

# DIFERENCIAS EN EL PERFIL DE CITOCINAS DE ACUERDO AL GRADO DE INFLAMACIÓN Y ESTEATOSIS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Cisneros Villanueva, Ricardo David (1), Gallegos Tirado, Berenice Rosalia (1), Ramírez Sánchez, Joel Alejandro (1), Gutiérrez Aguirre, Salvador Fabián (1), Jordán Pérez, Benjamín (2), Garnelo Cabañas, Serafín (2), García Ramírez, Juana Rosalba (2), Preciado Puga, Mónica del Carmen (3), Lazo de la Vega Monroy, María Luisa (4), Ruiz Noa, Yeniley (4), Ibarra Reynoso, Lorena del Rocío (4)

1 [Licenciatura en Médico Cirujano, Universidad de Guanajuato] | [rd.cisnerosvillanueva@ugto.mx]

2 [Hospital General de León]

3 [Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]

4 [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [rey221280@gmail.com]

## Resumen

**Introducción:** La enfermedad de hígado graso no alcohólico comprende un espectro de lesiones, de esteatosis simple a esteatohepatitis, llevando a fibrosis hepática, cirrosis, carcinoma hepatocelular y falla hepática. Es manifestación del síndrome metabólico, sobre todo de resistencia a la insulina. La esteatosis sensibiliza a los hepatocitos a mecanismos lesivos, desencadenando una respuesta inflamatoria donde las citocinas son determinantes en la progresión de la enfermedad. Se identifica las citocinas Th1 proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6), Th2 antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13) y Th17 proinflamatorias crónicas (IL-17, IL-22, IL-23). El índice de actividad histológica NAS aplicado en una biopsia hepática clasifica a esta enfermedad según la esteatosis, inflamación y balonamiento celular. Nuestro objetivo fue analizar las citocinas Th1, Th2 y Th17 de acuerdo al grado de inflamación y esteatosis. **Materiales y métodos:** En 72 pacientes integrados en 6 grupos según su diagnóstico histopatológico se cuantificaron IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 mediante citometría de flujo utilizando el kit CBA Human Th1/Th2/Th17 BD™. **Resultados:** existe una asociación negativa entre IL-4 y el índice de actividad de EHGNA ( $p < 0.018$ ). **Discusión-conclusiones:** Los resultados confirman el perfil antiinflamatorio de IL-4 y la relación de IL-4 circulante de forma sistémica con la inflamación localizada en el hígado.

## Resumen

**Introduction:** Non-alcoholic fatty liver disease comprehends a spectrum of lesions, from simple steatosis to steatohepatitis, leading to hepatic fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and hepatic failure. It is a metabolic syndrome manifestation, especially of insulin resistance. The steatosis sensitizes the hepatocytes to mechanisms of injury, triggering to a inflammatory response where the cytokines are determinant in the progression of the disease. The Th1 proinflammatory cytokines are identified (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6), as well as the Th2 anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13) and the chronic Th17 proinflammatory ones (IL-17, IL-22, IL-23). The NAS histopathological activity score applied on liver biopsy classifies this disease based on cellular steatosis, inflammation and ballooning. Our goal was to analyze the cytokines Th1, Th2 and Th17 according on the degree of inflammation and steatosis. **Materials and methods:** 72 patients integrated on 6 groups in accordance with the histopathological diagnosis. IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-17 were quantified through flow cytometry using CBA Human Th1/Th2/Th17 BD™ Cytokine Kit. **Results:** A negative association exists between IL-4 and the NAFLD activity score ( $p < 0.018$ ). **Discussion-conclusions:** The results confirm the IL-4 antiinflammatory attribute and the relationship of the IL-4 circulating systemically with the inflammation localized on the liver.

## Palabras clave

Enfermedad de Hígado Graso no alcohólico; Inflamación; Citocinas.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) ha aumentado en todo el mundo en paralelo a la obesidad, es conceptualizada como un espectro clínico e histológico de lesiones hepáticas que van de esteatosis simple a esteatohepatitis no alcohólica, llevando a fibrosis hepática, cirrosis y en algunos casos carcinoma hepatocelular o falla hepática con la necesidad de trasplante. Debido a su fuerte asociación con obesidad central, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión arterial e hipertrigliceridemia, la EHGNA es considerada por algunos como una manifestación hepática del síndrome metabólico (SM) y de la resistencia a la insulina (RI) [1].

