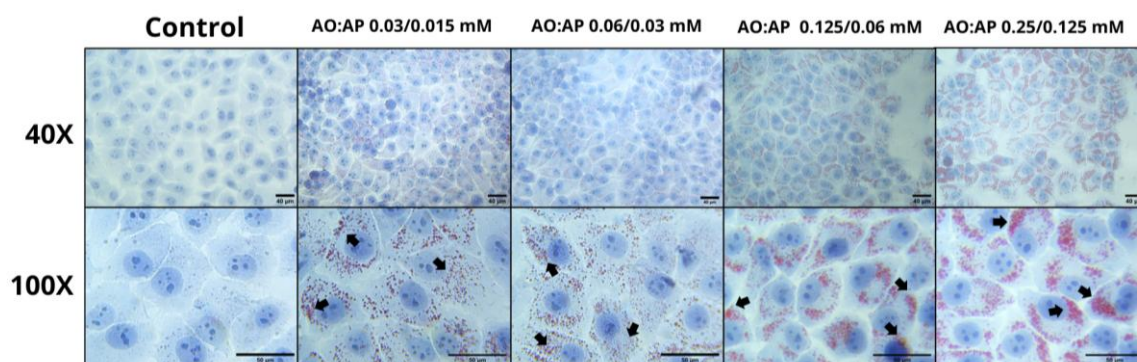


Figura 15. Modelo de esteatosis en células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones de AO:AP en una proporción 2:1. Las gotas lipídicas fueron identificadas mediante tinción ORO y señaladas con flechas de color negro. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía óptica a aumentos de 40X y 100X utilizando el software ImageView.

3. Cobertura porcentual de gotas lipídicas en células HepG2 tratadas por AO:AP

Después de estandarizar el modelo *in vitro* de esteatosis, se realizó la cuantificación del área de cobertura por evaluando 5 campos aleatorios por pozo para la visualización de las gotas lipídicas en las diferentes concentraciones de tratamiento ya establecidas previamente. Este análisis se llevó a cabo mediante la cuantificación de píxeles de las imágenes tomadas previamente utilizando el software Image J V1.0. Se seleccionaron las imágenes tomadas con un aumento de

100X, para confirmar la inducción de esteatosis en las células HepG2. Como se esperaba, los resultados mostraron que el control (0.1%) no se encontraron gotas lipídicas. La esteatosis hepática se define como la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos que supera el 5% del contenido celular. La concentración de AO:AP 0.03/0.015 obtuvo un área de cobertura de gotas lipídicas de (3.66 %; $p<0.0001$) por lo que fue descartada para futuros experimentos, debido a que no cruza el umbral con esta condición. En AO:AP 0.06/0.03 mM (5.31 %; $p<0.0001$), AO:AP 0.125/0.06 mM (11.32 %; $p<0.0001$) y las concentraciones AO:AP 0.25/0.125 mM (17.37 %; $p<0.0001$). El área de cobertura lipídica mostró un aumento progresivo a medida que se iban incrementando las concentraciones de AO:AP, como se puede observar en la (Figura 16)

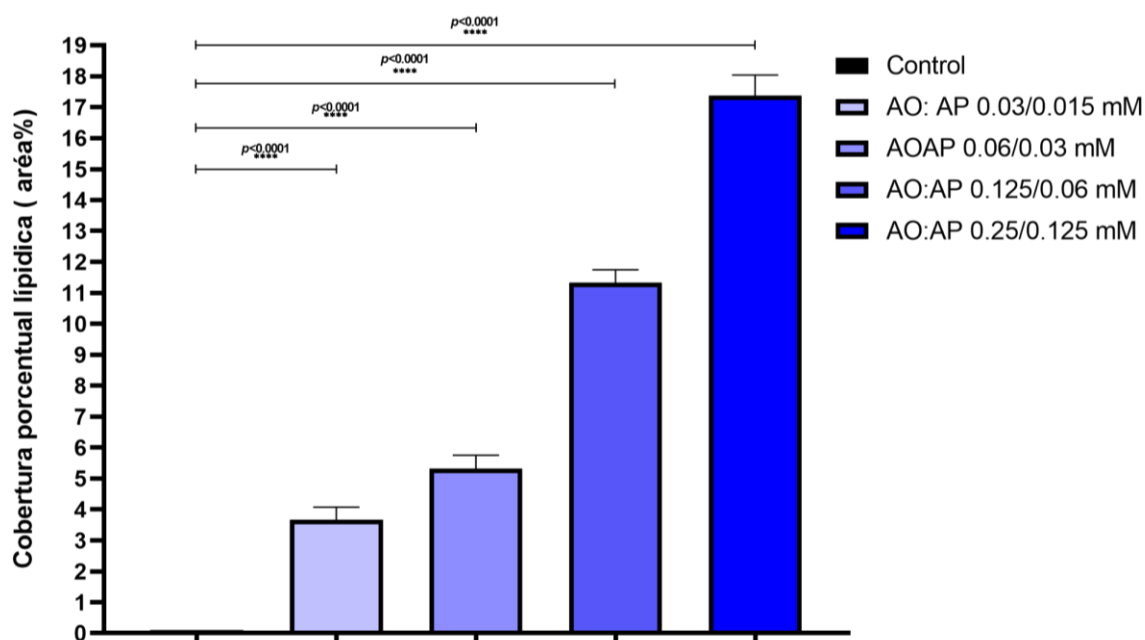


Figura 16. Cuantificación del área de cobertura de gotas lipídicas en células HepG2. Los valores representan el porcentaje de cobertura obtenido mediante el análisis de píxeles de imágenes microscópicas a 100x en ImageJ V1.0. Las barras representan la media $\pm$ DE de cuatro réplicas independientes (n=3). El análisis estadístico empleado se realizó mediante ANOVA de una vía y un análisis post hoc, aplicando la prueba de Tukey.

4. Evaluación de la expresión génica de los genes *BCL2*, *PARP1*, *TP53*, *CASP3*, *CYCS* e *IL10* por RT-qPCR, en la línea celular HepG2 tratadas a concentraciones crecientes de AO:AP.

Los genes relacionados a la vía intrínseca de la apoptosis, así como *IL10*, fueron evaluados mediante la técnica de RT-qPCR para determinar su expresión génica en la línea celular HepG2 expuesta a diferentes concentraciones de AO:AP, por 24 horas.

Los resultados obtenidos en *BCL2* (**Figura 17 B**), las diferentes concentraciones de AO:AP no mostraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se observó una tendencia a la alza en algunos tratamientos. En la concentración de AO:AP 0.06/0.03 mM mostró 1.38 veces de cambio respecto al control, en la concentración de AO:AP de 0.125/0.06 mM se observó 1.78 veces de cambio en comparación con el control. En contraste, la concentración AO:AP 0.25/0.125 mM mostró una tendencia a la baja de 0.51 veces respecto al control.

De manera similar, el gen *PARP1* (**Figura 17 C**), aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia a la alza en la expresión de este gen en todos los tratamientos con AO:AP. En la concentración de AO:AP 0.06/0.03 mM se expresó 4.9 veces de cambio, con AO:AP 0.125/0.06 mM 1.6 veces y AO:AP 0.25/0.125 mM 1.85 veces, respecto al control.

Por el contrario, el gen supresor de tumores *TP53* (**Figura 17 D**), presentó un aumento estadísticamente significativo en todas las condiciones evaluadas. En la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM presentó una sobreexpresión de 4.9 veces de cambio ($P < 0.0003$), en AO:AP 0.125/0.06 mM incrementó 5.48 veces de cambio ($P < 0.0003$) y con AO:AP 0.25/0.125 mM aumentó 4.32 veces de cambio ($P < 0.0016$), respecto al control.

El gen *CASP3* (**Figura 17 E**) y *CYCS* (**Figura 17 F**), mediadores clave de la cascada apoptótica, mostraron una diferencia estadísticamente significativa únicamente ante el tratamiento AO:AP 0.06/0.03 mM, con un incremento de 5.50 veces ($p < 0.0016$) para *CASP3* y (4.40 veces ($P < 0.0079$) para *CYCS*, respecto al control. En las concentraciones AO:AP 0.125/0.06 mM y AO:AP 0.25/0.125 mM, no se observaron cambios estadísticamente significativos, sin embargo, se mostró una tendencia a la alta de 1.98 y 1.55 veces de cambio para *CASP3* mientras que para *CYCS* se observó 3.03 y 1.59 veces de cambio, respecto al control.

Finalmente, la expresión del gen de la citocina *IL10* (**Figura 17 G**), no mostró diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de tratamiento. La concentración de AO:AP 0.06/0.03 mM mostró una tendencia al incremento de 1.99 veces de cambio, mientras que con AO:AP 0.125/0.06 mM se observa una tendencia a la baja de 0.56 veces de cambio, ambas respecto al control. En AO:AP 0.25/0.125 mM no se observaron cambios respecto a los niveles basales de expresión (1.12 veces).

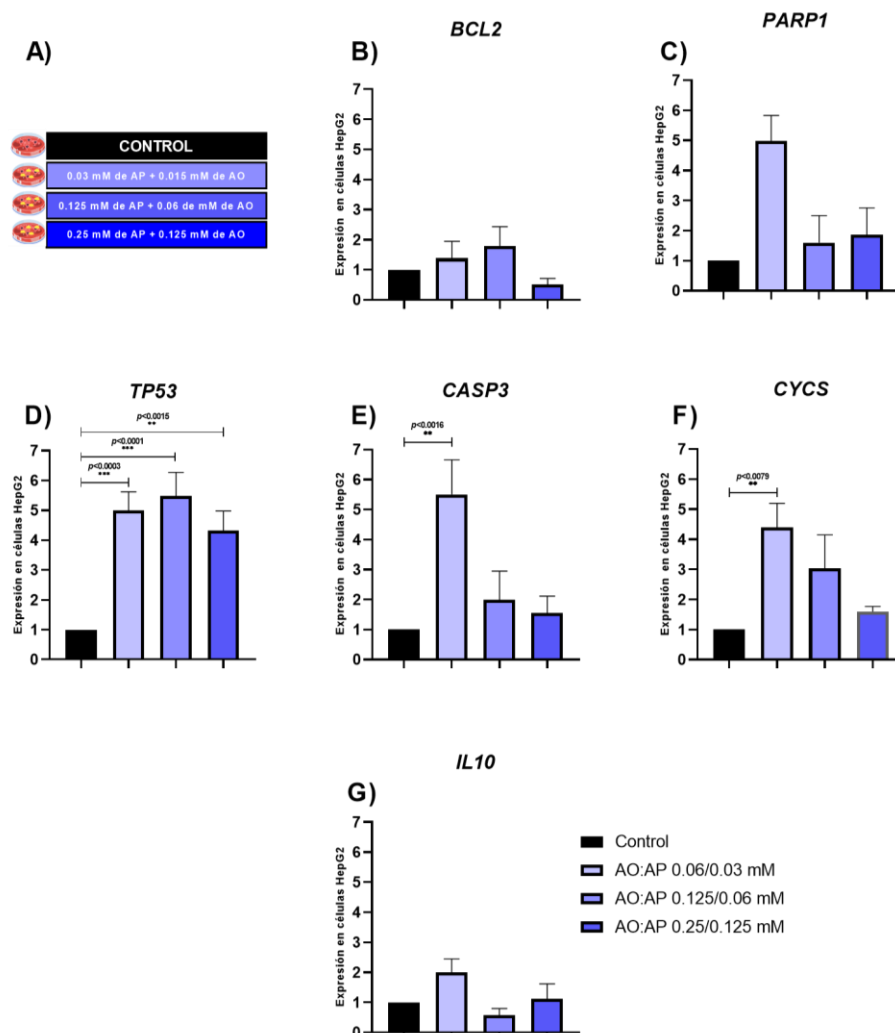


Figura 17. Expresión relativa de genes relacionados a la apoptosis e IL10 en células HepG2 tratadas en concentraciones crecientes de AO:AP. A) Esquema de los grupos experimentales. B) *BCL2*, C) *PARP1*, D) *TP53*, E) *CASP3*, F) *CYCS* y G) *IL10* mediante RT-qPCR tras un tratamiento de 24 h con diferentes concentraciones de AP:AO. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de (n=3) experimentos independientes y un duplicado técnico por cada condición. La expresión génica se normalizó respecto al grupo control (valor = 1). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía.

5. Viabilidad con tratamiento IL-10

Se seleccionaron las concentraciones AO:AP 0.06/0.03 mM, una condición donde la viabilidad celular no se ve comprometida (85.91%) y la concentración 0.125/0.06 mM en la que se comienza a comprometer la viabilidad (82.48%; $p < 0.0030$), respecto al control (**Figura 14**).

