

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA
Y SALUD PÚBLICA**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN MEDICINA
CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**

TESIS DOCTORAL

*ESTUDIO EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA DE LOS FACTORES
RELACIONADOS CON LA SEÑALIZACIÓN HEPÁTICA DE LEPTINA,
ADIPONECTINA E INSULINA Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DEL
HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO*

**Luis Miguel Alcázar Jaén
Granada, octubre de 2013**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Luis Miguel Alcázar Jaén
D.L.: GR 1061-2014
ISBN: 978-84-9028-962-4

Dr. FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR,
CATEDRÁTICO DE DIGESTIVO DEL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio de la Comisión, Don Luis Miguel Alcázar Jaén, titulada *“Estudio en pacientes con obesidad mórbida de los factores relacionados con la señalización hepática de leptina, adiponectina e insulina y su relación con la progresión del hígado graso no alcohólico”*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 22 de abril de 2013

Fdo. Dr. Francisco Javier Salmerón Escobar.

Dr. ÁNGEL CARAZO GALLEGO, TÉCNICO SUPERIOR DE LA
UNIDAD DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio de la Comisión, Don Luis Miguel Alcázar Jaén, titulada *“Estudio en pacientes con obesidad mórbida de los factores relacionados con la señalización hepática de leptina, adiponectina e insulina y su relación con la progresión del hígado graso no alcohólico”*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 22 de abril de 2013

Fdo. Dr. Ángel Carazo Gallego.

Dra. JOSEFA LEÓN LÓPEZ, INVESTIGADORA DE LA UNIDAD DE
APOYO A LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio de la Comisión, Don Luis Miguel Alcázar Jaén, titulada *“Estudio en pacientes con obesidad mórbida de los factores relacionados con la señalización hepática de leptina, adiponectina e insulina y su relación con la progresión del hígado graso no alcohólico”*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 22 de abril de 2013

Fdo. Dra. Josefa León López.

El doctorando Luis Miguel Alcázar Jaén y los directores de la tesis Fco. Javier Salmerón Escobar, Ángel Carazo Gallego y Josefa León López Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 6 de septiembre de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

Fco. Javier Salmerón Escobar

Luis Miguel Alcázar Jaén

Ángel Carazo Gallego

Josefa León López

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queria agradecerles a Javier y a Ángel, mis directores, su dedicacion, porque sin ellos este proyecto no habria salido adelante. A Javier, por la puesta en marcha de este trabajo y por haber confiado en mí para llevarlo a cabo. A ti Ángel, por tu gran esfuerzo, por tantas horas dedicadas a mí, (lectivas y no lectivas), por tu paciencia y sabiduría, y por tu confianza y amistad.

Quiero agradecer a Pepi León su dedicación prestada al desarrollo del trabajo publicado y los ánimos que me ha dado para terminar la tesis. También a todos los miembros de la unidad de cirugía de la obesidad mórbida y de anatomía patológica del hospital universitario San Cecilio de Granada, que han colaborado de forma excepcional en la obtención y procesamiento de las muestras necesarias para la realización del trabajo.

A todos los miembros del programa oficial de doctorado de la Universidad de Granada y al personal de la Escuela de Postgrado por haberme ayudado en todo lo referente a los trámites de la tesis.

Muchas gracias a todos los médicos residentes, médicos adjuntos, personal de enfermería y administración – servicios de la Unidad Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, por vuestro ejemplo y apoyo diarios. Para mi sois todos como una familia y estoy muy orgulloso de haberme formado con vosotros. A Ali, mi co-R, que ha caminado día a día junto a mí por este sendero tan complicado, y me ha demostrado la inmensa capacidad de trabajo, esfuerzo e ilusión, acompañada de una entrañable amistad y cariño. También a mis residentes mayores (ya adjuntos) por ayudarme y escucharme en todas las dudas profesionales y personales durante la residencia.

A Sara, por su amor incondicional hacia mí, y por todas esas horas que hemos dejado de estar juntos para que yo pudiera dedicarme a escribir la tesis, por su ayuda infinita, me faltan palabras para describir todo lo has hecho y haces por mí.

A mi padre, a mi madre y a mi hermana, por su paciencia, apoyo, ayuda infinitos. No os imagináis cuanto cariño y admiración os tengo. A mi familia, así como a los padres de Sara y sus familiares, que han sido para mí pilares fundamentales en mi vida.

A todos los miembros del Equipo de Investigacion CTS-277 del HUSC de Granada. No olvidaré los buenos momentos que hemos pasado juntos. Os echaré siempre de menos.

A todos mis amigos, por su ánimo incondicional. Me siento muy orgulloso de tenerlos a mi lado.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 OBESIDAD.....	9
1.1.1 DEFINICIÓN DE SOBREPESO Y OBESIDAD. CLASIFICACIÓN. EPIDEMIOLOGÍA.....	9
1.1.2 DIAGNÓSTICO DE LA OBESIDAD.....	13
1.1.2.1 ANAMNESIS.....	13
1.1.2.2 EXPLORACIÓN FÍSICA Y PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.....	13
1.1.2.3 EVALUACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO GLOBAL Y REGIONAL.....	14
1.1.2.4 EVALUACIÓN DEL PERÍMETRO LA CINTURA.....	14
1.1.3 REPERCUSIÓN CLÍNICA.....	16
1.1.3.1 SÍNDROME METABÓLICO.....	18
1.2 EL TEJIDO ADIPOSO.....	22
1.2.1 EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO.....	23
1.2.1.1 EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO COMO ÓRGANO SECRETOR.....	25
A) LEPTINA.....	25
B) ADIPONECTINA.....	30
C) RESISTINA.....	34
D) PROTEÍNA DE UNIÓN 4 DEL RETINOL.....	35
E) PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS DEL TEJIDO ADIPOSO.....	35

	F) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA.....	36
	G) INTERLEUQUINA 6.....	36
1.2.1.2	ADAPTACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN LA OBESIDAD.....	36
1.3	HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.....	39
1.3.1	ETIOLOGÍA.....	39
1.3.2	EPIDEMIOLOGÍA.....	41
1.3.3	FISIOPATOLOGÍA.....	42
1.3.3.1	FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON ADIPOQUINAS Y SUS RECEPTORES HEPÁTICOS.....	44
	A) SEÑALIZACIÓN DE ADIPONECTINA.....	44
	B) SEÑALIZACIÓN DE LEPTINA.....	47
1.3.3.2	FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON SEÑALIZACIÓN DE INSULINA: MECANISMOS DE RESISTENCIA A INSULINA.....	49
1.3.3.3	FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON EL METABOLISMO LIPÍDICO.....	53
1.3.3.4	FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	58
1.3.3.5	FACTORES RELACIONADOS CON INFLAMACIÓN.....	59
1.3.3.6	RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EHGNA.....	62
1.3.3.7	PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A GOTAS LIPÍDICAS EN LA PROGRESIÓN DE LA EHGNA.....	63
1.3.3.8	HIERRO HEPÁTICO.....	64

1.3.3.9	MODALIDAD DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO.....	65
1.3.3.10	APOPTOSIS DE LOS HEPATOCITOS.....	65
1.3.3.11	FACTORES GENÉTICOS.....	66
1.3.3.12	PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	66
1.3.3.13	FÁRMACOS.....	67
1.3.4	HISTORIA NATURAL.....	67
1.3.5	DIAGNÓSTICO.....	70
1.3.5.1	HISTORIA CLÍNICA.....	70
1.3.5.2	EXPLORACIÓN.....	71
1.3.5.3	HALLAZGOS ANALÍTICOS.....	72
1.3.5.4	DIAGNÓSTICO POR IMAGEN.....	73
1.3.6	ESTADIFICACIÓN.....	74
1.3.6.1	BIOPSIA HEPÁTICA. DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA.....	75
1.3.6.2	ESTADIFICACIÓN POR TÉCNICAS NO INVASIVAS.....	78
	A) TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHNA.....	78
	B) TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DE FIBROSIS.....	80
1.3.6.3	ALGORITMO PARA LA ESTADIFICACIÓN Y SEGUIMIENTO DE UN PACIENTE CON EHGNA.....	84
1.3.7	TRATAMIENTO.....	85
1.3.7.1	INTERVENCIÓN SOBRE EL ESTILO DE VIDA.....	85
1.3.7.2	AGENTES SENSIBILIZADORES DE INSULINA.....	86
1.3.7.3	VITAMINA E.....	87

1.3.7.4	ÁCIDO URSODESOXICÓLICO, ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y AGENTES DIVERSOS.....	88
1.3.7.5	CIRUGÍA BARIÁTRICA.....	88
1.3.7.6	ESTATINAS.....	89
1.3.7.7	NUEVOS TRATAMIENTOS.....	89
1.3.7.8	TRATAMIENTO DEL HGNA EN PACIENTES CON OTRAS PATOLOGÍAS HEPÁTICAS CRÓNICAS.....	90
1.3.7.9	RECOMENDACIONES RELATIVAS A LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	91
2.	RESÚMEN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	95
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	102
3.1	MUESTRA.....	102
3.2	PARÁMETROS BIOLÓGICOS.....	103
3.2.1	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS.....	103
3.2.2	DETERMINACIONES DE LEPTINA Y ADIPONECTINA PLASMÁTICA.....	104
3.2.3	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICOS.....	104
3.2.4	ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO.....	105
3.2.5	ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN HEPATOCITO.....	106
3.2.5.1	EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DEL TEJIDO HEPÁTICO.....	107
3.2.5.2	RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA.....	108
3.2.5.3	DISEÑO DE LOS CEBADORES.....	108

3.2.5.4	PCR A TIEMPO REAL.....	111
3.2.6	MATERIAL Y MÉTODOS DEL MODELO INVITRO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA.....	112
3.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	113
4.	RESULTADOS.....	117
4.1	CARACTERÍSTICAS BASALES.....	117
4.2	PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICOS.....	119
4.3	NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA INTRAHEPÁTICA Y CORRELACIONES.....	120
4.3.1	RECEPTORES DE ADIPONECTINA Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	120
4.3.2	RECEPTORES DE LEPTINA Y SEÑALIZACIÓN DE INSULINA..	124
4.3.3	PROTEÍNAS SOCS.....	130
4.3.4	PERILIPINA 1 Y ADIPOFILINA.....	135
4.3.4.1	RESULTADOS EN EL MODELO CELULAR DE ESTEATOSIS.....	137
4.3.5	METABOLISMO LIPÍDICO.....	138
4.4	ANÁLISIS MULTIVARIABLE.....	142
4.5	VARIACIONES DEL IMC Y PARÁMETROS SANGUÍNEOS TRAS CIRUGÍA BARIÁTRICA (ESTUDIO OBSERVACIONAL CON SEGUIMIENTO DE LA COHORTE).....	143
5.	DISCUSIÓN.....	147
6.	CONCLUSIONES.....	166
6.1	LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS.....	167
7.	ABREVIATURAS.....	172
8.	GLOSARIO DE FIGURAS Y TABLAS.....	178
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	185

ANEXO. RESUMEN DE LA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL...206

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial [1], fruto de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente. En países desarrollados como España, afecta a un gran porcentaje de la población, en todas las edades, condiciones sociales y en ambos sexos. Su prevalencia ha aumentado y continúa incrementándose de forma alarmante en nuestra sociedad, así como en países de economía en transición, hasta adquirir proporciones epidémicas [1]. La obesidad y sus repercusiones clínicas conducen a una carga económica significativa. El promedio de los costes médicos anuales son 1,6 veces mayores en los pacientes obesos con síndrome metabólico en comparación con aquellos sin síndrome metabólico [85] y la obesidad representa entre el 2% y el 6% del total de los costes de salud en muchos países [85].

1.1.1 DEFINICIÓN DE SOBREPESO Y OBESIDAD. CLASIFICACIÓN. EPIDEMIOLOGÍA

La obesidad es una enfermedad que se caracteriza por el exceso de grasa corporal. En función de la grasa corporal, se podrían definir como sujetos obesos a aquellos que presentan porcentajes de grasa corporal por encima de los valores considerados normales, que son del 12 al 20% en varones y del 20 al 30% en mujeres adultas [1].

Aunque el índice de masa corporal (IMC), que consiste en calcular el peso expresado en kilogramos, dividido por la talla al cuadrado expresada en metros cuadrados (kg/m^2) [1], no es un buen indicador de adiposidad en individuos musculados

(deportistas) y en ancianos, es el índice utilizado por la mayoría de estudios epidemiológicos y el recomendado por diversas sociedades médicas y organizaciones de salud internacionales para el uso clínico, dadas su reproducibilidad, facilidad de utilización y capacidad de reflejar la adiposidad en la mayoría de la población.

Se acepta como punto de corte un valor de IMC de 30 kg/m² o superior, aunque también se han establecido valores superiores al percentil 85 de la distribución de la población de referencia. La Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), en el documento publicado en 1996, introdujo algunas modificaciones a la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS): se rebajó el límite inferior del peso normal a 18,5 kg/m², se subdividió la gama de sobrepeso en 2 categorías y se introdujo un grado adicional de obesidad para los pacientes con IMC de 50 kg/m² o superior, que son tributarios de indicaciones especiales en la elección del procedimiento de cirugía bariátrica (**tabla 1**). En la población infantil y juvenil se utilizan como criterios para definir el sobrepeso y la obesidad los valores específicos por edad y sexo de los percentiles 85 y 97 del IMC, respectivamente. Ello permitirá establecer comparaciones con estudios internacionales. En personas mayores de 60 años, se utiliza el IMC siguiendo los mismos criterios que en adultos.

Tabla 1. Criterios para definir obesidad en grados según el IMC (OMS) modificada por la SEEDO en 1996 [1].

Categoría	Valores límite de IMC (kg/m ²)
Peso insuficiente	< 18,5
Peso normal	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥ 50

- EPIDEMIOLOGÍA

El aumento de la prevalencia de la obesidad es un problema mundial, con una estimación aproximada de unos 1.460 millones de adultos afectados a nivel mundial y una reducción de la esperanza de vida de hasta 7 años en comparación con las personas

que presenta normopeso [85, 86]. Se estima que, a nivel mundial, unos 170 millones de niños (menores de 18 años de edad) tienen sobrepeso u obesidad, la cual afecta a más del 20% de todos los niños en muchos países (Estados Unidos, Gran Bretaña, Australia, Brasil, Chile) [86].

En la población infantil y juvenil española (2-24 años), de acuerdo con los resultados del estudio enKid [2], la prevalencia de obesidad se estima en un 13,9% y la de sobrepeso en un 12,4%. En conjunto, suponen el 26,3%. La obesidad es significativamente más prevalente en varones (15,6%) que en mujeres (12,0%). En el grupo de varones, las tasas más elevadas se observan entre los 6 y los 13 años. En las chicas, las tasas de prevalencia más elevadas se observan entre los 6 y los 9 años.

La prevalencia de obesidad en la población adulta de 25 a 64 años, según los resultados del estudio DORICA [3], se estima en un 15,5%, y es más elevada en mujeres (17,5%) que en varones (13,2%). El 0,79% de los varones y el 3,1% de las mujeres de entre 25 y 60 años tienen una obesidad tipo II (IMC de 35-39) y el 0,3% de los varones y el 0,9% de las mujeres presentan una obesidad mórbida (IMC \geq 40 kg/m²). Datos provisionales del estudio DRECE (Dieta y Riesgo de Enfermedades Cardiovasculares en España) [4] muestran que en 14 años se ha producido un incremento del 34,5% en la prevalencia de obesidad, que ha pasado del 17,4% en 1992 a un 24% en 2006. Estos datos concuerdan con los obtenidos en la última Encuesta Nacional de Salud, con registros de peso y talla autorreferidos, en la que se describe un incremento absoluto de un 6% en las tasas de obesidad en 14 años de evolución (de un 7,7% en 1987 a un 13,6% en 2001).

Para la población mayor de 65 años se estima una prevalencia de obesidad del 35% (un 30,9% en varones y un 39,8% en mujeres). Esta prevalencia es mayor (36%) en la población anciana no institucionalizada que en la institucionalizada (21%) [5].

Los resultados del estudio enKid [2] han puesto de manifiesto que la obesidad en la población española en edad infantil y juvenil está adquiriendo dimensiones que merecen especial atención. La prevalencia de obesidad, según este estudio, es más importante en la población en edad escolar, especialmente en los años que preceden al inicio de la pubertad. El consumo elevado de productos de bollería industrial y de otros alimentos ricos en grasas, el bajo consumo de fruta y verduras y un estilo de vida sedentario han sido identificados como factores determinantes de la obesidad en este grupo de edad [6].

En la mayoría de los estudios realizados en adultos en España (**tabla 2**), la prevalencia de obesidad es más elevada en el subgrupo femenino y aumenta a medida que avanza la edad, especialmente en las mujeres con menor nivel de instrucción. Entre los factores que influyen en una mayor prevalencia de la obesidad destacan, por un lado, los ligados al estilo de vida, tales como mayor sedentarismo, menor consumo de frutas y verduras, así como el incremento del aporte calórico a expensas de grasas o de alcohol. Por otra parte, la multiparidad, un bajo nivel socioeconómico y cultural, y la residencia en las comunidades autónomas del sudeste del país, del noroeste y Canarias son factores asociados a una prevalencia superior de obesidad [1].

En población adulta, la prevalencia de obesidad en España se sitúa en un punto intermedio entre los países del norte de Europa, Francia y Australia, que presentan las proporciones de obesos más bajas, y EE UU y los países del este europeo, que en la actualidad tienen las mayores prevalencias.

TABLA 2

Prevalencia de obesidad en la población española por grupos de edad y sexo

	Varones (%)	Mujeres (%)	Total (%)
Población infantil y juvenil ^a			
2-9 años	16,3	11,6	14,0
10-17 años	18,5	9,1	13,9
18-24 años	12,6	14,9	13,7
Población adulta ^b			
25-34 años	7,1	4,8	5,9
35-44 años	11,7	12,2	12,0
45-54 años	16,9	26,4	22,0
55-60 años	21,5	34,2	28,5
Población > 65 años ^c			
Ancianos no institucionalizados ^d	31,5	40,8	36
Ancianos institucionalizados ^e	20,5	21,7	21

Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad [1].

- a) Resultados del estudio enKid [2], donde para calcular la prevalencia de obesidad se consideraron los valores específicos por edad y sexo del percentil 97 del índice de masa corporal (IMC), empleando las tablas de Orbeagoz confeccionadas por Hernandez en 1988.
- b) Resultados del estudio DORICA [3], en el que para definir la obesidad se emplearon valores de IMC por encima de 30 kg/m².
- c) Para definir la obesidad se utilizaron valores de IMC por encima de 30 kg/m².
- d) Resultados del estudio de Gutiérrez Fisac et al (Obes Res. 2004;12:710-5).
- e) resultados del estudio de Aranceta et al [5].

1.1.2 DIAGNÓSTICO DE LA OBESIDAD

1.1.2.1 ANAMNESIS

Para la realización de una correcta anamnesis se deben recoger antecedentes familiares y personales de interés, se profundizará en la evolución de la obesidad a lo largo de la vida y se harán constar aquellos aspectos de interés en cuanto a la alimentación y hábitos de vida [1]. Concretamente, se prestará especial atención a los siguientes puntos:

- a) causas desencadenantes de la obesidad (gestación, menopausia, cese del consumo de tabaco, toma de fármacos asociados a un incremento de peso corporal).
- b) causas secundarias de obesidad (hipotiroidismo, síndrome de ovario poliquístico, enfermedad de Cushing...).
- c) estudio de comorbilidades mayores o menores.
- d) estudio de los hábitos alimentarios, descartando posibles alteraciones del comportamiento alimentario, y nivel de actividad física.
- e) registros de los intentos previos de pérdida de peso, los tratamientos utilizados y su eficacia.
- f) motivación para enfrentarse a un nuevo programa de adelgazamiento.

1.1.2.2 EXPLORACIÓN FÍSICA Y PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

La exploración física irá dirigida a observar la presencia de signos de obesidad secundaria (hipotiroidismo, enfermedad de Cushing, hiperinsulinismo, hipogonadismo, síndrome de ovarios poliquísticos, etc.) y, a la vez, las consecuencias de la propia obesidad (signos de insuficiencia cardíaca, dislipemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial...) [1].

Para completar el estudio básico del paciente, será indispensable la realización de una analítica general, una ecografía abdominal (para descartar la presencia de colelitiasis, hígado graso u ovarios poliquísticos), pruebas funcionales respiratorias y estudio polisomnográfico para el diagnóstico de síndrome de apneas durante el sueño, o ecocardiografía ante la sospecha de insuficiencia cardíaca o enfermedad valvular. El registro de la presión arterial debe realizarse con un esfigmomanómetro adaptado para obesos; la anchura recomendada del brazalete para adultos con obesidad moderada es de 14 a 15 cm, y para personas muy obesas, de 16 a 18 cm [1].

1.1.2.3 EVALUACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO GLOBAL Y REGIONAL

Se pesará al paciente sin zapatos y en ropa interior. A partir del peso y la estatura se calculará el IMC, con la fórmula: peso expresado en kilogramos, dividido por la talla al cuadrado expresada en metros cuadrados (kg/m^2) [1].

1.1.2.4 DETERMINACIÓN DEL PERÍMETRO DE LA CINTURA

Se determina con una cinta métrica flexible, milimetrada, con el paciente en bipedestación, sin ropa y en estado relajado. Se debe localizar el borde superior de las crestas ilíacas, y por encima de ese punto, rodear la cintura con la cinta métrica, de manera paralela al suelo, asegurando que esté ajustada, pero sin comprimir la piel. La lectura se realiza al final de una espiración normal [1].

Pese a ser un parámetro aparentemente muy sencillo de determinar, en la práctica la medida puede resultar compleja. Esto es así, fundamentalmente, porque no siempre es sencillo localizar las referencias anatómicas en pacientes obesos, lo que favorece una apreciable variabilidad entre observadores. El perímetro de la cintura es un mejor indicador de la grasa visceral (y de sus cambios con la pérdida de peso), así como del riesgo cardiovascular, que la relación cintura/cadera [7].

- Otros métodos de determinación de la composición de tejido adiposo corporal:

La medida de los pliegues cutáneos y la determinación de la cantidad de grasa mediante impedancia bioeléctrica, absorciometría radiográfica de doble energía y otros métodos de estimación de la composición corporal son de utilidad clínica limitada, relegándose su uso a la investigación [1].

1.1.3 REPERCUSIÓN CLÍNICA

La morbilidad asociada al sobrepeso y la obesidad está escenificada en muchas alteraciones de salud, entre las que cabe destacar la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la dislipemia, la hipertensión, la enfermedad coronaria y cerebrovascular, la colelitiasis, la osteoartrosis, la insuficiencia cardíaca, el síndrome de apneas durante el sueño, algunos tipos de cáncer, alteraciones menstruales, la esterilidad y alteraciones psicológicas [1, 83] (**figura 1**). El clínico debe realizar un esfuerzo para determinar las enfermedades asociadas al exceso ponderal y especialmente las susceptibles de mejoría tras la pérdida de peso [1]. La obesidad, especialmente la visceral, confiere un aumento del riesgo de morbimortalidad en general [1].

La mayor parte de los estudios epidemiológicos poblacionales [8] observan que la mortalidad empieza a aumentar cuando el IMC supera los 25 kg/m². Las personas con un IMC superior o igual a 30 kg/m² presentan un incremento de aproximadamente entre el 50 y el 100% tanto de la mortalidad total como de la debida a enfermedades cardiovasculares respecto a la población con un IMC de 20 a 25 kg/m². El aumento de la mortalidad es modesto cuando el IMC se sitúa entre 25 y 30 kg/m² (**tabla 3**). Una reducción estimada del 1% en el IMC en la población podría dar lugar a una disminución de hasta 2,4 millones de casos de diabetes y 1,7 millones de casos de cardiopatías y accidentes cerebrovasculares por año [83].

A pesar de que la relación IMC-mortalidad es importante, la repercusión clínica de la obesidad puede variar ampliamente entre los sujetos que presentan un IMC similar [83]. El IMC es un índice bastante burdo de la cantidad de tejido adiposo total en el sujeto, por lo que además de esta medida, también son importantes factores como la genética, el sexo, la edad, la etnia, la función cardiorrespiratoria, y la distribución de la grasa corporal (visceral vs subcutánea), que también juegan un papel en la morbilidad y mortalidad [83].

Los individuos con obesidad a edades tempranas reducen significativamente su esperanza de vida y en ellos se predice el futuro desarrollo de patologías como el síndrome metabólico, la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (ECV) [83, 84]

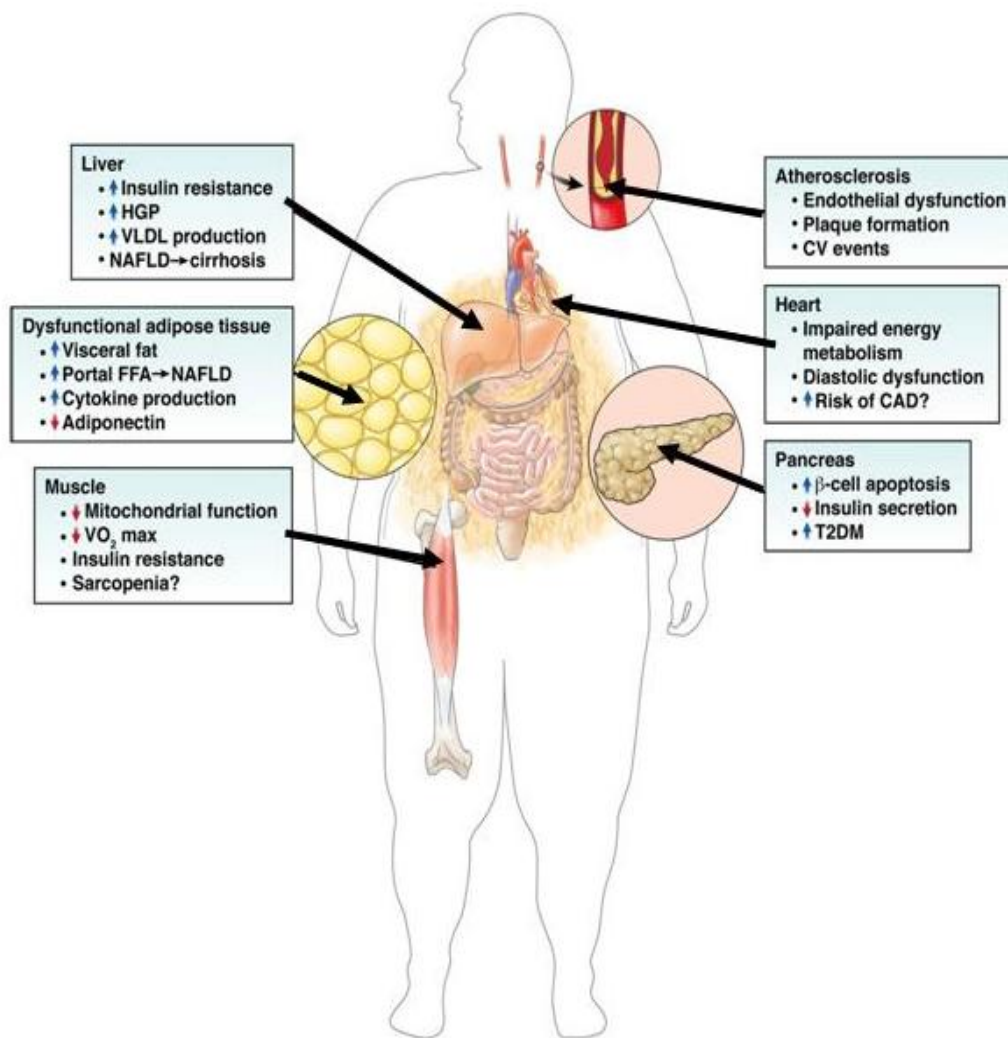


Figura 1. Relación entre obesidad y enfermedades como el hígado graso no alcohólico (HGNA), la DM2, ECV y otras. Adaptado de [83].

La evaluación del riesgo de morbimortalidad que comporta el exceso de peso debe realizarse en el contexto global de la historia clínica del paciente. Este cálculo del riesgo condicionará la estrategia que se debe seguir. El riesgo dependerá especialmente del exceso de peso (IMC y perímetro de cintura: **tabla 3**), la distribución de la grasa corporal, la presencia de factores de riesgo cardiovascular y otras comorbilidades.

Tabla 3

Riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confieren el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo

	IMC (kg/m ²)	Riesgo relativo a partir del perímetro de la cintura	
		Varones ≤ 102 cm	Varones > 102 cm
		Mujeres ≤ 88 cm	Mujeres > 88 cm
Peso normal	18,5-24,9	Ninguno	Ligeramente aumentado
Sobrepeso	25,0-29,9	Ligeramente aumentado	Aumentado
Obesidad	30,0-34,9	Aumentado	Alto
Obesidad mórbida	35,0-39,9 ≥ 40	Alto Muy alto	Muy alto Muy alto

IMC: índice de masa corporal.

Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad [1].

1.1.3.1 SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico es una constelación de factores de riesgo asociados a la obesidad abdominal, entre los que se encuentran la dificultad en la utilización de glucosa (resistencia a la insulina), la dislipemia aterogénica y la hipertensión arterial. Puede considerarse una entidad clínica especial, que confiere un alto riesgo de enfermedad cardiovascular y/o diabetes. El síndrome metabólico está muy relacionado con la EHGNA, siendo considerado como su expresión hepática, y por tanto constituye un eje central en nuestro estudio [83].

Si bien la patogenia del síndrome metabólico y de cada uno de sus componentes es compleja y no suficientemente conocida, la obesidad central y la resistencia a la insulina se han considerado los ejes fundamentales del síndrome.

Hay diversas definiciones de síndrome metabólico, entre las que cabe destacar la realizada por la OMS en 1998 y la plasmada en el tercer informe del National

Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). Esta última, recientemente actualizada, es más simple y útil desde el punto de vista clínico, ya que la de la OMS requiere la realización de un test de sobrecarga oral de glucosa y la determinación de insulina. Más recientemente están ganando fuerza los criterios establecidos por la International Diabetes Federation (IDF) [9], ya que en ellos se especifican puntos de corte para el perímetro de la cintura propios de la población europea (y otras poblaciones), y además es una clasificación de uso clínico fácil y asequible. En la **tabla 4** se establece la definición del síndrome metabólico según los criterios del ATP III y la IDF [9].

TABLA 4

Definición del síndrome metabólico según los criterios del Adult Treatment Panel III (ATP III), definición actualizada en 2005, y la International Diabetes Federation (IDF)

ATP III	IDF
<p>Tres o más de los siguientes factores:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Obesidad central, definida por una medición del perímetro de la cintura ≥ 102 cm en varones y ≥ 88 cm en mujeres - Aumento de los triglicéridos: ≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/l) - cHDL reducido: < 40 mg/dl (1,03 mmol/l) en varones < 50 mg/dl (1,3 mmol/l) en mujeres - Aumento de la presión arterial: Sistólica ≥ 130 y/o diastólica ≥ 85 mmHg, o toma de tratamiento antihipertensivo - Aumento de la glucosa plasmática en ayuno: glucemia ≥ 100 mg/l (5,6 mmol/l) 	<p>Presencia de obesidad central, definida por la medida del perímetro de la cintura en población europea de ≥ 94 cm en varones y ≥ 80 cm en mujeres^a</p> <p>Junto a 2 o más de los siguientes factores:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aumento de los triglicéridos (≥ 150 mg/dl o 1,7 mmol/l) o tratamiento específico para la reducción de los triglicéridos - cHDL reducido (< 40 mg/dl o 1,03 mmol/l en varones y < 50 mg/dl en mujeres) o tratamiento específico para esta alteración en el cHDL - Aumento de la presión arterial: sistólica ≥ 130 y/o diastólica ≥ 85 mmHg, o toma de tratamiento antihipertensivo - Aumento de la glucosa plasmática en ayuno: glucemia ≥ 100 mg/l (5,6 mmol/l), o diabetes tipo 2 anteriormente diagnosticada^b

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

^aEn japoneses los puntos de corte considerados son de 85 cm en varones y de 90 cm en mujeres, y en población china y asiática son de 90 y 80 cm en varones y mujeres, respectivamente; ^bsi la glucemia es superior a esta cifra, se recomienda la realización de una prueba de sobrecarga oral de glucosa, aunque no es necesaria para el diagnóstico del síndrome metabólico.

En relación a la fisiopatología del síndrome metabólico, la importancia del tipo de crecimiento del tejido adiposo blanco en los pacientes obesos, cuyas características se comentarán en el siguiente apartado, determina la relación entre la cantidad de grasa visceral y el síndrome metabólico. A diferencia de la denominada obesidad en “forma de manzana” (asociada a un exceso de grasa visceral), que presenta un alto riesgo de síndrome metabólico, la obesidad en “forma de pera” (asociada a un exceso de grasa subcutánea) está asociada a un riesgo mucho más reducido. Se han formulado dos hipótesis para explicar este fenómeno:

- 1) El tejido adiposo blanco visceral es más susceptible de alterar su función endocrina que el subcutáneo [65, 67].
- 2) La actividad endocrino-metabólica mediada por adipocitoquinas liberadas por el tejido adiposo blanco visceral afectan más intensamente al hígado, a través de la circulación portal-hepática: esta hipótesis explica el desarrollo de EHGNA en el contexto del síndrome metabólico. [65, 67, 83].

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo, hepático y muscular, es el eje central del síndrome metabólico [83], y se acompaña de otras alteraciones que no se incluyen en los criterios diagnósticos de éste, pero que suponen un incremento adicional del riesgo cardiovascular y de otras alteraciones asociadas [83]:

- Factores lipídicos: incrementos de las apolipoproteínas B y C-III, partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL: muy aterogénicas), incremento de la lipemia posprandial y disminución de la apolipoproteína A1.
- Factores protrombóticos: incremento de las concentraciones del inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1, del fibrinógeno y aumento de la viscosidad.
- Factores proinflamatorios: incremento del recuento de leucocitos, aumento de las citocinas factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 6, de la proteína C reactiva y de la resistina, o disminución de la adiponectina.
- Microalbuminuria.
- Otros: hiperuricemia, hiperhomocisteinemia, esteatohepatitis no alcohólica, síndrome de apneas durante el sueño, síndrome de ovarios poliquísticos.

La prevalencia del síndrome metabólico es diferente entre poblaciones, debido a la influencia de la raza, el sexo y la edad en su definición. De acuerdo con los criterios

del Adult Treatment Panel III (ATP III), la prevalencia media en EE UU se encuentra en el 20-30% [9]. La prevalencia estimada de síndrome metabólico en España, según diversos estudios epidemiológicos, va desde un 17% en Segovia, pasando por el 25% del Spanish Insulin Resistance Study y el 24,4% en la Comunidad Canaria, hasta el 28,9% en Valencia [10]. Estas diferencias pueden deberse a la edad de los participantes, al IMC promedio de la muestra y a la contribución porcentual de cada uno de los componentes del síndrome metabólico [10].

1.2 EL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es el mayor reservorio energético del organismo, y por tanto desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis de los ácidos grasos corporales [65].

En los mamíferos hay dos tipos de tejido adiposo, ambos de origen mesenquimal: el tejido adiposo pardo y el tejido adiposo blanco, que se diferencian claramente en la morfología y función. Los adipocitos del tejido adiposo pardo tienen numerosas gotas citoplásmicas de lípidos y una red mitocondrial muy desarrollada, mientras que los adipocitos del tejido adiposo blanco tienen sólo una gran gota lipídica y una red mitocondrial muy reducida [65]. Los adipocitos pardos son células muy especializadas que intervienen en la generación del calor corporal (termogénesis), mientras que los adipocitos blancos están más especializados en el almacenamiento de lípidos actuando como reserva energética [65]. El proceso de termogénesis en los adipocitos pardos se realiza a través de la proteína desacoplante mitocondrial 1 (Uncoupling Protein-1: UCP-1, también llamada termogenina) que se considera como un marcador específico de estos adipocitos [66]. UCP-1 genera calor por disipación del gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna [66].

En los seres humanos (a diferencia de los roedores), el tejido adiposo pardo es un tejido residual y sólo durante el período neonatal contribuye significativamente a la termogénesis [65]. En la actualidad el estudio del tejido adiposo blanco confiere una mayor relevancia en la fisiopatología de la obesidad y la EHGNA.

1.2.1 EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El tejido adiposo blanco está constituido por adipocitos especializados en el almacenamiento de lípidos actuando como reserva energética.

El origen del tejido adiposo blanco deriva de células madre mesenquimales pluripotentes que se convierten en adipoblastos y posteriormente en células preadiposas (precursores del futuro adipocito blanco adulto). La maduración depende de un sistema de señalización compleja, regulada por PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), el cual es esencial, en conjunto con otros factores de transcripción, como SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c), las proteínas entrelazadas CCAAT, y las proteínas morfogenéticas óseas, entre otras. Además, PPAR γ es un marcador de adipocitos maduros ya que sólo aparece cuando se culmina la diferenciación. Con SREBP1c ocurre algo parecido con la diferencia de que aparece algo más pronto que PPAR γ [83].