Se estima una prevalencia mundial de 20-30% en población adulta, hasta 80% de personas con obesidad pueden desarrollar alguna de estas formas clínicas, teoría que permite inferir una prevalencia de 26% en México. Aproximadamente el 30% de la esteatosis simple progresa a la esteatohepatitis, y alrededor del 20% de estos desarrolla cirrosis [2,6].

La historia natural de la EHGNA no está completamente comprendida. Estudios indican que la esteatosis simple es potencialmente reversible y tiende a ser estable con el tiempo, pero le confiere al paciente mayor riesgo cardiovascular y cáncer de origen no hepático, mientras que la esteatohepatitis se asocia a mayor riesgo de desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular [1,3].

## Fisiopatología de la EHGNA

La principal característica histopatológica es la esteatosis en más de 5% de los hepatocitos y debe presentarse en ausencia de consumo de alcohol, infecciones virales hepáticas u otra enfermedad hepática [1].

Cuando la infiltración de grasa hepática se acompaña de inflamación lobular y balonamiento de los hepatocitos el diagnóstico cambia a esteatohepatitis. La inflamación lobular implica focos de células inflamatorias, principalmente linfocitos y macrófagos e inusualmente de neutrófilos. El balonamiento o células en globo se refiere a la pérdida de organización celular, estas células pueden o no encontrarse más grande que los hepatocitos normales. La fibrosis se asocia a esteatohepatitis, aunque puede estar presente en esteatosis simple. El grado de fibrosis influye en la mortalidad global independientemente de la presencia o gravedad de los otros componentes de esteatohepatitis. La progresión de fibrosis

incluye puentes de fibrosis y cirrosis como la etapa final [1, 3].

Day y James [1] propusieron la teoría del “doble golpe” para explicar la progresión de la esteatosis simple a esteatohepatitis. El “primer golpe” es la esteatosis, que sensibiliza al hígado al “segundo golpe”, representado por el estrés oxidativo y toxinas endógenas causantes de inflamación y necrosis. Recientemente la teoría de “múltiples impactos paralelos” toma a la esteatosis como resultado de varios mecanismos lesivos donde la resistencia a la insulina es el principal al estimular la lipogénesis e inhibir la lipólisis aumentando así el flujo de ácidos grasos libres (AGL) hacia los hepatocitos, haciéndolos susceptibles a factores patogénicos como: radicales libres producidos por la oxidación de AGL, disregulación en la producción de citocinas, inflamación desencadenada por endotoxinas, cambios en la microbiota intestinal, disfunción mitocondrial y activación de células estrelladas hepáticas [1, 6].

## EHGNA e Inflamación.

EHGNA se caracteriza por cambios en el microambiente hepático determinados por la secreción de citocinas provenientes del tejido adiposo y hepático, tienen participación en los procesos de inmunidad, inflamación y resistencia a la insulina [6]. La respuesta inflamatoria ocurre ante una dieta rica en grasas que promueve el reconocimiento antigénico de los lípidos. Las citocinas se agrupan con base en su función: las secretadas por linfocitos Th1 (T colaboradores o helper tipo 1) con función proinflamatoria: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), Interleucina 2 (IL-2) e IL-6; Th2 antiinflamatorio: IL-4, IL-10 e IL-13 y Th17 proinflamatorio crónico: IL-17, IL-22, IL-23, entre muchas otras.

En modelos murinos de esteatosis inducida por dieta se han demostrado cambios significativos en poblaciones de células como macrófagos, linfocitos T y B, células dendríticas, así como en la secreción de citocinas determinantes en la infiltración de macrófagos en el parénquima hepático, relacionado con el estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria local y sistémica [7, 9].

La función de algunas citocinas ha sido identificada en modelos murinos, como el TNF- $\alpha$  que tiene efectos inflamatorios, proliferativos y necróticos en tejido adiposo y hepático siendo un claro agente causal en la patogénesis de EHGNA, donde los niveles séricos elevados se asocian positivamente a la gravedad de la enfermedad. Es secretado por células de Kupffer (macrófagos localizados en el hígado), que junto con los linfocitos Natural Killer (que también secretan

IFN- $\gamma$ ) y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) representan la respuesta inflamatoria temprana para EHGNA [7].