Después de evaluar la expresión de los genes relacionados con la apoptosis con el tratamiento AO:AP por 24 horas. Se evaluó si el tratamiento con 2, 5 y 10 ng de proteína IL-10 exógena presenta efectos citotóxicos en el modelo *in vitro* de esteatosis. Para ello, se indujo esteatosis en las células a través de la exposición a AO:AP durante 24 horas y posteriormente tratadas durante 4 horas con IL-10 exógena.

En la concentración de AO:AP 0.06/0.03 mM, el control se usó como referencia (100% de viabilidad), en 2 ng (95.49%), 5 ng (89.43%), 10 ng (89.64%). En 0.125/0.06 mM, en 2 ng (96.36%), 5 ng (91.98%), 10 ng (95.46%), respecto al control. Demostrando que la IL-10 exógena no presenta un efecto citotóxico para las células después de 4 horas de exposición. En ninguno de los tratamientos se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular. (**Figura 18**).

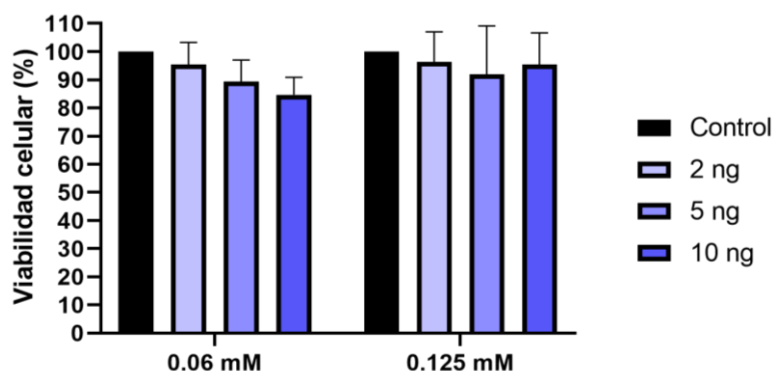


Figura 18. Viabilidad celular tras la exposición de AO:AP por 24 horas e IL-10 exógena por 4 horas. Porcentaje de viabilidad celular (%) en células HepG2 tratadas con AO:AP 0.06/0.03 mM y AP:AO 0.125/0.06 mM durante 24 horas y una exposición posterior del tratamiento IL-10 exógena, mediante la exclusión con azul de tripano. Los datos se presentan como valores promedio $\pm$ desviación estándar correspondientes a 4 réplicas

independientes para cada condición evaluada (n=4). El análisis estadístico empleado se realizó mediante ANOVA de dos vías, no se observaron diferencias significativas.

6. Evaluación de la expresión de *BCL2*, *TP53*, *CYCS*, *CASP3*, *PARP* e *IL10* en células HepG2 tratadas con concentraciones crecientes de AO:AP e IL-10 exógena.

La expresión de genes relacionados con la vía intrínseca de la apoptosis, junto con *IL10*, fue evaluada mediante RT-qPCR en un modelo de esteatosis (línea celular HepG2 expuesta a las concentraciones AO:AP 0.06/0.03 mM y AO:AP 0.125/0.06 mM durante 24 horas) y, a un tratamiento de 4 horas con IL-10 exógena.

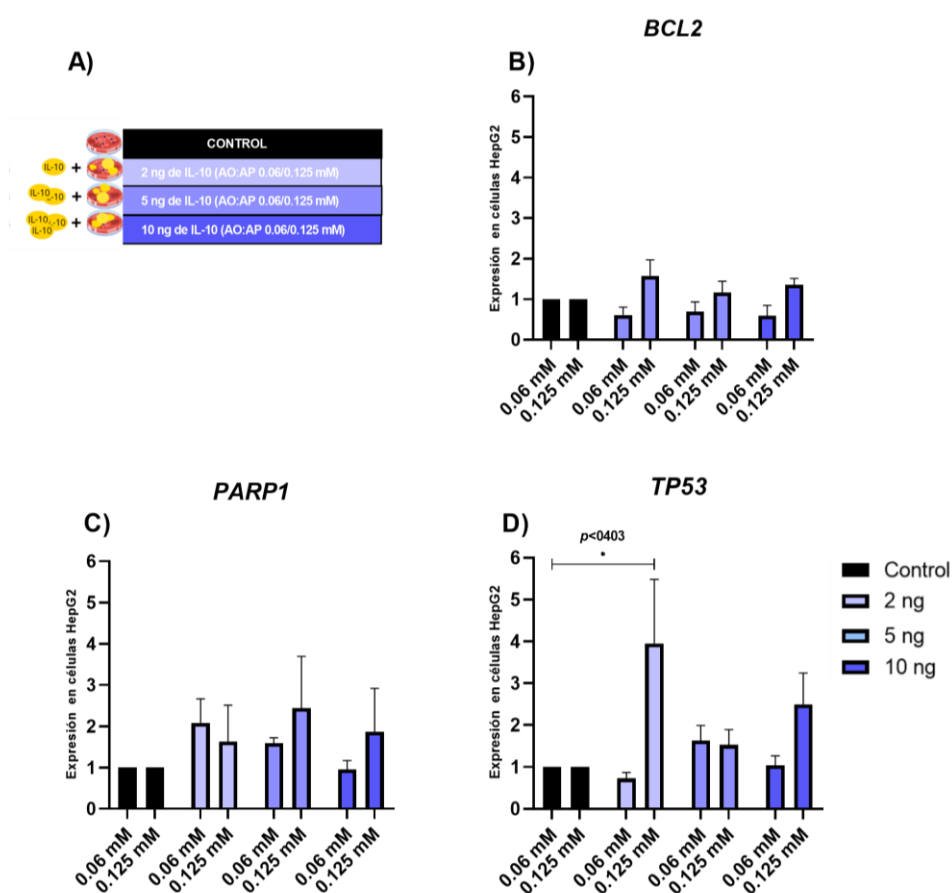
Los resultados obtenidos tras la exposición al tratamiento con IL-10 exógena en el modelo *in vitro* de esteatosis no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *BCL2* (**Figura 19 B**). En la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM, el tratamiento con 2 ng de IL-10 mostró una tendencia a la baja con un cambio de (0.60 veces de cambio), con 5 ng, una disminución de (0.69 veces de cambio) y con 10 ng, una reducción de (0.58 veces de cambio), respecto al control sin alcanzar diferencias con significancia estadística. En contraste, en la concentración AO:AP 0.125/0.06 mM, el tratamiento con 2 ng de *IL10* mostró una tendencia al alza (1.57 veces); con 5 y 10 ng se observaron niveles de expresión cercanos al basal (1.15 veces de cambio, en ambos casos), respecto al control.

El gen *PARP1* (**Figura 19 C**), otro gen antiapoptótico, en la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM no mostró diferencias estadísticamente significativas tras el tratamiento con IL-10. No obstante, se observó una tendencia al alza con 2 ng de IL-10 (2.08 veces), con 5 ng (1.54 veces), respecto al control, mientras que con 10 ng se mostraron niveles de expresión cercanos al control (0.95 veces).

En la concentración AO:AP 0.125/0.06 mM, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el tratamiento con 2 ng de IL-10 mostró una tendencia al alza (1.65 veces); con 5 ng, un incremento de (2.45 veces) y con 10 ng, una tendencia al alza de (1.87 veces), respecto al control.

El gen *TP53* (**Figura 19 D**) en la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM no mostró cambios estadísticamente significativos en su expresión. No obstante, el tratamiento con 2 ng de IL-10 presentó una tendencia a la baja (0.73 veces de cambio), mientras que con 5 ng se observó una tendencia al alza (1.63 veces de cambio), con 10 ng se observaron niveles de expresión cercanos al basal (1.03 veces), respecto al control.

La expresión de *TP53* en la concentración de AO:AP 0.125/0.06 mM y el tratamiento con 2 ng de IL-10 exógena mostraron una diferencia estadísticamente significativa, con una sobreexpresión de (3.95 veces; $p<0.0403$), con 5 ng (1.53 veces) y 10 ng (2.50 veces) sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas en las últimas dos condiciones.



independientes y un duplicado técnico por cada condición. La expresión génica se normalizó respecto al grupo control (valor = 1). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía.

El gen *CASP3* (**Figura 20 A**) en la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos evaluados. Con 2 ng de IL-10 se observó una disminución de la expresión génica de 0.08 ($P < 0.0001$); con 5 ng, una reducción de 0.10 veces ($P < 0.0001$); y con 10 ng, una disminución de 0.11 veces ($P < 0.001$), respecto al control.

De manera similar, en la concentración AO:AP 0.125/0.06 mM se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las condiciones evaluadas. El tratamiento con 2 ng de IL-10 mostró una marcada disminución de la expresión 0.01 veces de cambio ($P < 0.0001$), con 5 ng, una reducción de 0.14 veces de cambio ($P < 0.0001$) y con 10 ng, una disminución de 0.06 veces de cambio ($P < 0.0001$), respecto al control.

La expresión del gen *CYCS* (**Figura 20 B**) mostró diferencias estadísticamente significativas bajo condiciones de esteatosis en la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM en todos los tratamientos evaluados. Con 2 ng de IL-10 se observó una marcada disminución de la expresión 0.03 veces de cambio ($P < 0.0001$); con 5 ng, una tendencia a la baja de 0.24 veces de cambio ($P < 0.0001$), con 10 ng, una disminución 0.11 veces de cambio ($P < 0.0001$), respecto al control. En contraste, en la concentración AO:AP 0.125/0.06 mM se observaron diferencias estadísticamente significativas únicamente con el tratamiento de 2 ng de IL-10, el cual indujo una sobreexpresión de 3.54 veces de cambio ($P < 0.0001$). En la concentración de 5 ng de IL-10 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, aunque se observaron tendencias a la alza de (1.64 veces), respecto al control. Con 10 ng se mostraron niveles de expresión cercanos al control (1.10 veces).

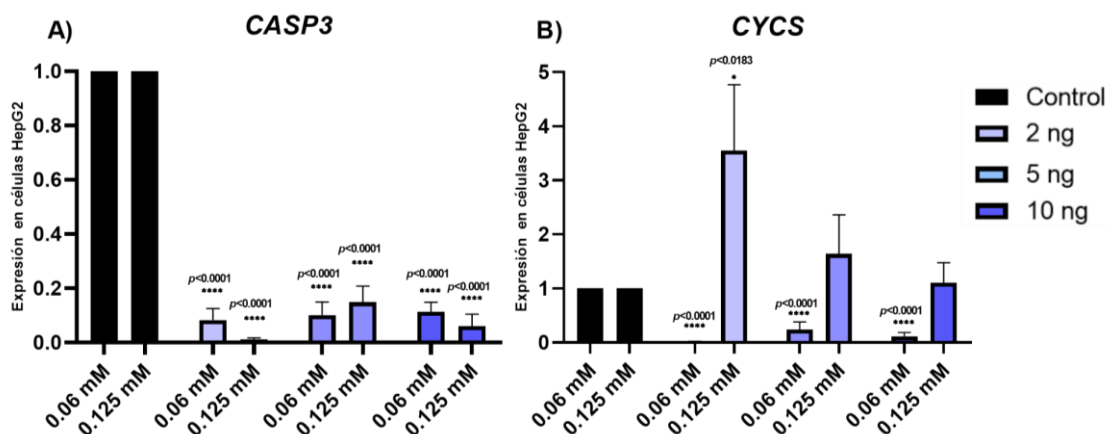


Figura 20. Expresión relativa de genes proapoptóticos en células HepG2 tratadas con AO:AP en concentraciones crecientes de AO:AP e IL-10 exógena. A) CASP3, B) CYCS mediante RT-qPCR tras un tratamiento de 24 h con las concentraciones 0.06 y 0.015 mM de AP:AO y posteriormente una exposición de 4 horas por el tratamiento IL-10 exógena. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de (n=3) experimentos independientes y un duplicado técnico por cada condición. La expresión génica se normalizó respecto al grupo control (valor = 1). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía.

El gen *IL10* (**Figura 21 A**) no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos evaluados en las condiciones de esteatosis con una concentración AO:AP 0.06/0.03 mM. En 2, 5 y 10 ng de IL-10 exógena se observaron niveles de expresión cercanos al control (1.35, 0.94 y 1.02 veces, respectivamente). De manera similar, en la condición de esteatosis con una concentración AO:AP 0.125/0.06 mM no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *IL10*. Sin embargo, el tratamiento con 2 ng de IL-10 mostró una tendencia a la baja (0.25 veces de cambio), mientras que con 5 ng se mostraron niveles de expresión cercanos al control (1.41), en 10 ng se observó una tendencia a la alza (1.93 veces), respecto al control.