Las células principales del tejido adiposo son los adipocitos, que son células post-mitóticas, por tanto la generación de nuevos adipocitos debe producirse a partir de la activación de células precursoras quiescentes, y a esta modalidad de crecimiento se le denomina hiperplasia (mecanismo predominante en la infancia). Además, los adipocitos tienen una enorme capacidad para incrementar su tamaño (modalidad de crecimiento denominada hipertrofia: predominante en adultos), en consecuencia el crecimiento del tejido adiposo blanco es mediado por hiperplasia, hipertrofia o una combinación de ambas [71].

Estudios recientes han estimado que, en individuos no obesos, los adipocitos tienen una tasa anual de renovación de aproximadamente un 10% [71]. El crecimiento por hipertrofia predomina tras una sobrealimentación crónica y se asocia con síndrome metabólico [72]. En varios estudios se ha publicado que la cantidad de pre-adipocitos quiescentes determinan la modalidad de crecimiento del tejido graso y que dicha cantidad decrece tras ganancia de peso y, gradualmente, tras la pubertad [71, 73].

De acuerdo con su localización hay dos tipos de tejido adiposo blanco: interno y subcutáneo. El tejido adiposo interno más importante desde el punto de vista

endocrinometabólico, y por tanto, el más relacionado con la fisiopatología del síndrome metabólico y la EHGNA, es el visceral situado en la cavidad abdominal [67].

Desde el punto de vista histológico, el tejido adiposo blanco se compone de adipocitos integrados en una malla de tejido conectivo laxo que contiene los precursores de los adipocitos, fibroblastos, células del sistema inmune, y otros tipos celulares [67]. En estudios recientes, se ha publicado el descubrimiento de un nuevo tipo de adipocito termogénico en el tejido adiposo blanco. Este nuevo tipo de adipocito se ha denominado adipocito pardo-marrón (también nombrado como beige), debido a su similitud con los adipocitos pardos, de hecho, los adipocitos de color beige expresan UCP-1 y muestran varias gotas citoplasmáticas de lípidos [68]. En un estudio realizado en nuestra unidad de apoyo a la investigación del hospital Universitario San Cecilio de Granada, acerca de la relación entre UCP-1 y la progresión del HGNA, se ha obtenido como resultado que en obesos mórbidos, la expresión de la proteína desacoplante UCP-1 en los tejidos adiposos visceral y subcutáneo, disminuye en asociación con la progresión de la EHGNA (y por tanto su termogénesis). Adicionalmente, la expresión de UCP-1 se correlaciona positivamente con el grado de hiperplasia únicamente en el tejido adiposo visceral (y no de hipertrofia). Debido a la relación de esta proteína con la termogénesis y el nivel del metabolismo basal, estos datos ofrecen nuevas perspectivas sobre la influencia del tejido adiposo en el origen y progresión de la EHGNA. Estos resultados han sido presentados en la semana de enfermedades digestivas organizada por la Sociedad Española de Patología Digestiva y celebrada en Bilbao en 2012, y están pendientes de publicación en revista científica [149].

Desde el punto de vista funcional, el tejido adiposo blanco es algo más que un depósito pasivo de lípidos. Durante las dos últimas décadas el paradigma de la función desempeñada por el tejido adiposo blanco ha evolucionado desde el almacenamiento pasivo de energía hasta la atribución de funciones endocrinas y termogénicas. El tejido adiposo blanco es en la actualidad considerado como un órgano endocrino, finamente regulado, que libera un gran número de citoquinas y hormonas (llamadas adipocitoquinas o adipoquinas) con efecto sobre la homeostasis energética, el metabolismo glucídico y lipídico, la saciedad, la hemostasia y la presión sanguínea [69]. Adicionalmente, el descubrimiento de los adipocitos termogénicos en el tejido adiposo blanco postula que este órgano desempeña un papel relevante en el metabolismo basal y la termogénesis [68].

1.2.1.1 EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO COMO ÓRGANO SECRETOR

A) LEPTINA:

La leptina (del griego leptos, delgado, también llamada proteína Ob) es una hormona polipeptídica de 167 aminoácidos secretada principalmente por el tejido adiposo y en menor medida por el estómago, intestino, placenta y testículos [11, 64].

Esta proteína se descubrió precisamente analizando el defecto genético de los ratones ob/ob. Las mutaciones en el gen Ob murino (cuya expresión génica da lugar a la proteína Ob o leptina) ocasionan que los ratones portadores de la mutación (ratones ob/ob) carezcan de leptina sérica, manifestando una notable reducción de la sensación de saciedad, lo que los lleva a comer en exceso y a desarrollar obesidad grave asociada a otros problemas como hipotermia, menor actividad locomotora, inmunodepresión, hiperinsulinemia e infertilidad [76]. Posteriormente, diversos estudios [77, 78, 79] demostraron que la inyección diaria de leptina a ratones ob / ob reducía rápidamente la ingesta alimenticia, la masa corporal y el porcentaje de grasa corporal, manteniéndose el porcentaje de masa muscular. Además, la administración de leptina provocaba en estos ratones mayor gasto energético, restauración de la normoglucemia y de la función reproductiva, lo que confirmaba su papel como regulador de la ingesta y almacenamiento energético. Este hecho hizo plantear la hipótesis de que la obesidad podría deberse a una mutación en el gen Ob humano y, por tanto, la administración de leptina exógena podría ser la panacea en el tratamiento de la obesidad, sin embargo, esta idea se desvaneció al comprobar que la frecuencia de esta mutación en la población obesa es extraordinariamente baja y que la gran mayoría de los pacientes obesos presentan altos niveles de leptina sérica. Los escasos casos clínicos de humanos con deficiencia congénita de leptina se caracterizan por un fenotipo similar al hallado en los ratones ob/ob, caracterizado por obesidad grave, hiperfagia e hiperinsulinemia [64].

Los niveles séricos de leptina muestran un ritmo circadiano, de carácter pulsátil y periódico, con el nivel plasmático más alto entre 23:00 y 01:00 h [13]. Este ritmo circadiano está relacionado con los horarios de las comidas, porque un retraso de 6

horas en las comidas puede producir un cambio en el perfil de los niveles de leptina en plasma [13]. Este ritmo podría ser debido a la capacidad del tejido adiposo para almacenar grandes fracciones de leptina en compartimentos intracelulares, aunque la naturaleza de estos compartimentos intracelulares sigue siendo controvertida. Investigaciones recientes apuntan al retículo endoplásmico y su regulación hormonal interna de naturaleza todavía desconocida [11]. Los niveles circulantes de leptina se correlacionan intensamente con el índice de masa corporal y con cambios agudos en el estatus nutricional. La producción de leptina se incrementa durante la obesidad y alcanza niveles muy elevados en obesidad mórbida, disminuyendo sus niveles con la pérdida de peso, por lo que forma un papel relevante en la señalización del tejido adiposo [11, 63]. Un estudio demostró que existía una correlación lineal positiva ($R = 0,8$) entre los niveles circulantes de leptina y el total de la masa grasa corporal, que puede ser explicada por una mayor liberación de leptina procedente de grandes adipocitos en comparación con pequeños adipocitos [12]. La liberación de leptina por gramo de tejido adiposo es dos veces mayor en sujetos obesos que en sujetos delgados, y a nivel de adipocitos, la secreción de leptina es hasta siete veces mayor en los obesos que en sujetos delgados, debido a que el tamaño del adipocito suele estar aumentado unas 2-4 veces en las personas obesas [11, 63].

Desde el punto de vista funcional, es una hormona pleiotrópica, con múltiples acciones biológicas, y juega un papel esencial en la regulación de la ingesta alimenticia, el gasto energético, y la cantidad de tejido adiposo corporal [64]. En el contexto de la homeostasis energética, su principal función es “informar” sobre el nivel de las reservas corporales de grasa, por lo tanto leptina juega un papel importante en la regulación de la homeostasis energética, la función neuroendocrina y el metabolismo [64].

En el hipotálamo la leptina causa saciedad. En el hígado, la leptina inhibe la lipogénesis y la síntesis de glucosa, y estimula la beta oxidación y la sensibilidad a insulina mediante la regulación de la actividad de las células β pancreáticas. A pesar de estas acciones en hipotálamo e hígado, la obesidad está intensamente asociada con esteatosis hepática y resistencia a insulina. Este fenómeno es consecuencia del desarrollo de resistencia leptina en los órganos citados (incluyendo probablemente el tejido adiposo blanco) [64, 69].

- Señalización de la leptina:

La acción de la leptina es mediada por receptores específicos llamados Ob-R. En humanos se han caracterizado seis isoformas del receptor de leptina. Cinco de las isoformas son celulares y se localizan en la membrana plasmática. La unión de la leptina a estos receptores culmina en la activación de las rutas intracelulares de señalización JAK-STAT, MAPK y PI3K [11].

Las vías de señalización de leptina juegan un papel muy diverso en las células mononucleares de la sangre periférica, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, así como otros procesos relacionados con la apoptosis [64].

El receptor de la leptina (Ob-R, también conocido como LEP-R, LR, DR, CD295, HuB219) fue aislado por primera vez en los plexos coroidales del ratón, y es miembro de la familia del receptor de la interleucina-6 y de los receptores de citoquinas de clase I [11]. El gen Ob-R, codifica en humanos cinco formas de corte y empalme alternativo del receptor de la leptina: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Re [11]. Ob-Rb es la forma larga del receptor de la leptina (también conocido como ObR-L) y tiene una larga región a nivel citoplasmático que contiene varios elementos necesarios para la transducción de señales [11]. Ob-Rb se encuentra en altas concentraciones (30-40% del total de Ob-R) en el cerebro y más concretamente en las áreas que regulan la alimentación, como los núcleos arcuato, dorsomedial y ventromedial del hipotálamo [11]. También se encuentra en bajas concentraciones (5-8% del total de Ob-R) en varios tejidos periféricos como el tejido adiposo, los ovarios, testículos, placenta, suprarrenales, el hígado, las células beta pancreáticas, pulmonares, yeyuno, las células mononucleares sanguíneas, los condrocitos articulares, el corazón y músculo esquelético [11].

En comparación con la forma larga del receptor (ObR-L), las formas cortas del receptor, ObR-S (Ob-Ra, Rc, Rd y Re) están presentes en concentraciones relativamente bajas en el hipotálamo, pero se expresan en mayor concentración y por doquier a nivel del plexo coroideo del cerebro, y en resto de tejidos periféricos mencionados [11].

Existe poca información sobre la implicación exacta de las diferentes isoformas celulares del receptor en la señalización de la leptina, pues sólo una de ellas (Ob-Rb) tiene los dominios necesarios para activar todas las rutas. De las cinco isoformas de los receptores cuatro de ellas polimerizan en un complejo de membrana y una (Ob-Re:

receptor soluble de leptina) se localiza en sangre. La función de este complejo posiblemente depende la composición de las isoformas [11]. La misión precisa del receptor soluble es incierta pero se ha sugerido que regula la biodisponibilidad de la leptina [11]. Todas estas isoformas están codificadas por el mismo gen (Ob-R) y se fabrican mediante procesamiento alternativo del ARN y, en el caso del receptor soluble, mediante modificación post-traducciona [11].

Al igual que otras clases de receptores de citoquinas, el receptor Ob-R carece de actividad tirosinkinasa intrínseca y por lo tanto requiere el reclutamiento de receptores activados asociados a quinasas de la familia Janus (JAK) [11]. Los activadores de la transcripción (STAT) y las señales de transducción activadas, procederán a dimerización y translocación al núcleo, donde se producirán determinadas respuestas genéticas. Una de las respuestas más representativas se produce en el hipotálamo, donde la activación de estas vías suprime la expresión génica orexigénica [11].

A continuación presentamos los mecanismos completos de señalización intracelular de leptina mediados por la isoforma Ob-Rb (también Ob-RL), ya que presenta todos los dominios implicados, a diferencia del resto. La unión de la leptina con Ob-Rb, a través de su región BOX-2, permite la autofosforilación y activación de JAK-2, que a su vez conduce a la fosforilación de los residuos altamente conservados de tirosina (Tyr) ubicados en el dominio intracelular de Ob-Rb (Tyr985, Tyr1077 y Tyr1138) [64]. Tyr985 fosforilado media la unión con dominio SRC Homólogo 2 (SH2)-dominio que contiene fosfatasa de inositol 5', dando lugar a la posterior activación de ERK (extracellular signal-regulated kinase). Tyr1077 fosforilado media la activación de STAT5. Tyr1138 fosforilado media tanto la activación de STAT3 como de STAT5. La activación de STAT3 conduce finalmente a aumento de la transcripción y la expresión de los supresores de la señalización de citoquinas SOCS -3, que actúan como feedback negativo atenuando la señalización de Ob-R, debido en parte a la unión SOCS-3 con Tyr985. La expresión de SOCS-3 puede ser inducida además por otras adipoquinas, como la resistina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y la interleucina IL-6 (amplificadores de la expresión de SOCS-3), aumentando aún más, tanto la resistencia hipotalámica a leptina como resistencia periférica a insulina. SOCS-3 desempeña por tanto un papel clave en la resistencia a leptina en la obesidad [64].

En la **figura 2** se muestra de forma gráfica los mecanismos de señalización descritos.

En los mecanismos de señalización del receptor de leptina también destaca la activación de fosfoinositido-3 quinasa (PI3 K). La vía de la PI3 K es necesaria no sólo para la regulación de la homeostasis energética en el hipotálamo por parte de la leptina, sino también por su acción en los tejidos periféricos [64]. En condiciones normales, leptina mejora la sensibilidad periférica a la insulina a través de la vía PI3 K en el hígado, al suprimir la producción hepática de glucosa. Al parecer este mecanismo aparece debido a que el homólogo de SCR 2, que es la proteína (SH2)-B, interactúa tanto con JAK-2 como con IRS 1 y 2 (Insulin Receptor Substrate 1 y 2) (**figura 2**) [64].

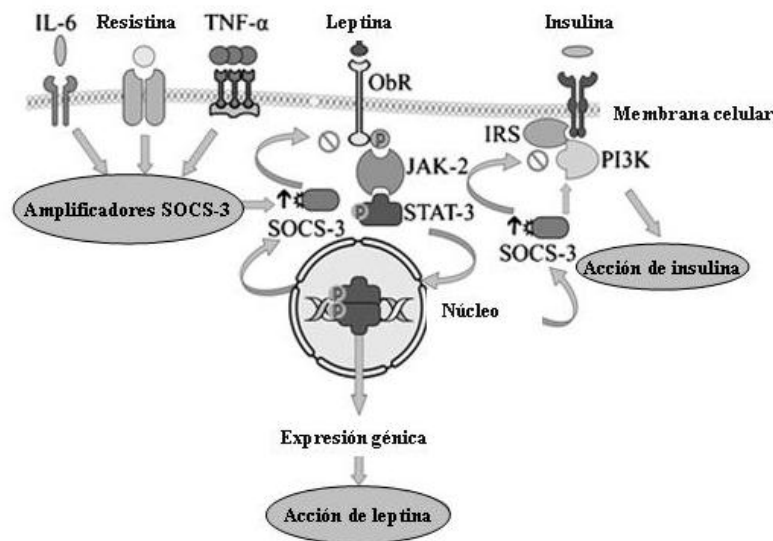


Figura 2. Mecanismos de señalización intracelular de leptina. Adaptado de [64].

- Resistencia a la leptina en la obesidad:

Aunque la administración de leptina recombinante en ratones ob / ob ha demostrado provocar una reversión rápida de la obesidad a través de una reducción en la ingesta calórica y un incremento en la tasa metabólica basal [77, 78, 79], la relevancia de este modelo genético para el tratamiento de la obesidad humana parece ser inexistente. En contraste con la deficiencia de leptina en ratones ob / ob, en la obesidad humana se aprecian altos niveles de leptina circulante en relación con la cantidad de tejido adiposo presente.

Por lo tanto, a pesar de la presencia de concentraciones elevadas de leptina, que deberían reducir la ingesta alimenticia e incrementar el metabolismo basal, las personas obesas parecen ser insensibles o resistentes a la leptina y siguen manteniendo los niveles de tejido adiposo corporal. Las bases moleculares de la resistencia a leptina en el hipotálamo son parcialmente conocidas e incluyen descensos de la expresión de los receptores celulares, incrementos de la expresión de SOCS-3 y disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica [64], sin embargo, en contraste con el hipotálamo, las bases moleculares de resistencia a leptina en hígado así como su implicación en el desarrollo de la EHNA durante la obesidad mórbida son desconocidos [64], y forman parte de nuestra línea de investigación.

B) ADIPONECTINA

La adiponectina es un polipéptido de 247-aminoácidos que circula en concentraciones séricas relativamente altas (5.30 $\mu\text{g} / \text{ml}$), por lo que es la adipoquina más abundante y específica de tejido adiposo. Los adipocitos sintetizan y liberan la adiponectina en una serie de complejos diferentes de orden superior que incluyen trímeros (bajo peso molecular), hexámeros (mediano peso molecular) y 18 meros (elevado peso molecular) [11, 14, 17] (**figura 3**).

Las diferentes isoformas estructurales de adiponectina tienen funciones biológicas diferentes. La isoforma metabólicamente más activa y sensibilizadora de insulina es la de elevado peso molecular. Es también la isoforma que más se reduce durante la obesidad. Las isoformas triméricas y hexaméricas parecen tener más influencia sobre el control de la saciedad, a nivel del hipotálamo [11, 14].

Aunque la adiponectina se consideraba hasta entonces secretada exclusivamente por adipocitos maduros, estudios más recientes han demostrado que los hepatocitos pueden producir adiponectina en menor proporción [15].

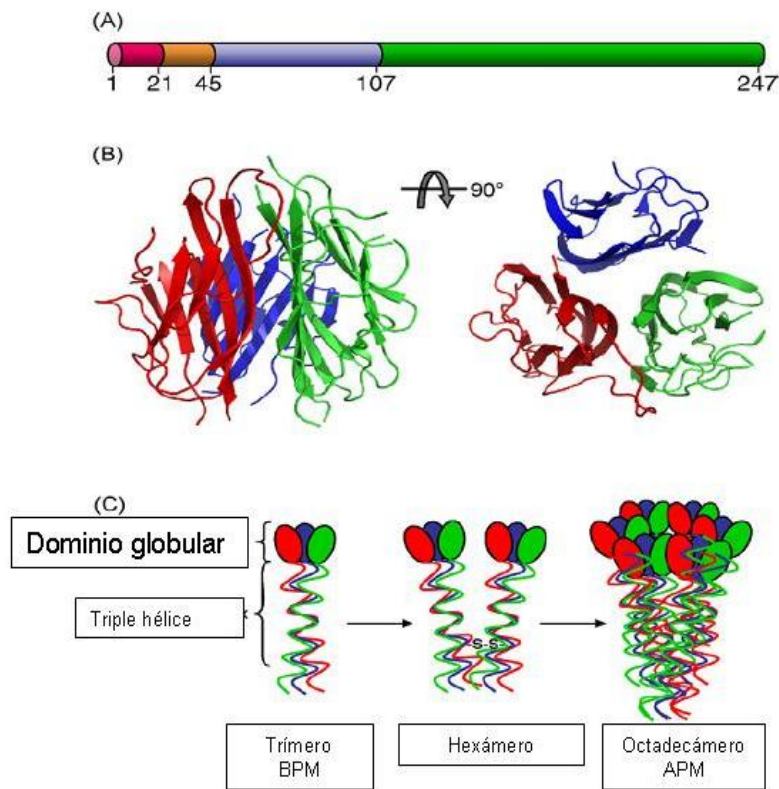


Figura 3. Adiponectina y su estructura. **(A)** dominio de la organización del protómero de adiponectina. **Rojo:** péptido señal, **naranja:** región variable; **azul:** región colágeno; **verde:** dominio globular. Los números indican los límites de la región. **(B)** estructura cristalóide que constituye un homotrímero dominio de adiponectina, conformado por la tríple hélice del dominio de colágeno **(C)** Representación de oligomerización trimérica, hexamérica y octadecamérica de la adiponectina. La ubicación del enlace disulfuro responsable de la asociación se visualiza en el hexámero. Adaptado de [11].

Los niveles de adiponectina varían de forma fisiológica según sexo, edad y origen étnico. En concreto, los niveles de adiponectina son mayores en las mujeres, a medida que incrementa la edad, y en las razas caucásicas en comparación con Asia o África [15].

A diferencia de otras adipoquinas, los niveles de adiponectina disminuyen de forma paradójica al incrementarse el volumen de tejido adiposo [16]. Los niveles de adiponectina sérica están relacionados de forma inversa con el índice de masa corporal (IMC), la cantidad grasa corporal, los niveles séricos de insulina en ayunas y de triglicéridos. Los mecanismos moleculares implicados en la reducción de adiponectina en pacientes obesos no son del todo conocidos, aunque varios estudios sugieren una relación con el desarrollo de resistencia a insulina en adipocitos [69].

La adiponectina es un polipéptido con potente actividad anti-inflamatoria, antidiabética, antiaterogénica y sensibilizadora de la insulina. Por tanto, niveles bajos de adiponectina sérica se ha relacionado con resistencia a insulina y síndrome metabólico, lipodistrofia, síndrome de ovario poliquístico, hipertensión arterial, aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular (ECV), incluyendo el síndrome coronario agudo [15]. En la configuración de la resistencia a insulina, cada vez hay más evidencia del papel hepatoprotector de la adiponectina en hígado graso no alcohólico.

A nivel hepático, además de incrementar la sensibilización a insulina, posee actividad antifibrogénica y anti-inflamatoria, debido a que inhibe la actividad de los macrófagos hepáticos (células de Kupffer), respectivamente [15]. El efecto de la adiponectina en las células endoteliales sinusoidales no ha sido investigado todavía. Es de destacar que la adiponectina tiene también un efecto antiapoptótico en hepatocitos [15].

El efecto hepatoprotector de la adiponectina y su acción insulinosensibilizante hacen que el estudio de su fisiología de la adiponectina a través de sus receptores hepáticos sea un atractivo potencial terapéutico en el hígado graso no alcohólico.

- Señalización de adiponectina:

Se han descrito dos receptores transmembrana de la adiponectina (AdipoR1, AdipoR2) que fueron identificados y descritos inicialmente en 2003 [60]. Estos receptores se expresan por doquier, pero AdipoR1 es más abundante en los músculos esqueléticos y AdipoR2 en el hígado [15]. Otro receptor adicional de membrana celular de la adiponectina es T-cadherina, pero carece de un dominio intracelular y su efecto en la señalización celular es desconocido [15].

En el hígado, a pesar de que la señalización postreceptor queda por esclarecer, AdipoR1 inhibe la gluconeogénesis y aumenta la sensibilidad a la insulina mediante la activación de la vía de la AMPK (proteinkinasa del 5-AMP cíclico), mientras que AdipoR2 aumenta la captación de glucosa por la activación de la vía PPAR- α [44].

- Regulación transcripcional y post-translacional de la adiponectina y sus receptores:

La transcripción genética de la adiponectina es estimulada por varios factores de transcripción implicados en adipogénesis, como PPAR, FoxO1 (Forkhead box protein O1), C / EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins) y SREBP, y es suprimido por la hipoxia, inflamación, represores de la transcripción, como NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) y CREB (cAMP response element-binding protein), y factores proinflamatorios como como TNF, IL-6 e IL-18 [17]. Alteraciones en la multimerización de la adiponectina están asociadas con niveles plasmáticos reducidos de adiponectina, que desembocan en obesidad y resistencia a la insulina. Varias proteínas reticuloendoplasmáticas asociadas como Ero1- $L\alpha$, ERp44 (Endoplasmic reticulum resident protein 44) y DSBA-L han sido identificadas jugando funciones críticas en la regulación de la multimerización de la adiponectina y / o secreción, y podrían constituir posibles dianas terapéuticas para mejorar la sensibilidad a insulina y otros problemas asociados. La elucidación de los mecanismos que regulan la multimerización de la adiponectina e identificación de los reguladores adicionales en la biosíntesis de la adiponectina pueden dar lugar al descubrimiento de dianas terapéuticas prometedoras para el diagnóstico y tratamiento de la resistencia a la insulina y sus enfermedades asociadas [17].

Como ya ha sido mencionado, la isoforma γ de la familia PPAR se expresa en la última fase de la diferenciación de adipocitos y es considerado como un marcador específico de adipocitos maduros. Además, con un alto nivel de evidencia se confirma que PPAR γ es un regulador positivo de la expresión del gen de adiponectina y su expresión se reduce en adipocitos de individuos obesos [17]. Parece ser que hay varias vías de señalización, así como diversos factores de transcripción que convergen en PPAR γ durante la adipogénesis para asegurar la expresión del programa completo adipogénico, que incluye la producción de adipoquinas importantes, como la adiponectina. En consecuencia, los componentes proteicos de estas vías reguladoras de la actividad PPAR γ son objetivos adicionales en el desarrollo de terapias para el tratamiento de trastornos relacionados con la obesidad como la DM tipo 2 [17], de hecho es la diana molecular de los fármacos antidiabéticos TDZ.

A nivel hepático, adiposo y muscular, los niveles de receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2 están regulados en respuesta a cambios en las condiciones

nutricionales [61, 62], probablemente para modificar el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, sin embargo, hay datos contradictorios sobre esta teoría entre diferentes estudios en modelos de roedores [61, 62].

C) RESISTINA:

El péptido hormona resistina (o FIZZ3) es un factor de secreción producido en adipocitos y ha demostrado desempeñar un papel importante en la resistencia a la insulina inducida por la obesidad [11].

La resistina se expresa en los adipocitos de los roedores y los macrófagos de los seres humanos, y su producción se incrementa con la alimentación, la obesidad y la disminución de los ligandos de PPAR γ .

Los estudios que demuestran un papel causal de la resistina en la homeostasis de la glucosa se basan en modelos animales con alteraciones de los niveles de resistina sérica. En estos estudios la infusión o sobre-expresión de resistina conduce a la hiperglicemia, sobre todo por aumento de la producción de glucosa hepática [11]. Una de las vías moleculares que producen resistencia a insulina activada por resistina consiste en la amplificación de SOCS 3, que inhibe la unión IRS-PI3K (vía de señalización de insulina) [64].

La importancia de la acción de la resistina en los seres humanos es menos clara, ya que no todos los estudios informan acerca de un aumento en suero de la resistina en obesos con DM tipo 2 [11], sin embargo, hay que señalar que el genotipo - 420G / G de la región promotora de resistina, se ha asociado con elevada transcripción de genes resistina, con aumento de los niveles de suero de resistina, que conducen a obesidad y resistencia a la insulina [150].

A pesar del gran interés generado por el descubrimiento de resistina en 2001 [11], son escasos los conocimientos acerca las vías de señalización intracelular por la cual la resistina induce sus efectos metabólicos, a pesar de que la resistina es una hormona importante en la regulación de las vías metabólicas de varios tejidos y órganos, incluyendo el hipotálamo, los adipocitos y el hígado [11].

D) PROTEÍNA DE UNIÓN-4 DEL RETINOL

La proteína de unión-4 del retinol es una molécula que causa resistencia sistémica a insulina secundaria a la alteración de la señalización de la insulina en el músculo y los adipocitos, y que conduce a la activación de la gluconeogénesis en el hígado [11].

Varios estudios han demostrado evidencias de correlación intensa tanto en roedores como en personas obesas entre los niveles séricos de la proteína de unión 4 del retinol y el síndrome metabólico [11].

E) PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS DEL TEJIDO ADIPOSO

En los últimos años se ha evidenciado que la expansión del tejido adiposo blanco en la obesidad se asocia con un aumento de la infiltración de macrófagos [11, 70]. La activación de los macrófagos del tejido adiposo blanco juega un papel importante en la disfunción del tejido adiposo, RI, exceso de ácidos grasos en el torrente sanguíneo y deposición de grasa ectópica en el hígado. En individuos delgados y metabólicamente sanos los macrófagos del tejido adiposo blanco contribuyen a mantener la homeostasis del tejido y muestran un fenotipo M2, “activado alternativamente”. Sin embargo, durante la obesidad los macrófagos del tejido adiposo blanco incrementan en número y muestran un fenotipo M1 proinflamatorio, liberando TNF y iNOS [11, 70], especialmente en los depósitos viscerales del tejido adiposo blanco. Numerosos autores analizan la obesidad desde el punto de vista de una inflamación crónica de baja intensidad en el tejido adiposo [70].

Los mecanismos celulares responsables de este reclutamiento de macrófagos siguen siendo desconocidos, y entre ellos destaca la proteína quemoatrayente de monocitos 1 (MCP-1), el factor inhibitorio de macrófagos y las células grasas en situación de necrosis, todas liberadas tanto a nivel local como desde los monocitos del torrente sanguíneo [83].

F) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

La fracción de macrófagos del estroma vascular es la principal fuente de producción de TNF en el tejido adiposo. El aumento de los niveles de esta citoquina en la obesidad se debe al aumento de la infiltración del tejido adiposo por parte de los macrófagos citados [11]. TNF fue el primer factor sugerido para representar un vínculo entre la obesidad, la inflamación y la diabetes [11]. El mecanismo propuesto por el cual TNF α produce resistencia a insulina se basa en la inhibición de la vía de señalización de insulina (IRS-PI3K) a través de la amplificación de la expresión de SOCS3, al igual que resistina [11, 64].

G) INTERLEUQUINA 6

Los niveles plasmáticos de IL-6 se incrementan en la diabetes tipo 2 y presentan una correlación positiva con el volumen de tejido adiposo y las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres [11]. La mayoría de IL-6 producida por el tejido adiposo proviene de las células de la fracción vascular estromal. En los adipocitos y hepatocitos se ha demostrado que la IL-6 inhibe la vía de señalización de insulina (IRS-PI3K) a través de la amplificación de la expresión de SOCS3, al igual que resistina y TNF α [11].

1.2.1.2 ADAPTACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN LA OBESIDAD

La obesidad se caracteriza por un gran incremento de tejido adiposo blanco resultante de la necesidad de almacenar el superávit energético procedente de la ingesta. Este proceso se acompaña de alteraciones funcionales y morfológicas con un profundo impacto en el síndrome metabólico y la incidencia de HGNA [83, 86].

La primera adaptación del tejido adiposo en los adultos para evitar lipotoxicidad general a partir de la sobrealimentación crónica es la ampliación de los adipocitos

(hipertrofia), seguida por un mecanismo de compensación a largo plazo, que incluye la replicación de células grasas (hiperplasia). En la obesidad infantil el mecanismo de adaptación del tejido adiposo predominante es la hiperplasia [83].

La expansión del tejido adiposo en la obesidad conduce a un incremento de infiltración de macrófagos, que producen citoquinas pro-inflamatorias como el TNF e IL-6. La activación de vías inflamatorias se acompaña de una mayor liberación de ácidos grasos libres y conduce a la secreción alterada en el adipocito de leptina, resistina, adiponectina y RBP4 (Retinol Binding Protein 4). A nivel sistémico, la secreción alterada de adipoquinas y proteínas inflamatorias (TNF α , IL-6) puede conducir a una mayor ingesta - reducción del gasto energético mediados por el hipotálamo (resistencia hipotalámica a leptina que produce falta de saciedad); provoca a nivel del músculo resistencia a insulina y activación de vías inflamatorias que conducen a una reducción en el consumo de glucosa - β -oxidación de ácidos grasos; y a nivel hepático provoca acúmulo de triglicéridos que conducen al desarrollo de la EHGNA, resistencia hepática a insulina y activación de vías inflamatorias que conducen a un incremento de glucólisis-gluconeogénesis incrementándose los niveles plasmáticos de glucosa. Todos estos mecanismos desembocan en una resistencia sistémica a insulina, esencial en el desarrollo del síndrome metabólico [83, 86]. Todas estas acciones se resumen en la **figura 4**.

Las rutas moleculares de señalización intracelular con más relevancia sobre el desarrollo de resistencia a insulina en el tejido adiposo de obesos, algunas descritas en el apartado anterior, son [83, 86]:

- La vía del inhibidor de la quinasa κ B / factor nuclear κ B, en la cual los ácidos grasos libres (AGL) activan receptores Toll-like (TLR) -4 en los macrófagos y los adipocitos.
- La vía c-Jun N-terminal quinasa / activador de la proteína 1, en la cual se inhibe la señalización de insulina en presencia del TNF α .
- La vía CREB-H (cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H), que promueve la secreción de proteínas reactantes de fase aguda como la proteína C-reactiva, y la generación de especies reactivas de oxígeno.
- La vía de JAK (Janus Kinase)/ STAT (signal transducer and activator of transcription).

Todas estas vías se activan por medio de un exceso de ácidos grasos, especies reactivas del oxígeno, el estrés del retículo endoplásmico y los lípidos de subproductos tales como diacilglicerol y ceramida; y son inhibidas por la adiponectina y las TZD [83].

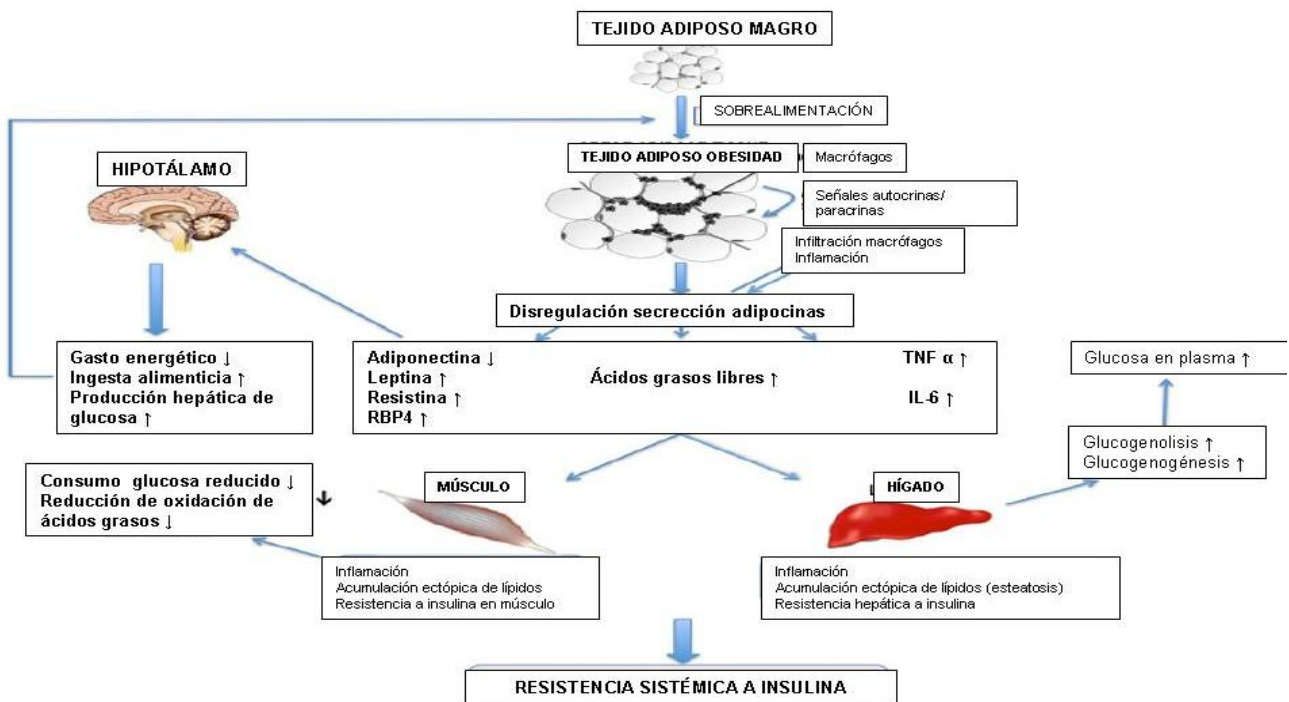


Figura 4. Cambios inducidos durante la obesidad en la secreción de adipocinas que propician el desarrollo de resistencia sistémica a insulina. Adaptado de [11].

1.3 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) abarca un espectro de enfermedades que van desde la esteatosis simple (hígado graso no alcohólico: HGNA), esteatohepatitis (EHNA) hasta la cirrosis y el hepatocarcinoma en última instancia. El término HGNA fue acuñado por primera vez por Ludwig et al. en 1980 [18] y su definición actual requiere que (1) exista evidencia de esteatosis hepática, ya sea mediante técnicas de imagen radiológicas o por la histología y (2) no existen causas secundarias que justifiquen la acumulación de grasa hepática, como el consumo significativo de alcohol, uso de medicación esteatogénica o trastornos hereditarios [120, 139]. La EHGNA se clasifica histológicamente en HGNA y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). El HGNA se define como la presencia de esteatosis hepática sin evidencia de daño hepatocelular en forma de balonización hepatocitaria. EHNA se define como la presencia de esteatosis e inflamación hepática con lesión de hepatocitos (balonización) con o sin fibrosis.