IL-6 es una citocina pleiotrópica, sus efectos proinflamatorios son bien conocidos. Los niveles séricos se elevan en presencia de obesidad y RI y es predictor de desarrollar DM2 [6]. En murinos, la deficiencia de IL-6 o su bloqueo reduce la inflamación hepática sin influir en la esteatosis, sugiriendo únicamente una función inflamatoria [10].

En relación con la obesidad, se ha demostrado el nivel elevado de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, mientras que en SM se han encontrado mayores niveles de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-12, IL-13 [8]. La infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo sigue la secreción de TNF- $\alpha$  y ácidos grasos libres provenientes de los adipocitos. La activación de los macrófagos puede cambiar de la vía predominante alternativa o no inflamatoria (M2), a la vía clásica proinflamatoria (M1), esta polarización se encuentra intensificada en obesidad y es estimulada por IFN- $\gamma$  y el Factor Estimulante de Colonias de los Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF), mientras IL-4 e IL-13 muestran propiedades en favor de la activación M2. En obesidad, los linfocitos Th1 y los macrófagos M1 fueron reportados en estado activado y productores de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$ , mientras que la diferenciación de las células colaboradoras en Th2, así como la actividad de los linfocitos T reguladores se encontraron reducidas [9, 11, 13].

### Diagnóstico y clasificación para EHGNA

El ultrasonido o la elastografía se consideran el método diagnóstico de primera elección cuando el paciente tiene factores de riesgo metabólicos y elevación moderada de transaminasas o relación AST/ALT < 1. Sin embargo, la biopsia hepática es el "estándar de oro" ya que permite conocer la gravedad de la enfermedad.

El índice de actividad histológica denominado NAS (NAFLD Activity Score) clasifica a la esteatosis en una escala del 0 al 3 tomando en cuenta el porcentaje de hepatocitos afectados, en inflamación se incluyen niveles del 0 a 3 y para balonamiento celular de 0 a 2, basado en la estimación de células señaladas. En esta clasificación se excluye a la fibrosis por su condición irreversible [4]. Basado en la validación realizada por Kleiner [5], los puntajes de 0 a 2 son negativos; 3 a 4 son divididos en no diagnósticos o estar en el límite positivo y de 5 a 8 se consideran positivos.

Tabla 1. Índice de actividad NAS (NASH Activity Score) [4]

Característica	Puntos	Criterios
Esteatosis	0	Afectación <5% de hepatocitos
	1	5 a 33%
	2	>33 a 66%
	3	>66%
Inflamación lobular	0	No focos inflamatorios
	1	<2 focos/200X
	2	2-4 focos/200X
	3	>4 focos/200X
Balonamiento	0	Negativo
	1	Balonamiento en pocas células
	2	Balonamiento prominente

La esteatosis y la esteatohepatitis podrían aparecer como condiciones independientes, que implicaría vías patogénicas distintas. La identificación de estos mecanismos mejoraría la comprensión biológica de la enfermedad y permitiría dirigir a los pacientes hacia su mejor opción terapéutica. En la actualidad son escasos los estudios que demuestren los niveles de citocinas en sujetos con EHGNA y se desconoce si existe un perfil inflamatorio predominante para cada una de las manifestaciones de esta enfermedad, el objetivo del presente estudio fue analizar el perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17 medidas por citometría de flujo en una muestra de suero, de acuerdo al grado de inflamación y esteatosis en pacientes con EHGNA diagnosticado por biopsia.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron datos de 72 pacientes de un estudio previo del Hospital General de León, aprobado por el comité de ética de dicho hospital (aprobación SSGTO00075), realizado por alumnos de Maestría en Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato.

#### Criterios de inclusión y no inclusión

Los criterios de inclusión fueron datos de pacientes que hayan ingresado al estudio previo y de los cuales se contara con muestras de suero, datos clínicos en la base de datos y con diagnóstico histopatológico. Los criterios de no inclusión fueron datos de pacientes que hayan ingresado al estudio previo y de los cuales no se contara con muestras de suero, de datos clínicos o el diagnóstico histopatológico y por último, deseo del paciente de no participar en este proyecto.