IL10

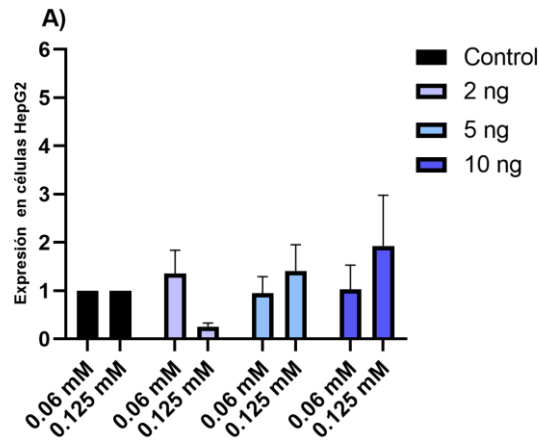


Figura 21. Expresión relativa del gen *IL10* en células HepG2 tratadas con AO:AP en concentraciones crecientes de AO:AP e IL-10 exógena. A) *IL10* mediante RT-qPCR tras un tratamiento de 24 h con las concentraciones 0.06 y 0.015 mM de AP:AO y posteriormente, una exposición de 4 horas por el tratamiento IL-10 exógena. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de (n=3) experimentos independientes y un duplicado técnico por cada condición. La expresión génica se normalizó respecto al grupo control (valor = 1). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía.

IX. Discusión

La evaluación de los mecanismos moleculares asociados a la esteatosis hepática y la exposición a IL-10 requiere un equilibrio entre la inducción de acumulación lipídica y la conservación de la viabilidad celular. La exposición de células HepG2 a una mezcla de ácido oleico y ácido palmítico (AO:AP; 2:1) por 24 horas (**Figura 14 B**), resultó en la inducción de un fenotipo esteatósico de manera dosis-dependiente, en donde las concentraciones más bajas 0.03/0.015 mM y 0.06/0.03 mM AO/AP no afectan de forma significativa la viabilidad celular (99.16% y 85.91%, respectivamente), mientras que las concentraciones más altas sí la afectan (viabilidad menor a 80%), probablemente debido a un mecanismo de lipotoxicidad, asociada con el aumento en la concentración de ácidos grasos acumulados al interior de la célula. En un estudio hecho por Gómez-Lechón., et al., 2007, desarrollaron un modelo *in vitro* de esteatosis hepática, mediante la exposición a una concentración 2:1 de oleato/palmitato en células hepáticas primarias humanas y células HepG2, donde permitieron diferenciar la acumulación lipídica de los efectos citotóxicos/apoptóticos. Los autores observaron que bajas concentraciones de palmitato inducen esteatosis con baja toxicidad y una mayor supervivencia celular, mientras que a altas proporciones generaron daño celular y un porcentaje significativo de la muerte celular.

Estos resultados sugieren que, a concentraciones bajas, la célula HepG2 es capaz de gestionar el flujo de ácidos grasos, mediante mecanismos de compensación, principalmente a través de la formación de gotas lipídicas para evitar la lipotoxicidad por AG libres (Listenberger, L., et al., 2003). Por el contrario, a mayor concentración (0.125/0.06 mM AO/AP) hubo una reducción significativa de la viabilidad (82.48%; $p < 0.0030$), indicando el inicio de estrés celular medible. En la concentración más alta utilizada (0.25/0.125 mM AO/AP), la viabilidad descendió al 76.11% ($p < 0.0308$). Este último valor se considera un modelo citotóxico significativo, internacionalmente establecido (Standard, I. 2009). La literatura menciona que esta disminución en la viabilidad puede ser debida a la saturación de la capacidad de esterificación del retículo endoplásmico, lo que deriva en estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y la activación de cascadas proapoptóticas mediadas por el ácido palmítico, cuya naturaleza de ácido graso saturado lo hace inherentemente más tóxico que el ácido oleico (Ricchi, M., et al., 2009).

Por su parte, la viabilidad celular con el tratamiento de IL-10 exógena a concentraciones crecientes durante 4 horas, es suficiente para identificar cambios en la expresión de genes relacionados con la apoptosis, dado que los mecanismos apoptóticos se activan rápidamente tras el estímulo, activándose en minutos y siendo detectables entre las 2 y 6 horas (Calzada M, J. A., et al., 2015). No obstante, esta cinética puede variar dependiendo de factores como el estímulo, la concentración, el tipo celular. En nuestro estudio, la exposición a IL-10 exógena demostró no ser citotóxica, obteniendo una viabilidad celular mayor al 80% en todas las concentraciones, sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control (**Figura 18**). Aunque la bibliografía es limitada en cuanto a la viabilidad de HepG2 tras tratamiento con IL-10 exógena, existe un estudio que demuestra que la IL-10 puede modular la apoptosis en células hepáticas primarias de ratón de manera dependiente del contexto. En las células HepG2 reduce apoptosis inducida por TNF- α /CHX (vía NF- κ B), mientras que en hepatocitos primarios expuestos a etanol se ha descrito un efecto distinto (Santiago-Lomelí, et al., 2005).

La mezcla de ácido oleico y ácido palmítico se utiliza ampliamente para inducir esteatosis in vitro por su relevancia fisiológica, dado que ambos ácidos grasos son de los más abundantes en los triglicéridos hepáticos en condiciones normales y en NAFLD/MASLD. En particular, proporciones con mayor contribución de oleato (p. ej., OA/PA 2:1) favorecen una acumulación intracelular significativa de lípidos neutros con efectos tóxicos menores, aproximando un fenotipo de esteatosis simple. Además, la acumulación lipídica inducida por OA/PA sigue un comportamiento dosis-dependiente: al incrementarse la concentración de ácidos grasos disponibles, aumenta el flujo hacia reesterificación y almacenamiento en forma de triglicéridos y gotitas lipídicas, lo que se refleja en lecturas basadas en ORO y cuantificación de lípidos intracelulares (Dave. T., et al., 2018). La observación microscópica con tinción ORO confirmó la presencia y almacenamiento intracelular de lípidos en las células tratadas, la cual fue cuantificada mediante el área de cobertura de gotas lipídicas con el programa Image J (**Figura 15-16**) lo que permitió validar la inducción de acumulación lipídica a nivel celular. La esteatosis hepática se define como la acumulación de lípidos en más del 5% del contenido celular, bajo este criterio la concentración de AO:AP 0.03/0.15 mM utilizada alcanzó únicamente un (3.66 %; $p < 0.0001$) de cobertura lo cual resultó insuficiente para representar un modelo patológico de esteatosis, por ello fue descartada para experimentos posteriores. En contraste, se observó un

incremento progresivo dosis-dependiente en las concentraciones superiores. La dosis de 0.06/0.03 mM logró una cobertura del (5.31 %; $p < 0.0001$), superando el umbral patológico del 5%. Las concentraciones de 0.125/0.06 mM (11.32 %; $p < 0.0001$) y 0.25/0.125 mM (17.37 %; $p < 0.0001$) mostraron una acumulación de lípidos mucho más abundantes, respecto al control.

Desde el punto de vista funcional, el oleato puede atenuar la lipotoxicidad del palmitato al favorecer rutas de almacenamiento neutral y modular procesos asociados a estrés del retículo endoplásmico y muerte celular, lo cual contribuye a obtener un modelo robusto de acumulación lipídica sin pérdida marcada de viabilidad (Moravcová, A., et al., 2015). Por lo tanto, la exposición a condiciones crecientes de AO:AP en la línea celular HepG2, permite un entorno lipotóxico, la disfunción mitocondrial afectando principalmente la cadena de transporte de electrones, disminuyendo la β -oxidación, que es característico de la esteatosis hepática, estrés en el RE mediante la activación de la vía de señalización UPR (Unfolded Protein Response), la lipofagia, y resistencia a la insulina (Ishii ., M., et al., 2014).

El análisis obtenido mediante la expresión génica por RT-qPCR, mostró una incapacidad de sostener una respuesta antiinflamatoria adecuada, con profundas implicaciones en la supervivencia celular, lo que se refleja de manera coherente en los niveles de expresión de *BCL2* (**Figura 17 B**). Aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *BCL2*, se observaron tendencias dosis-dependientes que aportan información sobre el estado funcional de la célula. En las concentraciones AO:AP 0.06/0.03 mM (1.38 veces), AO:AP 0.125/0.06 mM (1.78 veces), la ligera inducción transcripcional de *BCL2* sugiere la activación de mecanismos compensatorios tempranos orientados a preservar la integridad de la membrana mitocondrial externa frente a señales proapoptóticas emergentes. En términos mecanísticos, BCL-2 y otros miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2 actúan preservando la integridad mitocondrial al antagonizar eventos que culminan en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de citocromo c, un paso central en la ejecución de la apoptosis (Volkman, N., et al., 2014).

En la concentración de AO:AP 0.25/0.125 mM, el gen *BCL2* mostró una tendencia a la baja (0.51 veces), lo que sugiere una disminución del soporte antiapoptótico a nivel transcripcional.

El autor, Letai A, (2005), menciona que la baja expresión de *BCL2* no debe interpretarse como un proceso lineal hacia la apoptosis, sino como un evento umbral. Una vez superado dicho umbral, se desencadena la permeabilización irreversible de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y define el punto de no retorno en la vía intrínseca de la apoptosis. En este contexto, aun cuando la apoptosis convencional mediada por la cascada de *CASP3* y *CYCS* pueda verse obstaculizada por el déficit energético celular, la pérdida de *BCL2* deja a la mitocondria vulnerable a un daño estructural irreparable. En conjunto, la ausencia de una respuesta sólida de IL-10 y el declive de *BCL2* bajo estrés lipotóxico severo indican que el hepatocito no solo es incapaz de ejercer una defensa antiinflamatoria, sino que también agota los recursos moleculares destinados a preservar la integridad mitocondrial (Hutchings, D. E., *et al.*, 1993).

La tendencia a la baja en la expresión de *BCL2* observada en la concentración de AO:AP 0.06/0.03 mM sugiere que, incluso ante un estrés lipídico moderado, el balance transcripcional puede desplazarse hacia un estado menos pro-supervivencia (Letai; 2005). En modelos celulares hepáticos se ha descrito que el AP puede promover apoptosis y asociarse con un descenso del cociente *BCL-2/BAX*, compatible con activación de la vía intrínseca (Ji, J., *et al.*, 2005). De manera complementaria, los ácidos grasos saturados inducen estrés del RE y apoptosis en células hepáticas (Malhi, H., *et al.*, 2008), lo que ofrece un marco mecanístico para entender por qué la suplementación con IL-10 no revirtió la tendencia descendente de *BCL2* en esta condición.

Bajo AO:AP 0.125/0.06 mM, los perfiles divergentes (2 ng: 1.57 veces; 5 ng: 1.15 veces; 10 ng: 1.35 veces) sugieren una dinámica dependiente de dosis que, aunque no significativa, podría reflejar variaciones en la capacidad de respuesta a IL-10 conforme aumenta la carga lipotóxica. Una explicación plausible (a corroborar) es la activación de retroalimentación negativa de la vía IL-10/JAK–STAT (p. ej., inducción de SOCS), que puede atenuar o modular la respuesta transcripcional ante el estímulo exógeno (Hutchins, A. P., *et al.*, 2013).

Este comportamiento es consistente con la retroalimentación negativa dependientes de STAT3, cuya función biológica primordial es limitar la respuesta inmune exacerbada (Sharmin, M. M., *et al.*, 2020). La variabilidad observada en la respuesta a 2 ng de IL-10 exógena, en comparación

con 5 y 10 ng, podría estar relacionada con una modulación dependiente de dosis de la vía IL-10/JAK–STAT3, incluyendo fenómenos de saturación de la señalización y/o la inducción de reguladores negativos como las proteínas SOCS (Suppressors of Cytokine Signaling), ampliamente descritas como mediadores del control fino de esta vía. En este contexto, es posible que concentraciones bajas de IL-10 permitan una activación transcripcional más eficiente de genes asociados a supervivencia celular, como *BCL2*, mientras que dosis superiores no generen un incremento proporcional debido a la activación de mecanismos reguladores intracelulares. De manera complementaria, y sin que ello constituya evidencia confirmatoria, patrones observados en un reanálisis transcriptómico de biopsias hepáticas humanas (GSE126848) muestran una modulación de genes reguladores del eje IL-10/JAK–STAT en etapas tempranas de MASLD, con atenuación hacia fases más avanzadas (análisis propio, datos no publicados). No obstante, esta interpretación debe considerarse exploratoria, ya que la respuesta a IL-10 puede variar según el estado metabólico de la célula y la integración con otras vías activadas bajo estrés lipotóxico.