El hígado graso no alcohólico está intensamente relacionado con la obesidad y resistencia a la insulina, incluso es reconocido como la manifestación hepática del síndrome metabólico. La prevalencia de Hígado graso no alcohólico ha aumentado rápidamente en paralelo con el dramático incremento de la obesidad y la diabetes tipo 2, por lo que representa la causa más común de enfermedad hepática en el mundo occidental [120, 139].

1.3.1 ETIOLOGÍA

En la gran mayoría de los casos, el HGNA surge en asociación con una o más patologías del síndrome metabólico, como la resistencia a la insulina (intolerancia a la glucosa o la diabetes) la obesidad central, la dislipidemia y la hipertensión [88, 120, 139].

Es importante realizar una historia clínica detallada, en la que se excluirá la ingesta etílica mayor a 20 gramos/día y otras causas de esteatosis que deben ser consideradas como causas nutricionales (pérdida rápida de peso, nutrición parenteral total, trastornos metabólicos raros, esteatosis inducida por fármacos como glucocorticoides, estrógenos, amiodarona y antirretrovirales de gran actividad (TARGA)) [120, 139]. La esteatosis se asocia frecuentemente con la hepatitis C, en particular con el virus genotipo 3, y los trastornos endocrinos, tales como el síndrome de ovario poliquístico (SOP) [19], hipopituitarismo [20] e hipotiroidismo. En la **tabla 5** se recogen causas comunes de esteatosis hepática secundaria:

Esteatosis macrovesicular
Consumo excesivo de alcohol
Hepatitis C (genotipo 3)
Enfermedad de Wilson
Lipodistrofia
Inanición
Nutrición parenteral
Abetalipoproteinemia
Fármacos (amiodarona, metotrexato, tamoxifeno, corticoesteroides)
Esteatosis microvesicular
Síndrome de Reye
Fármacos (ácido valproico, antirretrovirales)
Durante el embarazo
Síndrome HELLP
Errores del metabolismo congénitos (deficiencia de LCAT, enfermedad de los depósitos de ésteres de colesterol, enfermedad de Wolman)

Tabla 5. Causas comunes de esteatosis hepática secundaria. Adaptado de [120, 139].

1.3.2 EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de HGNA que se sitúa entre el 20% y el 30% en los adultos occidentales y hasta en más del 90% de los obesos mórbidos [21].

La EHNA, como espectro clínico más importante del hígado graso no alcohólico, es menos común, y presenta una prevalencia estimada del 2-3% en la población general y un 16 - 37% en los obesos mórbidos [21], siendo aún mayor en presencia de parámetros clínicos asociados al síndrome metabólico, lo que constituye un motivo de preocupación en estos pacientes. La prevalencia de cirrosis asociada a EHNA en la población general es actualmente desconocida, pero se estima que hasta un 5% de pacientes obesos mórbidos pueden presentar cirrosis asociada a EHNA [120, 139].

El HGNA afecta actualmente al 3% de la población pediátrica general, presentándose hasta en un 53% en los niños obesos con una repercusión importante en la progresión de la enfermedad y en el pronóstico [22]. El HGNA puede estar presente hasta en 70% de pacientes con diabetes tipo 2 [23]. La DM 2 es también un factor de riesgo para desarrollo de fibrosis en pacientes con hígado graso no alcohólico [23, 27], y además es un factor de incremento de mortalidad, ya que en un estudio de cohorte, pacientes con HGNA y DM 2 tuvieron una mayor mortalidad global que los pacientes no diabéticos con HGNA [23].

La edad, el género y la etnia también se asocian con diferencias en la prevalencia esta enfermedad [120, 121, 139]. Numerosos estudios han demostrado que la prevalencia de HGNA aumenta con la edad. La probabilidad de progresión de la enfermedad a fibrosis avanzada o la mortalidad se incrementa en pacientes ancianos con hígado graso no alcohólico [120, 121, 139]. Numerosos estudios recientes han demostrado que el género masculino es un factor de riesgo para la enfermedad de hígado graso [120, 121, 139].

La enfermedad del hígado graso no alcohólico afecta a todos los grupos étnicos, aunque la prevalencia parece ser mayor en los hispanos y los europeo-americanos en comparación con los afros - estadounidenses. Esta diferencia se mantiene después de controlar los factores de obesidad y resistencia a insulina, y puede estar relacionada con las diferencias en el metabolismo lipídico que presentan las diferentes etnias [21].

Patologías como el hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipogonadismo, síndrome de apnea obstructiva del sueño, el síndrome de ovario poliquístico, o pacientes con

resección pancreato-duodenal, son factores de riesgo independientes de la obesidad para el desarrollo de HGNA, y por tanto su prevalencia está incrementada en estas patologías [120, 139].

1.3.3 FISIOPATOLOGÍA

La esteatosis hepática aparece cuando la velocidad de entrada de AG (absorción y síntesis con subsiguiente esterificación a TG) es mayor que la velocidad de salida (oxidación y secreción). Los posibles mecanismos fisiopatológicos generales que propician la formación de esteatosis hepática son los siguientes [83, 114]:

(1) Disminución de la beta-oxidación de ácidos grasos en la mitocondria hepática.

(2) Aumento de la síntesis endógena de ácidos grasos o de la entrada de ácidos grasos en el hígado.

(3) Deficiente incorporación o exportación de triglicéridos por proteínas de muy baja densidad (VLDL).

La teoría del doble impacto publicada por Day [24] establece la secuencia hígado sano a esteatohepatitis en la que la peroxidación lipídica juega un papel muy importante. En el “primer impacto”, la resistencia a la insulina desempeña un papel fundamental en el depósito de ácidos grasos y triglicéridos en el hepatocito, lo que daría lugar a la esteatosis, la cual puede permanecer estable durante muchos años. La relación temporal entre HGNA y RI [25] es controvertida, sin embargo, la RI y la hiperinsulinemia posterior parecen jugar un papel importante tanto en el desarrollo de hígado graso como la progresión del hígado graso a EHNA [26]. La gravedad de la RI se correlaciona con la gravedad de la EHNA, y su manifestación clínica (DM 2) es más frecuente en los pacientes con EHNA y sobre todo aquellos que evolucionan a cirrosis [27].

Muchos de los pacientes con esteatosis no progresan a necroinflamación o fibrosis hepática. Esto sugiere que, además de la propia esteatosis (el primer “impacto”), el desarrollo de la esteatohepatitis requiere la presencia de algún otro factor (segundo “impacto”) en el que intervendrían factores adicionales que condicionarían la aparición de estrés oxidativo y peroxidación lipídica, que en algunos pacientes ocasionarían inflamación, necrosis y lesiones típicas de la esteatohepatitis [24]. Este mecanismo está

asociado a un incremento en la expresión de CYP2E1 (citocromo P450 2E1) demostrado en pacientes y modelos animales de EHNA [24]. CYP2E1 puede generar radicales libres de forma endógena que a nivel hepático pueden producir cuerpos cetónicos, aldehídos y N-nitrosaminas (peroxidación lipídica). Los posibles mediadores de la inducción de CYP2E1 en el HGNA son un alto contenido de grasa en la dieta entre los pacientes en los que la esteatosis hepática está relacionada con la obesidad, aunque también una rápida pérdida de peso causada por la dieta, o la realización de un bypass intestinal, el estrés quirúrgico, el consumo de alcohol y la diabetes. Todos estos factores se asocian con un aumento en la concentración de ácidos grasos y / o cetonas en la sangre y por tanto rápida acumulación en gran cantidad en el hígado. Además del CYP2E1, un aumento en la concentración intrahepática de ácidos grasos libres puede proporcionar una mayor fuente de estrés oxidativo a través de β -oxidación peroxisomal. Esta vía es importante en las condiciones de sobrecarga de sustrato o cuando la β -oxidación mitocondrial es inhibida. A diferencia de su homóloga mitocondrial, la β -oxidación peroxisomal produce peróxido de hidrógeno que, en presencia de hierro libre, se convierte en un gran reactivo radical hidroxilo. La peroxidación de lípidos a nivel de la membrana celular da lugar a productos aldehído: 4-hidroxinonenal y malondialdehído (MDA), son capaces de activar las células estrelladas hepáticas, que son las principales productoras de colágeno en el hígado, liberándose citoqueratinas para formar cuerpos de Mallory-Weiss, también MDA es quimiotáctica para neutrófilos y puede contribuir a la inflamación mediante la activación de NF- κ B (nuclear factor Kappa-Beta), un factor de transcripción que regula la expresión de varias citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión como TNF- α , IL-8, moléculas de adhesión intercelulares y selectina-E. Este proceso descrito puede causar necrosis hepatocelular y megamitocondrias [24].

1.3.3.1 FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON ADIPOQUINAS Y SUS RECEPTORES HEPÁTICOS

Una compleja interacción entre adipoquinas producidas por los adipocitos y / o células inflamatorias que infiltran tejido adiposo parecen jugar un papel crucial en la patogénesis de hígado graso no alcohólico, ya que pueden alterar la sensibilidad a la insulina en determinados órganos como el hígado [11].

Desde el punto de vista fisiológico, algunas adipoquinas, como la adiponectina y la leptina (en individuos sanos), pueden influir positivamente en la sensibilidad a la insulina además de presentar carácter antiinflamatorio, mientras que otras, como el TNF- α y resistina, pueden influir negativamente en este mecanismo (antagonistas de la insulina) [11].

A) SEÑALIZACIÓN DE ADIPONECTINA

Diversos estudios clínicos han demostrado que los niveles séricos de adiponectina son menores en los adultos y niños con EHNA y SM que en controles aparentemente sanos, y se correlacionan de forma inversamente proporcional con el contenido de grasa hepática y RI [16]. También se ha demostrado que los niveles de adiponectina sérica son menores en pacientes con EHNA que en los pacientes con HGNA [16]. Por tanto, la adiponectina sérica se correlaciona con la gravedad de la histología hepática. También la expresión de adiponectina hepática es más reducida en pacientes con obesidad mórbida y EHNA en comparación con aquellos pacientes con HGNA y se asocia de forma inversamente proporcional con un mayor grado de inflamación hepática y fibrosis [28].

Hay datos contradictorios respecto a la expresión de los receptores AdipoR1 y AdipoR2 en HGNA. Por una parte, En un estudio se describió que los niveles de expresión génica del receptor AdipoR2 hepático disminuían en pacientes con EHNA, en comparación con los controles [29]. Sin embargo, otros estudios no han encontrado variaciones en la expresión génica de estos receptores en la progresión del HGNA [30],

o por lo contrario se ha descrito que el nivel de expresión génica de dichos receptores aumenta [31] o aumenta sólo la isoforma AdipoR2 [32, 33].

Diversos factores de confusión (es decir, diferencias en el IMC o en el nivel de resistencia a insulina entre los grupos) puede explicar, al menos en parte, estas discrepancias entre diferentes estudios. Por lo tanto, las pruebas adicionales son necesarias para dilucidar si las diferencias en el nivel de los receptores podrían interaccionar en la patogenia de la EHNA. También diferencias metodológicas a la hora de cuantificar los niveles de mRNA a la hora de valorar el grado de expresión génica de estos receptores podría justificar estas diferencias, al no utilizar genes de normalización (housekeeping) adecuados que puedan no ser exclusivos para la valoración de la expresión génica en hepatocito.

Dos polimorfismos de nucleótido único (PNU) (45GT y 276GT) asociados con el gen de la adiponectina han sido estudiados recientemente. Estos polimorfismos se han asociado con EHNA y predicen la gravedad de la enfermedad hepática en un estudio [34]. Estos resultados han sido sólo parcialmente confirmados en otros dos estudios realizados en China [35] y en la población japonesa [36].

También se ha publicado que un PNU en el gen PPAR- γ está asociado con hígado graso no alcohólico, posiblemente a través de la vía de señalización para adiponectina [37].

Se ha demostrado recientemente que el polimorfismo Rs7903146C PNU / T de la transcripción 7 predispone al hígado graso no alcohólico. Cabe destacar que el mismo polimorfismo puede predisponer a esta patología a través de la modulación de la función de las células β y la modulación de los niveles de lípidos, descrito en la dislipidemia familiar [38].

Dos artículos recientes estudiaron la actividad del promotor de los receptores de adiponectina en relación con vías de estrés oxidativo en modelos celulares. El promotor de AdipoR1 se activa a través de FOXO1 [56], en conexión con las vías inflamatorias, mientras que el promotor de AdipoR2 es reprimido por ATF3 [42], que muestra una conexión con las vías de estrés oxidativo endocitoplásmático. El estudio de esta conexión es uno de los objetivos de nuestra tesis.

El efecto hepatoprotector de la adiponectina y su acción insulinosensibilizante hacen que la adiponectina y el estudio de su fisiología a través de sus receptores hepáticos sean un atractivo potencial terapéutico en el hígado graso no alcohólico. La

administración de diversos agentes terapéuticos y / o modificaciones del estilo de vida pueden provocar un aumento en la producción de adiponectina (**figura 5**) [15].

Hay tres principales estrategias que parecen actuar, al menos parcialmente, a través de la regulación positiva de la adiponectina en hígado graso no alcohólico:

1. Pérdida de peso / ejercicio.
2. Sensibilizadores a la insulina.
3. Agentes reductores de lípidos.

Los cambios en los niveles sanguíneos de adiponectina en los ensayos controlados aleatorios (ECA) que evaluaron el papel de las intervenciones terapéuticas en el HGNA se resumen en el cuadro que figura a continuación [15].

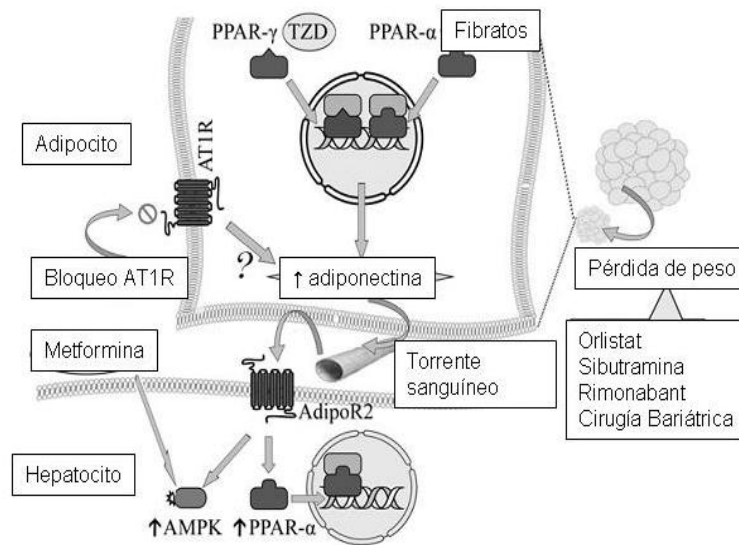


Figura 5. Las estrategias terapéuticas para la regularización de adiponectina o interacción con la señalización de adiponectina en el HGNA. Orlistat, sibutramina, rimonabant y la cirugía bariátrica están relacionadas con regulación al alza de adiponectina en los adipocitos, principalmente por la disminución de la masa grasa. TZD (en la actualidad pioglitazona y rosiglitazona) son agonistas PPAR- γ que posiblemente incrementen la transcripción del gen de adiponectina. Los fibratos son agonistas PPAR pan-(α -, γ -, δ -) fundamentalmente PPAR- α - y también tienen un impacto en la activación de genes de transcripción relacionados con la adiponectina. La metformina actúa vía activación de AMPK, al igual que la adiponectina. Los bloqueadores de AT1R bloquean AT1R y regular al alza la secreción de adiponectina, pero el mecanismo intracelular por el que se lleva a cabo este procedimiento queda por esclarecer. La secuencia de TZD-adiponectina es de especial interés, ya que PPAR- γ y PPAR α -son sucesivamente activados tanto en los adipocitos como en hepatocitos, respectivamente. AMPK, 5-AMP proteínquinasa activada; AT1R, angiotensina II tipo 1 receptor, PPAR, receptor activado de la proliferación de peroxisomas; TZD, tiazolidinedionas. Adaptado de [15].

B) SEÑALIZACIÓN DE LEPTINA:

En el hígado, la leptina suprime la síntesis de glucosa y la lipogénesis de novo, mientras que induce la oxidación de ácidos grasos. También induce la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético, evitando así la acumulación de lípidos en los tejidos no adiposos y aumentando la sensibilidad a la insulina [64, 69]. Se cree que la acción citada está regulada tanto directa como indirectamente, a través del sistema nervioso central [69]. Por el contrario, la hiperleptinemia se ha implicado en la patogénesis de la EHGNA [64, 69] que incluye como espectro más grave la EHNA, y sus concentraciones séricas se correlacionan con la esteatosis hepática, la inflamación, los índices antropométricos, el perfil lipídico, los niveles de insulina, de glucosa, y de alanina aminotransferasa (ALT) [64].

Existe evidencia acerca del papel profibrogénico de la leptina, por lo que desempeña un papel clave en la fibrosis hepática. La leptina actúa directamente en la fibrogénesis hepática por medio de la estimulación del inhibidor de la metaloproteinasas (TIMP) -1 producido en las células estrelladas hepáticas activadas (CEH) [80]. Este proceso parece estar mediado por la vía JAK / STAT a través de la activación del receptor Ob-Rb y p38 dependiente de H_2O_2 , y las vías ERK-1/2 a través de la activación de JAK [80]. La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa es también un mediador fundamental en las acciones proliferativa, fibrogénica y proinflamatoria de la leptina sobre las CEH [64]. Además, leptina previene la apoptosis y modula todas las características del fenotipo de las CEH al modo profibrogénico. Una vez activadas, las CEH contribuyen a la mayor expresión de leptina, por lo que se establece un círculo vicioso [64, 69]. La leptina también promueve la fibrogénesis hepática a través de la regulación positiva de factor de TGF- β en células de Kupffer y del endotelio sinusoidal [64].

Existen datos recientes publicados acerca del papel de la leptina en la oncogénesis del hígado. Los estudios in vitro han demostrado que leptina promueve la proliferación y migración celular en líneas celulares de hepatoma y este mecanismo parece ser esencial para la progresión desde la EHNA, a través de la fibrosis, hacia el carcinoma hepatocelular (CHC) en pacientes obesos [64, 81]. Leptina aumenta la proliferación, la migración y la invasión de células HCC humanas [64, 81]. El receptor

Ob-R aparece elevadamente expresado en el CHC humano y se correlaciona positivamente con la angiogénesis [64, 81]. La neovascularización mediada por leptina en coordinación con el factor de crecimiento endotelial vascular juega un papel importante no sólo en el desarrollo de la fibrosis hepática, sino también en la carcinogénesis relacionada con EHNA [64, 81]. Posiblemente el aumento de la incidencia de obesidad y HGNA dará lugar a un importante aumento en la incidencia del carcinoma hepatocelular en las próximas décadas [82].

Una vez descritos los mecanismos de señalización intracelular de la leptina en el apartado anterior, así como el papel en el metabolismo de glucosa y lípidos, y en la fibrogénesis y oncogénesis a nivel hepatocelular, se propone la hipótesis de que la resistencia hepática a la leptina puede variar en función de los diferentes tipos de células del hígado y de la progresión del hígado graso no alcohólico [64]. La acción de la leptina inicialmente puede impedir la esteatosis hepática, y su efecto sobre las células de Kupffer, células quiescentes sinusoidales y CEH es mínima. Sin embargo, la hiperleptinemia prolongada en los estados de resistencia a la leptina (es decir, en las formas comunes de la obesidad) en última instancia, puede dar lugar a:

- 1) Sobreexpresión de SOCS-3, lo que agrava tanto la resistencia a la propia leptina y la resistencia a insulina en los hepatocitos, que en última instancia es mayor que el efecto beneficioso de la leptina, dando lugar a la esteatosis hepática [64].
- 2) La activación de las células estrelladas hepáticas (CEH), de Kupffer, y del endotelio sinusoidal, que muestran una mínima o ninguna resistencia a la leptina, y desencadenan la cascada proinflamatoria, profibrogénica y tumorigénica asociada a la progresión del HGNA [64].

Además de la leptina, y como se ha comentado anteriormente, SOCS-3 puede ser inducida por adipoquinas, incluyendo la resistina, TNF- α e IL-6 [45, 64]. Todas ellas podrían actuar como amplificadores de la expresión de SOCS -3, aumentando aún más tanto la resistencia a la leptina como la RI actuando como agravante en el HGNA.

Huang et al. [145] sugirieron que el incremento de liberación de leptina en individuos con HGNA se acompaña de una disminución de la concentración sanguínea de la forma soluble de Ob-R (Ob-Re), lo que una podría dar lugar a un aumento de resistencia a nivel los tejidos periféricos a la acción de la leptina. Profundizando más en esta hipótesis, los niveles de Ob-Re en plasma podrían reflejar la cantidad de Ob-R expresada por los tejidos. La disminución de los niveles séricos de Ob-Re en el HGNA sugiere un aumento de la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la leptina, debido a la disminución de la expresión y secreción de Ob-R en éstos [145].

La mayoría de los estudios que relacionan a la leptina y su señalización con la EHGNA son observacionales y transversales, y actualmente no existe un estudio que realice una evaluación a largo plazo de los niveles séricos de leptina en asociación con la histología hepática en el seguimiento de los mismos individuos. Además, hay una heterogeneidad en los grupos control en los diferentes estudios: aparente reclutamiento de individuos sanos o pacientes con hígado graso simple, o diferencias en RI, IMC, sexo o raza, por lo tanto, serían necesarios estudios que incluyan poblaciones mayores y más homogéneas, así como controles cuidadosamente escogidos para obtener resultados y conclusiones más definitivas y concretas [64].

1.3.3.2 FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON SEÑALIZACIÓN DE INSULINA: MECANISMOS DE RESISTENCIA A INSULINA

En diversos estudios epidemiológicos, DM2 se asocia con un riesgo 2 a 4 veces superior de enfermedad hepática grave [83, 89], cirrosis y carcinoma hepatocelular [83, 90]. En los pacientes con HGNA, DM2 se asocia a mayor resistencia hepática y del tejido adiposo a insulina [91] y a peores índices de actividad del HGNA y de fibrosis hepática [83, 89, 91].

Los pacientes con HGNA pueden beneficiarse de la detección precoz de la diabetes tipo 2 para permitir la intervención oportuna y evitar complicaciones relacionadas con el hígado y la diabetes [83].

En pacientes obesos con HGNA se produce un deterioro abrupto en la sensibilidad del músculo a la insulina, que es proporcional al grado de resistencia a la insulina del tejido adiposo, lo que indica un defecto primario en el tejido adiposo en lugar del músculo esquelético [83].

Se ha demostrado que la elevación sostenida en plasma de AGL altera la secreción de insulina por parte de las células B pancreáticas en sujetos no diabéticos, genéticamente predispuestos a desarrollar DM tipo 2 [88].

El exceso de ácidos grasos no sólo induce la resistencia hepática a la insulina, sino que también perjudica el aclaramiento de insulina tanto en estudios in vitro como in vivo [59, 103, 104]. Esto conlleva a la hiperinsulinemia típica de los pacientes con resistencia a la insulina y de los pacientes con HGNA [54, 70, 72, 105, 106].

En el HGNA, la reducción del aclaramiento de insulina es proporcional a la cantidad de grasa hepática [107].

Desde el punto de vista fisiológico, la unión de la insulina a su receptor de membrana provoca la activación, mediante fosforilación, de dos proteínas conocidas como IRS1 e IRS2 que a su vez activan determinadas vías intracelulares de transducción que culminan en una precisa modulación del metabolismo glucídico y lipídico [167]. En un hígado sano la insulina estimula el incremento de la importación de glucosa (a través de la proteína de membrana GLUT4), inhibe la producción hepática de glucosa, restaura los depósitos de glucógeno y estimula la síntesis de ácidos grasos, permitiendo la exportación de triglicéridos como VLDL [167].

Los mecanismos moleculares de resistencia a insulina inducidos por el hepatocito están relacionados con el contenido de diacilglicerol hepático (DAG), que se incrementa debido a la entrada de exceso de ácidos grasos libres procedentes de la circulación o el aumento de la lipogénesis de novo, siendo una consecuencia de la resistencia a la insulina sistémica. Esta situación se exacerba por el deterioro de la β -oxidación de AGL, y cuando los 3 mecanismos citados actúan conjuntamente, emerge un círculo vicioso de resistencia hepática a la insulina. Estos mecanismos provocan un fallo en la fosforilación del receptor de insulina que a su vez no puede fosforilar IRS-2: insulin receptor substrate 2. La consecuencia fisiopatológica consiste en la disminución de síntesis de glucógeno debido a que GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) no está fosforilada, y el fallo en la fosforilación de FOXO (Forkhead box O) que participa en mecanismos de regulación de translocación nuclear, provocan la regulación al alza de PEPCCK (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase), que a su vez aumenta la exportación de

la glucosa por el transportador GLUT2, agravando aún más la resistencia a la insulina hepática y sistémica [113]. Todos estos mecanismos se visualizan en la figura 6.

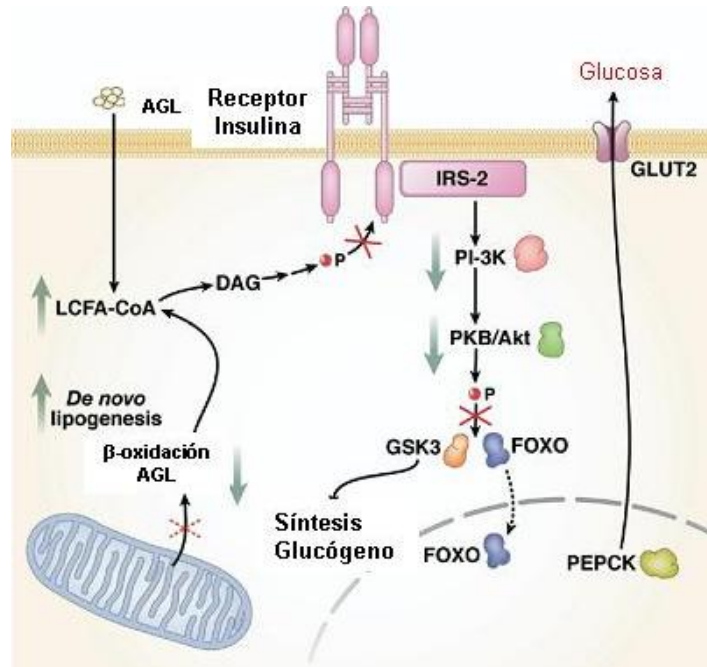


Figura 6: mecanismos moleculares de resistencia hepática a insulina. Adaptado de [113].

Otro de los mecanismos de resistencia a insulina consiste en la activación de la proteína quinasa C por parte de los ácidos grasos y sus metabolitos. La proteína quinasa C cataliza la fosforilación de serina / treonina de IRS -1 y 2, y provoca la sobreexpresión hepática del citocromo P450 2E1 en pacientes con EHNA, generando estrés oxidativo asociado a la alteración del receptor de insulina [119].

Uno de los principales mecanismos que contribuyen a la RI en la progresión a inflamación hepática es el estímulo crónico de la enzima IKK- β (inhibitor kappa beta kinase). El estímulo crónico de la enzima IKK- β promueve la activación de un factor nuclear kappa-beta (NF- $\kappa\beta$), que es un factor de transcripción relacionado con la producción de citoquinas inflamatorias, fundamentalmente con el TNF- α , que a su vez provoca cambios en la fosforilación de la serina en lugar de tirosina en IRS-1,

alterando la señal intracelular ocasionada por el acoplamiento de la insulina a su receptor [114, 119]. Normalmente, el NF- κ B se encuentra de forma inactiva en el citoplasma debido a que esta unido a la proteína IKK. Las concentraciones elevadas de ácidos grasos y la formación de radicales libres de oxígeno tienen la capacidad de activar la IKK-beta que desacopla al NF- κ B de la IKK, y por tanto queda libre para migrar al núcleo e iniciar procesos de transcripción, lo que da lugar a la formación de TNF- α . Dado que el TNF- α también activa la IKK- β se inicia un proceso de retroalimentación que perpetúa la resistencia a la insulina y contribuye a la patología del HGA [114, 119].

SOCS-1, que forma parte de una familia de proteínas cuya misión principal consiste en inhibir las vías de señalización de citoquinas y de la insulina, puede desempeñar un papel importante en la obesidad [133]. Además, SOCS1 se considera un gen candidato en la patogénesis de la diabetes tanto de tipo 1 y diabetes tipo 2 [133]. En ratones diabéticos y obesos, la expresión génica intrahepática de SOCS-1 está incrementada [134]. La sensibilidad hepática a la insulina y los niveles de IRS -2 desempeñan funciones centrales en la patogénesis del síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (DM2). En este contexto SOCS-3 disminuye la fosforilación de tirosina tanto de IRS-1 e IRS-2, mientras que SOCS-1 altera de forma selectiva la fosforilación de IRS-2 [138]. En estudios *in vivo* con ratones deficientes en SOCS1 se ha demostrado que se incrementa la expresión de IRS-2 y mejora la sensibilidad a insulina intrahepática [135, 136, 137, 145].

1.3.3.3 FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON EL METABOLISMO LIPÍDICO

En los seres humanos existe una estrecha relación entre el tejido adiposo y el metabolismo lipídico hepático debido a que los adipocitos suministran más de dos tercios de los ácidos grasos utilizados para la síntesis hepática de triglicéridos [92].

La velocidad de liberación de AGL en la circulación sistémica aumenta de forma directamente proporcional al incremento de la masa grasa en hombres y mujeres, de modo que la velocidad de liberación de AGL en relación a la masa grasa es mayor en los obesos que no obesos. Además, la expresión de genes de lipasa hepática y lipoproteína lipasa hepática son más altos en los sujetos obesos con EHNA que los sujetos sin EHNA, lo que sugiere que los AGL liberados de la lipólisis de TG circulantes también contribuyen a la acumulación de ácidos grasos libres a nivel hepático y por tanto a la esteatosis [114].

La expresión del gen que culmina en la síntesis de la proteína proteína de membrana FAT/CD36, que es un importante regulador de la absorción a nivel de tejidos de AGL del plasma, se incrementa en el hígado y músculo esquelético, pero disminuye en el tejido adiposo en sujetos obesos con HGNA en comparación con los sujetos obesos sin HGNA normal, lo que sugiere que las proteínas de membrana de transporte de AG redirigen la captación de AGL del plasma a partir de tejido adiposo hacia otros tejidos (**figura 7**). Por lo tanto, la suma de estos datos sugiere que las alteraciones en la actividad lipolítica del tejido adiposo, la lipólisis hepática regional de los triglicéridos circulantes y las proteínas tisulares de transporte de AGL (CD 36) están involucradas en la patogénesis de la esteatosis hepática o “primer impacto” en la fisiopatología de la EHGNA] y la acumulación de grasa ectópica [114].

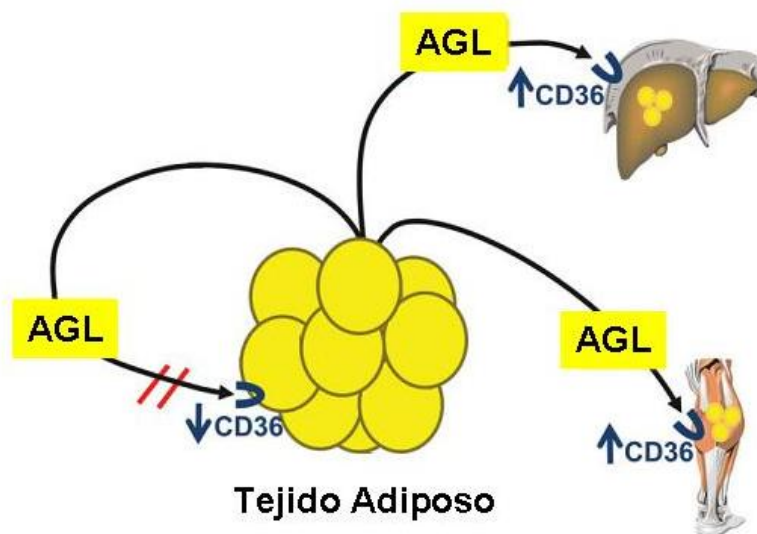


Figura 7. Implicación de las proteínas tisulares de transporte de AGL (CD 36) en la patogénesis de HGNA y la acumulación de grasa ectópica. Adaptado de [114].

La contribución de la lipogénesis a la producción total de triglicéridos intrahepáticos en pacientes con HGNA es mucho más elevada que en individuos sin HGNA, y representa entre el 15% y el 23% de los AG sumando los TG intrahepáticos y los secretados en VLDL-TG [93, 114]. La producción y secreción de TG a través de VLDL aumenta en pacientes con EHGNA (demostrada en determinados estudios [117, 118] aunque en otros no [116]) respecto a sujetos sanos, proporcionando un mecanismo para evacuar TG intrahepáticos, sin embargo, la tasa de secreción no es lo suficientemente adecuada para compensar la tasa de producción de TG intrahepática en estos pacientes [114]. El aumento de la glucosa en plasma y la hiperinsulinemia asociada a EHGNA, estimula la lipogénesis de novo (DNL) e inhibe la oxidación de AG a través de SREBP-1c y ChREBP (proteínas localizadas en la membrana del retículo endoplásmico). Cuando se estimulan liberan un dominio proteico que se importa al núcleo y actúa como un potente factor de transcripción, estimulando la expresión de genes relacionados con la síntesis de lípidos. Estos procesos metabólicos conducen a un aumento de AG intracelulares que no se oxidan o exportan por medio de VLDL-TG, y se esterifican a TG, almacenándose dentro de gotitas lipídicas [114]. La resistencia a la insulina en el músculo esquelético podría promover la acumulación TGIIH mediante el

desvío de carbohidratos ingeridos fuera del almacén de glucógeno muscular y hacia la síntesis AG de novo en hígado [114]. Estos mecanismos de DNL que contribuyen al “primer impacto” de la fisiopatología del HGNA se visualizan en la **figura 8**. Ciertos productos intermedios del metabolismo de lípidos como el diacilglicerol (DAG) pueden alterar la señalización de insulina contribuyendo a su resistencia a nivel hepático (ver apartado: mecanismos de resistencia hepática a insulina en HGNA) [113, 114]. Se debe tener en cuenta que, aunque de la lipogénesis de novo se incrementa en HGNA, contribuye en menor medida al pool total de triglicéridos hepáticos totales en comparación con los ácidos grasos derivados de tejido adiposo que representan la mayor parte (~ 60%) de la acumulación hepática de triglicéridos en HGNA [110].

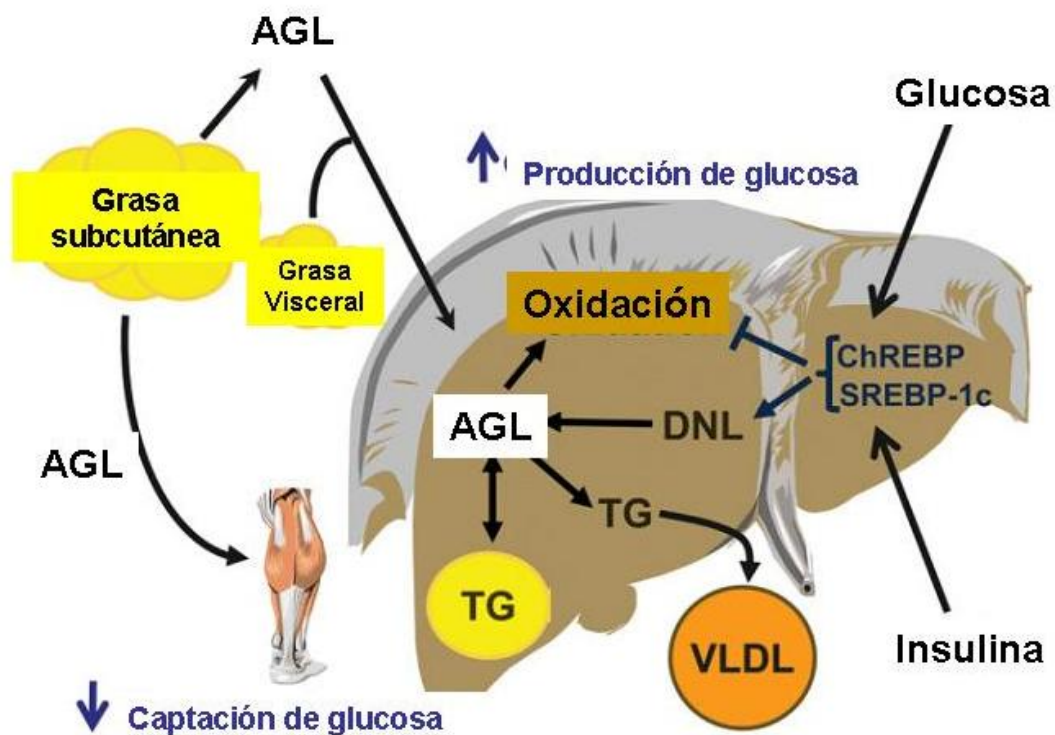


Figura 8. La resistencia hepática y sistémica a insulina conduce a esteatosis hepática. Adaptado de [114].