**Tabla 2. Diferencias entre los grupos de EHNA**

	Grupo 1 Inflamación 0, esteatosis 0 N=15 m±DE	Grupo 2 Inflamación 0, esteatosis 1-3 N=9 m±DE	Grupo 3 Inflamación 1, esteatosis 0 N=15 m±DE	Grupo 4 Inflamación 2 y 3, esteatosis 0 N=5 m±DE	Grupo 5 Inflamación 1, esteatosis 1-3 N=15 m±DE	Grupo 6 Inflamación 2 y 3, esteatosis 1-3 N=13 m±DE	f	p
Edad	35.33 ±10.85	39.44 ±9.35	38.20 ±14.61	42.20 ±8.52	40.60 ±10.72	40.61 ±11.60	0.501	0.774
Peso (Kg)	70.90 ±16.57	70.36 ±8.35	70.28 ±8.69	72.08 ±11.12	72.79 ±16.13	77.43 ±15.41	0.499	0.776
Talla (m)	1.57 ±0.07	1.55 ±0.07	1.57 ±0.06	1.60 ±0.02	1.58 ±0.07	1.58 ±0.08	0.398	0.849
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28.89 ±6.83	29.10 ±4.31	28.54 ±4.79	28.11 ±4.04	29.12 ±6.66	30.49 ±4.43	0.227	0.949
INDICE DE ACTIVIDAD	0	1.55 ±0.73	1.73 ±0.46	3.00 ±0.71	3.66 ±0.90	5.76 ±0.44	156.83	<0.000000 1
IL2 (pg/ml)	5.94 ±2.72	5.98 ±2.87	5.33 ±5.06	2.24 ±3.15	6.71 ±4.51	4.54 ±2.71	1.15	0.341
IL4 (pg/ml)	2.94 ±2.25	3.88 ±1.86	1.90 ±2.39	2.14 ±2.19	3.27 ±1.88	0.71 ±1.75	3.56	<0.006 <sup>a, b, c, d</sup>
IL6 (pg/ml)	6.38 ±3.55	7.86 ±4.13	4.60 ±3.44	3.37 ±5.18	6.74 ±3.95	7.26 ±7.04	1.29	0.276

Post hoc: a(1 vs 6), b(2 vs 3), c (2 vs 6), d(5 vs 6)

Los pacientes tenían edad entre 18 y 60 años, ingesta de alcohol negativa o menor de 20 gr/día para mujeres y menor de 30 gr/día para hombres y no tenían diagnóstico previo de enfermedad hepática. La recolección de la biopsia hepática fue en pacientes que asistieron a colecistectomía programada y con deseo de participar. La muestra de suero fue preservada a -80 grados centígrados.

Integramos a los pacientes en 6 grupos de estudio de acuerdo con el índice de actividad NAS (NASH Activity Score, tabla 1) [4].

- Grupo 1 Inflamación 0, esteatosis 0
- Grupo 2 Inflamación 0, esteatosis 1-3
- Grupo 3 Inflamación 1, esteatosis 0
- Grupo 4 Inflamación 2 y 3, esteatosis 0
- Grupo 5 Inflamación 1, esteatosis 1-3
- Grupo 6 Inflamación 2 y 3, esteatosis 1-3

### Análisis del perfil de citocinas

Se obtuvo suero de la muestra de sangre venosa para la determinación de los niveles solubles de las citocinas Th1/Th2/Th17, cuya medición se realizó por citometría de flujo utilizando un kit de citocinas Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 BD™ mediante tecnología de matriz de perlas para detectar simultáneamente múltiples citocinas en las muestras problema. Las siete poblaciones de perlas estaban recubiertas con anticuerpos de captura específicos para las proteínas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e IL-17A. Se mezclaron las perlas de captura de citocinas con los estándares y con las muestras desconocidas, se incubaron con los anticuerpos de detección conjugados con Ficoeritrina (PE) para formar complejos tipo sándwich. La intensidad de la fluorescencia de PE de cada complejo reveló la concentración de cada una de las citocinas. Después se analizaron las muestras en un citómetro de flujo BD FACS CANTO II, utilizando el software BD FCAP™ para generar los resultados en formato gráfico y tabular.

### Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados usando el programa STATISTICA. (Versión 7.0). Se utilizó ANOVA para analizar las diferencias de las variables entre los grupos de estudio, con prueba de post hoc LSD. Además, se realizó un análisis multivariado con regresión múltiple para

determinar las asociaciones de las citocinas con el índice de actividad. Las diferencias fueron consideradas significativas con una  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 72 pacientes clasificados en 6 grupos de acuerdo al resultado histopatológico de la biopsia de tejido hepático. La edad promedio fue de 39 años, el 83% de los pacientes eran de sexo femenino.