Una tendencia similar se observó para *PARP1* (**Figura 17 C**). Aunque el tratamiento con AO:AP 0.06/0.03 mM mostró un incremento no significativo de 4.9 veces en los niveles de mRNA, a mayor concentración AO:AP 0.125/0.06 mM y AO:AP 0.25/0.125 mM presentaron una ligera tendencia a la alza no significativa (1.6 y 1.85 veces, respectivamente) en comparación con el control. Lo que podría sugerir que la célula activa inicialmente de manera robusta la inducción de *PARP1* como una respuesta adaptativa al daño en el DNA causado por el estrés oxidativo lipotóxico, con el objetivo de reparar rupturas de cadena sencilla y preservar la integridad genómica. El papel de *PARP1* en la detección temprana del daño ocasionado por los ácidos grasos y su rápido reclutamiento a los sitios de ruptura del ADN ocasionado por la oxidación de las bases nitrogenadas mediada por ROS, es fundamental para la activación de la reparación por escisión de bases, un mecanismo ampliamente descrito como respuesta inmediata al daño inducido por estrés oxidativo (Li, R., *et al.*, 2022). No obstante, el hecho de que los niveles de mRNA de *PARP1* no aumenten proporcionalmente conforme se incrementa la carga de ácidos grasos podría reflejar una regulación dependiente de la intensidad del estrés, incluyendo cambios postranscripcionales o un desplazamiento hacia estados celulares menos adaptativos cuando el daño supera la capacidad de compensación. En este sentido, la actividad de *PARP1*,

más que su transcripción, también puede ser crítica, ya que su activación sostenida se ha asociado con consumo de NAD⁺/ATP y disfunción metabólica en escenarios de estrés persistente; sin embargo, esta posibilidad requeriría validación funcional adicional (Fouquerel, E., *et al.*, 2014; Nishida *et al.*, 2022).

Bajo la condición AO/AP 0.06/0.03 mM combinada con la adición de IL-10 exógena, la expresión de *PARP1* no alcanzó significancia estadística, aunque se observó una tendencia dosis-dependiente. En presencia de 2 ng de IL-10, *PARP1* mostró un incremento de 2.08 veces, mientras que con 5 ng el aumento fue de 1.54 veces y con 10 ng no se detectaron cambios respecto a los niveles basales (0.95 veces) (**Figura 19C**). Este patrón sugiere que, bajo un estrés lipotóxico moderado, dosis bajas de IL-10 podrían favorecer transitoriamente la expresión de genes asociados a la respuesta al daño en el ADN; sin embargo, concentraciones superiores no generan un efecto adicional, posiblemente debido a mecanismos de regulación negativa o saturación de la vía de señalización.

Estos hallazgos resultan relevantes considerando que la activación sostenida de *PARP1*, si bien es esencial para la detección temprana del daño genómico, puede derivar en efectos deletéreos cuando ocurre de manera crónica, debido al consumo excesivo de NAD⁺ y ATP, lo que compromete la homeostasis bioenergética celular (Guo *et al.*, 2025). En contraste, bajo una condición de mayor estrés lipotóxico (AO/AP 0.125/0.06 mM), la respuesta inducida por IL-10 mostró un incremento parcial de la expresión de *PARP1* (2 ng: 1.65 veces; 5 ng: 2.45 veces; 10 ng: 1.87 veces), lo que sugiere un efecto citoprotector limitado, orientado a reforzar la capacidad de reparación del ADN. No obstante, la magnitud de esta respuesta no parece suficiente para contrarrestar de manera efectiva el daño celular asociado a una carga lipotóxica más severa, lo que indica que la capacidad adaptativa mediada por IL-10 es dependiente del contexto y de la intensidad del estrés metabólico.

El gen *TP53* mostró una sobreexpresión estadísticamente significativa en todas las concentraciones de AO:AP evaluadas: 0.06/0.03 mM (4.9 veces; $p < 0.0003$), 0.125/0.06 mM (5.48 veces; $p < 0.0003$) y 0.25/0.125 mM (4.32 veces; $p < 0.0016$), en comparación con el control (**Figura 17D**). Este patrón es consistente con la activación de programas de respuesta al

estrés asociados a sobrecarga lipídica, en los que p53 participa como integrador de señales que pueden conducir a adaptación (p. ej., detención del ciclo/recuperación) o, si el daño persiste, a apoptosis (Haronikova, L., *et al.*, 2019). En el contexto de MASLD/MASH, se ha reportado que la activación de p53 se asocia con disfunción hepatocelular y con vías proapoptóticas, particularmente en escenarios de lipotoxicidad (Haronikova, L., *et al.*, 2019).

En concordancia con este contexto, los resultados obtenidos con la IL-10 exógena (**Figura 19 D**) sugieren que la citocina modula la expresión de *TP53* bajo carga lipídica, lo que podría reflejar un ajuste en la intensidad de la respuesta al estrés celular; no obstante, esta interpretación debe tomarse con cautela, ya que está basada en niveles de mRNA y requeriría validación adicional a nivel proteico/funcional.

En las concentraciones más altas de AO:AP (0.125/0.06 mM y 0.25/0.125 mM) no se observaron cambios estadísticamente significativos; sin embargo, se detectó una tendencia al alza en la expresión de *CASP3* (1.98 y 1.55 veces) y *CYCS* (3.03 y 1.59 veces, respectivamente) respecto al control. En conjunto, estos datos sugieren que la respuesta transcripcional asociada a la apoptosis no se anula, pero tampoco muestra un incremento robusto y consistente conforme aumenta la carga lipídica. Más que indicar una activación de la apoptosis clásica, este patrón puede interpretarse como una activación parcial o de este programa celular bajo condiciones de lipotoxicidad creciente.

Esta interpretación es congruente con lo observado en el reanálisis de biopsias hepáticas humanas (GSE126848), donde *CASP3* no se incrementa con la progresión de la enfermedad y, de hecho, muestra reducción significativa en NAFL frente a los controles normopeso, mientras que *CYCS* presenta una disminución significativa tanto en NAFL como en NASH. En ese sentido, tanto el reanálisis en tejido humano como el comportamiento en el modelo *in vitro* sugieren que, en el contexto de MASLD, la activación transcripcional de componentes centrales de la vía mitocondrial de apoptosis puede ser limitada o modulada, especialmente conforme se intensifica el estrés metabólico. En la literatura se ha descrito que en escenarios de lipotoxicidad y progresión hacia MASH/NASH pueden participar mecanismos alternativos de muerte celular como piroptosis o necroptosis; por ello, no puede descartarse que, cuando el estrés celular es

más intenso, la célula active programas distintos a la apoptosis clásica (Wree, A., *et al*;2015). Esta posibilidad requeriría validación específica con marcadores funcionales (p. ej., actividad de caspasas, MLKL fosforilado o gasderminas).

Nuestros resultados confirman que, en un entorno lipídico moderado (0.06/0.03 mM), el tratamiento con IL-10 exógena actúa como una molécula protectora que inhibe la fase terminal de la muerte celular. En *CASP3* (**Figura 20 A**) en AO:AP 0.06/0.03 mM con 2 ng de IL-10 se observó una marcada disminución de la expresión génica (0.03 veces $p < 0.0001$); con 5 ng, una reducción de (0.24 veces; $p < 0.0001$), con 10 ng, una disminución de (0.11 veces; $p < 0.0001$), respecto al control. En AO:AP 0.125/0.06 mM se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las condiciones evaluadas. El tratamiento con 2 ng de IL-10 mostró una marcada disminución de la expresión génica (0.01 veces; $p < 0.0001$), con 5 ng, una reducción de (0.14 veces $p < 0.0001$) y con 10 ng, una disminución de (0.06 veces; $p < 0.0001$), respecto al control.

El gen *CYCS* (**Figura 20 B**), en la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM, con 2 ng de IL-10 mostró una disminución de la expresión génica de (0.08; $p < 0.0001$); con 5 ng, una reducción de (0.10 veces; $p < 0.0001$); y con 10 ng, una disminución de (0.11 veces; $p < 0.001$), respecto al control. Sin embargo, ante un estrés mayor, en la concentración AO:AP 0.125/0.06 mM se observaron diferencias estadísticamente significativas únicamente con el tratamiento de 2 ng de IL-10, el cual indujo una sobreexpresión de (3.54 veces; $p < 0.0001$). En las condiciones de 5 y 10 ng no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, aunque se observaron pequeñas tendencias a la alza de (1.64 y 1.10 veces). Según Ott *et al.* (2002), la liberación de citocromo c es un evento regulado a nivel proteico y mitocondrial, que puede ocurrir sin la activación de la cascada de caspasas. En este contexto, las alteraciones observadas en la expresión génica de *CYCS*, en ausencia de la activación de la transcripción de *CASP3*, no reflejan directamente la liberación del citocromo c, sino que podrían asociarse a un estado de disfunción mitocondrial severa. Este tipo de disfunción ha sido vinculada con la activación de formas alternativas de muerte celular independiente de caspasas, como se ha descrito previamente (Badea, A., *et al.*, 2010).

Por otro lado, la expresión *IL10* (**Figura 17 G**) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales de dosis crecientes de AO:AP, sin embargo, el análisis de las tendencias de expresión revela un patrón dependiente de la concentración de AO:AP que resulta relevante desde el punto de vista biológico. En la concentración AO:AP 0.06/0.03 mM (1.99 veces) y AO:AP 0.125/0.06 mM (0.56 veces), AO:AP 0.25/0.125 mM (1.12 veces), no se observaron cambios respecto a los niveles basales de expresión.

Esto podría sugerir que, ante una acumulación baja de ácidos grasos, el hepatocito aún conserva la capacidad de inducir parcialmente una respuesta antiinflamatoria compensatoria a nivel transcripcional. Los hallazgos sugieren que los hepatocitos activan inicialmente vías de señalización antiinflamatorias como salvaguarda frente al daño por ácidos grasos; sin embargo, la carga de AO:AP 0.125/0.06 mM induce una disminución de esta respuesta. La disminución de la expresión de *IL10* en AO:AP 0.125/0.06 mM (0.56 veces), podría sugerir una restricción en la capacidad transcripcional cuando hay una cantidad considerable de ácidos grasos generando un escenario de estrés celular. El autor Bradley R., *et al.*, 2008, menciona que la disminución en la expresión endógena de *IL10*, se debe a que el AP, impide el correcto funcionamiento de factores como STAT3 y la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), detiene la producción de mediadores de supervivencia celular y antiinflamatorios, limitando la disponibilidad y expresión de *IL10*.

Esto ocasiona que la célula pierda su principal mecanismo de defensa, quedando expuesta a la progresión del daño metabólico e inflamatorio inducido por la sobrecarga de lípidos. Esto sugiere que el hepatocito reorienta sus recursos hacia el sistema de supervivencia de emergencia, o en su defecto, trans hacia rutas de muerte, lo que debilita la homeostasis de la célula ante cargas lipídicas bajas.

En cuanto al modelo HepG2, la transcripción de *IL10* con la exposición al tratamiento de IL-10 exógena, no alcanzó variaciones con diferencia estadística en ninguna de las condiciones analizadas tras la exposición de IL-10 exógena (0.06/0.03 mM y 0.125/0.06 mM de AO:AP) (**Figura 21 A**). Sin embargo, en el análisis se observa una tendencia que revela una modulación dependiente del entorno metabólico y del aporte externo de la citocina. Específicamente, ante

una carga lipídica moderada (0.06/0.03 mM), se observó cierta variabilidad en los perfiles de expresión; no se observaron cambios respecto a los niveles basales de expresión (1.35 veces con 2 ng de IL-10 exógena, 0.94 veces con 5 ng , 1.02 veces con 10 ng) lo que podría ser efecto de un esfuerzo metabólico de la célula por preservar la homeostasis antiinflamatoria y posible activación de mecanismos de retroalimentación negativa, en los cuales la presencia de IL-10 exógena podría reducir la necesidad de su transcripción endógena.