En la lipogénesis de novo, la activación de SREBP-1c por la hiperinsulinemia estimula a varias enzimas lipogénicas, tales como L-PK (liver pyruvate kinase), la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y FAS (fatty acid synthase). Primero se activa L-PK para

producir acetil-CoA [142], posteriormente se produce la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA a través de la activación de la enzima citosólica acetil-CoA carboxilasa (ACC), independientemente de los niveles de AGL. Malonil-CoA es un regulador clave de los niveles de AGL, a través de esterificación u oxidación [142]. Una alta concentración de malonil-CoA constituye un reflejo de actividad de DNL, y una baja concentración reflejaría un incremento de lipólisis [142]. Aunque en condiciones de resistencia a insulina, SREBP-1c no debería ser activado, la insulina estimula la expresión de SREBP-1c incluso en estados de intensa resistencia a la insulina, dando lugar a un incremento de lipogénesis de novo. [142]. El incremento de lipogénesis hepática, que da lugar a la producción malonil-CoA, a su vez inhibe la actividad de CPT-1 (Carnitine palmitoyltransferase-1) cuya misión consiste en incrementar la entrada de ácidos grasos procedentes del torrente sanguíneo a la mitocondria hepática para su oxidación. Se ha descrito que en pacientes con HGNA la expresión hepática de CPT-1 está disminuida [115].

Los triglicéridos se unen a la apolipoproteína B (Apo B) para construir la partícula de lipoproteína madura que será secretada. La síntesis de Apo B es estimulada por niveles elevados de AGL y niveles de TG, así como por MTP (microsomal transfer protein), mientras que es inhibida por la acción de la insulina [94, 95, 142]. Se ha planteado como hipótesis que la inadecuada regulación de apoB 100-VLDL en sujetos obesos con HGNA condiciona la producción de partículas largas de VLDL, que no pueden penetrar los poros endoteliales sinusoidales para exportar TG fuera del hígado [114].

Además de la implicación en la resistencia a insulina, el aumento de SOCS-1 y SOCS-3 también causar incremento de expresión del regulador clave de la síntesis de ácidos grasos en el hígado, SREBP-1c [133, 134]. La expresión de SREBP-1c es inhibida por la expresión de STAT-3 (Signal Transduction and Activator of Transcription 3). STAT3, que a su vez inhibe la expresión de SREBP-1c, es antagonizada por la co-expresión de proteínas SOCS 1-3, estimulando la expresión de SREBP-1c [134]. Con estos datos la hipótesis planteada consiste en que los sujetos obesos presentan un tejido adiposo en estado inflamatorio persistente que libera TNF- α , resistina y otras citoquinas (IL-6) al torrente circulatorio, en el contexto de bajos niveles plasmáticos de adiponectina y una hipotética resistencia a leptina, estimulando la producción hepática de proteínas SOCS 1 y 3, que a su vez inhiben la expresión de

STAT-3, y conllevan al incremento de expresión de SREBP-1c y el consiguiente aumento de grasa en el hígado. [134].

Aunque el total de calorías y la ingesta de grasa es un factor determinante para el desarrollo de la obesidad y la esteatosis hepática, determinados lípidos de la dieta como el colesterol o los ácidos grasos trans (palmitato) pueden ser más relevantes para el desarrollo de enfermedades, incluidas las lesiones del hígado, inflamación y fibrosis [100, 110], posiblemente debido a que el colesterol puede ser redirigido a las CEH cuando la excreción biliar se bloquea o se altera su absorción por parte de los hepatocitos [100, 110, 111]. Una dieta rica en colesterol puede amplificar la respuesta fibrogénica en las CEH [100, 111].

Los AGL son componentes hepatotóxicos, motivo que refuerza la hipótesis que postula a la síntesis de triglicéridos en los hepatocitos como un mecanismo citoprotector [112]. Tanto los AGL como la propia esteatosis hepática pueden causar daño directo a los hepatocitos, y pueden participar en los siguientes mecanismos [142]:

- 1) Inducción de la apoptosis mitocondrial a través de el estrés endoplásmico reticular, o de UPR (unfolded protein response).
- 2) Inducción directa de la apoptosis de los hepatocitos a través de la estimulación de TNF- α .
- 3) Incremento del ligando FAS al receptor de FAS lo que conduce a la apoptosis extramitocondrial de hepatocitos.
- 4) Deterioro de la β -oxidación mitocondrial de las reservas de AG que conduce finalmente a la producción de peróxido de hidrógeno y otros productos de la peroxidación de lípidos provocando apoptosis y necrosis de los hepatocitos.

Han sido descritas anormalidades a nivel de los TGIH en pacientes con EHGNA: destaca el aumento de la relación ácidos grasos saturados/insaturados, así como alteración de la regulación de las desaturasas de ácidos grasos, el aumento de los niveles intracelulares de colesterol, y la estrecha relación entre las alteraciones metabólicas e histológicas. Los ácidos grasos saturados, tales como palmitato, dan lugar

a la acumulación de tóxicos derivados de triglicéridos y metabolitos que pueden inducir disfunción mitocondrial, activación de caspasas y lipoapoptosis, mientras que los hepatocitos expuestos a acúmulos de ácidos grasos insaturados no dan lugar a estos procesos [83, 97].

En el “segundo impacto”, que da paso al desarrollo de la EHNA, se produce a nivel de la mitocondria defectos en la fosforilación oxidativa, deterioro de la cadena respiratoria principal con generación de especies reactivas de oxígeno y actividad reducida de la síntesis de ATP. Cuando la oxidación mitocondrial se altera, los AGL se acumulan en el citosol y se oxidan alternativamente a través de los peroxisomas (β -oxidación peroxisomal) y los microsomas (ω -oxidación), lo que da lugar a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno. Los productos de oxidación microsomal son los ácidos dicarboxílicos, que amplifican el daño por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. La activación de los peroxisomas hepáticos parece estar mediado por el PPAR- α [142, 146].

1.3.3.4 FISIOPATOLOGÍA EN RELACIÓN CON MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La glutatión peroxidasa 1 (GPx1) es una proteína que reduce hidroperóxidos de selenio por medio del glutatión. Su papel es principalmente de elemento antioxidante. En un estudio in vitro se ha demostrado que los ratones que no expresan GPx1 (modificados genéticamente) toleran el estrés oxidativo moderado, pero son muy susceptibles a estrés oxidativo intenso [39]. En este mismo estudio se ha observado que los ratones que no expresa GPx1 presentan aumento de sensibilidad a la insulina [39].

En contraste, en otro estudio se ha observado que los ratones que sobreexpresan GPx1 son más resistentes al estrés oxidativo agudo y desarrollan obesidad así como resistencia a la insulina [40].

La actividad iNOS es una de las mayores fuentes de óxido nítrico producido por los macrófagos durante la inflamación y es una de las enzimas más importantes implicadas en la producción de estrés oxidativo. En modelos animales, la iNOS juega

un papel crucial en el desarrollo de esteatohepatitis [58] y, en cohortes humanas, se han asociado polimorfismos en el gen de la iNOS con el riesgo de esteatohepatitis [59]

Aunque un exceso de daño oxidativo se ha asociado con la fisiopatología de muchas enfermedades humanas, estudios recientes están mostrando que bajos niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno juegan un importante papel regulador dentro de la fisiología celular [41]. En este contexto, un estudio reciente demostró que el promotor genético de AdipoR2 se ve afectado por el estrés oxidativo endoplasmático [42]. En otro estudio reciente se afirmó que la disrupción de AdipoR1 músculo específica disminuía al incrementar las enzimas detoxificantes del estrés oxidativo a nivel muscular y mitocondrial [43]. En un estudio anterior y por medio de un modelo de ratones obesos y diabéticos, se ha demostrado sobre-expresión de AdipoR2, que a su vez se incrementa en relación con la expresión de enzimas antioxidantes hepáticas [44].

1.3.3.5 FACTORES RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN

La esteatosis hepática es un factor de riesgo independiente para la elevación de la proteína C reactiva en asociación adicional con la obesidad y el síndrome metabólico en el desarrollo de la inflamación sistémica [83].

La infiltración de macrófagos y los marcadores inflamatorios son mayores en el tejido adiposo de pacientes con HGNA que los sujetos con similar IMC y TGIH normales [114]. En los mecanismos de RI mencionados en el apartado “mecanismos de resistencia a insulina en la EHGNA” durante la progresión a inflamación hepática, la activación de NF- κ B, que se regula positivamente por incremento de la producción de citocinas proinflamatorias por parte del tejido adiposo, puede alterar a la acción de la insulina tanto a nivel local como sistémico, participando como mecanismo adicional de RI a los ya estudiados [114, 119].

En la progresión de la obesidad, la activación de los macrófagos del tejido adiposo precede a la activación de las células de Kupffer. El desequilibrio de las células Kupffer M1/M2 (M1>M2) y la liberación de mediadores inflamatorios por éstas mismas células son fundamentales en la patogenia de la EHNA y un objetivo de tratamiento atractivo [83].

La activación alternativa M2 en las células de Kupffer por agonistas PPAR- γ invierte la resistencia hepática a la insulina inducida por la obesidad [87].

En la **figura 9**, se muestra la importancia de las células Kupffer como fuente importante de liberación de citoquinas inflamatorias. En su interacción con las células B y T juegan un papel similar al de los macrófagos M1 polarizados en el tejido adiposo para el desarrollo de resistencia a la insulina, inflamación y apoptosis en la progresión de la EHGNA [83, 87].

PPAR- γ se encuentra ampliamente distribuido entre los adipocitos (más abundante), macrófagos, y varias fracciones celulares del estroma vascular, así como a nivel del hígado. Su amplia distribución explica los múltiples efectos metabólicos y antiinflamatorios de los agonistas PPAR- γ , y proporciona una justificación para su uso clínico en el hígado graso no alcohólico. TZD mejoran la sensibilidad a la insulina a nivel general por múltiples mecanismos que incluyen la regulación del coactivador 1 α del PPAR- γ (PGC-1 α), la mejora de la biogénesis mitocondrial adipocitaria y capacidad oxidativa, así como un incremento en la expresión génica de adiponectina. Los agonistas PPAR- γ ejercen efectos anti-inflamatorios en la EHGNA sobre todo a nivel de las células de Kupffer y el incremento de adiponectina [83].

Durante la progresión de la EHGNA, y como se ha citado en anteriores apartados, la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 se induce en los hepatocitos por una variedad de estímulos exógenos tales como IL-6 e IFN- γ . En ratones deficientes de SOCS-1 y/o SOCS-3, se produce, además de un daño multiorgánico por una respuesta inmune aberrante, inflamación hepática acompañada de degeneración grasa y necrosis hepatocitaria, que es la causa principal de la muerte en estos ratones (incremento de hepatitis, cirrosis y hepatocarcinoma). Esta hepatitis fulminante en ratones deficientes de SOCS 1 o 3 se debe a la activación de linfocitos hepáticos, incluyendo las células NK (natural killer), y el aumento de sensibilidad hepatocitaria a citoquinas inflamatorias tales como IFN- γ [137]. Futuros estudios sobre las proteínas SOCS ayudarán a conocer mejor la fisiopatología de las enfermedades hepáticas humanas y a desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades hepáticas agudas y crónicas utilizando como diana estas proteínas [137].

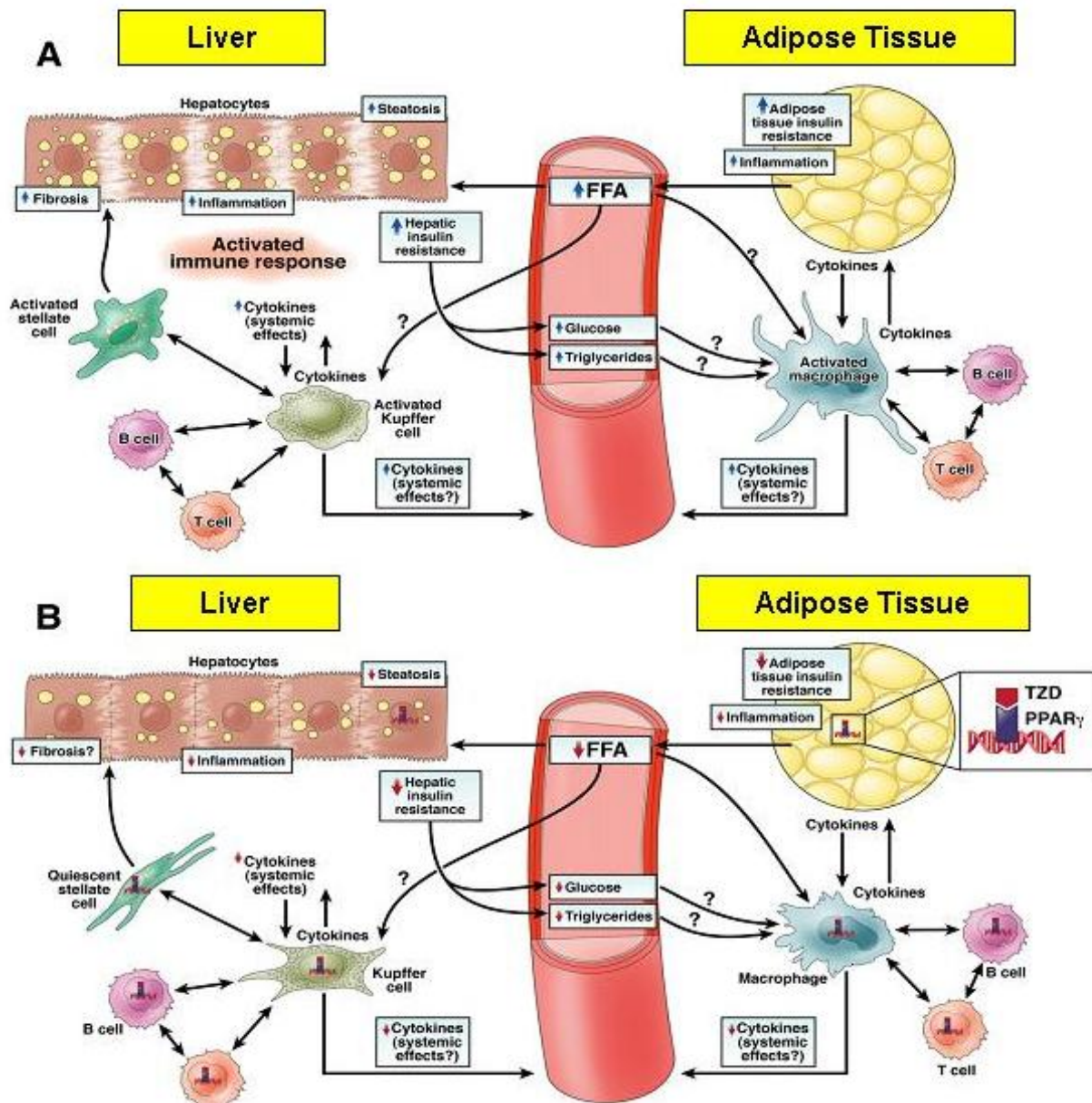


Figura 9. (A) En la obesidad, la activación de los macrófagos / sistema inmunológico contribuye al desarrollo de adipocitos disfuncionales y resistentes a insulina que liberan cantidades excesivas de ácidos grasos libres y causan resistencia a la insulina y lipoapoptosis en tejidos a distancia (hígado, músculo, células beta del páncreas, lecho vascular, otros). La acumulación de metabolitos tóxicos de lípidos intracelulares derivados de triglicéridos activa las vías inflamatorias dentro de los hepatocitos, células Kupffer y otras células inmunes, a semejanza de la reacción inflamatoria en los adipocitos. La activación de las CEH conduce a la deposición de colágeno contribuyendo a la progresión a cirrosis. (B) el PPAR- γ está ampliamente distribuidos entre los adipocitos, hepatocitos y las células estrelladas hepáticas, así como los macrófagos y las células inmunes infiltradas en el tejido adiposo y el hígado. Éste puede ser objetivo de los agonistas PPAR- γ como las TZD en pacientes con EHNA. Adaptado de [83].

1.3.3.6 RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EHNA

La asociación de EHNA con el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 conduce a la conexión entre el hígado graso y el desarrollo de RCV [101]. Varios estudios epidemiológicos informan que los pacientes con concentraciones plasmáticas de aminotransferasas elevadas tienen una mayor puntuación de riesgo de Framingham y / o número de eventos cardiovascular en comparación con aquellos que presentan niveles normales [102, 103].

La elevación persistente de los niveles plasmáticos de insulina puede promover la aterogénesis. La hiperglucemia per se es un factor establecido para RCV, así como la dislipidemia aterogénica en EHNA impulsada por la hipersecreción de VLDL, como ha indicado en apartados anteriores [83].

Se conoce que los individuos con EHNA presentan una función endotelial anormal. El incremento de AGL altera la señalización de insulina de las células endoteliales y la producción de óxido nítrico en modo dosis-dependiente a través de la activación de la vía del inhibidor κ B de la Quinasa B / Factor nuclear κ B [104].

Existe una estrecha correlación entre el grado de EHNA, la esteatosis miocárdica y la disfunción diastólica precoz [105]. Aquellos tratamientos que contribuyen a la disminución de la esteatosis hepática tienen efectos beneficiosos sobre la función miocárdica. La pioglitazona mejora la esteatosis hepática y de miocardio, aunque la mejoría de la función cardíaca por las TZD puede involucrar mecanismos que van más allá de la acumulación de metabolitos tóxicos derivados de triglicéridos en el miocardio [106].

Aunque en los estudios realizados en esta materia, los factores metabólicos y clínicos apoyan la idea de que el EHNA conlleva un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, se necesitan estudios prospectivos a largo plazo y de mayor tamaño poblacional para establecer plenamente la naturaleza de esta asociación [83]. En la **tabla 6** se indican los principales estudios que evalúan RCV en relación con EHNA.

Tabla 6. Estudios que evalúan el RCV en pacientes con y sin HGNA. Adaptada de [83].

Author (year)	Method used for the diagnosis of NAFLD	Primary end point	Increased CVD risk? (after adjustment for confounders) ^a
Villanova et al (2005)	Liver biopsy	Endothelial function ^b	Yes
Brea et al (2005)	Liver US	CIMT/carotid US	No
Volzke et al (2005)	Liver US	CIMT	No
Targher et al (2005)	Liver US	CV events	Yes
Targher et al (2006)	Liver biopsy	CIMT	Yes
Mirbagheri et al (2007)	Liver US	Coronary angiography	Yes
Hamaguchi et al (2007)	Liver US	CV events	Yes
Schindhelm et al (2007)	ALT	CV events	Yes
McKimmie et al (2008) ^c	CT	CIMT	No
Fracanzani et al (2008)	Liver US or biopsy	CIMT	Yes
Goessling et al (2008)	AST, ALT	CV events	No
Haring et al (2009)	US	CV events	Yes
Poanta et al (2011) ^c	US	CIMT	No

ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, CT: tomografía computarizada, US: ultrasonografía.

a) RCV después del ajuste para los factores de riesgo tradicionales (edad, sexo, índice de masa corporal, tabaquismo, diabetes tipo 2, el síndrome metabólico, otros).

b) Medida por la vasodilatación mediada por el flujo de la arteria braquial.

c) Todos los pacientes tenían diabetes tipo 2.

1.3.3.7 PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A GOTAS LIPÍDICAS EN LA PROGRESIÓN DE LA EHGNA

Las gotas lipídicas son orgánulos celulares dinámicos que están gestionados por una familia de proteínas anfifílicas denominadas PAT, nombre que proviene de los tres miembros fundadores de la familia: Perilipina, Adipofilina (también conocida como ADRP: adipocyte differentiation-related protein o perilipina 2) y TIP47. Hasta el momento se han descrito dos miembros más (OXPAT y S3-12) elevando a 5 el número de miembros conocidos de la familia [173, 174]. Las proteínas de la familia PAT: perilipina 1, adipofilina (perilipina 2) y la cola de interacción de proteínas de 47 kDa (TIP47), son proteínas anfifílicas asociados con la monocapa de fosfolípido que rodea las gotitas de lípidos que desempeñan un papel en su maduración y el metabolismo, incluyendo la hormona sensible a la lipasa inducida. En los adipocitos, TIP47 y adipofilina se expresan en pequeñas gotitas de lípidos, inmaduras, mientras perilipina 1 se expresa en gotas lipídicas más grandes y maduras [141]. Un trabajo reciente

demuestra que estas proteínas también juegan un papel en la progresión de la EHGNA. Straub et al. publicaron que existe sobreexpresión de proteínas PAT asociadas a gotitas lipídicas en el HGNA, y mediante el uso de la tinción inmunohistoquímica, con el apoyo de métodos biológicos y moleculares, demostraron una correlación positiva entre la expresión de adipofilina-perilipina y el contenido de gotas lipídicas en los hepatocitos [140]. No se observaron diferencias en el patrón de expresión de proteínas PAT entre HGNA y EHNA [140].

Estos datos proporcionaron un desarrollo experimental a nivel terapéutico en ratones que carecían de adipofilina, en los que se demostró que están protegidos contra la formación de hígado graso. Además, la administración de oligonucleótidos antisentido contra la producción de adipofilina igualmente demostró efectos beneficiosos al evitar la aparición de HGNA y mejorar la sensibilidad a insulina [140].

En términos de diagnóstico del HGNA, la esteatosis macrovesicular es fácilmente detectable en la microscopía de luz, pero la esteatosis microvesicular es difícil de valorar adecuadamente, y adipofilina ha demostrado ser un buen marcador en los casos de esteatosis microvesicular [141].

1.3.3.8 HIERRO HEPÁTICO

La importancia de la presencia de hierro hepático en la patogénesis de la enfermedad ha sido estudiada, y se ha descrito que los pacientes con EHNA tienen una mayor frecuencia de la mutación C282Y en relación con la hemocromatosis genética, aunque todos los determinantes genéticos de estrés oxidativo también pueden desempeñar un papel en la susceptibilidad a EHNA [24].

1.3.3.9 MODALIDAD DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

La modalidad de crecimiento del tejido adiposo blanco expuesta en el apartado anterior ha sido propuesta recientemente como una hipótesis para explicar la esteatosis hepática ligada a obesidad. Esta hipótesis postula que la capacidad de crecimiento del tejido adiposo tiene un límite, que está determinado por factores genéticos y ambientales. Cuando un individuo obeso se acerca al límite de expansión de su tejido adiposo, el superávit energético procedente de la dieta no puede almacenarse adecuadamente en el tejido graso y se deposita ectópicamente en músculo e hígado (donde puede desarrollarse resistencia a insulina mediante mecanismos lipotóxicos) [74].

1.3.3.10 APOPTOSIS DE LOS HEPATOCITOS

La apoptosis de los hepatocitos es un fenómeno patológico importante en la EHNA y la magnitud de la apoptosis se correlaciona con el grado de daño hepático y el estadio de la fibrosis [107, 108]. Diversos estudios experimentales sugieren que la vía extrínseca de la apoptosis y en particular la activación del sistema Fas / Fas Ligando pueden constituir un mecanismo central que provoca daño hepático y el desarrollo de EHNA [107]. La exposición de células hepáticas humanas a AGL provoca la regulación positiva de la expresión de Fas y un aumento de la sensibilidad a la apoptosis mediada por Fas [107]. El mecanismo preciso por el cual los AGL promueven la expresión de Fas sigue siendo desconocido [107].

1.3.3.11 FACTORES GENÉTICOS

Los factores genéticos pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de esteatosis hepática y EHNA. Entre los genes candidatos destacan aquellos que influyen en el estrés oxidativo, en el metabolismo de triglicéridos y ácidos grasos, en la síntesis de matriz extracelular / degradación (es decir, en la fibrosis hepática), en las vías de endotoxina (es decir, TLR-4), y en la producción de citoquinas por los macrófagos y tejido adiposo. El gen cuya asociación con el HGNA es más reproducible en el estudio del genoma es un alelo de fosfolipasa patatin-like 3 (PNPLA3; rs738409) [151]. Este alelo es más común en la población hispana. El papel de PNPLA3 en la patogénesis del hígado graso no alcohólico aún no ha sido establecido [151]. Otro gen estudiado es el que codifica la apolipoproteína C3 (APOC3) (T-455C en el rs2854116 y C-482T en el rs2854117), cuya alteración da lugar a un incremento de la grasa hepática y de la concentración plasmática de triglicéridos en sujetos con HGNA (estudio realizado en sujetos de la India) [152].

1.3.3.12 PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Otros mecanismos que pueden contribuir al desarrollo de EHNA incluyen la disfunción de la microbiota intestinal. La liberación de productos bacterianos (polisacáridos) desde el intestino hacia el hígado, a través de la vena porta podrían activar sustancias proinflamatorias como el TNF- α . Además estudios en ratas con sobrecrecimiento bacteriano han sugerido que el etanol producido por la fermentación en caso de sobrecrecimiento bacteriano también podría contribuir al desarrollo de esteatosis. En un estudio publicado recientemente en *Hepatology* [138] existe una asociación inversa e independiente (de la dieta y del índice de masa corporal) entre la presencia de EHNA y el porcentaje de bacteroides en las heces lo que sugiere que la microbiota intestinal pueden jugar un papel importante en el desarrollo del HGNA.

1.3.3.13 FÁRMACOS

Farmacos con propiedades lipofílicas (tamoxifeno, amiodarona, etc.) atraviesan la membrana mitocondrial y en el interior de la mitocondria pueden inhibir la beta oxidacion (causando esteatosis) y bloqueando la cadena respiratoria (generando radicales libres de oxígeno) pueden dar lugar a HGNA [88].

1.3.4 HISTORIA NATURAL

La evolución de los cambios histológicos hepáticos en pacientes con HGNA y EHNA ha sido investigada en diversos estudios, pero estos generalmente incluyen un número pequeño de pacientes y han presentado un seguimiento relativamente corto [120, 139]. No obstante, se acepta en general que los pacientes con esteatosis simple presentan una progresión histológica muy lenta, mientras que los pacientes con EHNA pueden exhibir progresión histológica de la enfermedad a estadio cirrótico [120, 121, 139].

Se ha demostrado que los pacientes con diagnóstico de hígado graso no alcohólico presentan en general un incremento de mortalidad en comparación con poblaciones similares en edad y sexo sin dicho diagnóstico [45]. Es de destacar que el exceso de mortalidad en este grupo es atribuible tanto a patologías cardiovasculares como al incremento de morbilidad hepática [45].

Desde el descubrimiento en 1998 de los diferentes tipos histológicos de hígado graso no alcohólico en relación con su relevancia en el pronóstico [24], varios estudios posteriores han demostrado que la presencia de sólo esteatosis simple, sin inflamación ni fibrosis, se asocia a un riesgo de mortalidad similar a la de la población general comparable en edad y sexo [113, 120, 121, 139]. Esta afirmación refuerza la necesidad

de estratificar los pacientes con hígado graso no alcohólico en esteatosis simple o enfermedad más avanzada. La enfermedad más avanzada se puede definir como avance de los niveles de fibrosis y / o la presencia / nivel de la inflamación y balonización hepatocitaria [113,121].

El desarrollo de fibrosis grave suele aparecer en el 5% al 10% de los pacientes con EHNA, y hasta el momento los estudios de cohorte sólo han identificado a la fibrosis avanzada, y no la inflamación, como un factor predictor de peor pronóstico [46, 47].

Quizás sea necesario aumentar las muestras poblacionales de futuros estudios o excluir factores de confusión como los individuos con polimorfismos PNPLA 3 que pueden incrementar el desarrollo de fibrosis hepática para perfeccionar los criterios de estratificación y pronóstico en los pacientes con hígado graso no alcohólico [46, 151].

El desarrollo de la cirrosis (**figura 10**) depende de mecanismos poco conocidos que implican una interrelación entre los hepatocitos lipoapoptóticos, las células de Kupffer y las CEH activadas [83, 98]. La obesidad es un importante factor de riesgo clínico para la cirrosis [83, 99], y constituye otro signo de evidencia indirecta que apoya el carácter progresivo de la EHNA. Los pacientes diagnosticados de cirrosis criptogénica tienen una prevalencia desproporcionadamente elevada de factores de riesgo metabólicos (diabetes tipo 2, la obesidad, el síndrome metabólico) típicos de los pacientes con HGNA, y sus biopsias hepáticas muestran con frecuencia una o más características de EHNA, aunque diversos estudios han demostrado que con el desarrollo de la cirrosis se produce la pérdida de las características histológicas de EHNA, motivo que lleva a un diagnóstico indeterminado [120, 121, 122].

Los pacientes con HGNA presentan mayor riesgo de HCC, pero este riesgo está probablemente limitado a aquellos con fibrosis avanzada y cirrosis, y tienen un riesgo significativamente menor para HCC que la aquellos que presentan cirrosis asociada a hepatitis C [120].

La **figura 10** resume las implicaciones tanto a nivel básico como clínico que influyen en la historia natural de la NAFLD. El "modelo lineal" descrito a continuación debe ser visualizado sólo como una representación esquemática de un proceso complejo, teniendo en cuenta que sólo una minoría de los sujetos con esteatosis "simple" desarrollará cirrosis [83]. La progresión de la enfermedad desde esteatosis simple a lipotoxicidad hepática y esteatohepatitis se debe a la disfunción mitocondrial,

el estrés del retículo endoplásmico, la formación de especies reactivas del oxígeno, y la activación de vías inflamatorias (por ejemplo, c-Jun N-terminal quinasa, I κ B /factor nuclear κ B, TLR4) por metabolitos tóxicos de los lípidos tóxicos como diacilgliceroles, ceramidas, y otros, ya citados en los apartados anteriores.

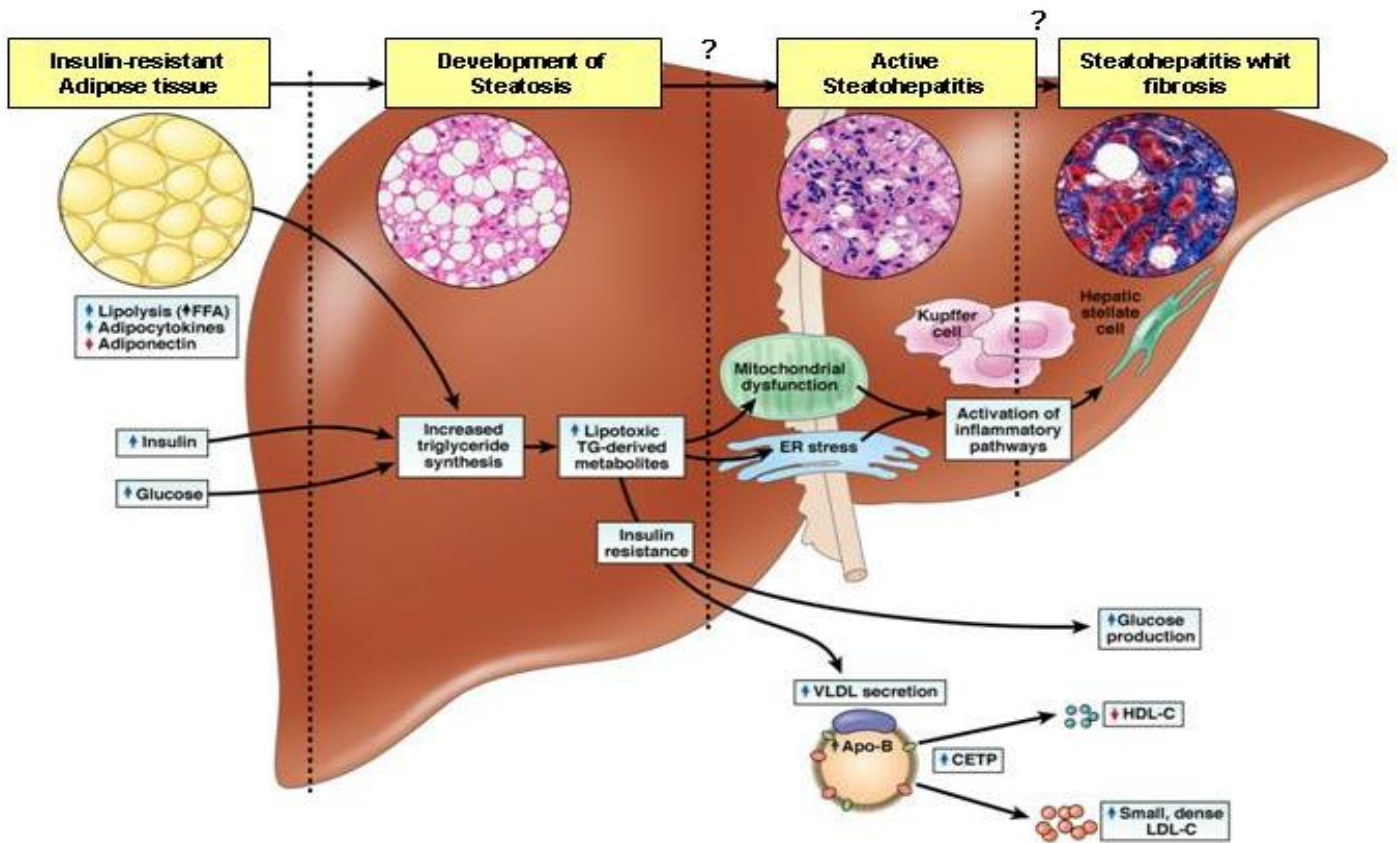


Figura 10. Representación esquemática de la historia natural de la EHGNA a través de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la EHNA (véase el texto de arriba para más detalles). Adaptado de [83].

1.3.5 DIAGNÓSTICO

En la guía de práctica clínica actualizada de la AASLD, tomada como referencia bibliográfica [120, 139], se ha adoptado para la caracterización de las recomendaciones la clasificación utilizada por el sistema GRADE (Grading of Recommendation Assessment, Development, and Evaluation) [154]. En el sistema GRADE, la fuerza de las recomendaciones se clasifica como intensa (1: calidad de la evidencia y resultados relevantes - eficientes para los pacientes) o débil (2: menor seguridad, menor relevancia o mayor consumo de recursos). La calidad de la evidencia que respalda las recomendaciones intensas o débiles es designada por uno de los tres niveles: alto (A: es poco probable que la investigación adicional cambie la confianza en la estimación del efecto clínico), moderado (B: investigaciones adicionales podrían cambiar la confianza en la estimación del efecto clínico), o de baja calidad (C: es muy probable que investigaciones adicionales cambien la confianza en la estimación del efecto clínico) [154].

1.3.5.1 HISTORIA CLÍNICA

El diagnóstico de HGNA requiere 1: la visualización de esteatosis hepática mediante pruebas de imagen o histología, 2: ausencia de consumo de alcohol significativo, 3: ausencia de causas que producen esteatosis hepática, y 4: imposibilidad de coexistencia enfermedad hepática crónica [120, 139].

Se deben excluir diagnósticos alternativos mediante historia clínica y analíticas específicas para despistaje de hepatitis virales (serologías víricas), el consumo excesivo de alcohol, la hemocromatosis, enfermedad hepática autoinmune, déficit de alfa-1 antitripsina, la enfermedad de Wilson o la disfunción hepática inducida por fármacos.

El consumo de alcohol actual o reciente superior a un promedio de 21 bebidas por semana en hombres y superior a un promedio de 14 bebidas por semana en las mujeres es una definición razonable para el consumo significativo de alcohol en la evaluación de pacientes con sospecha de HGNA en la práctica clínica [120].

La mayoría de los pacientes con HGNA son asintomáticos y el diagnóstico se sospecha por presentar hipertransaminasemia en las pruebas de rutina. Los síntomas más comunes son molestias en hipocondrio derecho y la fatiga, aunque estos últimos pueden también ser causados por la obesidad y/o el Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS).

La esteatosis hepática suele ser un hallazgo incidental frecuente al realizar una ecografía por otras razones, como por ejemplo ante sospecha de patología biliar, por lo tanto cuando los pacientes con esteatosis hepática no sospechada y detectada en las pruebas de imagen tienen síntomas o signos atribuibles a enfermedad hepática o tienen bioquímicas hepáticas anormales, deben ser evaluados como pacientes sospechosos de tener HGNA (fuerza de recomendación - 1, evidencia - A) [120, 139]. Si carecen de síntomas o signos relacionados con el hígado y tienen bioquímicas hepáticas normales, es razonable evaluar factores de riesgo metabólicos (por ejemplo, obesidad, intolerancia a la glucosa, dislipidemia) y causas alternativas para esteatosis hepática tales como el consumo de alcohol significativo o medicamentos sospechosos (fuerza de recomendación - 1, evidencia - A). [120, 139].