La edad, peso, talla e IMC no fueron diferentes entre los grupos. Las citocinas cuantificadas fueron: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17, sin embargo, en la citometría de flujo, solo IL-2, IL-4 e IL-6 arrojaron resultados, por lo cual solo estas se incluyeron en el análisis estadístico.

Nuestros resultados muestran que la interleucina 4 (IL-4) es diferente entre los grupos de acuerdo con el grado de inflamación y esteatosis ( $p < 0.006$ ). Sin embargo, las citocinas IL-2 e IL-6 no muestran diferencias estadísticamente significativas (IL-2  $p = 0.341$ ; IL-6  $p = 0.276$ , respectivamente).

En nuestro estudio se demuestra que existe una asociación negativa entre la interleucina 4 y el índice de actividad de la Enfermedad de Hígado Graso no Alcohólico, cuando se toma en cuenta un análisis de regresión múltiple, tomando el índice de actividad como variable dependiente ( $p < 0.018$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3: Análisis de regresión múltiple**

Factores asociados con el índice de actividad de EHGNA R <sup>2</sup> Ajustada=0.064			
	Beta $\pm$ EE	t	p
Intercept		9.25600	0.0000001
IL-4	-0.28 $\pm$ 0.11	-2.42428	<0.018

## DISCUSIÓN

La enfermedad de hígado graso no alcohólico está caracterizada por esteatosis e inflamación. El rol que le compete a las citocinas en relación con la inflamación es bien conocido, aunque no completamente en el caso de EHGNA en donde no se ha dilucidado aún cual es el perfil inflamatorio que caracteriza los diferentes grados de la enfermedad. En este estudio, analizamos un perfil sérico de citocinas en grupos de pacientes y encontramos una diferencia significativa de los niveles de IL-4 entre los grupos clasificados según el índice de actividad NAS, así como una asociación negativa significativa de los niveles de IL-4 con dicho índice ( $p < 0.018$ ). Este estudio muestra que además de las citocinas Th1, de las

que se cuenta con una clara asociación con EHGNA en murinos y en menor evidencia en humanos, las citocinas Th2 (grupo al que la IL-4 pertenece además de IL-10 e IL-13), pueden desempeñar un papel importante en el proceso de la enfermedad. IL-4 es producida por macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células NK, basófilos, eosinófilos y linfocitos Th2 [11].

Este hallazgo corresponde con estudios que describen la función antiinflamatoria de esta citocina [8, 12, 14], uno de sus principales mecanismos es estimular la polarización M2 de los macrófagos y la secreción de citocinas antiinflamatorias, siendo este mecanismo factor clave al contribuir a mantener la sensibilidad a la insulina [6, 8, 14], factor determinante en la patogénesis de EHGNA [1].

La diferencia en la expresión de citocinas Th1/Th2 en sujetos con obesidad y/o síndrome metabólico y sujetos control, es bien conocida [8]. El perfil Th1 ha sido reportado activado en asociación con obesidad, citocinas que conducen a un entorno proinflamatorio en el tejido adiposo blanco y el hígado, así como a resistencia a la insulina y en consecuencia esteatosis [7, 8]. Sin embargo, a pesar de la fuerte asociación de estos factores de riesgo metabólico con la EHGNA [1], la inflamación comprendida en esta última es compleja y polifacética.

Con base en el perfil sérico de IL-4 observado en nuestro estudio y en la evidencia disponible podemos hacer algunas conclusiones: la RI y el aumento del flujo de AGL hacia los hepatocitos promueve el reconocimiento antigénico de los lípidos [6], desencadenando una respuesta inflamatoria local caracterizada por la infiltración de macrófagos y su polarización hacia un perfil proinflamatorio, así como la activación indeterminada de los linfocitos Th y la secreción de citocinas [7, 11]. La regulación de este proceso es determinada por la activación inespecífica de linfocitos, células de Kupffer, células dendríticas y endoteliales; y este fenómeno sucederá en respuesta a los factores lesivos o protectores presentes en el microambiente hepático [4], en el que la IL-4 muestra una función regulatoria o antiinflamatoria en la patogenia de EHGNA. Con la progresión de este desequilibrio, las citocinas pueden incrementar sus niveles séricos y dicha magnitud relacionarse con la inflamación que acontece en el hígado como lo demostramos en este estudio.