Esto refuerza la idea de que, una acumulación de ácidos grasos en baja concentración , el hepatocito aún conserva su homeostasis antes de alcanzar un estado de lipotoxicidad irreversible. En este contexto, la célula conservaría su capacidad para inducir *IL10* como parte de una respuesta adaptativa orientada al mantenimiento de la homeostasis. Por el contrario, en la condición de AO:AP 0.125/0.06 mM, no son estadísticamente significativa, la disminución registrada con 2 ng de IL-10 (0.25 veces) apunta a una posible represión transcripcional inicial ejercida por la citocina exógena sobre su propio gen, un fenómeno que podría estar mediado por la señalización de STAT3 y mecanismos de retroalimentación negativa (Knolle, P. A., *et al.*, 1998). Por el contrario, 5 ng (1.41 veces) no se observaron cambios respecto a los niveles basales de expresión, mientras que 10 ng (1.93 veces) presentó una tendencia a la alza, respecto al control. Esto se podría relacionar que ante una mayor carga lipídica, es necesario emplear concentraciones superiores de IL-10 exógena. Estas dosis permitirían vencer el umbral de autolimitación impuesto por los circuitos de retroinhibición, facilitando así una actividad antiinflamatoria más estable y prolongada.

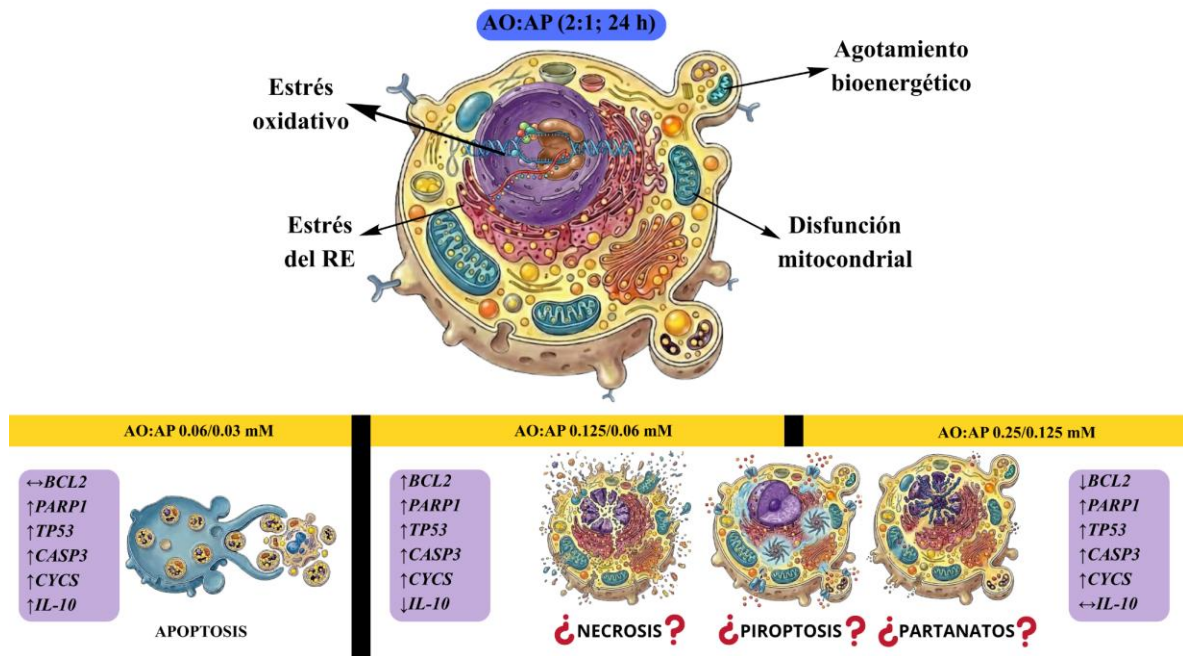


Figura 22. Resumen del efecto dosis-dependiente del tratamiento AO:AP (proporción 2:1; por 24 h) sobre el destino celular y los marcadores moleculares. El panel superior ilustra el daño celular inicial generalizado provocado por el tratamiento, caracterizado por la inducción de estrés oxidativo, estrés del RE, disfunción mitocondrial y agotamiento bioenergético. El panel inferior muestra cómo la concentración del tratamiento determina el mecanismo de muerte celular. La dosis baja (0.06/0.03 mM) induce predominantemente apoptosis. A medida que la dosis aumenta (0.125/0.06 mM y 0.25/0.125 mM), se produce un cambio hacia modalidades de muerte celular pro-inflamatorias y menos reguladas, como la necrosis, piroptosis y partanatos. Las tablas adyacentes resumen la modulación de los marcadores moleculares clave (*BCL2*, *PARP1*, *TP53*, *CASP3*, *CYCS*, *IL-10*), indicando con flechas los cambios relativos en su expresión o actividad para cada condición (↑ aumento, ↓ disminución, ↔ sin cambios).

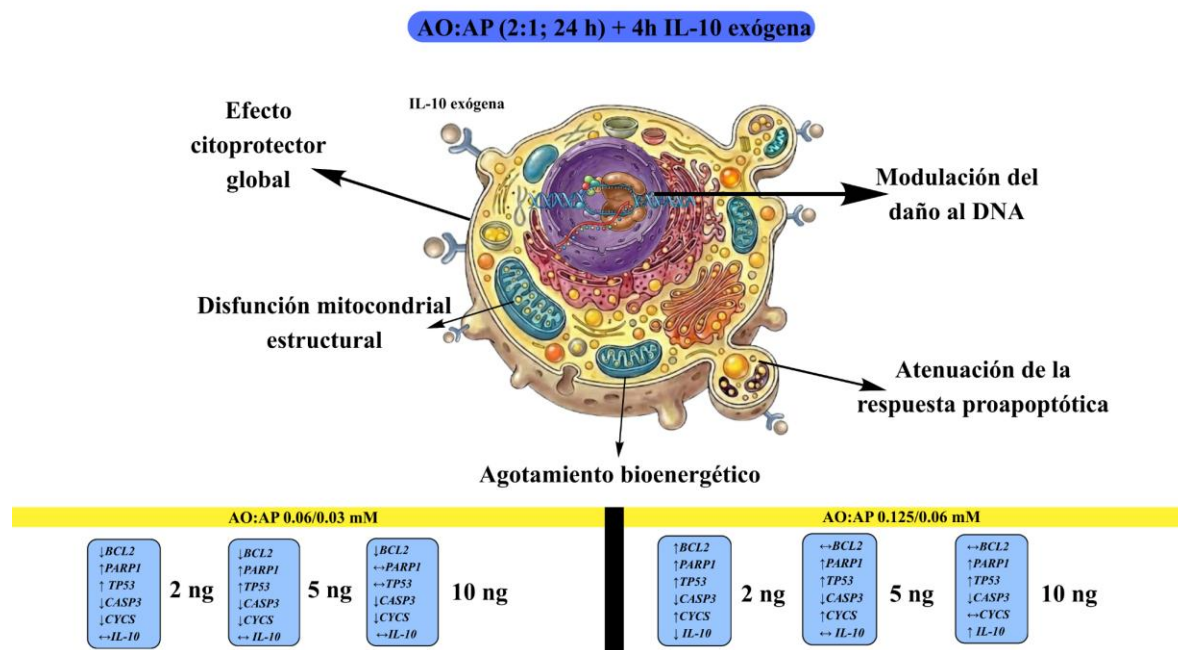


Figura 23. Resumen del efecto citoprotector del tratamiento con IL-10 exógena frente al daño celular inducido por AO:AP. El panel superior describe la respuesta celular tras la administración de IL-10 exógena (4 h) posterior al tratamiento con AO:AP (2:1; 24 h). Se destaca un efecto citoprotector global caracterizado por la modulación del daño al ADN y la atenuación de la respuesta proapoptótica, a pesar de persistir la disfunción mitocondrial estructural y el agotamiento bioenergético. Los paneles inferiores detallan la respuesta molecular dependiente de la concentración de IL-10 (2, 5 y 10 ng) para dos dosis de AO:AP. Se observa que concentraciones crecientes de IL-10 exógena logran estabilizar marcadores críticos como *TP53* y *PARP1* (especialmente a 10 ng en dosis baja) y reducir la activación de efectores de muerte como *CASP3* y *CYCS*, indicando con flechas los cambios relativos en su expresión o actividad para cada condición (↑ aumento, ↓ disminución, ↔ sin cambios).

X. Conclusiones

1. El modelo *in vitro* de esteatosis hepática desarrollado por nuestro grupo de trabajo, es viable y capaz de producir una acumulación lipídica dosis-dependiente a concentraciones crecientes de AO:AP.
2. En concentraciones bajas de AO:AP, se activa la vía de apoptosis mitocondrial, mientras que en concentraciones altas la muerte celular parece no depender de esta vía, y sugiere la participación de otros mecanismos de muerte celular como necrosis, partanatos y piroptosis.
3. La IL-10 exógena, tiene la capacidad de modular, por lo menos parcialmente, la expresión de genes relacionados a la apoptosis clásica y de supervivencia celular.
4. La IL-10 podría ser considerada como una diana terapéutica para tratar enfermedades metabólicas como la MASLD.
5. En estudios posteriores se recomienda medir marcadores relacionados a mecanismos de muerte celular alternativos, así como el efecto de IL-10 exógena a nivel proteico (traducción).

XI. Bibliografía.

1. Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282(5739), 615–616. <https://doi.org/10.1038/282615a0>.
2. Akazawa Y, Nakao K. Las vías de lipotoxicidad se intersecan en los hepatocitos: estrés del retículo endoplásmico, cinasa N-terminal c-Jun-1 y receptores de muerte. *Hepato Res.* 2016;46(10):977–84.
3. Arzumanyan, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>.
4. Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and applied biochemistry*, 69(4), 1633–1645. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>.
5. Avni, D., Ernst, O., Philosoph, A., & Zor, T. (2010). Role of CREB in modulation of TNFalpha and IL-10 expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Molecular immunology*, 47(7-8), 1396–1403. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.02.015>.
6. Badea, A., Johnson, G. A., & Jankowsky, J. L. (2010). Remote sites of structural atrophy predict later amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroImage*, 50(2), 416–427. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.12.070>.
7. Ballester Ferré, M. P. (2021). Caracterización del deterioro neurológico y la respuesta al tratamiento con rifaximina en pacientes con encefalopatía hepática mínima.
8. Batista, M. L., Jr, Lopes, R. D., Seelaender, M. C., & Lopes, A. C. (2009). Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 93(6), 643–700.
9. Ben-Ari, Z., Schmilovitz-Weiss, H., Belinki, A., Pappo, O., Sulkes, J., Neuman, M. G., Kaganovsky, E., Kfir, B., Tur-Kaspa, R., & Klein, T. (2003). Circulating soluble cytochrome c in liver disease as a marker of apoptosis. *Journal of internal medicine*, 254(2), 168–175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01171>.
10. Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & molecular immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
11. Benítez Ruiz, R. (2022). *Análisis del papel del neuropéptido cortistatina en fibrosis hepática* (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).
12. Berger, N. A., & Petzold, S. J. (1985). Identification of minimal size requirements of DNA for activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry*, 24(16), 4352–4355. <https://doi.org/10.1021/bi00337a015>.
13. Berkers, C. R., Maddocks, O. D., Cheung, E. C., Mor, I., & Vousden, K. H. (2013). Metabolic regulation by p53 family members. *Cell metabolism*, 18(5), 617–633. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.019>.
14. Bernal-Reyes, R., Icaza-Chávez, M. E., Chi-Cervera, L. A., Remes-Troche, J. M., Amieva-Balmori, M., Priego-Parra, B. A., Martínez-Vázquez, S., Méndez-Guerrero, I. O., Martínez-Rodríguez, L., Barranca-Enríquez, A., Palmeros-Exsome, C., Cano-Contreras, A. D., & Triana-Romero, A. (2023). Prevalence and clinical-epidemiologic characteristics of a Mexican population with metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease: An open population study. *Revista de gastroenterología de México (English)*, 88(3), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.rgmex.2022.04.001>.
15. Bouchard C. (2021). Genetics of Obesity: What We Have Learned Over Decades of Research. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 29(5), 802–820. <https://doi.org/10.1002/oby.23116>.
16. Bourette, R. P., Thérier, J., & Mouchiroud, G. (2005). Macrophage colony-stimulating factor receptor induces tyrosine phosphorylation of SKAP55R adaptor and its association with actin. *Cellular signalling*, 17(8), 941–949. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.11.009>.
17. Bradley, R. L., Fisher, F. F., & Maratos-Flier, E. (2008). Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(5), 938–944. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.39>.
18. Budick-Harmelin N, Anavi S, Madar Z, Tirosh O. Fatty acids-stress attenuates gluconeogenesis induction and glucose production in primary hepatocytes. *Lipids Health Dis.* 2012 Jul 9;11:66. doi: 10.1186/1476-