El screening de hígado graso no alcohólico en adultos que acuden a atención primaria o los grupos de alto riesgo, que asisten a las clínicas de diabetes u obesidad, no es aconsejable en este momento debido a la incertidumbre sobre las pruebas diagnósticas y las opciones de tratamiento, junto con la falta de conocimientos relacionados con los beneficios a largo plazo y la rentabilidad de cribado. Tampoco está recomendado el screening sistemático a familiares de estos pacientes [120, 139].

1.3.5.2 EXPLORACIÓN

La hepatomegalia es la manifestación clínica más común, siendo raros los signos de hepatopatía crónica en pacientes con hígado graso avanzado a cirrosis. Se ha demostrado que la lipohipertrofia dorsocervical es un parámetro antropométrico intensamente asociado con la gravedad de la esteatohepatitis [46].

1.3.5.3 HALLAZGOS ANALÍTICOS

A pesar de que el hígado graso no alcohólico está asociado a pruebas de función hepática ligeramente anormales en la analítica, más de dos tercios de los pacientes tienen niveles normales de transaminasas y en todo el espectro histológico de HGNA pueden apreciarse niveles de alanina aminotransferasa (ALT) normales [47].

ALT suele estar más incrementada que la aspartato aminotransferasa (AST), y rara vez más de tres veces el límite superior de la normalidad. Una proporción AST:ALT mayor de 1.0 sugiere la presencia patología avanzada [47]. La fosfatasa alcalina puede estar ligeramente elevada, pero en raras ocasiones. Gamma-glutamil transferasa (GGT) se encuentra frecuentemente elevada, y también puede considerarse un marcador de incremento de mortalidad. Un nivel bajo de albúmina y la hiperbilirrubinemia pueden indicar una enfermedad hepática avanzada. En el estudio de anemias pueden aparecer niveles de ferritina elevados hasta en un 50% de los pacientes y el índice de saturación de la transferrina (IST) elevado en aproximadamente el 10% [47]. Sin embargo, estos hallazgos no parecen correlacionarse con concentración de hierro hepático elevada. En un paciente con sospecha de HGNA, niveles de ferritina sérica elevada y estudio genético con mutación C282Y heterocigoto u homocigoto en el gen HFE se debe considerar una biopsia hepática para evaluar la concentración de hierro hepático y para excluir lesiones hepáticas significativas así como fibrosis (fuerza de recomendación -1, evidencia - B) [120, 139].

En pacientes con HGNA es común apreciar títulos elevados de autoanticuerpos en suero, considerándose generalmente como un epifenómeno. La apreciación de títulos séricos elevados de autoanticuerpos en asociación con otras características sugerentes de enfermedad hepática autoinmune (transaminasas altas, globulinas alta), deben motivar a la investigación de una enfermedad hepática autoinmune (fuerza de recomendación - 1, evidencia - B) [120, 139].

1.3.5.4 DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

El índice de hígado graso (fatty liver Index: FLI), fue desarrollado como un simple algoritmo para predecir la probabilidad de hígado graso mediante ecografía en la población general [48]. El FLI está basado en cuatro variables: índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, GGT y los niveles de triglicéridos en suero [48]. Se utiliza sobre todo en grupos de investigación sobre HGNA. Un índice alto puede predecir hasta en más del 80% la existencia de hígado graso mediante ecografía.

La ecografía es la prueba utilizada de forma generalizada en pacientes con sospecha de hígado graso no alcohólico. En la esteatosis hepática, las imágenes ecográficas reflejan un hígado hiperecogénico y brillante de forma difusa. La clasificación clásica de la esteatosis hepática mediante US se realiza en grados: esteatosis leve, la ecogenicidad del hígado es superior a la del riñón derecho; esteatosis moderada, el aumento de la ecogenicidad hepática borra las paredes de los vasos portales; y esteatosis grave, el aumento de la ecogenicidad hepática perturba la transmisión del sonido y no se consiguen visualizar segmentos profundos del hígado ni el diafragma [49].

Un reciente estudio examinó la exactitud de la ecografía en 235 pacientes con sospecha de patología hepática que fueron sometidos a biopsia hepática, y mostró una sensibilidad del 64% y una especificidad del 97%, que se incrementó hasta un 91% y 93% respectivamente en pacientes que presentaban esteatosis (que conformaban el 30% del total de las hepatopatías) [49]. Sin embargo, la presencia de obesidad mórbida reduce considerablemente la sensibilidad y especificidad. La ecografía no puede cuantificar la cantidad de grasa presente o proporcionar información acerca del estadiaje de la enfermedad y es operador dependiente presentando variabilidad intra e interobservadores que puede ser significativa [49].

La tomografía computarizada se puede utilizar para vigilar el curso de la enfermedad en exploraciones sucesivas. Las lesiones grasas hepáticas pueden ser identificadas por tomografía computarizada de doble energía que demuestran un aumento de la atenuación de la energía (unidades hounsfield) y ningún cambio en los normales. Las principales desventajas de la TC para la cuantificación de la esteatosis

hepática son el empleo de radiaciones ionizantes, la interferencia de los depósitos de hierro hepática y su baja sensibilidad para grados de esteatosis inferiores al 30% [153].

La resonancia magnética abdominal es uno de los métodos no invasivos más sensibles para la detección y cuantificación de los depósitos grasos del hígado [153]. En secuencias convencionales potenciadas en T1, la grasa aparece hiperintensa. Sin embargo, las secuencias convencionales spin eco (SE) son poco sensibles para la detección y cuantificación de la grasa hepática. La cuantificación de la grasa hepática, mediante resonancia, puede estimarse mediante técnicas basadas en el desplazamiento químico (Chemical Shift) o con espectroscopia (ERM) [153].

1.3.6 ESTADIFICACIÓN

Después de haber realizado un diagnóstico de hígado graso no alcohólico, el siguiente paso es determinar la gravedad, ya que proporciona información importante en el pronóstico. Históricamente este paso ha requerido una biopsia hepática, aunque ha habido muchos avances recientes que permiten el estadiaje no invasivo. Al determinar la estadificación en pacientes con hígado graso no alcohólico, hay dos aspectos a considerar: (1) el nivel de fibrosis y (2) el nivel de inflamación / balonización hepática, y existen diferentes métodos para su evaluación que van desde los menos invasivos hasta los más invasivos, ilustrados en la **tabla 7** [88]. Estos métodos se describirán con mayor profundidad en los siguientes apartados.

Tabla 7. Métodos para la evaluación de fibrosis y EHNA. Adaptada de [88].

	<i>Fibrosis</i>	<i>EHNA</i>
Menos invasivos	Fibroscan NAFLD fibrosis score/ BARD/Fibrotest	CK18 / NASH test / FibroMax Ultrasonografía contraste
Más invasivos	Biopsia hepática	Biopsia hepática

1.3.6.1 BIOPSIA HEPÁTICA: DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

La biopsia hepática sigue siendo el estándar de oro o “Gold Standard” para el diagnóstico y estadificación de la EHGNA, sin embargo, es cara y conlleva un cierto riesgo de morbilidad y mortalidad [88, 120, 139]. Dados los riesgos y beneficios citados, se debe considerar la biopsia hepática en los pacientes con HGNA que tienen mayor riesgo de esteatohepatitis y fibrosis avanzada (fuerza de recomendación - 1, evidencia - B) [120, 139]. La presencia de síndrome metabólico y el índice de fibrosis HGNA (se cita en el apartado “técnicas no invasivas para el estadiaje del HGNA”) pueden ser válidos para la identificación de pacientes que tienen mayor riesgo de presentar esteatohepatitis y fibrosis avanzada (fuerza de recomendación - 1, evidencia - B) [120, 139]. La biopsia hepática también debe ser considerada en pacientes con sospecha de HGNA en los que no se puede descartar otra etiología de esteatosis hepática o la coexistencia de enfermedades crónicas hepáticas sin biopsia (fuerza de recomendación - 1, evidencia - B) [120, 139].

No hay cambios patológicos que puedan distinguir de forma significativa el HGNA del hígado grado alcohólico (HGA), por lo tanto una historia clínica en la que se confirme la ingesta etílica es esencial para distinguir entre estas dos patologías

comunes.

Los cambios histológicos en el hígado graso no alcohólico son principalmente parenquimatosos y en localización perivenular, aunque pueden aparecer en menor medida lesiones portales y periportales. La esteatosis simple es por lo general macrovesicular, resultante de la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos, de hecho, la presencia de esteatosis en al menos el 5% de los hepatocitos es aceptada para confirmar el diagnóstico de HGNA [27].

Las características de la esteatohepatitis no alcohólica incluyen lesión hepatocelular, que se caracteriza por balonización de hepatocitos, con inflamación, fibrosis perisinusoidal, y predominio de las lesiones en la zona 3 [27]. En la EHNA pueden ocurrir alteraciones mitocondriales que contribuyen al daño hepático, pero rara vez aparecen en la esteatosis simple [27]. Más recientemente, el EHNA-CRN (NASH Clinical Research) ha establecido que la EHNA está establecida por "la presencia de un patrón característico de esteatosis, inflamación y dilatación hepatocelular en las biopsias de hígado en la ausencia de consumo de alcohol importante", eliminando así la fibrosis sinusoidal de la definición [75].

Las características histológicas típicas de la esteatosis y la inflamación a menudo desaparecen en la enfermedad avanzada a fibrosis. El carcinoma hepatocelular es una complicación bien reconocida de la cirrosis relacionada con EHNA, pero también pueden estar asociados con hígado graso no alcohólico precirrótico.

En la biopsia hepática hay que subrayar la dificultad actual para establecer una clara distinción entre lo que constituye EHNA, probable EHNA y esteatosis simple [26, 27, 155]. En este contexto, no es por tanto sorprendente que el diagnóstico puede variar según patólogo, lo que justificaría la necesidad de aclarar esta controversia [26, 27, 155].

Se han propuesto varios sistemas para la evaluación histológica de hígado graso no alcohólico, entre los cuales el sistema más aceptado en la actualidad es el de Kleiner (NAS: NAFLD Activity Score) [27].

El sistema Kleiner proporciona una puntuación que combina el grado de esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y el nivel de balonización hepatocelular (0-2), con una puntuación adicional para la fibrosis. Una puntuación superior a 5 sugiere probable EHNA o EHNA definitiva, e inferior a 3 indica que la EHNA es poco probable [27]. A pesar de que los valores extremos están estrechamente vinculados a la ausencia

(NAS <3) o la presencia de EHNA (NAS > 4), hay una zona indeterminada sobre los valores intermedios.

Recientemente, a partir de un estudio, se ha propuesto un nuevo algoritmo, que incluye un sistema de puntuación para la clasificación histopatológica de las lesiones hepáticas que cubre todo el espectro de lesiones posibles en pacientes con obesidad mórbida [155]. Para la diferenciación de las lesiones hepáticas en: hígado normal, HGNA o EHNA se ha constituido el índice SAF (S: steatosis; A: activity; F: fibrosis), que mide los siguientes parámetros [155]:

- Esteatosis: presencia de gotas lipídicas de gran o mediano tamaño en los hepatocitos, con las siguientes puntuaciones: (0) <5% de hepatocitos; (1) 5-33%; (2) 34 - 66%; (3) > 67 %).
- Balonización hepatocelular: (0) hepatocitos normales con forma cúbica, color rosa y citoplasma eosinófilo; (1) presencia de grupos de hepatocitos con una forma redondeada y citoplasma pálido generalmente reticulado, con tamaño similar al de los hepatocitos normales; (2) similar a 1 con algunos hepatocitos agrandados, al menos 2 veces superiores a los hepatocitos normales.
- Inflamación lobular: presencia de 2 o más células inflamatorias en el lóbulo hepático. Este recuento se realiza al microscopio en 20 aumentos (0: ninguno; 1: < 2 células; 2: ≥ 2 células).
- Presencia de fibrosis perisinusoidal: (F0) ninguna; (F1) 1a o 1b si fibrosis perisinusoidal en la zona 3, o 1c si fibrosis portal; (F2) la fibrosis periportal y perisinusoidal sin transición a puente; (F3) fibrosis en puente; (F4) cirrosis.

En este nuevo índice, el grado de actividad (A) tiene una puntuación entre 0 y 4, constituyendo la suma de balonización (0-2) e inflamación lobular (0-2). Aquellos casos con una puntuación A = 0, no presentan actividad, A = 1: actividad leve, A = 2: actividad moderada, A ≥ 3: actividad intensa.

En este estudio [155], realizado a 679 pacientes obesos mórbidos sometidos a biopsia hepática durante la realización de cirugía bariátrica, el índice de actividad “A” (balonización + inflamación lobular) se correlacionó intensamente con el diagnóstico de

EHNA, ya que todos los pacientes con EHNA tenían una puntuación superior a 2, mientras que ningún paciente con puntuación inferior a 2 tenía EHNA. Esta puntuación se correlacionó estrechamente con ALT y AST ($p < 0,0001$, ANOVA). El acuerdo entre observadores para el diagnóstico de EHNA fue excelente ($\kappa = 0,80$) entre los patólogos, y no hubo diferencias significativas entre el diagnóstico inicial y el diagnóstico utilizando el nuevo algoritmo.

En el sistema SAF, el diagnóstico de HGNA de acuerdo con este estudio, se establece con una puntuación $S \geq 1$, $A < 2$, F cualquiera; y el diagnóstico de EHNA se establece con $S \geq 1$, $A \geq 2$ (si A es = 2 debe de existir un punto por balonización y un punto por inflamación lobular) y F cualquiera.

A diferencia del sistema NAS, el índice SAF pueden identificar subgrupos especiales de pacientes difíciles de clasificar (no presentan criterios de EHNA), como por ejemplo aquellos con esteatosis y fibrosis perisinusoidal, pero sin lesiones celulares o inflamación lobular sin balonización ($S > 1$ A 0-2 F1); o los casos con inflamación y lesiones celulares, pero sin esteatosis ($S 0$ A > 2 F 0) [155].

1.3.6.2 ESTADIAJE POR TÉCNICAS NO INVASIVAS

A) TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHNA

Biomarcadores séricos:

Dentro de los marcadores comerciales para determinar la función hepática destacamos algunos de ellos:

- SteatoTest: combina 10 marcadores en el análisis de sangre (ALT, α -2-macroglobulina, apolipoproteína A-I, haptoglobina, bilirrubina total, GGT, colesterol, AST, glucosa) con la edad, sexo e IMC, presentando una validez de área bajo curva ROC de 0,8 en el diagnóstico de la esteatosis hepática, superior a la de la GGT, ALT o una ecografía [88].

-EHNA test que combina 13 marcadores bioquímicos y variables clínicas para predecir la presencia o ausencia de EHNA, presentando una especificidad, sensibilidad, VPP y VPN de 94%, 33%, 66% y 81% respectivamente [88].

Se han identificado muchos otros biomarcadores séricos que forman parte de los mecanismos clave en la patogénesis de EHNA, tales como marcadores inflamatorios, estrés oxidativo, apoptosis y RI. La inflamación se asocia con un aumento de TNF- α y disminución de la expresión de adiponectina (medidos mediante ELISA) y este desequilibrio de citoquinas parece correlacionarse con EHNA [15], aunque la precisión o utilidad clínica de estos marcadores aún no ha sido determinada.

Musso et al. observaron en un estudio que el nivel de adiponectina sérica fue significativamente menor en pacientes con EHNA que en aquellos con esteatosis simple, con un área bajo curva ROC de 0.765, sensibilidad del 68% y la sensibilidad de 79% para distinguir EHNA de esteatosis simple [50].

Ecografía con contraste (Levovist):

La ecografía con contraste (Levovist) consiste en la primera técnica de imagen utilizada para demostrar posibilidad de distinción entre esteatosis simple y EHNA. En un estudio de 64 pacientes clasificados en hígado normal, HGNA o EHNA, esta modalidad diagnosticó EHNA con un área bajo curva ROC de 100%. La acumulación de microburbujas Levovist en el parénquima hepático se mantuvo disminuido en la EHNA, pero no en el HGNA o la hepatitis viral crónica. El grado de disminución que se observa en la EHNA se correlaciona con la fibrosis en mayor medida que la esteatosis [88].

Elastografía por resonancia magnética:

En un reciente estudio publicado en radiology, las mediciones de rigidez hepática con elastografía por resonancia magnética en pacientes con HGNA podrían ayudar a identificar a los individuos con esteatohepatitis, incluso antes de la aparición de fibrosis, debido a que los pacientes con hígado graso no alcohólico que presentan

inflamación hepática pero no fibrosis tienen mayor rigidez hepática interpretada en la técnica que aquellos con esteatosis simple, y la media de rigidez hepática en pacientes con esteatohepatitis es a su vez más baja que los pacientes que presentan fibrosis [51].

B) TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE DE FIBROSIS:

Fibrometer:

Consiste en un panel de marcadores séricos que se originalmente fue desarrollado para la estadificación de la fibrosis en hepatopatía crónica por VHC (Virus de la Hepatitis C). Fibrometer ha demostrado una buena precisión diagnóstica en relación con la fibrosis asociada a EHNA. Este panel combina siete variables (edad, peso, glucosa en ayunas, AST, ALT, ferritina y recuento de plaquetas), y ha demostrado una validez de área bajo la curva ROC de 0.943 para fibrosis significativa (F2 y 3), 0.937 para la fibrosis severa (F4) y 0.904 para cirrosis, respectivamente. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de Fibrometer para el diagnóstico de fibrosis significativa era del 78,5%, 95,9%, el 87,9 y el 92,1% [88].

Fibroscan o Elastografía transitoria (Fibroscan, EchoSens):

Consiste en un método no invasivo para evaluar en el hígado la fibrosis. Emplea la tecnología de ultrasonidos basada en la medición de la rigidez del hígado, y ha sido validado para su uso en pacientes con hepatitis crónica C, coinfección VIH/VHC y enfermedades colestásicas. Puede que no se obtenga información en un 5% de los casos, siendo esta situación más común en los pacientes obesos, por lo que hasta ahora se ha limitado mucho su uso en la cohorte de pacientes con HGNA, aunque recientemente se ha introducido una sonda XL que puede reducir este problema. El equipamiento es caro. Diversos meta-análisis de fibroscan en HGNA han demostrado para la determinación de fibrosis una validez del área bajo curva ROC, sensibilidad y especificidad de 0.94, 0.94 y 0.95, respectivamente [52].

Índice de fibrosis HGNA:

Es un panel compuesto seis variables: edad, glucemia, índice de masa corporal, plaquetas, albúmina y relación AST / ALT. En el análisis de la validez del índice como prueba para determinar el índice de fibrosis hepática, sostiene un área bajo curva ROC de 0.84 [88].

Fibrotest:

Consiste en otro marcador validado para la determinación cuantitativa de la evaluación de la fibrosis en el HGNA. En el se utiliza la combinación de cinco marcadores bioquímicos: haptoglobina, a2-macroglobulina, apolipoproteína A1, bilirrubina total y la GGT, corregida por edad y género. Presenta una validez diagnóstica para determinación de fibrosis hepática con una media estandarizada de área bajo curva ROC de 0,84 para fibrosis avanzada en pacientes HGNA [88].

Puntuación de BARD:

Consiste en un sistema de puntuación simple diseñado para excluir una alta probabilidad de fibrosis avanzada en pacientes con hígado graso no alcohólico. Dicha puntuación combina tres variables: índice de masa corporal, AST / ALT y la presencia de diabetes (IMC mayor a 28 = 1 punto, la asociación de AST/ALT mayor a 0,8 = 2 puntos, DM = 1 punto), y la suma de dichos puntos se establece entre una puntuación de 0-4. Diversos estudios determinan la siguiente validez: área bajo la curva ROC de 0,67 (IC 95%: 0,56 a 0,77), con sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 51%, 77%, 45% y 81% respectivamente [52, 88].

FIB-4:

Sistema que combina la edad y tres parámetros bioquímicos convencionales (plaquetas, ALT y AST) para evaluar la fibrosis. Ha demostrado para el diagnóstico de fibrosis un área bajo curva ROC de 0,86, sensibilidad 85%, especificidad 65% y VPN de 95% [52, 88].

Índice APRI:

Consiste en dividir el resultado de la transaminasa AST por el valor de referencia (máximo) que aparece en el resultado del examen, y dicho resultado de la división debe ser dividido por el número de plaquetas y después ese nuevo resultado multiplicarlo por 100. Si el resultado del APRI es inferior a 0,5 muy probablemente no existe fibrosis (F0) o existe un mínimo de fibrosis (F1). Pero si el resultado del cálculo APRI es superior a 1,5 indica que puede existir una fibrosis avanzada (F3) o hasta cirrosis (F4). Un resultado entre 0,5 y 1,5 no logra identificar si existe cualquier grado de fibrosis o cirrosis. APRI fue desarrollado originalmente para su uso en la hepatitis crónica C, pero su utilidad en la EHGNA ha sido valorada en diversos estudios, dando una validez promedio de 0,65 – 0,75 en el área bajo la curva ROC para el diagnóstico de fibrosis avanzada [52, 88].

Índice AST/ALT:

Es un índice fácil de calcular, y es componente de otros sistemas de puntuación, por ejemplo BARD. Recomendado para la exclusión de fibrosis avanzada (área bajo curva ROC 0,742 para fibrosis avanzada si el índice es mayor a 0,8) [52, 88].

Los cuatro últimos sistemas han sido recomendados en la revisión reciente de sistemas de puntuación no invasiva para la exclusión de fibrosis avanzada en la práctica clínica [52].

Nuevas técnicas no invasivas para el estadiaje del HGNA

Como se ha descrito en el apartado de “fisiopatología de la HGNA”, la apoptosis de los hepatocitos es un fenómeno patológico importante en la EHNA y la magnitud de la apoptosis se correlaciona con el grado de daño hepático y el estadio de la fibrosis [107, 108]. Por lo tanto, la cuantificación no invasiva de la apoptosis hepatocelular representa un enfoque racional para evaluar la extensión del daño hepático. Un estudio reciente ha analizado un modelo no invasivo para el diagnóstico de EHNA, que incluye dos biomarcadores de la apoptosis de hepatocitos; fragmentos plasmáticos de CK-18 y sFas [109]. Los resultados demuestran que el uso de los dos biomarcadores parece ser más preciso para el diagnóstico de EHNA que el uso aislado de fragmentos de CK-18. Los fragmentos de CK-18 y los niveles de sFas se mantuvieron significativamente superiores en los pacientes con EHNA respecto a los pacientes con esteatosis hepática [109]. El AUC para el diagnóstico de EHNA incluyendo la medición de fragmentos plasmáticos de CK-18 y sFas (0,93) fue significativamente mayor que la utilización de fragmentos plasmáticos de CK-18 de forma aislada (0,86) o sFas sola (0,86), con una sensibilidad y especificidad para la predicción de la EHNA (88% y 89%, respectivamente) que son superiores que la sensibilidad y especificidad demostrada en la medición de fragmentos plasmáticos de CK-18 aislados [109].

Aunque la medición en suero de CK18 puede constituirse como un biomarcador prometedor para la identificación de la esteatohepatitis, todavía es prematura su recomendación en la práctica clínica habitual [109].

1.3.6.3 ALGORITMO PARA LA ESTADIFICACIÓN Y SEGUIMIENTO DE UN PACIENTE CON HGNA:

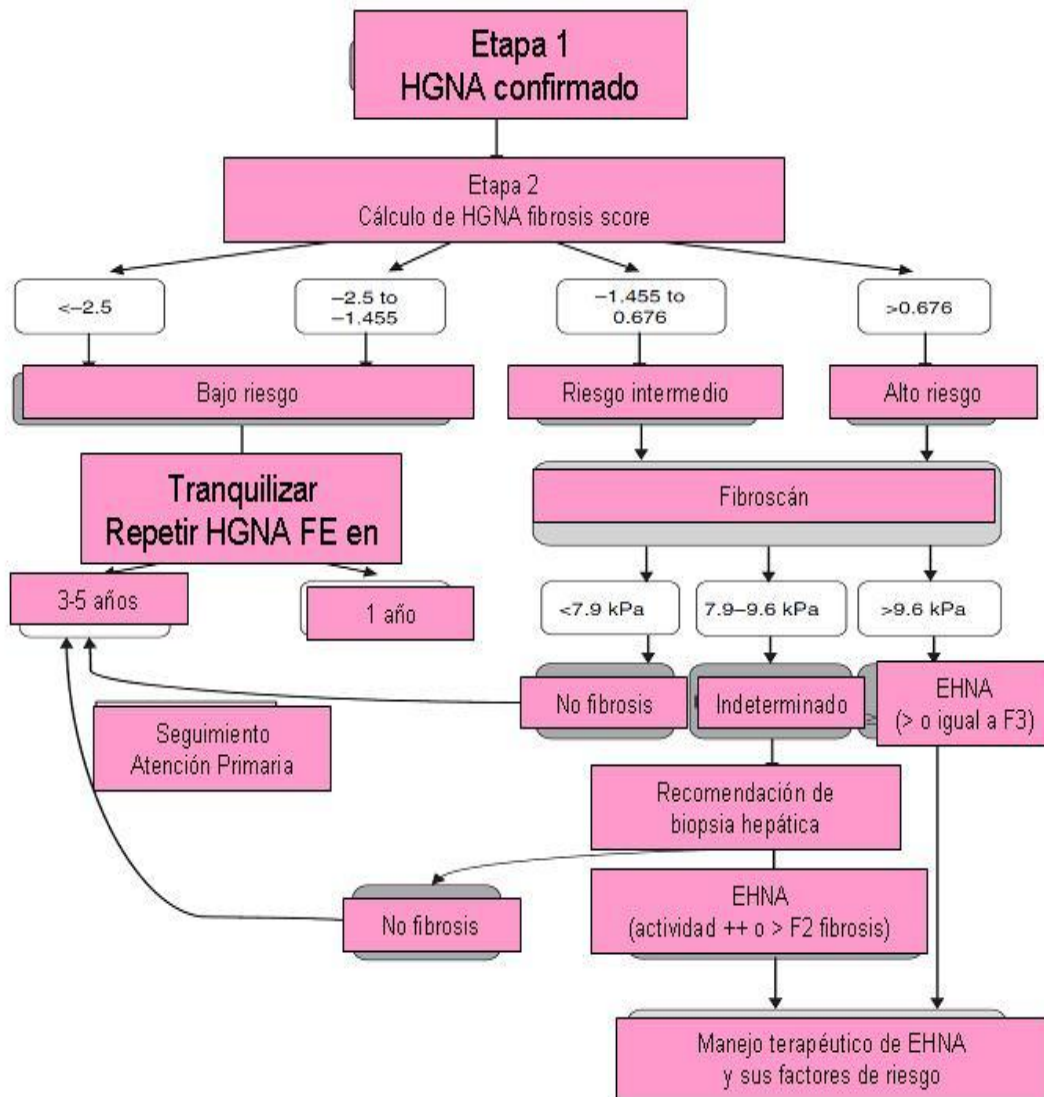


Figura 11. Propuesta de algoritmo para el seguimiento de un paciente con HGNA. Los pacientes con HGNA y una puntuación por debajo del límite para fibrosis tienen un bajo riesgo de fibrosis significativa y de progresión de la enfermedad posterior, y pueden seguirse con seguridad en atención primaria. La derivación a atención especializada está indicada si se sospecha progresión de la enfermedad en la clínica o análisis sanguíneos. Una puntuación en el rango de riesgo indeterminado o superior requiere mayor investigación. Se debe considerar biopsia hepática en pacientes cuyas pruebas no invasivas no son del todo concluyentes para diagnóstico de fibrosis. El uso del Fibroscan en este algoritmo puede ser sustituido por paneles de marcadores séricos de fibrosis (BARD, FIB-4, APRI, índice AST/ALT). Adaptado de [88].

1.3.7 TRATAMIENTO

El tratamiento de pacientes con HGNA se basa en el control de la patología hepática, así como las comorbilidades metabólicas asociadas: obesidad, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, y diabetes tipo 2. Como los pacientes con HGNA sin EHNA tienen excelente pronóstico desde el punto de vista hepático, los tratamientos dirigidos a mejorar la enfermedad hepática se deben limitar a las personas con EHNA.

1.3.7.1 INTERVENCIÓN SOBRE EL ESTILO DE VIDA

Numerosos estudios han demostrado que la modificación del estilo de vida puede reducir niveles de aminotransferasas y mejorar la esteatosis hepática cuando medida por ultrasonografía [120, 123, 139] o resonancia magnética [120, 124, 139].

La mejor evidencia actual que utiliza la pérdida de peso como un medio para mejorar la histología hepática en la EHNA proviene de un ensayo que asignó al azar a 31 personas obesas con EHNA a un grupo en el que se realizaron cambios de estilo de vida (dieta intensiva, modificaciones del comportamiento, y 200 minutos por semana de actividad física moderada durante 48 semanas) vs otro grupo en el que se aplicó una educación básica estructurada y aislada [125]. El grupo de sujetos sometido a terapia intensiva presentó una pérdida de peso del 9,3% (frente al 0,2% en el grupo de asesoramiento dietético aislado) y dio lugar a una mejoría en la esteatosis, necrosis e inflamación, pero no en la fibrosis. Es importante destacar que los participantes con pérdida de peso $\geq 7\%$, presentaron mejoría significativa en la esteatosis, inflamación lobular, balonización hepatocitaria, y en NAS (NAFLD Activity Score) [125].

Dada la evidencia demostrada en este campo, se afirma que la pérdida de peso reduce generalmente la esteatosis hepática, ya sea mediante dieta hipocalórica sola o en combinación con una mayor actividad física (fuerza de recomendación – 1, evidencia - A) [120, 139]. La pérdida de al menos 3 a 5% del peso corporal parece ser necesaria para mejorar la esteatosis, pero una mayor pérdida de peso (hasta 10%) puede ser importante para mejorar la actividad necroinflamatoria registrada en la EHNA (fuerza

de recomendación - 1, evidencia - B). La realización aislada de ejercicio en adultos con HGNA puede reducir la esteatosis hepática, pero su capacidad para mejorar otros aspectos de la histología hepática sigue siendo desconocida [120, 139].

1.3.7.2 AGENTES SENSIBILIZADORES DE INSULINA

- **Metformina:** un reciente meta-análisis [121] ha concluido que la suma de administración de metformina durante 6 - 12 meses más una intervención estilo de vida no ha mejorado los niveles de aminotransferasas o la histología hepática, en comparación con la intervención del estilo de vida sola, independientemente de la dosis de metformina o la presencia de diabetes, por tanto la metformina no tiene efecto significativo sobre la histología hepática y no se recomienda como tratamiento específico en adultos con EHNA (fuerza de recomendación – 1, evidencia – A) [120, 121, 139].

- **Tiazolidinedionas (TZDs):** Belfort, et al. [53] realizaron un ensayo clínico controlado y aleatorizado en el que se administraba pioglitazona (45 mg / día) en pacientes con EHNA que presentaron intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2. Aunque hubo un significativo aumento de peso ($2,5 \pm 0,5$ kg) con pioglitazona, se apreció mejoría significativa de aminotransferasas, así como de parámetros histológicos como esteatosis, balonización e inflamación. El NAS score mejoró en el 73% de los pacientes tratados con pioglitazona frente al 24% de los pacientes tratados con placebo ($P < 0,001$) y se observó una tendencia hacia la mejoría en la fibrosis en los pacientes asignados al azar a la pioglitazona ($P = 0,08$).

Un reciente meta-análisis [121] que incluyó cinco ensayos controlados y aleatorizados, mostraron que la pioglitazona mejora significativamente la esteatosis (OR: 4,05, IC del 95%: 2,58 a 6,35) y la inflamación (OR: 3,53, IC del 95%: 2,21 a 5,64), pero no la fibrosis (OR: 1,40, IC del 95%: 0,87 a 2,24).

Ha habido un debate considerable sobre la seguridad a largo plazo de las tiazolidinedionas, ya que se han asociado a mayor riesgo insuficiencia cardiaca congestiva en pacientes con cardiopatía de base, cáncer de vejiga y pérdida de masa ósea, por lo que se debe tener cuidado al considerar su uso sobre todo en pacientes con

deterioro de la función miocárdica [120, 139]. Debido al aumento del riesgo de eventos coronarios, la rosiglitazona no se comercializa en Europa y su uso está muy restringido en los Estados Unidos [120, 139].

En conclusión, La pioglitazona puede ser usada para tratar pacientes con EHNA confirmada con biopsia, sin embargo, hay que señalar que la mayoría de los pacientes que participaron en los ensayos clínicos que investigaban el uso de pioglitazona en la EHNA eran no diabéticos y que la eficacia y seguridad a largo plazo de pioglitazona en pacientes con EHNA no está establecida (fuerza de recomendación – 1, evidencia – B) [120, 139].

1.3.7.3 VITAMINA E

El estrés oxidativo es considerado un mecanismo clave de lesión hepatocelular y de progresión de la enfermedad en sujetos con EHNA. La vitamina E es un antioxidante y ha sido investigado como tratamiento de esta patología [120, 139]. En función de los resultados obtenidos de varios metaanálisis, se concluye que la vitamina E (α -tocoferol), administrada en dosis diaria de 800 UI / día, mejora pos parámetros histológicos hepáticos en adultos no diabéticos con EHNA y por lo tanto se debe considerar como una primera línea farmacoterapéutica en estos pacientes (fuerza de recomendación – 1, evidencia – B) [120, 139].

Hasta que resultados adicionales apoyen su eficacia en pacientes diabéticos, la vitamina E no se recomienda para el tratamiento de la EHNA en estos pacientes, ni se recomienda en pacientes con HGNA sin biopsia hepática, ni en cirrosis asociada a EHNA o cirrosis criptogénica (fuerza de recomendación – 1, evidencia – C) [120, 139].

Respecto a posibles riesgos asociados a este fármaco, un reciente ECA describió que la vitamina E administrada en una dosis de 400 UI / día aumentaba el riesgo de cáncer de próstata en hombres relativamente sanos (aumento absoluto del 1,6 por 1.000 personas-año que tomaban vitamina E) [125].

1.3.7.4 ÁCIDO URSODESOXICÓLICO, ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y AGENTES DIVERSOS

Numerosos ECAs multicéntricos han mostrado de forma convincente que el ácido ursodesoxicólico no produce mejoría histológica en pacientes con EHNA y HGNA y por tanto su uso no está recomendado (fuerza de recomendación – 1, evidencia – B) [120, 139]. Sería apresurado recomendar los ácidos grasos omega-3 para el tratamiento específico del HGNA o EHNA, pero pueden ser considerados como los agentes de primera línea para el tratamiento de la hipertrigliceridemia en pacientes con hígado graso no alcohólico (fuerza de recomendación – 1, evidencia –B) [120, 139].

1.3.7.5 CIRUGÍA BARIÁTRICA

La mayoría de los pacientes sometidos a cirugía bariátrica presentan HGNA, por tanto se ha mostrado un interés por la cirugía bariátrica situándose como una opción significativa de tratamiento para la EHNA. No hay ECAs que hayan evaluado cualquier tipo de procedimiento quirúrgico bariátrico para tratar específicamente el HGNA o EHNA. Sin embargo, existen varios estudios de cohorte retrospectiva y prospectiva que compararon la histología hepática en las personas con obesidad mórbida, antes y después de la cirugía bariátrica. Un reciente metaanálisis ha demostrado que la esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis parecen mejorar o resolverse completamente después de la cirugía bariátrica [127], sin embargo, una revisión Cochrane publicada recientemente [128] llegó a la conclusión de que la falta de ensayos clínicos aleatorizados o cuasi-aleatorizados impiden la evaluación definitiva de los beneficios y los daños de la cirugía bariátrica como una aproximación terapéutica para los pacientes con EHNA. En conclusión, la cirugía bariátrica no está contraindicado en individuos obesos con HGNA o EHNA (pero sin cirrosis establecida) (fuerza de recomendación – 1, evidencia –A). El tipo, la seguridad y la eficacia de la cirugía bariátrica en individuos obesos con cirrosis asociada a EHNA no está establecida (fuerza de recomendación – 1, evidencia – B). Sería prematuro considerar la cirugía bariátrica como una opción

terapéutica específica para la EHNA (fuerza de recomendación – 1, evidencia – B) [120, 139].

1.3.7.6 ESTATINAS

Como se ha citado en apartados anteriores, los pacientes con HGNA y EHNA tienen mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y varios estudios han establecido la enfermedad cardiovascular como causa de muerte más común en estos pacientes [101, 102]. Se debe considerar el tratamiento de la dislipemia en el marco general de la reducción del riesgo cardiovascular en pacientes con HGNA (fuerza de recomendación – 1, evidencia - B) [120, 139]. Numerosos estudios retrospectivos y prospectivos han establecido que las estatinas son seguras en pacientes con enfermedad hepática y no hay evidencia de que los pacientes con enfermedad hepática crónica, incluyendo a HGNA y EHNA tengan un mayor riesgo de lesión hepática grave causada por las estatinas respecto a pacientes sin enfermedad hepática [120, 139]. Hasta ECAs con estudios histológicos que permitan comprobar su eficacia, las estatinas no deben ser utilizadas para tratar específicamente la EHNA (fuerza de recomendación – 1, evidencia - B) [120, 139].