La principal limitación de nuestro estudio fue el tamaño pequeño de la muestra y su naturaleza transversal, en la que no es posible establecer una relación de causa y efecto. Este estudio gana importancia al centrarse en población de alto

riesgo sobre la que hay informes escasos para este tema. La utilidad de estos marcadores del sistema inmune para el desarrollo de EHGNA debe ser estudiada en estudios longitudinales.

## CONCLUSIONES

Encontramos diferencias en el nivel sérico de la citocina antiinflamatoria IL-4 al compararla en 72 pacientes integrados en 6 grupos determinados por su diagnóstico de histopatológico. El nivel de IL-4 se asoció a la inversa al índice de actividad histológico, es decir, a mayor cantidad de IL-4, fue menor el índice de actividad para EHGNA. Este estudio muestra que además de las citocinas proinflamatorias Th1, las citocinas Th2 como la IL-4 pueden desempeñar un papel importante en el proceso de la enfermedad. Los cambios en las concentraciones de citocinas pueden contribuir a la progresión de esteatosis simple a esteatohepatitis no alcohólica y sus complicaciones y parecen ser un objetivo diagnóstico y terapéutico en estas patologías.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por la oportunidad y el impulso a estos proyectos. Al personal de enfermería del Hospital General de León por su valiosa colaboración. A quienes forman parte del Departamento de Ciencias Médicas por el conocimiento transmitido y por alentarnos sobre el mundo de la investigación. A Karen Gutiérrez Aguirre y Marion Velázquez Villafaña. Muchas gracias.

## REFERENCIAS

- [1] Y. Yilmaz. (2012). Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?. *Aliment Pharmacol Ther*, 36, 815–823. Doi:10.1111/apt.12046
- [2] López Velázquez, J. A., Silva Vidal, K. V., Ponciano Rodríguez, G., Chávez Tapia, N. C., Arrese, M., Uribe, M. & Méndez Sánchez, N. (2014). The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Annals of Hepatology*, 13(2), 166-178.
- [3] Bedossa, P. (2017). Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 37, 85–89. Doi: 10.1111/liv.13301
- [4] Fiel, M. I. (2017). Histologic score system for chronic liver disease. UpToDate. Recuperado de [www.uptodate.com/contents/histologic-scoring-systems-for-chronic-liver-disease](http://www.uptodate.com/contents/histologic-scoring-systems-for-chronic-liver-disease)
- [5] Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., & cols. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-41. Doi:10.1002/hep.20701

[6] Abenavoli, L., Milic, N., Di Renzo, L., Preveden, T., Medić-Stojanoska, M. & De Lorenzo, A. (2016) *World J Gastroenterol*. 22(31), 7006-7016. Doi: 10.3748/wjg.v22.i31.7006

[7] Iyer, S., Upadhyay, P. K., Majumdar, S. S. & Nagarajan, P. (2015). Animal Models Correlating Immune Cells for the Development of NAFLD/NASH. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 5(3), 239–245. Doi:10.1016/j.jceh.2015.06.004

[8] Schmidt, F. M., Weschenfelder, J., Sander, C., Minkwitz, J., Thormann, J. & Chittka, T. et al. (2015). Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLoS ONE* 10(3): e0121971. doi:10.1371/journal.pone.0121971.

[9] Vansaun, M. N., Mendonsa, A. M. & Lee Gorden, D. (2013). Hepatocellular proliferation correlates with inflammatory cell and cytokine changes in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *PloS one*, 8(9), e73054. Doi:10.1371/journal.pone.0073054

[10] Mas, E., Danjoux, M., Garcia, V., Carpentier, S., Ségui, B. & Levade, T. (2009). IL-6 deficiency attenuates murine diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PloS one*, 4(11), e7929. PubMed PMID: 19936233. Doi:10.1371/journal.pone.0007929

[11] Van Dyken, S. J. & Locksley, R. M. (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*, 31:317–343. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095906

[12] Miura, K., Yang, L., van Rooijen N., Ohnishi, H. & Seki, E. (2012). Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 302(11), G1310-21. Doi: 10.1152/ajpgi.00365.2011

[13] Hallet, M. A., Venmar, K. T. & Fingleton, B. (2012) Cytokine Stimulation of Epithelial Cancer Cells: The Similar and Divergent Functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res*; 72(24), Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3544

[14] Xu, L., Kitade, H., Ni, Y. & Ota, T. (2015). Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules*, 5, 1563-1579; doi:10.3390/biom5031563