- 511X-11-66. PMID: 22676303; PMCID: PMC3391994.
19. Butera, Alessio e Ivano Amelio. "Descifrando el significado de las proteínas mutantes p53". *Trends in Cell Biology* 35.3 (2025): 258-268.
 20. Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.
 21. Cai, J., Zhang, X. J., & Li, H. (2018). Role of Innate Immune Signaling in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 29(10), 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.08.003>.
 22. Calzada Martínez, J. A., & CALZADA MARTINEZ, J. A. Estudio de la interacción de las proteínas NFAT, AP-1, NF-kB, Sp1 y STAT3 y su participación en la expresión del gen de IL-10 en macrófagos.
 23. Campo, P. A. F. (2025). *Progresión de fibrosis hepática en pacientes con enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD). Primera evaluación prospectiva en México* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México).
 24. Campos-Espinosa, A., Guzmán, C., Medina-Ávila, K. Z., & Gutierrez-Reyes, G. (2024). In Vitro Lipid Overload Affects Cellular Proliferation, Apoptosis, and Senescence in a Time-Dependent Manner in HepG2 Hepatocytes and LX-2 Hepatic Stellate Cells. *Cells*, 13(3), 282. <https://doi.org/10.3390/cells13030282>.
 25. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest*. 2003;83(5):655–63.
 26. Cao, S., Long, Y., & Yang, L. (2025). *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences*, 50(6), 1060–1066. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2025.240688>.
 27. Castro, R. E., Ferreira, D. M., Afonso, M. B., Borralho, P. M., Machado, M. V., Cortez-Pinto, H., & Rodrigues, C. M. (2013). miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 58(1), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.008>.
 28. Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., & Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 8(3), 705–711. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00320-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00320-3).
 29. Cheng, Z., Chu, H., Seki, E., Lin, R., & Yang, L. (2024). Hepatocyte programmed cell death: the trigger for inflammation and fibrosis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 12, 1431921. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1431921>.
 30. Colomer Merino, L. (2022). *Nuevos modelos in vitro para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
 31. Cuenca Hernández, C. A. (2023). Influencia del té sensual en la infiltración de macrófagos (CD68) y neutrófilos (CD177) en el hígado de ratas macho.
 32. Cusi, K., Chang, Z., Harrison, S., Lomonaco, R., Bril, F., Orsak, B., Ortiz-Lopez, C., Hecht, J., Feldstein, A. E., Webb, A., Loudon, C., Goros, M., & Tio, F. (2014). Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 60(1), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.042>.
 33. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(1), 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>.
 34. Dave, T., Tilles, A. W., & Vemula, M. (2018). A Cell-Based Assay to Investigate Hypolipidemic Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Therapeutics. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, 23(3), 274–282. <https://doi.org/10.1177/2472555217741077>.
 35. De Salud, S. (2025, 4 Marzo). 044. Secretaría de Salud llama a la población a sumarse a la lucha contra la obesidad. gob.mx.
 36. de Freitas Carvalho MM, Lage NN, de Souza Paulino AH, Pereira RR, de Almeida LT, da Silva TF, *et al*. Effects of açai on oxidative stress, ER stress, and inflammation-related parameters in mice with high fat diet-fed induced NAFLD. *Sci Rep-UK*. 2019;9:1.
 37. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., & de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by

- monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 174(5), 1209–1220. <https://doi.org/10.1084/jem.174.5.1209>.
38. Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Narthey, Y. A., Pose, E., & Kamath, P. S. (2023). Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of hepatology*, 79(2), 516–537. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>.
 39. Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.
 40. Dra, T. P. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457.
 41. El Kasmi, K. C., Smith, A. M., Williams, L., Neale, G., Panopoulos, A. D., Watowich, S. S., Häcker, H., Foxwell, B. M., & Murray, P. J. (2007). Cutting edge: A transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(11), 7215–7219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7215>.
 42. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
 43. Erekat N. S. (2022). Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 35(1), 65–78. <https://doi.org/10.1002/ca.23792>.
 44. Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., & Gallagher, G. (1997). Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*, 46(2), 120–128. <https://doi.org/10.1007/s002510050250>.
 45. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), & European Association for the Study of Obesity (EASO) (2024). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Journal of hepatology*, 81(3), 492–542. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.04.031>.
 46. Farinacci, M., Weber, S., & Kaufmann, S. H. (2012). The recombinant tuberculosis vaccine rBCG ΔureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Vaccine*, 30(52), 7608–7614. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.031>.
 47. Feldstein, A. E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L. J., Lindor, K. D., & Gores, G. J. (2003). Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 125(2), 437–443. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00907-7](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00907-7).
 48. Flores-López, L. A., Enríquez-Flores, S., De La Mora-De La Mora, I., García-Torres, I., López-Velázquez, G., Viedma-Rodríguez, R., Ávalos-Rodríguez, A., Contreras-Ramos, A., & Ortega-Camarillo, C. (2024). Pancreatic β-cell apoptosis in type 2 diabetes is related to post-translational modifications of p53 (Review). *Molecular medicine reports*, 30(5), 193. <https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13317>.
 49. Fouquerel, E., & Sobol, R. W. (2014). ARTD1 (PARP1) activation and NAD(+) in DNA repair and cell death. *DNA repair*, 23, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.09.004>.
 50. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
 51. Gao, B., & Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*, 141(5), 1572–1585. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.002>.
 52. Gárate-Rascón, M. (2023). Role of SLU7 in liver differentiation and in protecting the liver from damage: regulation of HNF4A.
 53. García, J. E. M., & Espejo, F. R. F. La obesidad. Tipos y clasificación. *Revista Digital-Buenos Aires*, 13.
 54. García-Cano, J., Sánchez-Tena, S., Sala-Gaston, J., Figueras, A., Viñals, F., Bartrons, R., Ventura, F., & Rosa, J. L. (2020). Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin ligase HERC2. *Molecular oncology*, 14(1), 69–86. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12592>

55. Gastaldelli, A., & Newsome, P. N. (2025). NAFLD vs MASLD (Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease)-Why the Need for a Change of Nomenclature?. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 110(7), e2407–e2410. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaf09>.
56. Glucksmann, A Cell deaths in normal vertebrate ontogeny *Biol. Rev.* 1951; 26:5986.
57. Gómez-Lechón, M. J., Donato, M. T., Martínez-Romero, A., Jiménez, N., Castell, J. V., & O'Connor, J. E. (2007). A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-biological interactions*, 165(2), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.11.004>.
58. Gómez-Lechón, M. J., Donato, M. T., Martínez-Romero, A., Jiménez, N., Castell, J. V., & O'Connor, J. E. (2007). A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-biological interactions*, 165(2), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.11.004>.
59. Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., Conde, I., & Donato, M. T. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 10(11), 1553–1568. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967680>.
60. Guo, R., Li, Y., Song, Q., Huang, R., Ge, X., Nieto, N., Jiang, Y., & Song, Z. (2025). Increasing cellular NAD⁺ protects hepatocytes against palmitate-induced lipotoxicity by preventing PARP-1 inhibition and the mTORC1-p300 pathway activation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 328(3), C776–C790. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00946.2024>.
61. Gutiérrez Gómez, M. (2024). Inflamación crónica de bajo grado en la obesidad: biomarcadores y perspectivas clínicas.
62. Hashimoto, S. I., Komuro, I., Yamada, M., & Akagawa, K. S. (2001). IL-10 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(7), 3619–3625. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.3619>.
63. Hefer, M., Petrovic, A., Roguljic, L. K., Kolaric, T. O., Kizivat, T., Wu, C. H., Tabll, A. A., Smolic, R., Vcev, A., & Smolic, M. (2024). Green Tea Polyphenol (-)-Epicatechin Pretreatment Mitigates Hepatic Steatosis in an In Vitro MASLD Model. *Current issues in molecular biology*, 46(8), 8981–8994. <https://doi.org/10.3390/cimb46080531>.
64. Henningsen, K. M., Manzini, V., Magerhans, A., Gerber, S., & Dobbelstein, M. (2021). MDM2-Driven Ubiquitination Rapidly Removes p53 from Its Cognate Promoters. *Biomolecules*, 12(1), 22. <https://doi.org/10.3390/biom12010022>.
65. Huang, Y. H., Chen, M. H., Guo, Q. L., Chen, Z. X., Chen, Q. D., & Wang, X. Z. (2020). Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis. *Cellular signalling*, 66, 109445. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109445>.
66. Hundt M, Basit H, John S. Physiology, Bile Secretion. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470209/>.
67. Hutchison, A. L., Tavaglione, F., Romeo, S., & Charlton, M. (2023). Endocrine aspects of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): Beyond insulin resistance. *Journal of hepatology*, 79(6), 1524–1541. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.08.030>.
68. Hutchins, A. P., Diez, D., & Miranda-Saavedra, D. (2013). The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in functional genomics*, 12(6), 489–498. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt028>
69. Hutchings, D. E., Zmitrovich, A. C., Brake, S. C., Church, S. H., & Malowany, D. (1993). Prenatal administration of methadone in the rat increases offspring acoustic startle amplitude at age 3 weeks. *Neurotoxicology and teratology*, 15(3), 157–164. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90011-c](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90011-c).
70. Inal, S., Subasi, F., Ay, S. M., & Hayran, O. (2007). The links between health-related behaviors and life satisfaction in elderly individuals who prefer institutional living. *BMC health services research*, 7, 30. <https://doi.org/10.1186/1472-6963-7-30>.
71. Ishii M, Maeda A, Tani S, Akagawa M. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. *Arch Biochem Biophys*. 2015 Jan 15;566:26-35. doi: 10.1016/j.abb.2014.12.009. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25527164.

72. Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical reviews in immunology*, 32(1), 23–63. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30>.
73. Jacobson, M.D · Weil, M · Raff, M.C Role of Ced-3/ICE family proteases in stuarosporine-induced programmed cell death *J. Cell Biol.* 1996; 133:1041-1051
74. JAISWAL, A., JAIN, K., & BABU, N. (2021). Metabolic Profile of Lean/Non Obese NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) Subjects. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 15(11).
75. Jee, Y. M., Lee, J. Y., & Ryu, T. (2025). Chronic Inflammation and Immune Dysregulation in Metabolic-Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease Progression: From Steatosis to Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, 13(5), 1260. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13051260>.
76. Ji, J., Zhang, L., Wang, P., Mu, Y. M., Zhu, X. Y., Wu, Y. Y., Yu, H., Zhang, B., Chen, S. M., & Sun, X. Z. (2005). Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 56(6), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.02.003>.
77. Johnson, G. L., & Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1341–1348. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.12.009>.
78. Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., Matsumoto, N., Yamagami, H., Ogawa, M., Imazu, H., Kuroda, K., & Moriyama, M. (2018). Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World journal of gastroenterology*, 24(25), 2661–2672. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2661>.
79. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., & Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research*, 53(17), 3976–3985.
80. Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American journal of physiology. Cell physiology*, 320(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>.
81. Keam S. J. (2024). Resmetirom: First Approval. *Drugs*, 84(6), 729–735. <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02045-0>.
82. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
83. Khanna, D., Khanna, S., Khanna, P., Kahar, P., & Patel, B. M. (2022). Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. *Cureus*, 14(2), e22711. <https://doi.org/10.7759/cureus.22711>.
84. Knolle, P. A., Uhrig, A., Protzer, U., Trippler, M., Duchmann, R., Meyer zum Büschenfelde, K. H., & Gerken, G. (1998). Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 27(1), 93–99. <https://doi.org/10.1002/hep.510270116>.
85. Kotenko, S. V., Krause, C. D., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Wu, W., & Pestka, S. (1997). Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *The EMBO journal*, 16(19), 5894–5903. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5894>.
86. Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111(3), 331–342. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01036-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01036-x).
87. Kvensakul, M., & Hinds, M. G. (2015). The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 20(2), 136–150. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1051-7>.
88. Lamadrid, P., Alonso-Peña, M., San Segundo, D., Arias-Loste, M., Crespo, J., & Lopez-Hoyos, M. (2021). Innate and Adaptive Immunity Alterations in Metabolic Associated Fatty Liver Disease and Its Implication in COVID-19 Severity. *Frontiers in immunology*, 12, 651728. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651728>.