1.3.7.7 NUEVOS TRATAMIENTOS

Existen diversos fármacos cuya eficacia se está probando en estudios fase 2/3 [156]. En estudios de pequeña cohorte, la pentoxifilina (anti TNF- α) ha demostrado beneficios histológicos y es un candidato adecuado para incluirlo en ECA multicéntricos [156]. Destacan también estudios en curso con el ácido eicosapentanoico, ácido obeticólico y con bitartrato de cisteamina (antioxidante) [156]. GFT-505 es un agonista PPAR- α/δ , desarrollado por Genfit para el tratamiento potencial de la aterosclerosis, dislipidemia, diabetes tipo 2, y EHNA [156, 157]. Estudios preclínicos y ensayos clínicos en fase II han demostrado que GFT-505 reduce los niveles plasmáticos de triglicéridos, incrementa los niveles de HDL y mejora la sensibilidad a la insulina y

los marcadores de disfunción hepática asociados a EHNA [157]. En estos ensayos no se han apreciado alertas toxicológicas o de seguridad tanto en animales como en humanos [157]. Actualmente los estudios acerca de este fármaco se encuentran en fase III, pero los resultados no han sido publicados, y tendrán que desarrollarse en el futuro estudios multicéntricos que corroboren su eficacia y seguridad [156, 157].

1.3.7.8 TRATAMIENTO DEL HGNA EN PACIENTES CON OTRAS PATOLOGÍAS HEPÁTICAS CRÓNICAS

Debido a la alta prevalencia de factores de riesgo para el HGNA y EHNA, no es infrecuente que en los pacientes con otras patologías hepáticas crónicas coexistan características histológicas del hígado graso no alcohólico [120, 139]. La coexistencia de esteatosis hepática es común en la hepatitis C y está intensamente asociada con enfermedad hepática avanzada [120, 139]. También se ha demostrado una alta prevalencia de la esteatosis (40,5%) y la esteatohepatitis (15%) en los pacientes con cirrosis biliar primaria, y en la práctica clínica, no es infrecuente que los pacientes obesos y / o diabéticos con enfermedad hepática autoinmune presenten esteatosis y esteatohepatitis en las biopsias hepáticas [120, 139].

Estudios anteriores han demostrado que la obesidad, la RI y la esteatosis hepática se asocian con una menor respuesta al interferón pegilado y ribavirina para el tratamiento del VHC [120, 129, 139]. La obesidad no tiene el mismo impacto negativo en la respuesta a los nuevos inhibidores de la proteasa [130] pero el impacto de la resistencia a la insulina y esteatosis hepática no han sido aún investigados suficientemente [120, 139]. No se sabe si el tratamiento de esteatosis y esteatohepatitis altera la historia natural de otras enfermedades crónicas del hígado como la hepatitis C y cirrosis biliar primaria. [120, 139] Además, no se conoce si los agentes tales como la vitamina E y pioglitazona son efectivos para el tratamiento de esteatosis y esteatohepatitis cuando están presentes otras enfermedades hepáticas crónicas [120, 139].

1.3.7.9 RECOMENDACIONES RELATIVAS A LA PRÁCTICA CLÍNICA

- Los pacientes con hígado graso no alcohólico no deben consumir grandes cantidades de alcohol (fuerza de recomendación – 1, evidencia - B). No se pueden hacer recomendaciones respecto al consumo leve de alcohol a personas con hígado graso no alcohólico (fuerza de recomendación – 1, evidencia - B) [120, 139].
- Los pacientes con cirrosis asociada a EHNA deben ser sometidos a gastroscopia para examinar la presencia o no de varices gastroesofágicas de acuerdo con las guías de práctica AASLD (fuerza de recomendación – 1, evidencia - B) [120, 131, 139].
- Los pacientes con cirrosis asociada a EHNA deben ser sometidos al cribado de HCC de acuerdo a las guías de práctica AASLD (fuerza de recomendación – 1, evidencia - B) [120, 132, 139].
- Los estudios recientes no apoyan la repetición rutinaria de la biopsia hepática en pacientes con HGNA o EHNA (fuerza de recomendación – 2, evidencia - C) [120, 139].

JUSTIFICACIÓN

**HIPÓTESIS DE
TRABAJO**

OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial, cuya prevalencia ha aumentado y continúa aumentando alarmantemente en nuestra sociedad, así como en países en economía en transición, hasta adquirir proporciones epidémicas [1]. Entre las repercusiones clínicas más importantes de la obesidad se encuentra el síndrome metabólico, cuya manifestación hepática es el HGNA [83, 113]. En consecuencia, la prevalencia del HGNA, y su espectro más importante, la EHNA, ha aumentado en paralelo con el incremento de la obesidad y la diabetes tipo 2, tanto en la población adulta como pediátrica [85, 86]. En la actualidad, el HGNA representa la causa más común de enfermedad hepática en el mundo occidental [83, 85].

El desarrollo de esteatosis hepática y su evolución hacia esteatohepatitis es un proceso complejo y multifactorial, en el que la resistencia a insulina aparece como uno de los mecanismos principales [83, 89, 91, 113]. Sin embargo, puede haber diferencias de un paciente a otro en la relevancia relativa de los mecanismos asociados a la EHGNA, en función de condicionantes genéticos y ambientales. De hecho, se ha descrito que el papel de la resistencia a insulina, como mecanismo generador de esteatosis, podría ser poco relevante en niños obesos prepúberes [176].

Insulina, leptina y adiponectina destacan entre las hormonas más relevantes en los procesos que conectan la obesidad con el síndrome metabólico y el hígado graso [28, 29, 30, 31, 32, 83, 64, 96, 113]. Nuestra hipótesis general es que, durante el origen y evolución de la EHGNA asociada a obesidad mórbida, el hígado sufre una alteración en la señalización de insulina, leptina y adiponectina. Se ha demostrado el desarrollo de resistencia hepática a insulina en pacientes con HGNA y existen evidentes argumentos a favor de que el hígado pudiera adquirir también resistencia a leptina [83, 113, 114, 133, 134, 135, 136, 137, 145]. En cambio, con respecto a la señalización hepática de

adiponectina durante el desarrollo de la EHGNA, los datos son contradictorios en la bibliografía.

Varios trabajos han demostrado una conexión entre la expresión de los receptores de adiponectina y enzimas implicadas en la maquinaria celular de defensa antioxidante [42, 43, 44, 58, 59].

. Esto, unido al destacado papel de los procesos oxidativos en el desarrollo de la EHGNA [40, 41], nos ha llevado a plantear la siguiente hipótesis de trabajo:

- Los posibles cambios en la expresión hepática de los receptores de adiponectina durante la progresión de la EHGNA, en obesidad mórbida, pueden estar asociados con la expresión de genes relacionados con la maquinaria celular de defensa antioxidante.

En un hígado sano, la leptina inhibe la síntesis de lípidos, incrementa la β -oxidación y aumenta la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina [64]. Sin embargo, en pacientes obesos, los niveles elevados de leptina se asocian a hígado graso y síndrome metabólico [64, 69]; siendo un importante argumento a favor de que el hígado adquiera resistencia a leptina durante la EHGNA. Además, está demostrado que hay resistencia a insulina en los hepatocitos de un hígado graso y se sabe que leptina e insulina comparten vías de señalización intracelular [83, 113, 114, 133, 134, 135, 136, 137, 145]. Estos datos nos han llevado a proponer la siguiente hipótesis de trabajo:

- Durante el desarrollo de la EHGNA en obesos mórbidos, aparecen cambios en la expresión de genes relacionados con la señalización hepática de leptina, que podrían asociarse con la expresión de genes relacionados con la señalización de insulina.

Histológicamente, la esteatosis hepática se caracteriza por una acumulación excesiva de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos [27, 155]. Las inclusiones lipídicas del citoplasma están gestionadas por una familia de proteínas anfílicas, localizadas en la superficie de las gotas. Dos de las proteínas más importantes de esta familia, perilipina y adipofilina, se encuentran presentes en los hepatocitos del hígado graso [140]. Partiendo del supuesto de que la esteatosis hepática es consecuencia de una disfunción endocrina en el hepatocito, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

- Durante el origen y la progresión de la EHGNA en obesos mórbidos, los incrementos de expresión de perilina 1 y adipofilina se podrían relacionar con la expresión de genes asociados a la señalización hepática de adiponectina, leptina e insulina, identificando elementos clave de resistencia endocrina.

- OBJETIVOS

En nuestro estudio, resalizado a pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, se han analizado los siguientes objetivos.

- 1) Valorar la presencia y progresión de la EHGNA a partir de biopsias hepáticas intraoperatorias, según el método de Kleiner.
- 2) Evaluar parámetros bioquímicos relacionados con perfil hepático, resistencia a insulina, metabolismo lipídico y adipoquinas, así como marcadores de estrés oxidativo en sangre durante el origen y progresión de la EHGNA.
- 3) Evaluar la expresión génica intrahepática de una serie de genes asociados a la señalización de adiponectina, leptina, insulina, proteínas PAT, metabolismo lipídico y estrés oxidativo durante el origen y progresión de la EHGNA, en las biopsias hepáticas.
- 4) Establecer un vínculo entre los niveles de receptores de adiponectina hepáticos y el nivel de estrés oxidativo hepatocitario en distintos estadios de la EHGNA (según clasificación histológica) mediante la medición de niveles sanguíneos de marcadores de estrés oxidativo, así como la cuantificación del nivel de expresión

génica intrahepática de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo: GPX1, GRD e iNOS, en biopsias hepáticas.

- 5) Establecer un vínculo entre los niveles de expresión hepática de los genes asociados a señalización de leptina, insulina y metabolismo lipídico durante el origen y progresión de la EHGNA.
- 6) Establecer un vínculo entre los niveles de expresión de proteínas PAT y los genes medidos anteriormente con la intención de identificar marcadores claves de resistencia hepática endocrina durante el origen y progresión de la EHGNA.
- 7) Valorar la evolución de la actividad de marcadores plasmáticos relacionados con el síndrome metabólico (glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL, insulina, HOMA-IR), marcadores de perfil hepático (transaminasas y GGT), marcadores plasmáticos de estrés oxidativo y adipocinas, en muestras sanguíneas realizadas antes y un año después de la cirugía bariátrica.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MUESTRA

Se ha realizado un primer estudio de corte transversal en el que se han incluido 60 sujetos, en total 18 hombres y 42 mujeres, con obesidad mórbida ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$), sometidos a cirugía bariátrica en el Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España).

Se ha realizado segundo estudio observacional, analítico, con seguimiento de la cohorte de pacientes citada (al final del estudio han quedado 42 pacientes), a los que se ha realizado una valoración estadística de la evolución del IMC y parámetros plasmáticos: glucosa e insulina, leptina y adiponectina, perfil hepático, perfil lipídico y de estrés oxidativo; antes y un año después de la cirugía.

Se ha realizado un tercer estudio en un modelo celular invitro de esteatosis hepática para verificar algunos datos obtenidos en la cohorte de pacientes en relación a la asociación entre adipofilina y SOCS-1.

Los **criterios de exclusión** para los estudios que han incluido a la cohorte de pacientes han sido: los trastornos hepáticos primarios, además de aquellos que presentan HGNA secundario a patologías como la deficiencia de alfa-1-antitripsina, la hepatitis infecciosa o enfermedad de Wilson, identificados por los marcadores de la enfermedad específica. El consumo de alcohol máximo permitido en los participantes del estudio ha sido como máximo de 30 g por semana en hombres y 20 g por semana en las mujeres.

El comité de ética del Hospital Universitario San Cecilio ha aprobado el estudio y todos los sujetos han aceptado y firmado el consentimiento informado escrito.

3.2 PARÁMETROS BIOLÓGICOS

Para el estudio de corte transversal las biopsias hepáticas han sido obtenidas en el momento de la cirugía bariátrica. Para el estudio observacional, analítico, con seguimiento de la cohorte se han tomado muestras de sangre antes de la cirugía, después de 10 horas de ayuno postoperatorio y un año después de la cirugía. Para el diseño del estudio de modelo celular se han utilizado cultivos de la línea celular establecida llamada PLC-PRF-5 (hepatocarcinoma humano), que sintetizan en la superficie el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg)

3.2.1 DETERMINACIONES DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS

Las muestras de sangre han sido procesadas y analizadas por métodos de rutina dentro de las 24 horas siguientes a la extracción en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario San Cecilio. En cada paciente, se han analizado los niveles de glucosa (mg / dl), insulina (mU / ml), triglicéridos (mg / dl), colesterol total (mg / dl), lipoproteínas de baja densidad (LDL) colesterol (mg / dl), lipoproteínas de alta densidad (HDL), colesterol (mg / dl), alanina aminotransferasa (ALT) (U / l), aspartato aminotransferasa (AST) (U / l) y gamma glutamiltransferasa (GGT) (U / l). En todos los pacientes se ha calculado el índice HOMA-IR, que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células beta mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas, para evaluar la resistencia a la insulina, mediante la fórmula citada a continuación.

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = (\text{insulina} \times \text{glucosa}) / 22,5$$

3.2.2 DETERMINACIÓN DE ADIPONECTINA Y LEPTINA PLASMÁTICA

Los niveles de adiponectina y leptina en plasma se han medido utilizando el kit de LINCOplex con el Sistema Integrado de Luminex 100 2.3 software en el Bio-Plex™ 200 System (BIO-RAD). Los ensayos han sido realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICOS

- **Niveles de nitritos:** las muestras de plasma se han desproteinizado y se han utilizado los sobrenadantes para medir la cantidad de nitrito, a través de la reacción de Griess a 550 nm en un lector de microplacas (serie TRIAD, Dynex Technologies). Las concentraciones de nitrito se han calculado de acuerdo a una curva estándar y se han expresado en nmol / ml.

- **Medición de niveles de glutatión peroxidasa 1 (GPx1) y de glutatión reductasa (GRD):** Los eritrocitos han sido lisados y se han utilizado sobrenadantes. La Glutatión peroxidasa (GPx1), glutatión reductasa (GRD) y su actividad han sido medidas después de la oxidación de NADPH durante 3 min en un espectrofotómetro UV-(BIOMATE, Thermo Spectronic) a 340 nm. La actividad de ambas enzimas se ha expresado en nmol / mg de hemoglobina (HB).

- **Determinación de niveles de glutatión reducido (GR):** los eritrocitos han sido lisados y los sobrenadantes se han incubado con optalaldehído. La fluorescencia de las muestras se ha medido en un espectrofluorómetro placa-lector (TRÍADA serie) y se ha calculado de acuerdo a una curva estándar de GR.

- **Determinación de niveles de glutathion oxidado (GO):** los sobrenadantes han sido pre-incubados con la N-etilmaleimida y, a continuación alcalinizados con NaOH (hidróxido de sodio). La fluorescencia mide la concentración de GO y se calcula de acuerdo a una curva estándar. Los niveles de GR y GO se han expresado en nmol / mg HB.

3.2.4 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Todas las biopsias han sido evaluadas por un único patólogo con experiencia utilizando el sistema de puntuación validada por Kleiner et al [27]. Este sistema de puntuación histológico cuantifica los cambios de actividad necroinflamatoria y esteatósicos (esteatosis, inflamación lobular y balonización), dando lugar a resultados para actividad de EHNA que oscilan entre 0 y 8. Las puntuaciones mayores o iguales a 5 han sido diagnosticadas como EHNA, las puntuaciones entre 3 y 4 han sido diagnosticadas como probable EHNA, las puntuaciones de 1 y 2 han sido diagnosticadas como HGNA sin EHNA, y la puntuación 0 ha sido diagnosticada como no HGNA. En función de esta puntuación los pacientes han sido divididos en tres grupos: grupo 0 (sin EHGNA: Kleiner 0), grupo 1 (HGNA sin EHNA: Kleiner 1 y 2) y grupo 2 (probable EHNA o EHNA: Kleiner > 2).

3.2.5 ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL HEPATOCITO

Mediante técnicas de RT-PCR a tiempo real, se han evaluado la expresión de una serie de genes asociados a la señalización de adiponectina, leptina, insulina, metabolismo lipídico, estrés oxidativo e inflamación en biopsias hepáticas intraoperatorias. La expresión de genes estudiados se detalla a continuación:

- **Relacionados con señalización de adiponectina:** estudio de la expresión génica intrahepática de los receptores de adiponectina Adipo R1 y Adipo R2.
- **Relacionados con señalización de leptina:** estudio de la expresión génica intrahepática de 2 isoformas celulares del receptor de leptina: OB-Ra, OB-Rb y dos proteínas asociadas a la señalización de leptina: SOCS-1 y SOCS-3.
- **Relacionados con señalización de insulina:** estudio de la expresión génica intrahepática del receptor de insulina (INS-R), así como dos proteínas asociadas a su señalización: IRS-1 e IRS-2.
- **Relacionados con la síntesis y catabolismo de lípidos:** determinación de la expresión génica intrahepática de factores de transcripción claves en la regulación de la síntesis lipídica: PPAR- α , SREBP-1c, SREBP-2 .
- **Relacionados con la gestión de las gotas lipídicas citoplásmicas:** dos proteínas implicadas en la gestión de las gotas intracitoplásmicas de ácidos grasos: perilipina A y adipofilina.
- **Estudio de factores asociados con la inducción y depuración de estrés oxidativo:** determinación de la expresión génica intrahepática de las enzimas de estrés oxidativo glutathion peroxidasa 1 (GPx1), glutathion reductasa (GRD) y la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS).

3.2.5.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDO HEPÁTICO

El RNA total (que incluye RNAs mensajeros, ribosómicos y de transferencia) de tejido hepático ha sido extraído mediante el kit comercial “RNeasy Mini Kit de Quiagen”. Con la intención de minimizar la contaminación con DNA genómico, se ha optado por digerir específicamente el DNA durante el proceso de extracción, utilizando el kit comercial “RNase-Free DNase Set de Quiagen”. El protocolo, según las instrucciones del fabricante, se describe brevemente a continuación:

Se homogeniza en 0,5 ml de tampón de lisis una biopsia tejido hepático. A continuación se mezcla el homogenado con un volumen equivalente de etanol al 75 % y se pasa por las columnas de extracción de RNA, suministradas por el fabricante, mediante centrifugación a 10000 rpm durante 30 segundos. Se resalta que el homogenado tiene las condiciones químicas necesarias para que el RNA sea específicamente retenido por la resina incluida en la columna, por lo que se desecha el líquido tras atravesar la resina. A continuación se realiza un lavado de la resina incluida en la columna con 350 μ l de tampón RW1, mediante centrifugación. El siguiente paso es una digestión, *in situ*, de DNA genómico añadiendo 80 μ l de DNAsa diluida en tampón de reacción (a la proporción indicada por el fabricante) sobre la propia resina e incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la digestión se realizan tres lavados (uno con 350 μ l de tampón RW1 y dos con 500 μ l de tampón RPE) mediante el procedimiento de centrifugar y desechar el volumen que atraviesa la resina. Por último, se eluye la resina en 50 μ l de agua ultrapura durante 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifuga la columna a 13000 rpm durante 1 minuto en un tubo limpio y se recupera el volumen que contiene disuelto el RNA total de tejido adiposo. La concentración final del RNA se determina mediante medida de la absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar para el RNA es de $40,0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}\cdot\text{DO}^{-1}$. La pureza del RNA se determina calculando la relación de absorbancias a 260 nm y a 280 nm. Relación que, para muestras puras de RNA, es de 2,0. El RNA se conserva a -80 °C hasta su utilización.

3.2.5.2 RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA

La retrotranscripción de RNA total a DNA copia ha sido realizada mediante el kit comercial “iScript™ Select cDNA Synthesis Kit de BioRad”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente el protocolo consiste en mezclar 500 ng de RNA con el tampón y la enzima suministrada por el kit, en un volumen final de 20 µl. A continuación se realiza una incubación, en un termociclador de 5 minutos a 20 °C (temperatura de hibridación de los cebadores), 30 minutos a 42 °C (temperatura de reacción) y 5 minutos a 85 °C (temperatura de desnaturalización irreversible de la enzima).

Se destaca que dicho kit utiliza dos tipos de oligonucleótidos para cebar el RNA: 1) hexanucleótidos de secuencia aleatoria y 2) oligo-adeninas, que se unirán a las “colas de poly-T” del extremo 3’ del los RNAs mensajeros.

Una vez finalizada la retrotranscripción, el producto de reacción se diluye con agua hasta un volumen final de 80 µl y se congela a -20 °C hasta su utilización.

3.2.5.3 DISEÑO DE LOS CEBADORES

Los cebadores (**tabla 8**) han sido analizados previamente para evaluar su especificidad y sensibilidad. El tamaño de los oligonucleótidos y la composición relativa en adenina y timina ha sido la misma en cada pareja de cebadores, con la intención de obtener temperaturas de hibridación similares. En el diseño de cada pareja de cebadores se ha prestado especial atención en evitar regiones de dimerización, que pudieran competir con la amplificación de la secuencia problema y sobreestimar el valor de fluorescencia emitido por el intercalante EvaGreen®. La ausencia de dímeros de cebadores ha sido comprobada previamente para cada pareja.

Los cebadores se han diseñado a partir de secuencias humanas de DNA copia de RNA mensajero, obtenidas de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Siempre que se detectasen isoformas en los RNAs, los cebadores se han diseñado frente a regiones comunes a todas ellas. Por último, siempre que ha sido posible, se han diseñado los cebadores frente a exones diferentes y contiguos, con la intención de eliminar completamente la interferencia provocada por trazas de DNA genómico. Esta interferencia es relevante únicamente en genes de muy bajo nivel de expresión.

Tabla 8. Secuencias de los cebadores para la amplificación de cDNA por PCR en tiempo real.

Gen	Sentido de imprimación	Antisentido de imprimación	Tamaño
ADIPOR1	ccatgcactttactatcgctgagggctttg	ctgaaggttgagactccatagaagtggac	233 bp
ADIPOR2	ttcctaccttgactatgtcatctcggagg	gaaacgaaactcctggaggtttgagacacc	251 bp
GPx1	tggacaattgcgccatgtgtgctgctc	tgatgcccaactggttgcacgggaag	265 bp
GRd	aacaacatcccaactgtggtcttcagccac	gtagggtgaaaggcactgtgttgtaaag	314 bp
iNOS	gatgaggaccacatctaccaggag	ccataggaaaagactgcaccgaag	284 bp
PPIA	ccatggcaaatgctggaccaacacaaaatg	tcttgagctacagaaggaatgatctggtgg	256 bp
RPS13	ggtgttgacacaagtacgttttgtgacaggc	tcatatttccaattgggagggaggactcgc	251 bp
Adipofilina	accacgtgccacaccctoctgtccaacatc	cttgtccatctctgcaccttggctctgagc	306 pb
Perilipina 1	caaagcgcagggcagcgacagcttcttcc	ccatagaaacagagcaggtgctggctctgg	348 pb
Ob-Ra	ccattgagaagtaccagttcagtcctttaccaatat	tccttgggtacttgagattagggagtgggtg	329 pb
Ob-Rb	ccattgagaagtaccagttcagtcctttaccaatat	aagaggaccacatgtcactgatgctgtatgc	326 pb
SOCS-1	tccgcacattccgttgcacgcccattacc	acgtagtgtctccagcagctogaagaggcag	301 pb
SOCS-3	tgcgtgctcaagctggtgcaccactacatg	gcatcgtactggtccaggaactcccgaatg	314 pb
INS-R	tctgatactagtcaaggtccagaaccagcc	aaagctgcagcacatttgatcctgcgttgc	284 pb
IRS-1	tgctgttaacgagtatgccatagataggac	ctttgtgtacacagatgaagtagcaccggg	297 pb
IRS-2	cggcttccagaatggtctcaactacatcgc	ctctttcacgatggtggcctccttcaagtg	280 pb
SREBP-1	agaagcttggcgatcgccggctgctgcaag	gcgaaggcacacagcagccgcaggtcgaac	232 pb
PPAR-α	cactggaactggatgacagtgatactccc	agcatccgactccgtcttcttgatgatctg	263pb
SREBP-2	acgcagagcaccaagcacggagaggtggat	ggcaatggcagtgccaccaccagcttaac	232 pb

3.2.5.4 PCR A TIEMPO REAL

La cuantificación de la concentración de cada RNA mensajero se ha determinado a partir de una fracción del volumen de retrotranscripción que ha oscilado entre 2 y 8 μ l, dependiendo de la “fuerza” de expresión genética. El proceso se ha desarrollado mediante la técnica de PCR a tiempo real, utilizando la Mix de PCR “SsoFast EvaGreen Supermix de BioRad” y la plataforma CFX96 de BioRad.

Brevemente, la técnica basa en una reacción de amplificación (Polimerase Chain Reaction) de una determinada secuencia (perteneciente al RNA mensajero a cuantificar) mediante el uso de cebadores específicos. La cuantificación se realiza acoplado la reacción de amplificación a un fluorímetro que determina con precisión la cantidad de DNA producida en cada ciclo de amplificación. De esta manera se establece una curva de crecimiento de DNA, a partir de la cual se puede estimar la concentración inicial, al inicio de la reacción. El parámetro más importante de dicha curva es el Ct (threshold cycle) que se define como el punto en que la curva de crecimiento de DNA supera el umbral de detección de fluorescencia. La relación matemática entre el valor de Ct y la cantidad inicial de DNA copia ha sido determinada previamente mediante una curva patrón.

La Mix de PCR empleada utiliza como método de cuantificación del DNA, la fluorescencia emitida por el intercalante EvaGreen[®]. Al ser un método que determina la cantidad global de DNA, se requiere un cuidado especial en el diseño y optimización de los cebadores.

El volumen final de todas las reacciones de PCR ha sido de 20 μ l y la concentración final de los cebadores ha sido de 200 nM. Cada amplificación ha sido realizada con 40 ciclos. Tras cada ciclo se ha realizado una lectura de fluorescencia. Cada ciclo consta de dos etapas: 30 segundos a 95 °C (temperatura de desnaturalización del DNA) y 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación de los cebadores. Se destaca que, siguiendo las recomendaciones del fabricante, no se añade una etapa de elongación adicional a 72 °C, como es habitual en los protocolos de PCR. La enzima incluida en la MIX (SsoFast[®]) ha sido modificada para incrementar la constante de afinidad por el DNA, por lo que la elongación puede realizarse durante la etapa de hibridación de cebadores, a temperaturas algo inferiores a 72 °C.

La temperatura óptima de hibridación de la reacción de PCR se ha determinado para cada pareja de cebadores, oscilando entre 65 y 69 °C. Cada reacción de amplificación se ha desarrollado por duplicado. Los resultados se han normalizado con la media del nivel de expresión de tres genes “housekeeping” (genes de expresión constante) bien establecidos en la bibliografía [158]: PPIA (Peptidilprolil Isomerasa A) RPS13 (Proteína Ribosomal S13) y ubiquitina C. Las unidades de expresión relativas han sido femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping.

3.2.6 MATERIAL Y MÉTODOS DEL MODELO INVITRO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA.

Para el diseño de este estudio se han utilizado cultivos de la línea celular establecida llamada PLC-PRF-5 (hepatocarcinoma humano), que sintetizan en la superficie el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) (sólo antígeno). Los cultivos se han mantenido en monocapa adherente utilizando el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 10 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se han incubado a 37° en una atmósfera a un 5% de dióxido de carbono (CO₂) [177].

Durante el transcurso de los experimentos la confluencia celular inicial ha oscilado entre el 60 y el 70%, y se han añadido al medio de cultivo concentraciones de ácido oleico entre 0,125 y 2 mM. Para favorecer la solubilidad del ácido oleico en el medio de cultivo se ha suplementado con un 0,1% de albúmina. Se ha extraído el RNA total según el método descrito para la extracción de RNA en biopsias hepáticas. La cuantificación de la expresión genética de adipofilina y SOCS-1 se ha realizado utilizando el mismo método descrito para las biopsias hepáticas.

Han sido realizados utilizando el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL. Las variables cuantitativas se han presentado como media \pm error estándar de la media (ESM), salvo la edad que se ha expresado en frecuencia absoluta y relativa (%).

En el estudio de corte transversal los análisis para comparación de los parámetros especificados en 3 grupos se han realizado mediante el test ANOVA con análisis de comparaciones múltiples entre los grupos mediante el test de Bonferroni asumiendo igualdad de varianzas o el test de Games-Howell no asumiendo varianzas iguales para comparación de medias en variables cuantitativas continuas. Aquellas variables que no se han ajustado a distribución normal, han sido transformadas mediante la aplicación de logaritmos. La correlación lineal ha sido calculada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. El significado del valor del coeficiente de correlación se ha expresado en: correlación muy débil si el valor es menor de 0,2; débil si el valor oscila entre $\geq 0,2$ y $< 0,4$; moderada si el valor oscila entre $\geq 0,4$ y $< 0,6$; intensa si oscila entre $\geq 0,6$ y $< 0,8$; y muy intensa si es $\geq 0,8$. Para la realización del análisis multivariante se ha aplicado el análisis de regresión logística binaria con la determinación de la OR ajustada (aOR) y sus IC (95%). El criterio de significación estadística ha sido de $P < 0,05$.

En el estudio observacional, analítico, con seguimiento de la cohorte, los análisis de las variables cuantitativas continuas se han realizado mediante el test de la *t* de Student para muestras apareadas. El criterio de significación estadística ha sido $P < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS BASALES

En el estudio han participado 60 pacientes con obesidad mórbida (18 varones y 42 mujeres). De acuerdo con la puntuación anatomopatológica de Kleiner, 8 de estos pacientes no presentaban HGNA, 15 presentaban HGNA, 25 presentaban probable EHNA y 10 personas presentaban EHNA. Los pacientes fueron divididos en tres grupos:

- **Grupo 0:** no HGNA (n = 8 pacientes).
- **Grupo 1:** HGNA sin EHNA (n = 15 pacientes).
- **Grupo 2:** EHNA o probable EHNA (n = 35 pacientes).

La **tabla 9** muestra los valores de las medias \pm sus correspondientes desviaciones estándar del IMC, parámetros bioquímicos sanguíneos y los niveles plasmáticos de leptina - adiponectina en los distintos grupos. En el análisis estadístico (**tabla 9**), se han apreciado incrementos significativos en: los niveles plasmáticos de AST en el grupo 2 respecto al grupo 1, los niveles de colesterol total en el grupo 2 respecto al grupo 0, los niveles de colesterol LDL en el grupo 2 respecto al grupo 0, los niveles de triglicéridos en el grupo 2 respecto al grupo 0 y los niveles de leptina en el grupo 2 respecto al grupo 0.

Tabla 9. Características basales.

Características basales	Grupo 0 n=8	Grupo 1 n=17	Grupo 2 n=35	P
Edad (años)	41,13 ± 2,5	45,1 ± 2,9	44,5 ± 1,6	ns
Género - Hombre- n (%)	4 (50%)	4 (23,5 %)	10 (28.5 %)	ns
- Mujer- n (%)	4 (50%)	13 (76,5 %)	25 (71.5 %)	
IMC (kg/m ²)	49 ± 4	51 ± 2,06	52,2 ± 1,3	ns
AST (U/l)	27,6 ± 4,1	26,3 ± 4,8	34,6 ± 2,7	0,026**
ALT (U/l)	28,8 ± 6,7	28,9 ± 4,8	41,1 ± 3,8	ns
GGT (U/l)	51,9 ± 14,2	40,5 ± 10,2	37,8 ± 4,9	ns
Colesterol total (mg/dl)	119,3 ± 11,2	158,6 ± 7,2	174,3 ± 9,3	0,018*
LDL-colesterol (mg/dl)	57,1 ± 9,3	92,8 ± 7,4	100,1 ± 7,6	0,026*
HDL-colesterol (mg/dl)	52,5 ± 4,8	39,8 ± 2,5	41,2 ± 3,1	ns
Triglicéridos (mg/dl)	87 ± 11,6	154,9 ± 21,7	200,3 ± 25,8	0,05*
Glucosa (mg/dl)	139,4 ± 15,7	127,2 ± 8,9	139,5 ± 9,0	ns
Insulina (μU/ml)	11,1 ± 4,4	11,4 ± 1,8	12,6 ± 1,3	ns
HOMA-IR	2,2 ± 0,8	3,5 ± 0,6	4,4 ± 0,5	ns
Adiponectina (ng/ml)	37,8 ± 21,2	31,1 ± 7,2	35,5 ± 5,8	ns
Leptina (ng/ml)	15.736 ± 5.135	29.202 ± 2.424	35.759 ± 3.306	0,010*

Edad expresada en número absoluto y proporción entre paréntesis. Resto de variables cuantitativas expresados en media ± error estándar. Los valores significativos (P) en los grupos están resaltados en negrita (indicando entre qué grupos las medias son significativas). ns: no significativo. * Entre el grupo 0 y 2. ** Entre el grupo 1 y 2.

4.2 PARÁMETROS PLASMÁTICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

La **tabla 10** muestra la concentración plasmática de nitritos, GPx eritrocitaria y actividad de la GRD específica, así como la concentración eritrocitaria de glutatión oxidado (GO) y reducido (GR) en relación con la progresión de la EHNA. Los datos son expresados en medias más menos sus correspondientes errores estándar. Estas variables son marcadores representativos de estrés oxidativo sistémico. En el análisis estadístico (**tabla 10**) se han apreciado incrementos significativos entre los niveles de nitritos en el grupo 2 respecto al grupo 0, y en los niveles de GO en el grupo 1 y 2 respecto al grupo 0.

Tabla 10. Marcadores de estrés oxidativo sanguíneos

Marcadores de estrés oxidativo sanguíneos	Grupo 0 n=8	Grupo 1 n=17	Grupo 2 n=35	P
Nitritos (nmol/mL)	5,25 ± 0,9	8,9 ± 1,2	10,0 ± 0,7	0,03*
Actividad específica GPx (nmol/mg HB)	24,9 ± 3,5	30,5 ± 2,5	27,3 ± 1,2	ns
Actividad específica GRd (nmol/mg HB)	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,1	ns
Glutation Total (nmol/mg HB)	3,1 ± 0,3	4,1 ± 0,5	4,9 ± 0,4	ns
GR (nmol/mg HB)	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,3	ns
GO (nmol/mg HB)	1,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	0,03* 0,004**

*Datos de variables cuantitativas expresados en media ± error estándar. Los valores significativos (P) en los grupos están resaltados en negrita. En aquellos parámetros cuyos valores alcanzan significación estadística en todos los grupos se muestran los valores P resultantes y al lado entre paréntesis a qué diferencia entre grupos pertenece cada valor de P. * Entre el grupo 0 y 1. ** Entre el grupo 0 y 2.*

4.3 NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA INTRAHEPÁTICA Y CORRELACIONES

4.3.1 RECEPTORES DE ADIPONECTINA Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La **tabla 11** muestra las concentraciones de mRNA hepático de AdipoR1, AdipoR2, GPx1, GRD e iNOS en relación con la progresión del HGNA. Los datos son expresados en medias más menos sus correspondientes desviaciones estándar. Se ha observado (**tabla 11**) que el nivel de expresión media de todos estos genes salvo GRD ha incrementado significativamente en los pacientes del grupo 2 respecto al grupo 1 y 0. En cuanto a la concentración relativa de las isoformas del receptor de la adiponectina (**tabla 11**), AdipoR2, ha sido significativamente mayor que AdipoR1 en el grupo 2 ($p < 0,000$) pero no en el grupo 1 y 0.

Tabla 11. Concentraciones de mRNA hepático de Adipo R1, Adipo R2, GPx1, GRD e iNOS en relación con la presencia y progresión del HGNA.

Concentración mRNA hepático	Grupo 0 n=8	Grupo 1 n=17	Grupo 2 n=35	P
Adipo R1	11,8 ± 2,7	16,4 ± 1,7	21,1 ± 0,9	<0,000* 0,036**
Adipo R2	11,6 ± 3,5	20,3 ± 2,8	30,3 ± 1,4	<0,000* 0,03**
GPx1	39,7 ± 5,3	52,02 ± 4,1	76,4 ± 2,9	<0,000* <0,000**
GRD	11,4 ± 4,2	17,9 ± 1,9	20,6 ± 0,9	ns
iNOS	17,7 ± 6,4	25,6 ± 11,9	50,9 ± 7,9	0,003* 0,004**

*Datos de variables cuantitativas expresados en media ± error estándar de las concentraciones de mRNA cuantificadas en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. Para la realización del test ANOVA, iNOS ha sido transformada posteriormente a logaritmo al no presentar una distribución normal. Los valores significativos (P) en los grupos están resaltados en negrita. * Entre el grupo 0 y 2. ** Entre el grupo 1 y 2. ns: no significativo.*

También se ha analizado la correlación entre la expresión génica hepática en todos los pacientes y, por separado, en grupo (categoría) mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Los niveles de expresión génica de iNOS se han transformado previamente por función logarítmica para normalizar la distribución. Se han representado en gráfico de dispersión (**figuras 12, 13 y 14**) aquellos valores que han presentado correlaciones significativas en el total de pacientes y todos los grupos / categorías, y en la **tabla 12** las correlaciones significativas (entre paréntesis grupo / categoría) entre los valores que no han presentado correlaciones significativas en todos los grupos / categorías aunque sí en el total de pacientes. En el total de pacientes se ha observado una correlación lineal intensa entre la expresión de ambos receptores de adiponectina y GPx1 (**figuras 12 y 13**). Al comparar por grupos / categorías, estas correlaciones han descendido ligeramente a moderadas-intensas en el grupo / categoría 2 respecto al 1 y 0 (**figuras 12 y 13**).

Los niveles de expresión de AdipoR1 han mostrado una correlación débil con las expresiones de GRD e iNOS para todos los pacientes (**tabla 12**). Por otra parte, los

niveles de expresión de AdipoR2 han presentado una correlación moderada con los niveles de expresión de GRD e iNOS para todos los pacientes, siendo intensa la correlación entre Adipo R2 y GRD en el grupo / categoría 1, en cambio, en el grupo / categoría 2 no son significativas.

Se ha observado una correlación lineal intensa y significativa entre la expresión génica de los dos receptores de adiponectina en todos los pacientes y sobre todo en el grupo / categoría 0 (prácticamente perfecta), que desciende a moderada en los grupos / categorías 1 y 2 (**figura 14**).

La expresión de GPX1 se ha correlacionado de forma moderada con la expresión de GRD y de iNOS en todos los pacientes (**tabla 12**). Al comparar por grupos / categorías, se ha observado una correlación moderada entre GPx1 y GRD en el grupo / categoría 1, y débil entre GPx1 e iNOS en el grupo / categoría 2, no siendo significativas en el resto de grupos / categorías (**tabla 12**).

Figura 12

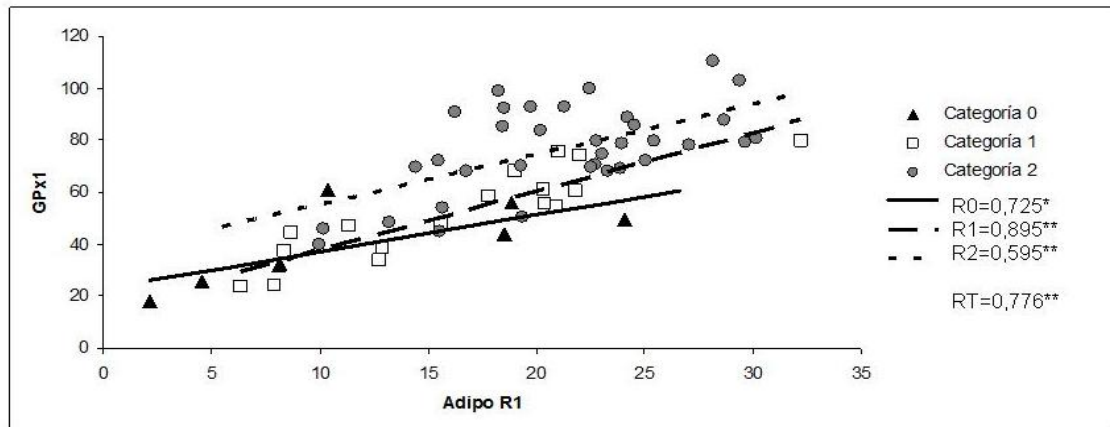


Figura 13

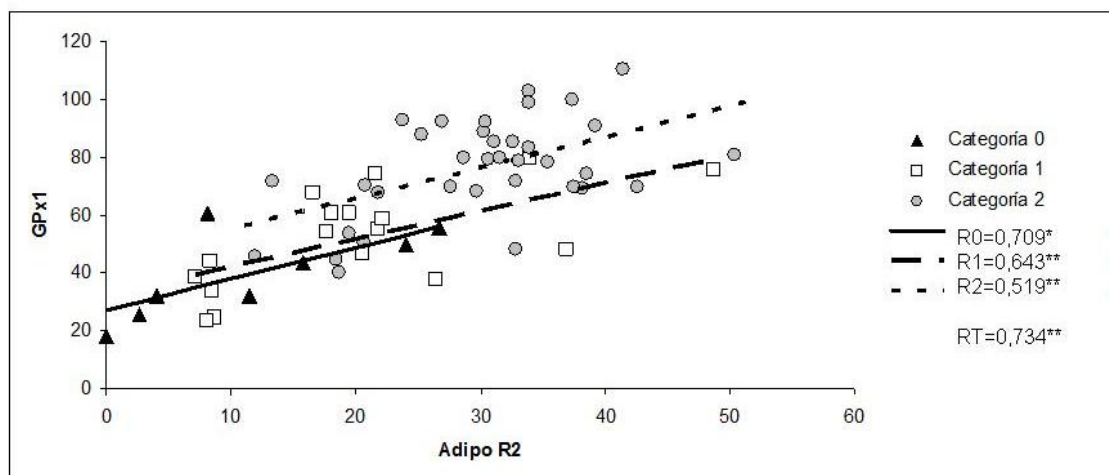
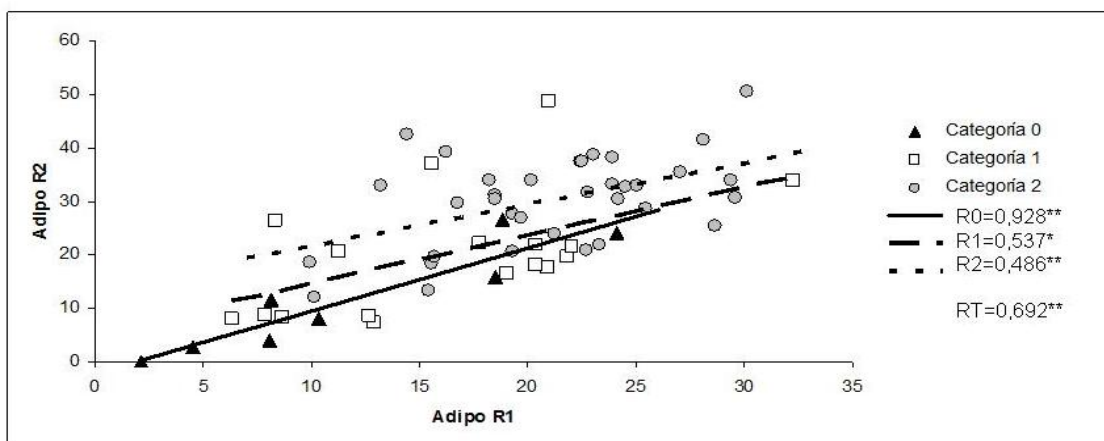


Figura 14



Figuras 12, 13 y 14. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de GPx1 y Adipo R1-2, y entre Adipo R1-2. Las concentraciones de mRNA se han cuantificado en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. Categoría=grupo. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes (n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo / categoría. *P<0,05, ** P<0,01.

	GRD	Log iNOS
Adipo R1	RT= 0,328*	RT= 0,388**
Adipo R2	R1= 0,659** RT= 0,551**	RT= 0,595**
GPx1	R1= 0,512* RT= 0,458**	R2= 0,382* RT= 0,579**

Tabla 12. Coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las concentraciones de mRNA de los parámetros indicados en el total de pacientes. Se han incluido sólo aquellos coeficientes significativos en el análisis por grupos. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes (n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo. * P<0,05, ** P<0,01.

4.3.2 RECEPTORES DE LEPTINA Y SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

Analizamos los niveles de expresión de tres genes clave en la señalización de insulina (INSR, IRS-1, IRS-2) y analizamos también los niveles de expresión de las dos isoformas predominantes del receptor de leptina en tejido hepático: OB-Ra (isoforma corta) y OB-Rb (isoforma larga). Los resultados se representan en la **tabla 13**.

En todos los grupos, la isoforma mayoritaria ha sido OB-Ra (**tabla 13**). A pesar de ello, no se aprecian diferencias significativas, respecto a la presencia y progresión de la EHGNA, ni en la concentración ni en la relación entre ambas isoformas (**tabla 13**). Merece sin embargo destacar la elevada concentración de OB-Ra en pacientes sin EHGNA, respecto a los pacientes con EHGNA. Diferencia que no es significativa, probablemente debido al reducido tamaño muestral del grupo 0 (**tabla 13**). En cuanto a los niveles de expresión de INS, IRS-1 e IRS-2, no se observan diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes, destacando que se aprecia un descenso no significativo en los niveles de expresión de IRS-1 entre el grupo 0 y la 1 grupo de obesos sin EHGNA, cuya pérdida de significación estadística se deba probablemente al reducido tamaño muestral (**tabla 13**).

En el análisis comparativo entre los receptores de leptina y los parámetros de señalización de la insulina, destaca una intensa correlación significativa entre los niveles

de expresión de genes asociados a la señalización de leptina (OB-Ra, OB-Rb) con los niveles de genes asociados a la señalización e insulina (INS-R, IRS-1, IRS-2) (**figuras 15-20**). Correlación que alcanza un máximo (coeficiente de Pearson de 0,887) entre la isoforma larga del receptor de leptina (OB-Rb) e IRS-1 (**figura 18**), en pacientes obesos sin EHGNA. Hay que destacar que los coeficientes de correlación entre los dos grupos de genes son muy elevados en pacientes sin EHGNA (**figuras 15-20**), pero descienden a moderadas en el grupo / categoría 1 e incluso evolucionan a débiles en el grupo / categoría 2 para IRS-2 e INS-R en correlación con Ob-Ra (no con Ob-Rb) (**figuras 16 y 17**). Esta situación no ocurre con IRS-1 en correlación con las isoformas del receptor de leptina (**figuras 15 y 18**), ni con IRS-2 e INS-R en correlación con Ob-Rb (**figuras 19 y 20**). Hemos observado también una importante correlación entre los niveles de expresión de las dos isoformas del receptor de leptina (OB-Ra y OB-b) (**figura 21**) y entre los niveles de expresión de las dos proteínas IRS (**figura 22**). Los coeficientes de correlación son muy intensas en el grupo de pacientes sin EHGNA (coeficiente de Pearson superior a 0,95 en ambos casos) y disminuyen (aunque siguen manteniéndose intensas) con el origen y progresión de la enfermedad.

Tabla 13. Concentraciones de mRNA hepático de Ob-Ra, Ob-Rb, INS-R, IRS 1 e IRS 2 en relación con la presencia y progresión del HGNA.

Concentración mRNA hepático	Grupo 0 n= 8	Grupo 1 n=17	Grupo 2 n=35	P
Ob-Ra	400,1 ± 319,4	122,6 ± 48,3	154,3 ± 32	ns
Ob-Rb	18,5 ± 10,9	10,2 ± 2	12,6 ± 1,8	ns
INS-R	6,7 ± 1,6	5,8 ± 0,6	7,7 ± 0,8	ns
IRS 1	4,9 ± 3,3	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2	ns
IRS 2	4,1 ± 1,5	3,1 ± 0,4	3,6 ± 0,4	ns

Datos de variables cuantitativas expresados en media ± error estándar de las concentraciones de mRNA cuantificadas en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. ns: no significativo. Para la realización del test ANOVA las variables que no siguen distribución normal (todas menos INS-R) han sido transformadas posteriormente a logaritmos.

Figura15

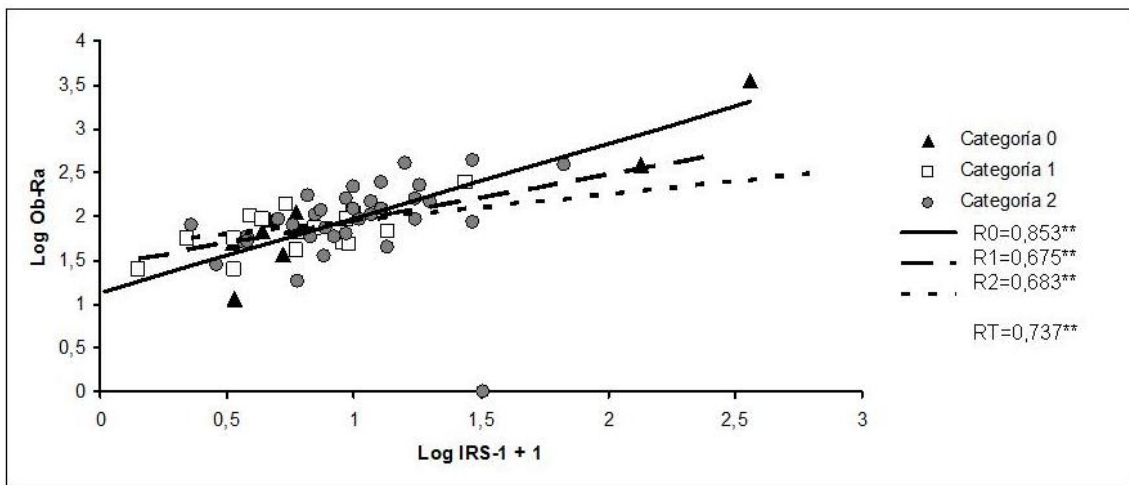


Figura 16

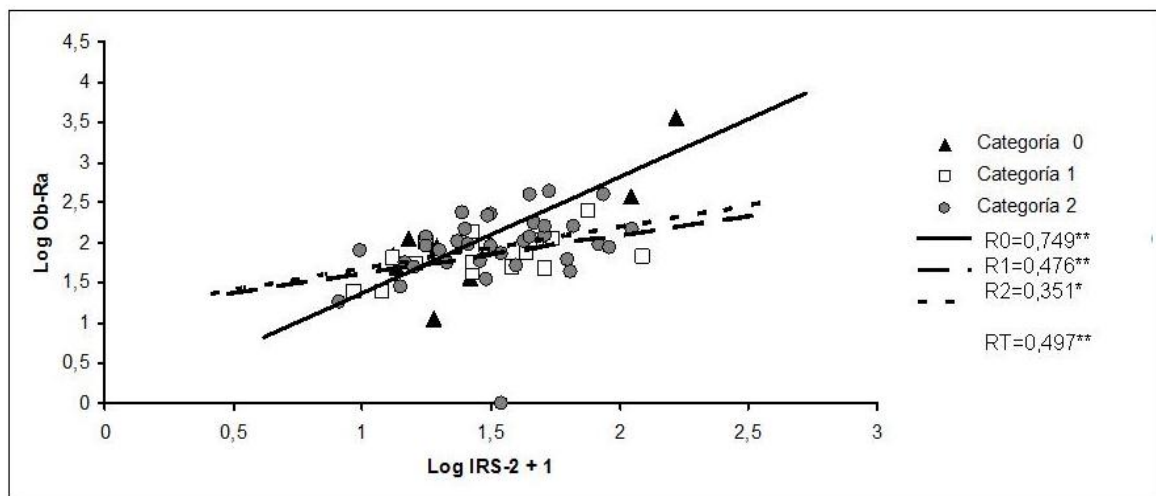


Figura 17

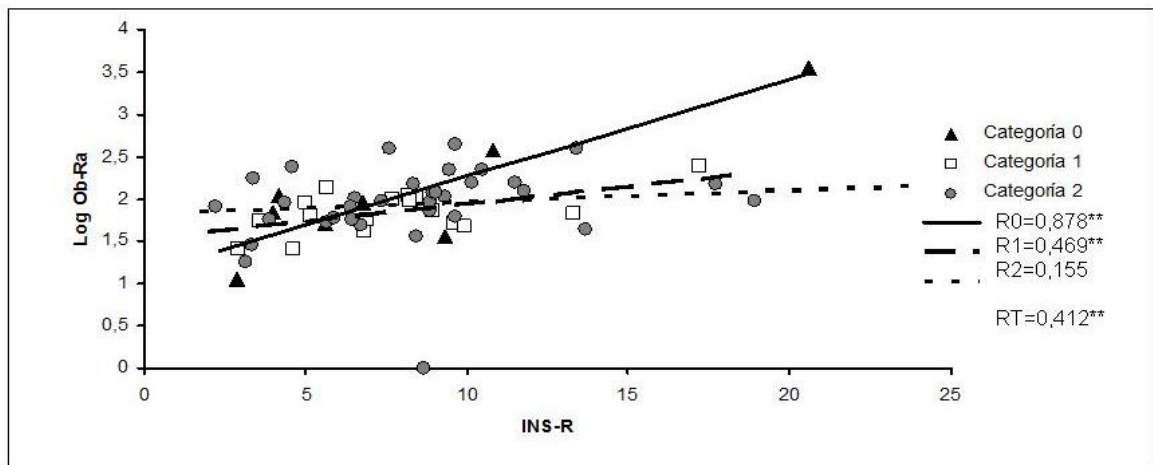


Figura 18

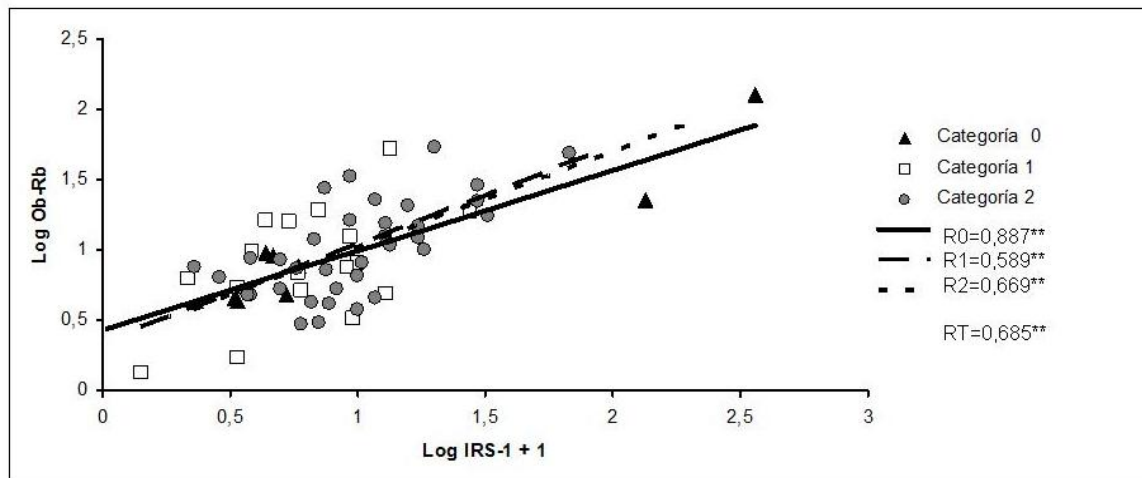


Figura 19

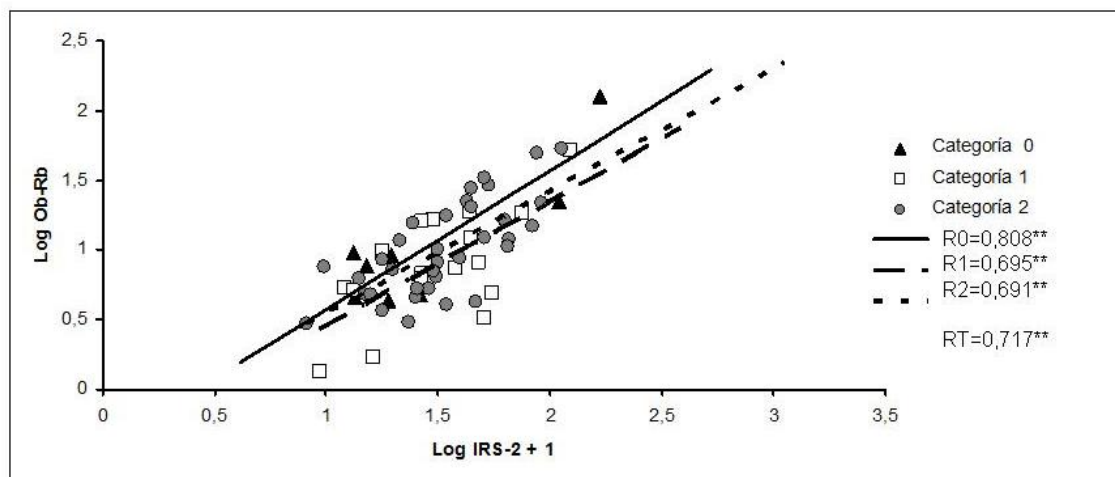


Figura 20

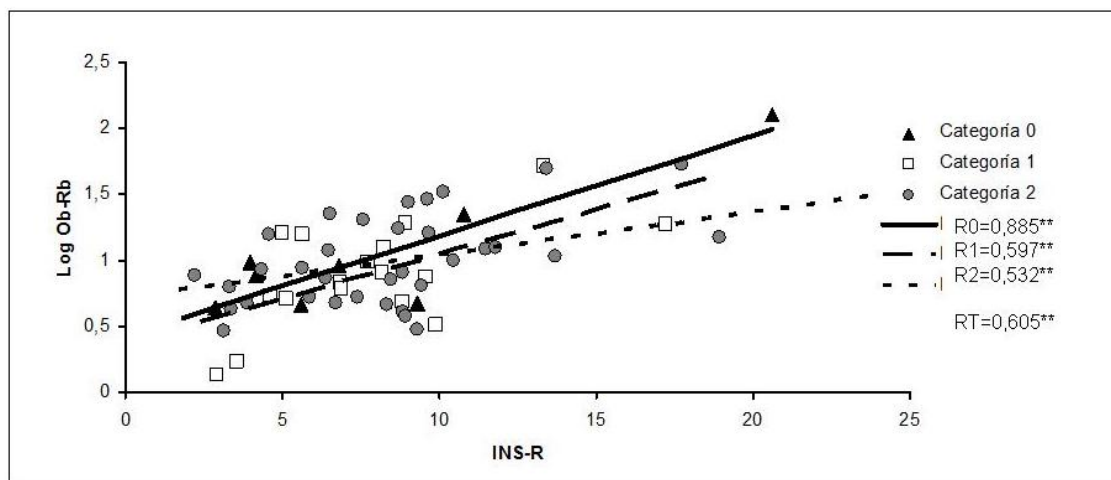


Figura 21

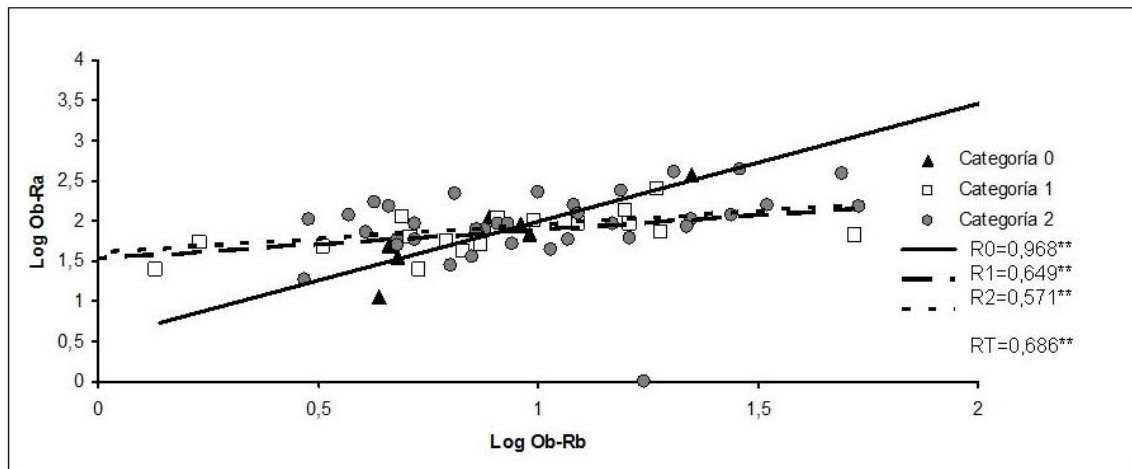
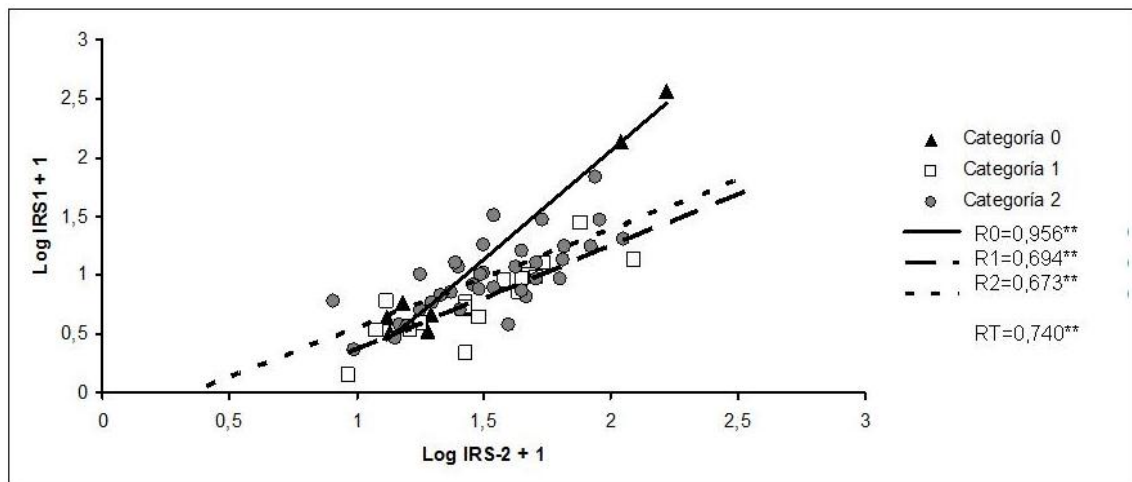


Figura 22



Figuras 15-22. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de las isoformas del receptor de leptina Ob-Ra y Ob-Rb y los factores relacionados con señalización de insulina IRS-1, IRS-2 e INS-R (figuras 15-20). También se muestran las correlaciones entre Ob-Ra – Ob-Rb (figura 21) y entre IRS-1 e IRS-2 (figura 22). Las concentraciones de mRNA se han cuantificado en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. Para la realización del coeficiente de correlación de Pearson, las variables que no siguen una distribución normal han sido transformadas a logaritmos, sumando una unidad en aquellas que presentan valores negativos. Categoría=grupo. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes(n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo / categoría. *P<0,05, ** P<0,01.

4.3.3 PROTEÍNAS SOCS

En nuestra cohorte de pacientes, el grupo 0 al compararse con el grupo 2, muestra tendencia a un menor nivel de expresión de SOCS-1 y a un mayor nivel de expresión de SOCS-3 (**tabla 14**).

En el análisis comparativo entre las proteínas SOCS-1 y 3 y las isoformas del receptor de leptina – genes asociados a la señalización de insulina, hemos encontrado correlaciones moderadas entre SOCS-1 y 3, y las isoformas del receptor de leptina Ob-Ra y Ob-Rb (**tabla 15**), destacando una correlación intensa y significativa entre Ob-Ra y SOCS-1 en el grupo / categoría 0 que disminuye a moderada en el grupo / categoría 1 y 2 (**figura 23 y tabla 15**). También destacar una correlación débil en el total de pacientes entre Ob-Rb y SOCS-1 a diferencia de Ob-Rb y SOCS-3, en la que se observan correlaciones moderadas y significativas en todos los grupos / categorías (**tabla 15**). Se aprecian correlaciones moderadas y significativas entre SOCS-3 y los genes asociados a la señalización de insulina (**figuras 24, 25, 26 y tabla 15**), alcanzando las máximas correlaciones entre IRS-2 y SOCS-3 en el grupo / categoría 2 ($R= 0,690$) y en el total de pacientes ($R= 0,607$) (**figura 25 y tabla 15**), a diferencia de SOCS-1 con el que presentan correlaciones débiles para los genes asociados a señalización de insulina (**tabla 15**).

SOCS-1 y SOCS-3 muestran una correlación moderada y significativa entre sí en el total de pacientes y en los grupos / categorías 1- 2 (**figura 27**).

Tabla 14. Concentraciones de mRNA hepático de SOCS-1 y 3 en relación con la presencia y progresión del HGNA.

Concentración mRNA hepático	Grupo 0 n=8	Grupo 1 n=17	Grupo 2 n=35	P
SOCS-1	2,5 ± 0,6	5,7 ± 1,3	6,2 ± 1,3	ns
SOCS-3	34,7 ± 18,7	15,5 ± 2,8	15,4 ± 2,9	ns

Datos de variables cuantitativas expresados en media ± error estándar de las concentraciones de mRNA cuantificadas en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. ns: no significativo. Para la realización del test ANOVA las variables han sido posteriormente transformadas a logaritmos debido a que no siguen una distribución normal.

Figura 23

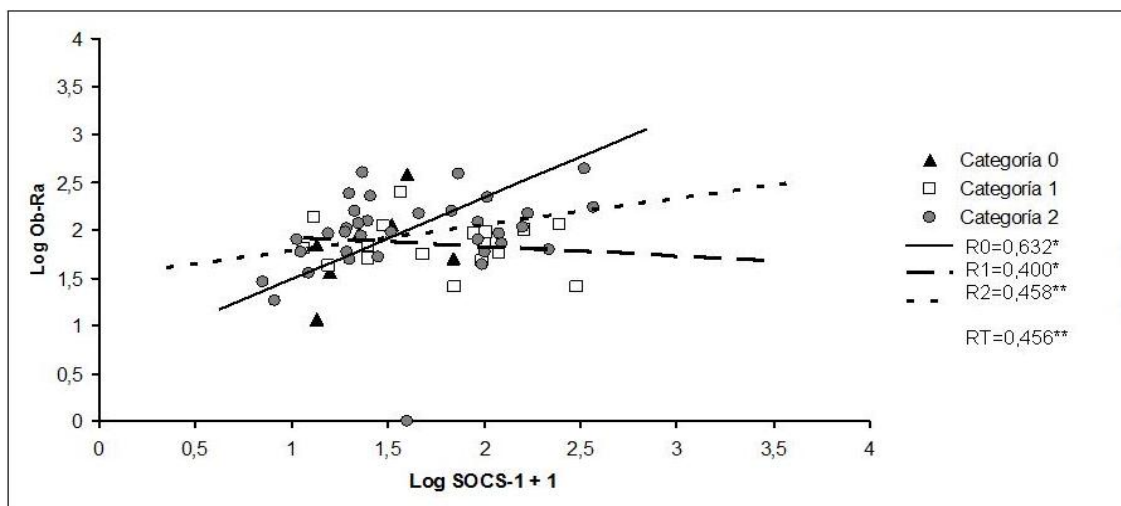


Figura 24

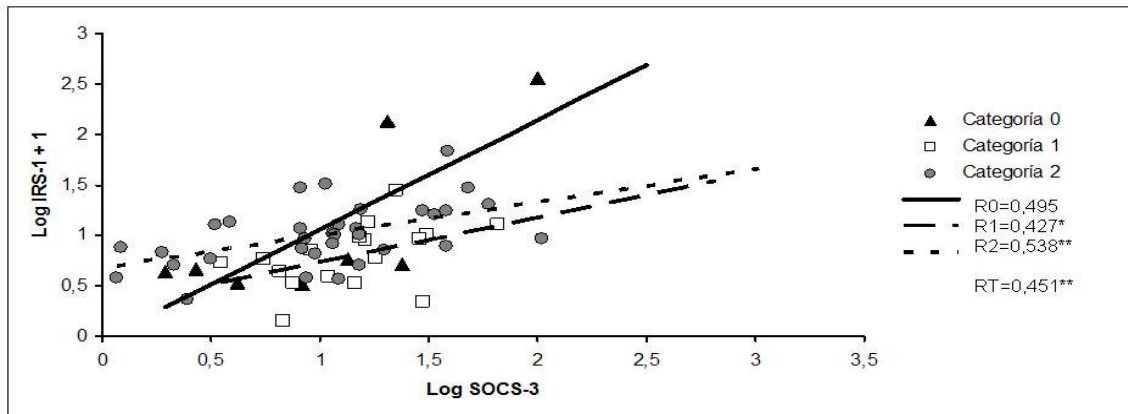


Figura 25

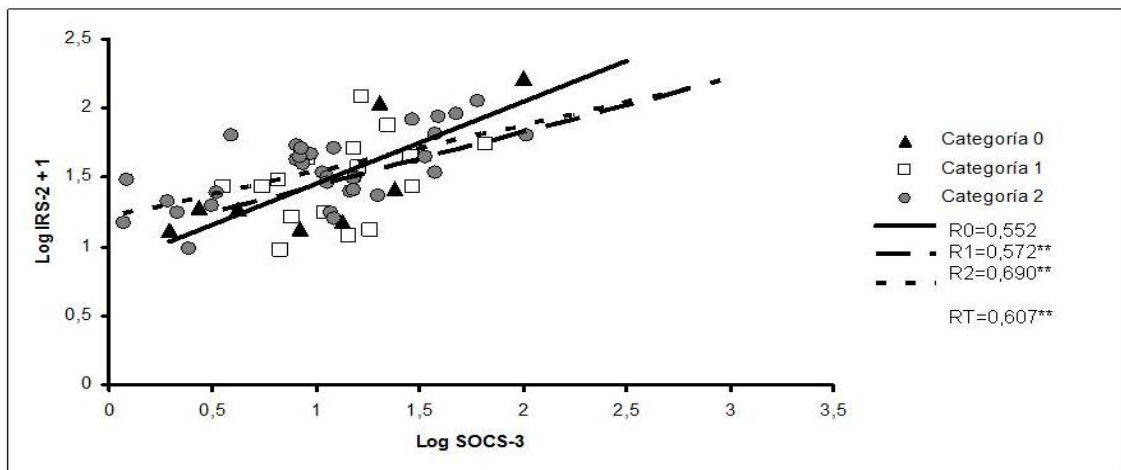


Figura 26

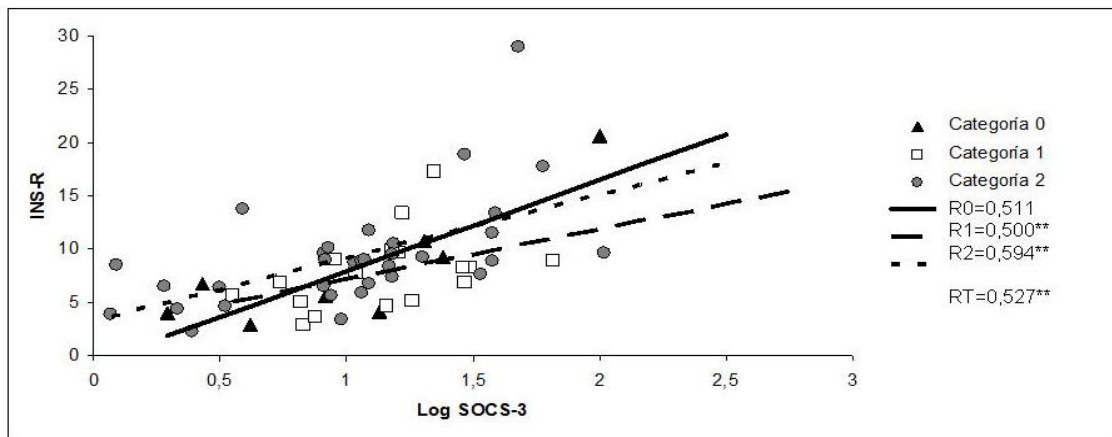
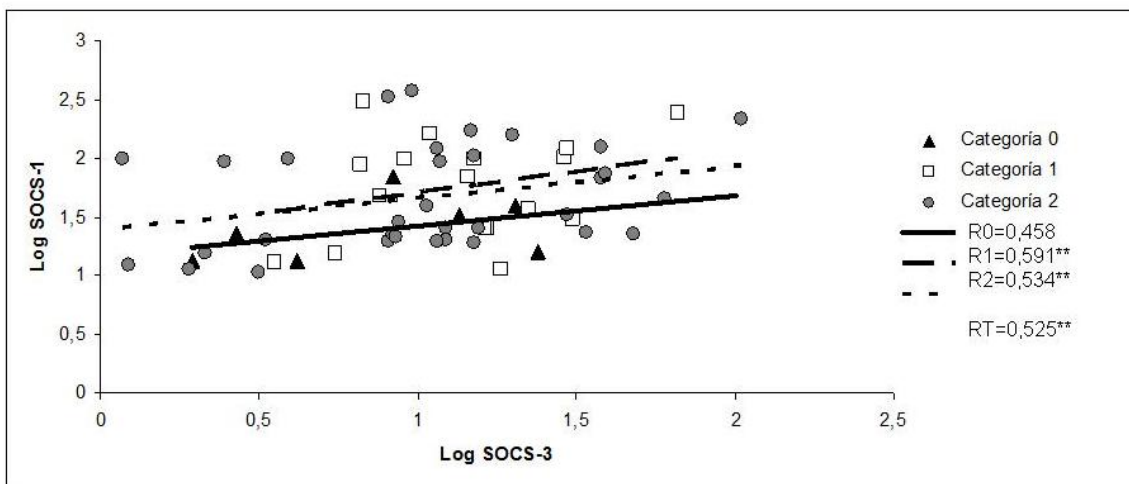


Figura 27



Figuras 23-27. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de la isoforma del receptor de leptina *Ob-Ra* y *SOCS-1* (figura 23) y de las correlaciones entre los factores relacionados con señalización de insulina *IRS-1*, *IRS-2* e *INS-R* y *SOCS-3* (figuras 24, 25 y 26). También se muestran las correlaciones entre *SOCS-1* y *SOCS-3* (figura 27). Las concentraciones de mRNA se han cuantificado en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. Para la realización del coeficiente de correlación de Pearson, las variables que no siguen una distribución normal han sido transformadas a logaritmos, sumando una unidad en aquellas que presentan valores negativos. Categoría=grupo. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes (n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo. *P<0,05, ** P<0,01.