89. Langelier, M. F., Planck, J. L., Roy, S., & Pascal, J. M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6082), 728–732. <https://doi.org/10.1126/science.1216338>.
90. Laritza Dayana, P. R., Maricarmen, P. E., & Omar, R. L. (2020, January). Cambios morfofuncionales del Hígado en la Cirrosis hepática. In Fórum Estudiantil Ciencias Médicas. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology : CB*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.
91. Le Rhun, Y., Kirkland, J. B., & Shah, G. M. (1998). Cellular responses to DNA damage in the absence of Poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemical and biophysical research communications*, 245(1), 1–10. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8257>.
92. LeFort, K. R., Rungratanawanich, W., & Song, B. J. (2024). Contributing roles of mitochondrial dysfunction and hepatocyte apoptosis in liver diseases through oxidative stress, post-translational modifications, inflammation, and intestinal barrier dysfunction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 81(1), 34. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-05061-7>.
93. Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2648-55. doi: 10.1172/JCI26250. PMID: 16200198; PMCID: PMC1236690.
94. Leung JCF, Loong TCW, Wei JL, Wong GLH, Chan AWH, Choi PCL, *et al*. Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Hepatology*. 2016;65(1):54–64.
95. Li, C. P., Li, J. H., He, S. Y., Li, P., & Zhong, X. L. (2014). Roles of Fas/FasL, Bcl-2/Bax, and Caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Genetics and molecular research : GMR*, 13(2), 3991–3999. <https://doi.org/10.4238/2014.May.23.10>.
96. Li, K., Li, Y., Shelton, JM, Richardson, JA, Spencer, E., Chen, ZJ, ... & Williams, RS (2000). La deficiencia de citocromo c causa letalidad embrionaria y atenúa la apoptosis inducida por estrés. *Cell* , 101 (4), 389-399.
97. Li P, *et al*. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479–489. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
98. Li, R., Luo, R., Luo, Y., Hou, Y., Wang, J., Zhang, Q., Chen, X., Hu, L., & Zhou, J. (2022). Biological function, mediate cell death pathway and their potential regulated mechanisms for post-mortem muscle tenderization of PARP1: A review. *Frontiers in nutrition*, 9, 1093939. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1093939>.
99. Li, X., Wang, J., Gong, X., Zhang, M., Kang, S., Shu, B., Wei, Z., Huang, Z. S., & Li, D. (2020). Upregulation of BCL-2 by acridone derivative through gene promoter i-motif for alleviating liver damage of NAFLD/NASH. *Nucleic acids research*, 48(15), 8255–8268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa615>.
100. Li, Y., Wang, C., Lu, J., Huang, K., Han, Y., Chen, J., Yang, Y., & Liu, B. (2019). PPAR δ inhibition protects against palmitic acid-LPS induced lipidosis and injury in cultured hepatocyte L02 cell. *International journal of medical sciences*, 16(12), 1593–1603. <https://doi.org/10.7150/ijms.37677>.
101. Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol*. 1998 Feb;274(2):F315-27. doi: 10.1152/ajprenal.1998.274.2.F315. PMID: 9486226.
102. Lipke, K., Kubis-Kubiak, A., & Piwowar, A. (2022). Molecular Mechanism of Lipotoxicity as an Interesting Aspect in the Development of Pathological States-Current View of Knowledge. *Cells*, 11(5), 844. <https://doi.org/10.3390/cells11050844>.
103. Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr, Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3077–3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>.
104. Liu, J. Y., Zhang, Y. C., Song, L. N., Zhang, L., Yang, F. Y., Zhu, X. R., Cheng, Z. Q., Cao, X., & Yang, J. K. (2019). Nifuroxazide ameliorates lipid and glucose metabolism in palmitate-induced HepG2 cells. *RSC advances*, 9(67), 39394–39404. <https://doi.org/10.1039/c9ra06527j>.
105. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9).
106. Lossi L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *The Biochemical journal*, 479(3), 357–384. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210854>.

107. Ma, X. Y., Zhang, M., Fang, G., Cheng, C. J., Wang, M. K., Han, Y. M., Hou, X. T., Hao, E. W., Hou, Y. Y., & Bai, G. (2021). Ursolic acid reduces hepatocellular apoptosis and alleviates alcohol-induced liver injury via irreversible inhibition of CASP3 in vivo. *Acta pharmacologica Sinica*, 42(7), 1101–1110. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00534-y>.
108. Machado, M. V., Michelotti, G. A., Pereira, T. de A., Boursier, J., Kruger, L., Swiderska-Syn, M., Karaca, G., Xie, G., Guy, C. D., Bohinc, B., Lindblom, K. R., Johnson, E., Kornbluth, S., & Diehl, A. M. (2015). Reduced lipoapoptosis, hedgehog pathway activation and fibrosis in caspase-2 deficient mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 64(7), 1148–1157. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307362>.
109. Malo-Serrano, M., Castillo, N., & Pajita, D. (2017, April). La obesidad en el mundo. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 78, No. 2, pp. 173-178).
110. Mandelia, C., Collyer, E., Mansoor, S., Lopez, R., Lappe, S., Nobili, V., & Alkhoury, N. (2016). Plasma Cytokeratin-18 Level As a Novel Biomarker for Liver Fibrosis in Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 63(2), 181–187. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001136>.
111. Margoliash, E. (1963). Estructura primaria y evolución del citocromo c. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 50 (4), 672-679.
112. Martin-Oliva, David & Muñoz-Gámez, José & Aguilar-Quesada, Rocio & Ruiz de Almodóvar, José & Oliver, Francisco. (2006). Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios, muerte celular y cáncer.
113. Marušić, M., Paić, M., Knobloch, M., & Liberati Pršo, A. M. (2021). NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology*, 2021, 6613827. <https://doi.org/10.1155/2021/6613827>.
114. Maya, M. A. B. (2024). *DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS FACULTAD DE MEDICINA* (Doctoral dissertation, INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR).
115. Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal*, 16(10), 2794–2804. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2794>.
116. Michalopoulos, G. K., & Bhushan, B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>.
117. Moravcová, A., Červinková, Z., Kučera, O., Mezera, V., Rychtmoc, D., & Lotková, H. (2015). The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiological research*, 64(Suppl 5), S627–S636. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933224>.
118. Morse, P. T., Arroum, T., Wan, J., Pham, L., Vaishnav, A., Bell, J., Pavelich, L., Malek, M. H., Sanderson, T. H., Edwards, B. F. P., & Hüttemann, M. (2024). Phosphorylations and Acetylations of Cytochrome c Control Mitochondrial Respiration, Mitochondrial Membrane Potential, Energy, ROS, and Apoptosis. *Cells*, 13(6), 493. <https://doi.org/10.3390/cells13060493>.
119. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Cao Z, Horváth B, Park O, Wang H, Erdelyi K, Holovac E, Wang Y, Liaudet L, et al. La poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 es un mediador clave de la inflamación y la fibrosis hepáticas. *Hepatology*. 2014;59:1998–2009. doi: 10.1002/hep.26763.
120. Newton, K., Wickliffe, K. E., Dugger, D. L., Maltzman, A., Roose-Girma, M., Dohse, M., Kőmüves, L., Webster, J. D., & Dixit, V. M. (2019). Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis. *Nature*, 574(7778), 428–431. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1548-x>.
121. Nikolic, M., Sustersic, T., & Filipovic, N. (2018). *In vitro* Models and On-Chip Systems: Biomaterial Interaction Studies With Tissues Generated Using Lung Epithelial and Liver Metabolic Cell Lines. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 120. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00120>.
122. Ning, H., Sun, Z., Liu, Y., Liu, L., Hao, L., Ye, Y., Feng, R., Li, J., Li, Y., Chu, X., Li, S., & Sun, C. (2016). Insulin Protects Hepatic Lipotoxicity by Regulating ER Stress through the PI3K/Akt/p53 Involved Pathway Independently of Autophagy Inhibition. *Nutrients*, 8(4), 227. <https://doi.org/10.3390/nu8040227>.
123. Nishida, T., Naguro, I., & Ichijo, H. (2022). NAMPT-dependent NAD⁺ salvage is crucial for the decision between apoptotic and necrotic cell death under oxidative stress. *Cell death discovery*, 8(1), 195. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01007-3>.
124. Norbury CJ and Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:367-401.

125. Nössing, C., & Ryan, K. M. (2023). 50 years on and still very much alive: 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics'. *British journal of cancer*, 128(3), 426–431.
126. Ouyang, W., & O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50(4), 871–891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>.
127. Paik, J. M., Kabbara, K., Eberly, K. E., Younossi, Y., Henry, L., & Younossi, Z. M. (2022). Global burden of NAFLD and chronic liver disease among adolescents and young adults. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 75(5), 1204–1217. <https://doi.org/10.1002/hep.32228>
128. Panasiuk, A., Dzieciol, J., Panasiuk, B., & Prokopowicz, D. (2006). Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(38), 6198.
129. Pazzaglia, S., & Pioli, C. (2019). Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases. *Cells*, 9(1), 41. <https://doi.org/10.3390/cells9010041>.
130. Peña Osorio, L. J. *Determinación de los niveles de expresión de los genes de IgT E IgM en diferentes tejidos de tilapia roja (Oreochromis sp) frente a infección por Streptococcus agalactiae serotipo Ib* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional De Colombia).
131. Pérez, D. O., & Estrada, L. C. (2024). Cirugía de hígado. *Cirugía en el paciente geriátrico*, 277.
132. Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1644(2-3), 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012>.
133. Ponder, K. G., & Boise, L. H. (2019). The prodomain of caspase-3 regulates its own removal and caspase activation. *Cell death discovery*, 5, 56. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0142-1>.
134. Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(2), 99–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>.
135. Prasun, P., Ginevic, I., & Oishi, K. (2021). Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease and alcohol related liver disease. *Translational gastroenterology and hepatology*, 6, 4. <https://doi.org/10.21037/tgh-20-125>.
136. Purnamasari, D., Badarsono, S., Moersadik, N., Sukardji, K., & Tahapary, D. L. (2011).
137. Qian, H., Chao, X., Williams, J., Fulte, S., Li, T., Yang, L., & Ding, W. X. (2021). Autophagy in liver diseases: A review. *Molecular aspects of medicine*, 82, 100973. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100973>.
138. Quek, J., Chan, K. E., Wong, Z. Y., Tan, C., Tan, B., Lim, W. H., Tan, D. J. H., Tang, A. S. P., Tay, P., Xiao, J., Yong, J. N., Zeng, R. W., Chew, N. W. S., Nah, B., Kulkarni, A., Siddiqui, M. S., Dan, Y. Y., Wong, V. W., Sanyal, A. J., Noureddin, M., ... Ng, C. H. (2023). Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 8(1), 20–30. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00317-X).
139. Rafaqat, S., Gluscevic, S., Mercantepe, F., Rafaqat, S., & Klisic, A. (2024). Interleukins: Pathogenesis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolites*, 14(3), 153. <https://doi.org/10.3390/metabo14030153>.
140. Recena Aydos, L., Aparecida do Amaral, L., Serafim de Souza, R., Jacobowski, A. C., Freitas Dos Santos, E., & Rodrigues Macedo, M. L. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. *Nutrients*, 11(12), 3067. <https://doi.org/10.3390/nu11123067>.
141. Reed J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17(25), 3225–3236. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202591>.
142. Reedy, C. J., & Gibney, B. R. (2004). Heme protein assemblies. *Chemical reviews*, 104(2), 617–649. <https://doi.org/10.1021/cr0206115>.
143. Ribeiro, P. S., Cortez-Pinto, H., Solá, S., Castro, R. E., Ramalho, R. M., Baptista, A., Moura, M. C., Camilo, M. E., & Rodrigues, C. M. (2004). Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *The American journal of gastroenterology*, 99(9), 1708–1717. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40009.x>.
144. Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L. I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., Lonardo, A., Carulli, N., & Loria, P. (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(5), 830–840. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x>.

145. Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4), 875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
146. Romero-Corral, A., Somers, V. K., Sierra-Johnson, J., Thomas, R. J., Collazo-Clavell, M. L., Korinek, J., Allison, T. G., Batsis, J. A., Sert-Kuniyoshi, F. H., & Lopez-Jimenez, F. (2008). Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population.
147. Samanic, C., Chow, W. H., Gridley, G., Jarvholm, B., & Fraumeni, J. F., Jr (2006). Relation of body mass index to cancer risk in 362,552 Swedish men. *Cancer causes & control : CCC*, 17(7), 901–909. <https://doi.org/10.1007/s10552-006-0023-9>.
148. Santiago-Lomelí, M., Gómez-Quiroz, L. E., Ortíz-Ortega, V. M., Kershenobich, D., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2005). Differential effect of interleukin-10 on hepatocyte apoptosis. *Life sciences*, 76(22), 2569–2579. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.048>.
149. Sanyal, A. J., Newsome, P. N., Kliers, I., Østergaard, L. H., Long, M. T., Kjær, M. S., Cali, A. M. G., Bugianesi, E., Rinella, M. E., Roden, M., Ratzl, V., & ESSENCE Study Group (2025). Phase 3 Trial of Semaglutide in Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis. *The New England journal of medicine*, 392(21), 2089–2099. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2413258>.
150. Saraiva, M., Christensen, J. R., Veldhoen, M., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & O'Garra, A. (2009). Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity*, 31(2), 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.012>.
151. Saxton, R. A., Tsutsumi, N., Su, L. L., Abhiraman, G. C., Mohan, K., Henneberg, L. T., Aduri, N. G., Gati, C., & Garcia, K. C. (2021). Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6535), eabc8433. <https://doi.org/10.1126/science.abc8433>.
152. Schülke S. (2018). Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Frontiers in immunology*, 9, 455. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00455>.
153. Serra Majem, L., Ribas Barba, L., Aranceta Bartrina, J., Pérez Rodrigo, C., Saavedra Santana, P., & Peña Quintana, L. (2003). Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Med. clín (Ed. impr.)*, 725-732.
154. Sharmin, M. M., Mizusawa, M., Hayashi, S., Arai, W., Sakata, S., & Yonekura, S. (2020). Effects of fatty acids on inducing endoplasmic reticulum stress in bovine mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, 103(9), 8643–8654. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18080>.
155. Sheka, A. C., Adeyi, O., Thompson, J., Hameed, B., Crawford, P. A., & Ikramuddin, S. (2020). Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*, 323(12), 1175–1183. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2298>.
156. Shi, D., & Gu, W. (2012). Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes & cancer*, 3(3-4), 240–248. <https://doi.org/10.1177/1947601912455199>.
157. Shojaie, L., Iorga, A., & Dara, L. (2020). Cell Death in Liver Diseases: A Review. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9682. <https://doi.org/10.3390/ijms21249682>.
158. Singh, A., Singhanian, R. R., Soam, S., Chen, C. W., Haldar, D., Varjani, S., Chang, J. S., Dong, C. D., & Patel, A. K. (2022). Production of bioethanol from food waste: Status and perspectives. *Bioresource technology*, 360, 127651. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127651>.
159. Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., & Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*, 144(2), 281–292. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.281>.
160. Smirnova OA, Ivanova ON, Mukhtarov F, Valuev-Elliston VT, Fedulov AP, Rubtsov PM, Zakirova NF, Kochetkov SN, Bartosch B, Ivanov AV. Los antígenos del virus de la hepatitis delta desencadenan estrés oxidativo, activan la vía antioxidante Nrf2/ARE e inducen la respuesta a proteínas desplegadas. *Antioxidants (Basel)* 2023;12:974. doi: 10.3390/antiox12040974.
161. Solleiro-Villavicencio, H., Méndez-García, L. A., Ocampo-Aguilera, N. A., Baltazar-Pérez, I., Arreola-Miranda, J. A., Aguayo-Guerrero, J. A., Alfaro-Cruz, A., González-Chávez, A., Fonseca-Sánchez, M. A.,

- Fragoso, J. M., & Escobedo, G. (2024). Decreased Hepatic and Serum Levels of IL-10 Concur with Increased Lobular Inflammation in Morbidly Obese Patients. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 60(6), 862. <https://doi.org/10.3390/medicina60060862>.
162. Song, S. J., Lai, J. C. T., Wong, G. L. H., Wong, V. W. S., & Yip, T. C. F. (2024). Can we use old NAFLD data under the new MASLD definition?. *Journal of hepatology*, 80(2), e54-e56.
 163. Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., & Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410(6824), 112–116. <https://doi.org/10.1038/35065125>.
 164. Standard, I. (2009). Evaluación biológica de dispositivos médicos — Parte 5: Pruebas de citotoxicidad in vitro. *Ginebra, Suiza: Organización Internacional de Normalización*, 10, 9781570203558.
 165. Stauffer, K., & Stauber, R. E. (2023). Steatotic Liver Disease: Metabolic Dysfunction, Alcohol, or Both?. *Biomedicines*, 11(8), 2108. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082108>.
 166. Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR, Nagata S. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*. 2013;341:403–406. doi: 10.1126/science.1236758.
 167. Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>.
 168. Tang, G. L. Q., Lai, J. X. H., & Pervaiz, S. (2024). Ubiquitin-proteasome pathway-mediated regulation of the Bcl-2 family: effects and therapeutic approaches. *Haematologica*, 109(1), 33–43. <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283730>.
 169. Targher, G., Corey, K. E., Byrne, C. D., & Roden, M. (2021). The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus—mechanisms and treatments. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 18(9), 599–612.
 170. Thapaliya, S., Wree, A., Povero, D., Inzaugarat, M. E., Berk, M., Dixon, L., Papouchado, B. G., & Feldstein, A. E. (2014). Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model. *Digestive diseases and sciences*, 59(6), 1197–1206. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3167-6>.
 171. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.09.019>.
 172. Treyer, A., & Müsch, A. (2013). Hepatocyte polarity. *Comprehensive Physiology*, 3(1). <https://doi.org/10.1002/cphy.c120009>.
 173. Tsujimoto, Y., & Croce, C. M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(14), 5214–5218. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.14.5214>.
 174. Vázquez Ogando, E. (2024). Relevancia de la fusión celular y de los hepatocitos de novo como fuentes de hepatocitos en la homeostasis, daño, envejecimiento y regeneración hepáticas en ratones reporteros de linaje celular.
 175. Vega-Badillo, J. (2017). Alteraciones en la homeostasis del colesterol hepático y sus implicaciones en la esteatohepatitis no alcohólica. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 20(1), 50–65.
 176. Velliou, R. I., Giannousi, E., Ralliou, C., Kassi, E., & Chatzigeorgiou, A. (2024). Herramientas y modelos ex vivo en la investigación de MASLD. *Cells*, 13(22), 1827.
 177. Vida A, Márton J, Mikó E, Bai P. Funciones metabólicas de las poli (ADP-ribosa) polimerasas. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;63:135–143. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.12.009.
 178. Volkmann, N., Marassi, F. M., Newmeyer, D. D., & Hanein, D. (2014). The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 21(2), 206–215. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.153>.
 179. Wang, D., Lao, L., Pang, X., Qiao, Q., Pang, L., Feng, Z., Bai, F., Sun, X., Lin, X., & Wei, J. (2018). Asiatic acid from *Potentilla chinensis* alleviates non-alcoholic fatty liver by regulating endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism. *International immunopharmacology*, 65, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.013>.

180. Wang, H., Mehal, W., Nagy, L. E., & Rotman, Y. (2021). Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases. *Cellular & molecular immunology*, 18(1), 73–91. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00579-3>.
181. Wang, W., Gao, X., Niu, W., Yin, J., & He, K. (2025). Targeting Metabolism: Innovative Therapies for MASLD Unveiled. *International journal of molecular sciences*, 26(9), 4077. <https://doi.org/10.3390/ijms26094077>.
182. Willems, F., Marchant, A., Delville, J. P., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M., & Goldman, M. (1994). Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *European journal of immunology*, 24(4), 1007–1009. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240435>.
183. Wittke, C. I., Cheung, E. C., Athineos, D., Clements, N., Butler, L., Hughes, M., Morrison, V., Watt, D. M., Blyth, K., Vousden, K. H., & Humpton, T. J. (2025). p53 and TIGAR promote redox control to protect against metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *JHEP reports : innovation in hepatology*, 7(7), 101397. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2025.101397>.
184. Wong R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.
185. Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Johnson, C. D., Canbay, A., Hoffman, H. M., & Feldstein, A. E. (2014). NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(3), 898–910. <https://doi.org/10.1002/hep.26592>.
186. Xu, D., Zhao, H., Jin, M., Zhu, H., Shan, B., Geng, J., Dziedzic, S. A., Amin, P., Mifflin, L., Naito, M. G., Najafov, A., Xing, J., Yan, L., Liu, J., Qin, Y., Hu, X., Wang, H., Zhang, M., Manuel, V. J., Tan, L., ... Yuan, J. (2020). Modulating TRADD to restore cellular homeostasis and inhibit apoptosis. *Nature*, 587(7832), 133–138. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2757-z>.
187. Ye, J., & McGuinness, O. P. (2013). Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 304(5), E466–E477. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00266.2012>.
188. Yeh, M. M., & Brunt, E. M. (2007). Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of clinical pathology*, 128(5), 837–847. <https://doi.org/10.1309/RTPM1PY6YGBL2G2R>.
189. Yin F, Wu MM, Wei XL, Ren RX, Liu MH, Chen CQ, Yang L, Xie RQ, Jiang SY, Wang XF, Wang H. Hepatic NCoR1 deletion exacerbates alcohol-induced liver injury in mice by promoting CCL2-mediated monocyte-derived macrophage infiltration. *Acta Pharmacol Sin*. 2022;43:2351–2361. doi: 10.1038/s41401-022-00863-0.
190. Yoon, S. I., Logsdon, N. J., Sheikh, F., Donnelly, R. P., & Walter, M. R. (2006). Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *The Journal of biological chemistry*, 281(46), 35088–35096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606791200>.
191. Younossi, Z. M., Loomba, R., Rinella, M. E., Bugianesi, E., Marchesini, G., Neuschwander-Tetri, B. A., Serfaty, L., Negro, F., Caldwell, S. H., Ratziu, V., Corey, K. E., Friedman, S. L., Abdelmalek, M. F., Harrison, S. A., Sanyal, A. J., Lavine, J. E., Mathurin, P., Charlton, M. R., Chalasani, N. P., Anstee, Q. M., ... Lindor, K. (2018). Current and future therapeutic regimens for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 68(1), 361–371. <https://doi.org/10.1002/hep.29724>.
192. Yu, G., Luo, H., Zhang, N., Wang, Y., Li, Y., Huang, H., Liu, Y., Hu, Y., Liu, H., Zhang, J., Tang, Y., & Huang, Y. (2019). Loss of p53 Sensitizes Cells to Palmitic Acid-Induced Apoptosis by Reactive Oxygen Species Accumulation. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6268. <https://doi.org/10.3390/ijms20246268>.
193. Yu, S., Jiang, X., Peng, L., Zeng, X., Wen, S., Xiong, H., Guo, S., Huang, F., Liu, H., & Luo, Q. (2025). Integrated bioinformatics decoding of the MASLD ceRNA network reveals novel therapeutic targets. *Clinical and experimental medicine*, 25(1), 354. <https://doi.org/10.1007/s10238-025-01890-x>.
194. Zhang, L., El-Shabrawi, M., Baur, L. A., Byrne, C. D., Targher, G., Kehar, M., Porta, G., Lee, W. S., Lefere, S., Turan, S., Alisi, A., Weiss, R., Faienza, M. F., Ashraf, A., Sundaram, S. S., Srivastava, A., De Bruyne, R., Kang, Y., Bacopoulou, F., Zhou, Y. H., ... Zheng, M. H. (2024). An international multidisciplinary consensus on pediatric metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *Med (New York, N.Y.)*, 5(7), 797–815.e2. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2024.03.017>.
195. Zhang, Q., Jin, Y., Xin, X., An, Z., Hu, Y. Y., Li, Y., & Feng, Q. (2023). A high-trans fat, high-

- carbohydrate, high-cholesterol, high-chole diet-induced nonalcoholic steatohepatitis mouse model and its hepatic immune response. *Nutrition & metabolism*, 20(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12986-023-00749-w>.
196. Zhao, J., Hu, Y., & Peng, J. (2021). Targeting programmed cell death in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD): a promising new therapy. *Cellular & molecular biology letters*, 26(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00254-z>.
 197. Zhong, J., Deaciuc, I. V., Burikhanov, R., & de Villiers, W. J. (2006). Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1762(4), 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.12.012>.
 198. Zhou, B., Ho, S. S., Greer, S. U., Spies, N., Bell, J. M., Zhang, X., Zhu, X., Arthur, J. G., Byeon, S., Pattni, R., Saha, I., Huang, Y., Song, G., Perrin, D., Wong, W. H., Ji, H. P., Abyzov, A., & Urban, A. E. (2019). Haplotype-resolved and integrated genome analysis of the cancer cell line HepG2. *Nucleic acids research*, 47(8), 3846–3861. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz169>
 199. Zou, Z. Y., Ren, T. Y., Li, J. Q., Jiao, T. Y., Wang, M. Y., Huang, L. J., Lin, S. Z., Wang, Y. Y., Guo, X. Z., Song, Y. Y., Yang, R. X., Xie, C., & Fan, J. G. (2024). Transcriptomic Landscape Analysis Reveals a Persistent DNA Damage Response in Metabolic Dysfunction-associated Steatohepatitis Post-dietary Intervention. *Journal of clinical and translational hepatology*, 12(9), 765–779