	Log SOCS-1	Log SOCS-3
Log Ob-Ra	R0= 0,632* R1= 0,400* R2= 0,458** RT= 0,456**	R1= 0,427* R2= 0,538** RT= 0,451**
Log Ob-Rb	RT= 0,259*	R2= 0,467** RT= 0,410**
Log IRS-1	R3= 0,330*	R1= 0,467** R2= 0,564** RT= 0,471**
Log IRS-2	R1= 0,359* R2= 0,401** RT= 0,377**	R1= 0,572** R2= 0,690** RT= 0,607**
INS-R	R1= 0,433* RT= 0,346**	R1= 0,500** R2= 0,594** RT= 0,527**

Tabla 15. Coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las concentraciones de mRNA de los parámetros indicados. Se han incluido sólo aquellos coeficientes significativos en el análisis por grupos. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes (n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo. * P<0,05, ** P<0,01.

4.3.4 PERILIPINA 1 Y ADIPOFILINA

En el análisis de las proteínas PAT (perilipina 1 y adipofilina) en la progresión de la EHGNA (**tabla 16**), se aprecia un incremento significativo de la expresión de perilipina A en relación con la aparición de esteatosis (grupo 1), pero este incremento es menor en la progresión de la enfermedad (grupo 2). También se aprecia un incremento de la expresión de adipofilina en los grupos 1 y 2 pero éste no es significativo probablemente debido al escaso tamaño muestral sobre todo del grupo 0 y también del grupo 1 (**tabla 16**).

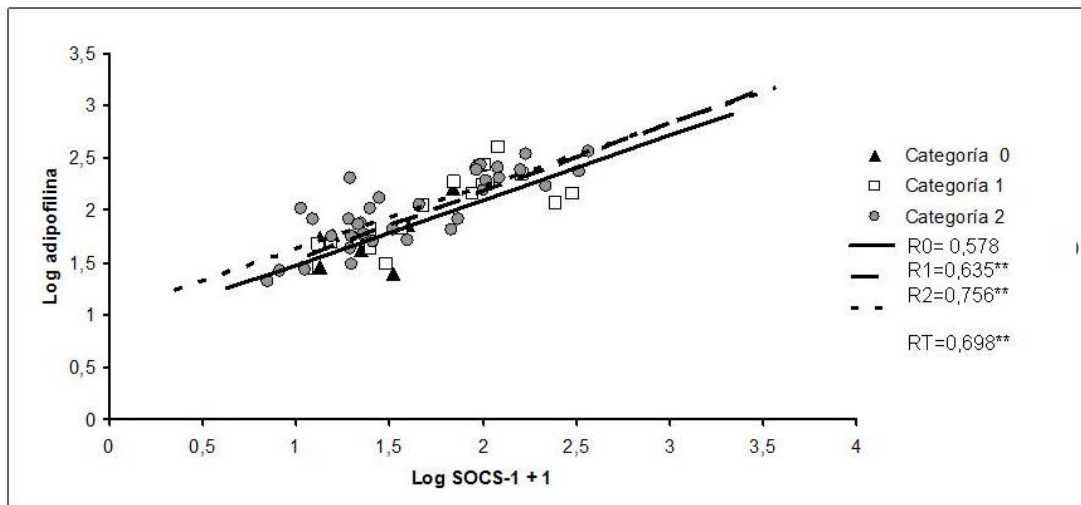
En el análisis comparativo de las proteínas PAT analizadas con los factores asociados a señalización de adiponectina, leptina, insulina, metabolismo lipídico y estrés oxidativo, sólo destaca una correlación intensa y significativa entre adipofilina y SOCS-1 en el grupo 1 y 2 (**figura 28**). El resto de correlaciones no son relevantes y no las incluimos en este apartado.

Tabla 16. Concentraciones de mRNA hepático de Perilipina A y adipofilina en relación con la presencia y progresión del HGNA.

Concentración mRNA hepático	Grupo 0 n=8	Grupo 1 n=17	Grupo 2 n=35	P
Perilipina 1	1,7 ± 0,2	3,1 ± 0,3	3,7 ± 0,3	0,05* 0,004**
Adipofilina	71,5 ± 18,6	98,6 ± 15,5	115,6 ± 13,8	ns

*Datos de variables cuantitativas expresados en media ± error estándar de las concentraciones de mRNA cuantificadas en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. Para la realización del test ANOVA las variables han sido posteriormente transformadas a logaritmos debido a que no siguen una distribución normal. Los valores significativos (P) en los grupos están resaltados en negrita. * Entre los grupos 0 y 1. ** Entre los grupos 0 y 2. ns: no significativo.*

Figura 28

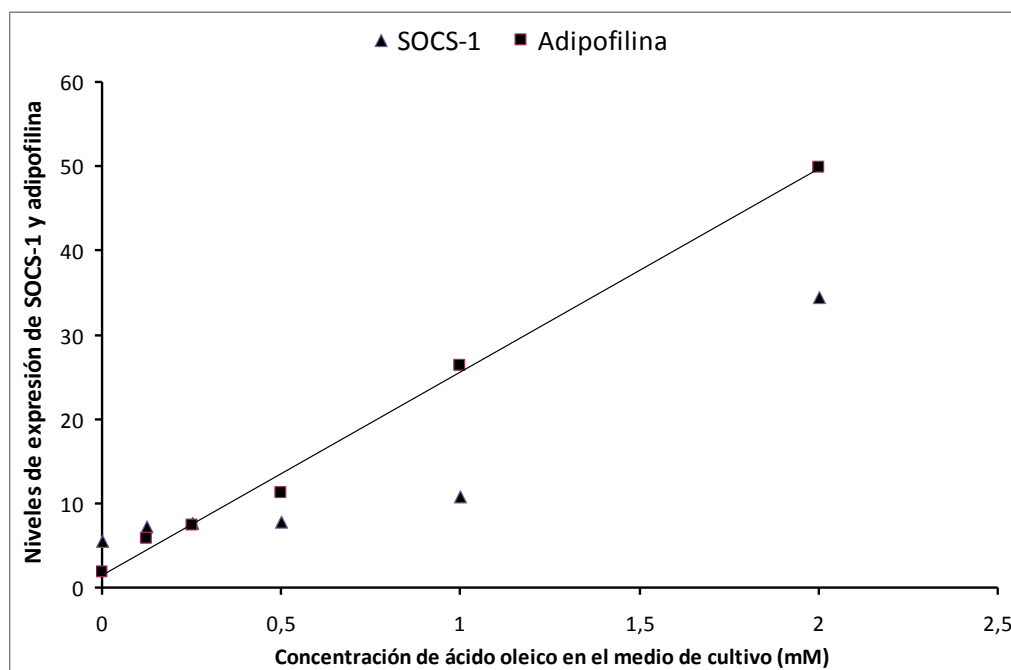


Representación gráfica de la correlación lineal entre las concentraciones de mRNA de adipoflina y SOCS-1. Las concentraciones de mRNA se han cuantificado en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. Para la realización del coeficiente de correlación de Pearson, las variables, que no siguen una distribución normal, han sido transformadas a logaritmos, sumando una unidad en aquellas que presentan valores negativos. Categoría=grupo. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes (n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo / categoría. *P<0,05, ** P<0,01.

4.3.4.1 RESULTADOS EN EL MODELO CELULAR DE ESTEATOSIS

Los cultivos celulares de la línea celular de hepatocarcinoma humano (PCL) se han incubado durante 24 horas con concentraciones crecientes de ácido oleico. Se han realizado un total de 6 medidas a concentraciones variables de ácido oleico en el medio de cultivo. Tras la incubación se ha extraído el RNA total y se ha medido la expresión génica de adipofilina y SOCS-1. Como resultados destacamos que la correlación entre los niveles de expresión de adipofilina y la concentración de ácido oleico en medio de cultivo es muy intensa y significativa ($R= 0,997$. $P < 0,05$. $n= 6$ mediciones). La expresión de SOCS-1 se incrementa considerablemente a partir de concentraciones de 1 mM de ácido oleico. La expresión de SOCS-1 se correlaciona de forma intensa y significativa ($R= 0,872$. $P < 0,05$. $n= 6$ mediciones) (**figura 29**) con la expresión de adipofilina en este modelo celular de esteatosis.

Figura 29



Representación gráfica de la correlación lineal entre las concentraciones de mRNA de adipofilina y SOCS-1 cuantificados en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping, en relación a la concentración de ácido oleico en medio de cultivo. Para la realización del coeficiente de correlación de Pearson, las variables, que no siguen una distribución normal, han sido transformadas posteriormente a logaritmos.

4.3.5 METABOLISMO LIPÍDICO

En el análisis de los factores relacionados con metabolismo lipídico en relación con el inicio y progresión de la EHGNA, no se han apreciado diferencias significativas en sus niveles de expresión al realizar el análisis bivalente (**tabla 17**).

En el análisis de correlación lineal, exponemos en la **tabla 18** aquellos factores que han presentado al menos una correlación significativa con alguno de los factores relacionados con metabolismo lipídico, y representamos de forma gráfica algunos ejemplos (**figuras 30-33**). Destacamos como relevantes para nuestro estudio la apreciación de un cambio en la correlación entre PPAR- α y el receptor de leptina Ob-Rb que evoluciona desde escasa en los pacientes con hígado sano hasta elevarse de forma progresiva tanto en el inicio como en el desarrollo de EHNA, hasta alcanzar la máxima correlación en los pacientes del grupo / categoría 2 ($R= 0,504$) (**figura 30 y tabla 18**). También PPAR- α se correlaciona de forma moderada y significativa en el grupo / categoría 2 con IRS-1 y SOCS-3 (**tabla 18**); y de forma intensa - significativas tanto en el grupo / categoría 1 como en el grupo / categoría 2 con IRS-2 (**figura 31 y tabla 18**) e INS-R (**tabla 18**). SREBP-1c se correlaciona de forma moderada y significativa en el grupo / categoría 2 con SOCS-3 e IRS-1; de forma moderada y significativa en los grupos / categorías 1 y 2 con Ob-Rb; y de forma intensa – significativa en el grupo / categoría 1 descendiendo a moderada y significativa en el grupo / categoría 2 con IRS-2 e INS-R. En nuestro estudio se aprecia una tendencia al cambio de correlaciones prácticamente nulas, o incluso negativas, hacia correlaciones moderadas en el grupo / categoría 1 e intensas en el grupo / categoría 2, entre SREBP-2 y Ob-Rb (**figura 32 y tabla 18**), SOCS-3 (**figura 33 y tabla 18**), IRS-2 e INS-R (**tabla 18**), manteniéndose moderada con IRS-1 (**tabla 18**).

Tabla 17. Concentraciones de mRNA hepático de factores asociados a metabolismo lipídico en relación con la presencia y progresión del HGNA.

Concentración mRNA hepático	Grupo 0 n=8	Grupo 1 n=17	Grupo 2 n=35	P
PPAR-α	12,4 \pm 3,8	13,7 \pm 1,8	16,7 \pm 1,4	ns
SREBP-1	11,4 \pm 2,2	11,6 \pm 1,2	11,2 \pm 1,1	ns
SREBP-2	17,7 \pm 3,1	16,9 \pm 1,9	15,9 \pm 1,9	ns

Datos de variables cuantitativas expresados en media \pm error estándar de las concentraciones de mRNA cuantificadas en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. ns: no significativo. Para la realización del test ANOVA las variables han sido posteriormente transformadas a logaritmos debido a que no siguen una distribución normal.

Figura 30

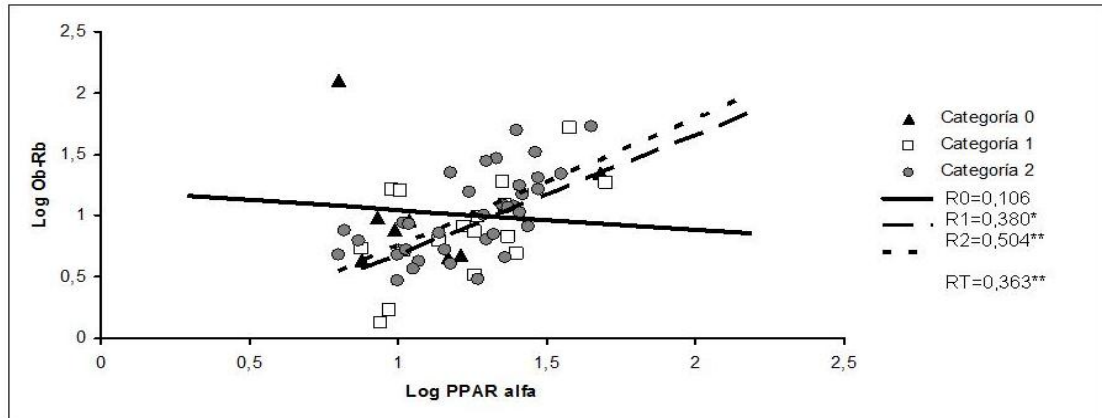


Figura 31

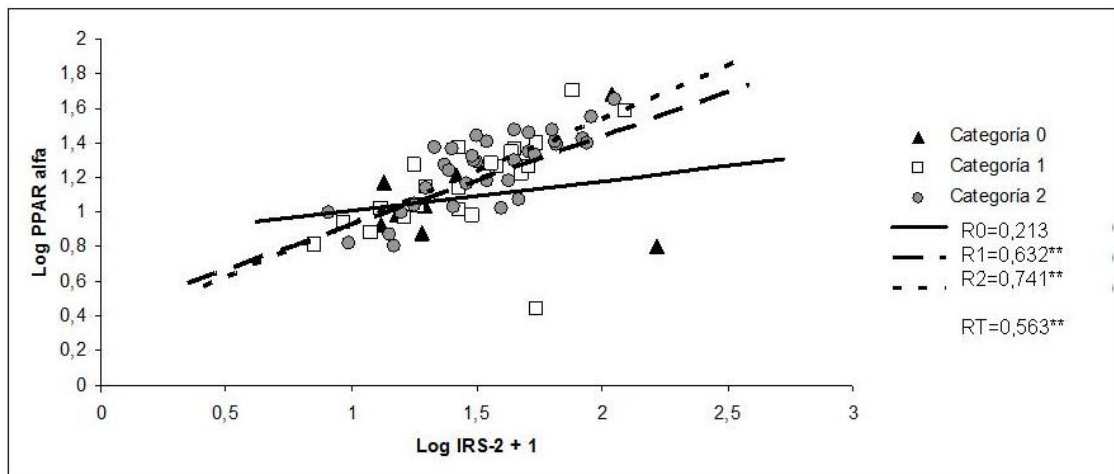


Figura 32

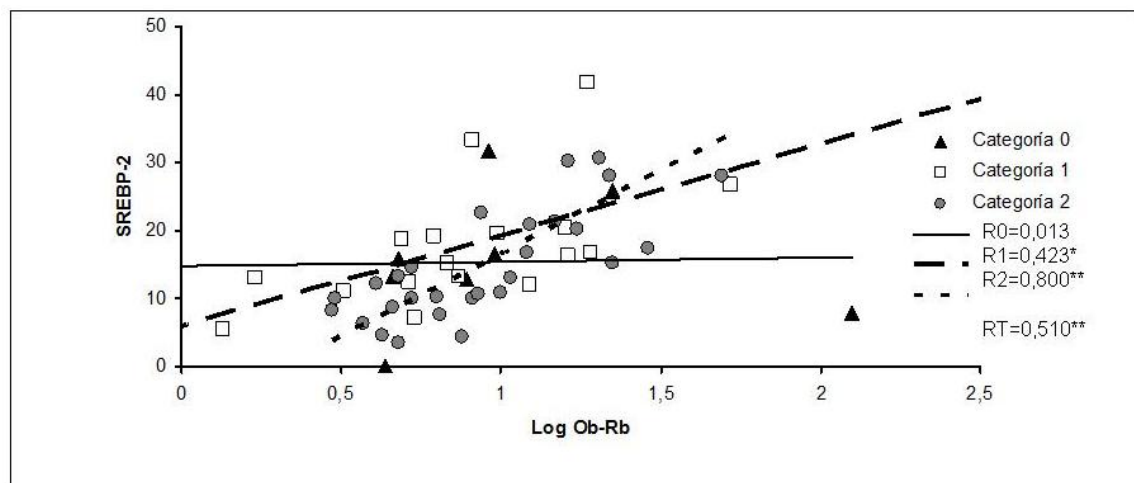
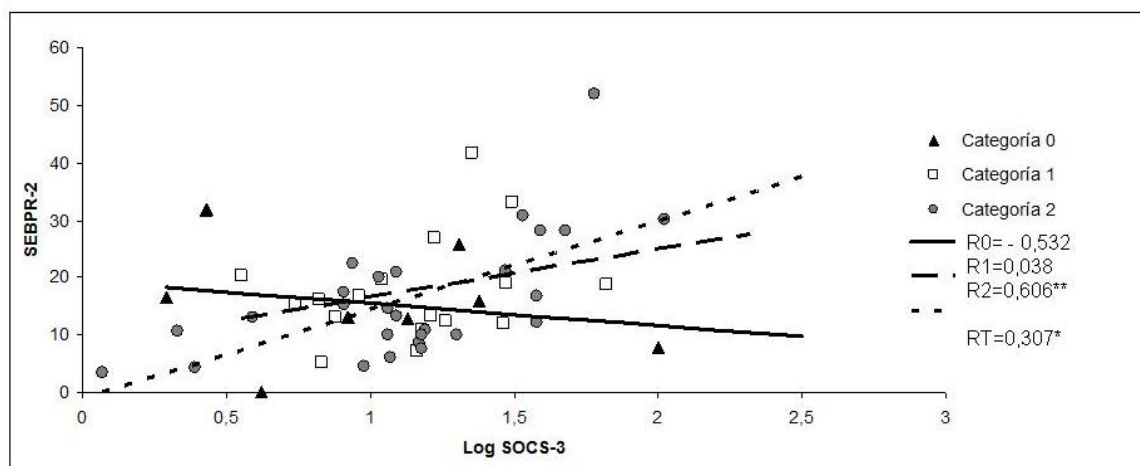


Figura 33



Figuras 30-33. Representaciones gráficas de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de los factores asociados a metabolismo lipídico PPAR- α y SREBP-2, el factor asociado a señalización de leptina Ob-Rb y los factores asociados a señalización de insulina IRS-2 y SOCS-3. Las concentraciones de mRNA se han cuantificado en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping. Para la realización del coeficiente de correlación de Pearson, las variables que no siguen una distribución normal han sido transformadas a logaritmos, sumando una unidad en aquellas que presentan valores negativos. Categoría=grupo. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes (n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo / cageroría. *P<0,05, ** P<0,01.

	Log PPAR- α	SREBP-1c	SREBP-2
Log SOCS-1	R2= 0,318* RT= 0,310*	ns	ns
Log SOCS-3	R2= 0,464**	R2= 0,401* RT= 0,388**	R2= 0,606** RT= 0,307*
Log Ob-Rb	R1= 0,380* R2= 0,504** RT= 0,363**	R1= 0,470* R2= 0,412* RT= 0,423**	R1= 0,423* R2= 0,800** RT= 0,510**
Log IRS-1	R2= 0,452** RT= 0,310**	R2= 0,448* RT= 0,435**	R1= 0,458* R2= 0,542** RT= 0,270**
Log IRS-2	R1= 0,632** R2= 0,741** RT= 0,563**	R1= 0,569** R2= 0,430* RT= 0,483**	R1= 0,508* R2= 0,725** RT= 0,516**
INS-R	R1= 0,791** R2= 0,753** RT= 0,628**	R1= 0,669** R2= 0,401* RT= 0,421**	R1= 0,617** R2= 0,591** RT= 0,468**

Tabla 18. Coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las concentraciones de mRNA de los parámetros indicados. Se han incluido sólo aquellos coeficientes significativos en el análisis por grupos. ns: no significativo ni en el total de pacientes ni por grupos. RT: coeficiente de correlación de Pearson en el total de pacientes (n= 60). R0-1-2: coeficiente según grupo. * P<0,05, ** P<0,01.

4.4

ANÁLISIS MULTIVARIANTE

El análisis multivariante ha sido realizado mediante regresión logística binaria, y se ha estudiado qué variables se asocian de forma independiente al origen de la EHGNA, y que variables se asocian de forma independiente a su progresión. Se han incluido las variables que no se correlacionan de forma moderada y significativa entre sí. En el caso de incluir subtipos de variables claramente asociados entre sí, se han establecido índices, por ejemplo, entre los logaritmos de los receptores de adiponectina, leptina, IRS y SREBP. El análisis mostró que las variables independientes asociadas al inicio del la EHGNA (hígado sano a esteatosis hepática sin esteatohepatitis) han sido:

- **Un incremento en el nivel de expresión de Perilipina 1 (OR: 1425,8. IC 95% = 18,6 – 109.487,4. P= 0,001).**
- **Un incremento en el nivel de expresión de GPx1 (OR: 1,081. IC 95%= 1 – 1,2. P = 0,05).**

Las variables independientes asociadas a la progresión de HGNA a EHNA han sido:

- **Un incremento en el nivel de expresión GPx1 (OR: 1,078, IC 95% = 1,025-1,135, P = 0,004).**
- **Un incremento en la expresión de iNOS (OR: 12,1, IC 95%= 1,2-121,8 P= 0,034).**

4.5 VARIACIONES DEL IMC Y PARÁMETROS SANGUÍNEOS TRAS CIRUGÍA BARIÁTRICA (ESTUDIO OBSERVACIONAL CON SEGUIMIENTO DE LA COHORTE)

La **tabla 19** muestra el IMC, parámetros bioquímicos relacionados con perfil hepático – metabolismo lipídico - resistencia a insulina, niveles plasmáticos de adiponectina y niveles plasmáticos de marcadores de estrés oxidativo en 42 pacientes de nuestro estudio (8 del grupo 0, 8 del grupo 1 y 26 del grupo 2) antes de la cirugía bariátrica y un año después. Como resultado de la pérdida de masa grasa corporal, la mayoría de los parámetros medidos en las muestras sanguíneas han vuelto a la normalidad. Se ha observado un aumento significativo en el nivel de adiponectina y una disminución significativa de la actividad de GPx.

Tabla 19. Comparación de IMC y parámetros sanguíneos antes y un año después de la cirugía.

	Antes cirugía n= 42	1 año después de cirugía n=42	P
IMC (kg/m ²)	51.5 ± 1.3	31.3 ± 0.9	<0.000
AST (U/L)	29.8 ± 3.3	20.4 ± 1.0	0.007
ALT (U/L)	31.0 ± 3.1	19.3 ± 1.5	0.001
GGT (U/L)	37.7 ± 8.0	17.5 ± 2.1	<0.000
Colesterol total (mg/dl)	183.1 ± 8.9	137.5 ± 6.0	<0.000
HDL-colesterol (mg/dl)	36.0 ± 1.6	50.6 ± 2.3	<0.000
Triglicéridos (mg/dl)	182.1 ± 18.1	88.0 ± 6.6	<0.000
Glucosa (mg/dl)	119.0 ± 6.5	104.3 ± 21.5	0.001
Insulina	10.6 ± 1.0	4.9 ± 0.6	0.008
HOMA-IR	3.4 ± 0.4	1.0 ± 0.1	0.001
Adiponectina (µg/mL)	39.9 ± 6.0	60.0 ± 2.1	0.002
Glutation total (nmol/mg)	4.9 ± 0.5	6.3 ± 0.5	0.05
Actividad específica GPx	27.9 ± 2.0	22.5 ± 1.3	0.026

Edad expresada en número absoluto y proporción entre paréntesis. Datos del resto de variables cuantitativas expresados en media ± error estándar. Los valores significativos (P) están resaltados en negrita.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La hipótesis del doble impacto se propuso en la década de los 90 como un modelo para explicar el origen de la esteatosis hepática y su posterior evolución hacia esteatohepatitis [24]. La acumulación de lípidos en los hepatocitos (primer impacto) desencadenaría una serie de eventos citotóxicos (segundo impacto) que culminarían en esteatohepatitis [24]. Este punto de vista inicial ha evolucionado y, en la actualidad, el origen de la esteatosis hepática y su posterior evolución hacia esteatohepatitis se considera un proceso multifactorial en el que los mecanismos más relevantes pueden variar de un paciente a otro, probablemente debido a una combinación de factores genéticos y ambientales [83, 114]. En el caso de la EHGNA ligada a la obesidad mórbida los mecanismos más relevantes se asocian a una alteración funcional y endocrina del órgano graso [83, 114].

El concepto multifactorial de la EHGNA está bien establecido y se conocen los principales mecanismos implicados, siendo la resistencia a insulina uno de los mecanismos centrales [83, 114]. Sin embargo, a una escala más molecular, existen numerosas lagunas sobre las alteraciones que sufre el tejido hepático durante el origen y progresión de la EHGNA.

El objetivo de nuestro estudio ha sido analizar, en una cohorte de pacientes con obesidad mórbida, que se sometieron a cirugía bariátrica, el nivel de expresión hepática de genes asociados a la señalización de adiponectina, leptina, insulina, metabolismo lipídico y estrés oxidativo, en relación con el origen y progresión de la EHGNA. Los pacientes han sido clasificados en tres grupos, en función de la presencia y progresión de la EHGNA, mediante valoración anatomopatológica de biopsia hepática.

Grupo 0: pacientes obesos mórbidos sin EHGNA (índice de Kleiner = 0).

Grupo 1: pacientes obesos mórbidos con HGNA pero sin esteatohepatitis (índice Kleiner 1 y 2).

Grupo 2: pacientes obesos mórbidos con probable esteatohepatitis o con esteatohepatitis (índice Kleiner > 2).

Análisis de los parámetros sanguíneos basales durante el origen y progresión de la EHGNA en la obesidad mórbida.

A pesar de que el hígado graso no alcohólico está asociado a pruebas de función hepática ligeramente anormales en la analítica, más de dos tercios de los pacientes tienen niveles normales de transaminasas y en todo el espectro histológico de HGNA pueden apreciarse niveles de alanina aminotransferasa (ALT) normales [47].

Una proporción AST/ALT mayor de 1.0 sugiere la presencia patología avanzada [47, 52, 88]. La fosfatasa alcalina puede estar ligeramente elevada, pero en raras ocasiones. Gamma-glutamil transferasa (GGT) se encuentra frecuentemente elevada, y también puede considerarse un marcador de incremento de mortalidad. En nuestro estudio, el único parámetro analítico asociado a perfil hepático que se ha incrementado significativamente en la progresión del HGNA a EHNA ha sido AST, en consonancia con los datos expuestos en la literatura (**tabla 9**).

La velocidad de liberación de AGL en la circulación sistémica aumenta de forma directamente proporcional al incremento de la masa grasa en hombres y mujeres, de modo que la velocidad de liberación de AGL en relación a la masa grasa es mayor en los obesos que no obesos. Además, la expresión de genes de lipasa hepática y lipoproteína lipasa hepática son más altos en los sujetos obesos con EHNA que los sujetos sin EHNA, lo que sugiere que los AGL liberados de la lipólisis de TG circulantes también contribuyen a la acumulación de ácidos grasos libres a nivel hepático y por tanto a la esteatosis [114]. La producción y secreción de TG a través de VLDL aumenta en pacientes con EHGNA (demostrada en determinados estudios [117, 118] aunque en otros no [116]) respecto a sujetos sanos, proporcionando un mecanismo para evacuar TG intrahepáticos, sin embargo, la tasa de secreción no es lo suficientemente adecuada para compensar la tasa de producción de TG intrahepática en estos pacientes [114]. El aumento de la glucosa en plasma y la hiperinsulinemia asociada a EHGNA, estimula la lipogénesis de novo (DNL) e inhibe la oxidación de AG a través de SREBP-1c y ChREBP (proteínas localizadas en la membrana del retículo endoplásmico). Estas afirmaciones pueden explicar el incremento significativo de los niveles basales de colesterol, triglicéridos y LDL entre los individuos sin HGNA (grupo 0) y los que presentan EHNA (grupo 2) en nuestro estudio (**tabla 9**). Los AGL son componentes hepatotóxicos, y tanto éstos como la propia esteatosis hepática pueden causar daño directo (apoptosis mitocondrial y hepatocitaria) como indirecto (inducción

del 2º impacto a través especies reactivas procedentes de la oxidación peroxisomal) a los hepatocitos, causando la progresión a EHNA [142], por tanto, es previsible que en nuestro estudio los niveles de lípidos (triglicéridos, colesterol y LDL) aparezcan más elevados en los pacientes con EHNA respecto al resto de grupos, contribuyendo a la progresión de la enfermedad (**tabla 9**).

Los niveles circulantes de leptina se correlacionan de forma intensa con el índice de masa corporal y con cambios agudos en el estatus nutricional. La producción de leptina se incrementa durante la obesidad y alcanza niveles muy elevados en obesidad mórbida, disminuyendo sus niveles con la pérdida de peso [11, 63]. Un estudio demostró que existía una correlación lineal positiva ($R = 0,8$) entre los niveles circulantes de leptina y el total de la masa grasa corporal, que puede ser explicado por una mayor liberación de leptina procedente de grandes adipocitos en comparación con pequeños adipocitos [12]. La liberación de leptina por gramo de tejido adiposo es dos veces mayor en sujetos obesos que en sujetos delgados, y a nivel de adipocitos, la secreción de leptina es hasta siete veces mayor en los obesos que en sujetos delgados, debido a que el tamaño del adipocito suele estar aumentado unas 2-4 veces en las personas obesas [11, 63]. La leptina es una hormona que ejerce a nivel del hipotálamo una función anorexígena y a nivel hepático una función antiesteatósica (suprime la síntesis de glucosa y la lipogénesis de novo, mientras que induce la oxidación de ácidos grasos). También induce la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético, evitando así la acumulación de lípidos en los tejidos no adiposos y aumentando la sensibilidad a la insulina [64, 69]. Esta función teóricamente contrarrestaría la progresión de la obesidad y sus enfermedades asociadas, sin embargo, durante la obesidad se producen un estado de resistencia hipotalámica y probablemente periférica a leptina, que contribuye a una hiperleptinemia prolongada asociada al mantenimiento de la obesidad y al inicio - progresión de la EHGNA [64]. En nuestro estudio, en consonancia con los datos aportados por la literatura, se aprecia un incremento significativo de los niveles de leptina entre el grupo 0 y el grupo 2, que podría explicar una mayor resistencia periférica (hepática) a leptina que da lugar a mayores niveles de leptina en plasma y a la progresión de la EHGNA (**tabla 9**).

Análisis de la relación entre la expresión de los receptores hepáticos de adiponectina y genes asociados al estrés oxidativo, durante el origen y progresión de la EHGNA en obesidad mórbida.

Las dos isoformas del receptor de adiponectina, codificadas por genes diferentes y denominadas como AdipoR1 y AdipoR2, se describieron inicialmente en 2003 [60]. La T-caderina ha sido propuesta por algunos autores como un tercer receptor celular de adiponectina, sin embargo la relevancia biológica de este estudio es controvertida [159]. En el hígado, se sabe que la isoforma AdipoR1 inhibe la producción de glucosa e incrementa la sensibilidad a insulina mediante la activación de la vía AMPK, mientras que la isoforma AdipoR2 incrementa la captación de glucosa mediante la activación de la vía PPAR- α [44]. Sin embargo, varios aspectos de la función hepática del receptor de adiponectina permanecen sin ser resueltos. Respecto al comportamiento del receptor de adiponectina durante el desarrollo de la enfermedad del hígado graso, se han publicado varios trabajos que describen cambios en la expresión de dicho receptor durante la progresión de la EHGNA aunque, como analizaremos más adelante, los datos son contradictorios [43, 44].

Ciertos trabajos publicados sugieren una conexión entre los mecanismos de detoxificación de radicales libres y el receptor de adiponectina. La glutatión peroxidasa (GPx1) es una de las enzimas más importantes implicadas en los mecanismos celulares de defensa frente al estrés oxidativo. Es una seleno-proteína que reduce el peróxido de hidrógeno, utilizando como sustrato el glutatión. Los ratones knockout para la GPx1 toleran un estrés oxidativo moderado pero son muy sensibles al daño oxidativo intenso. Por otra parte, los ratones knockout para la GPx1 muestran incrementada la sensibilidad a insulina [160]. En contraste, los ratones que sobreexpresan artificialmente la GPx1 son muy resistentes al estrés oxidativo agudo (como era previsible) pero, sorprendentemente, desarrollan resistencia a insulina y obesidad [39]. Estudios similares con el receptor de adiponectina han demostrado que la disrupción específica en tejido muscular, de la isoforma AdipoR1 provoca un descenso muscular de las enzimas implicadas en la detoxificación del estrés oxidativo y del contenido mitocondrial [43]. Además, la sobreexpresión de la isoforma AdipoR2, en modelos de ratones obesos y diabéticos, incrementa la expresión hepática de las enzimas antioxidantes [44]. En base a estos precedentes hemos elaborado la siguiente hipótesis de trabajo: durante la progresión de la EHGNA los posibles cambios en la expresión de las isoformas del

receptor de adiponectina se asocian a cambios en la expresión de genes relacionados con la detoxificación del estrés oxidativo.

Se han publicado resultados contradictorios sobre los cambios en la expresión hepática de las dos isoformas del receptor de adiponectina durante la progresión de la EHGNA en obesidad mórbida. En 2005 se describió por primera vez que la expresión de la isoforma AdipoR2 desciende en pacientes obesos con esteatohepatitis, respecto a pacientes obesos con esteatosis simple [29]. También se ha publicado que la isoforma AdipoR2 desciende en pacientes moderadamente obesos con EHGNA respecto a las personas delgadas sin esteatosis [54]. Sin embargo, estudios posteriores han publicado que no hay variaciones en la expresión las isoformas del receptor de adiponectina durante la transición hacia esteatohepatitis, que ambas isoformas se incrementan, o que únicamente lo hace la isoforma AdipoR2 [31, 32, 33]. Nuestros datos ponen de manifiesto un incremento significativo de la expresión de ambas isoformas del receptor hepático de adiponectina en relación al origen y evolución de la EHGNA (**tabla 11**).

Las contradicciones entre los diferentes estudios publicados podrían ser debidas a variaciones entre las cohortes de pacientes. Estas pueden diferir en la etnia mayoritaria, en los criterios de inclusión/exclusión o en los criterios anatomopatológicos empleados en el diagnóstico de la EHGNA. Sin embargo, desde nuestro punto de vista, las diferencias entre cohortes no explican completamente las intensas discrepancias publicadas. Las diferentes técnicas empleadas en la cuantificación de la expresión genética en muestras tisulares utilizan para normalizar resultados los niveles de expresión de los genes housekeeping [158]. Se considera que los genes housekeeping mantienen un nivel de expresión constante con independencia de variaciones fisiológicas o patológicas [158]. El problema deriva del hecho de que, en realidad, no existe ningún gen de expresión constante y es conocido que una mala elección del gen housekeeping puede influir notablemente en los resultados [158]. Actualmente se recomienda utilizar varios genes housekeeping, que además hayan sido validados para un tejido concreto [158]. Por otra parte, como criterio de calidad, se recomienda verificar una reducida dispersión para el nivel de expresión de los genes housekeeping entre los diferentes miembros de la cohorte [158].

El primer trabajo que comunicó un descenso de AdipoR2 en pacientes obesos con esteatohepatitis [29] utilizó como housekeeping el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), cuyo uso se encuentra actualmente muy desprestigiado. Nuestra opinión es que los resultados de dicho trabajo están

condicionados por la elección del gen housekeeping. Sin embargo, este primer artículo, unido al hecho de que se publicó en una revista de elevado índice de impacto, ha dejado impronta y es frecuente verlo citado en revisiones actuales sobre adiponectina.

En relación a los mecanismos de resistencia a insulina, un trabajo reciente ha descrito que los niveles de expresión de AdipoR1 y AdipoR2 se incrementan en pacientes obesos con elevado índice HOMA (7,3 de valor medio) respecto a pacientes obesos con índice HOMA reducido (1,7 de valor medio) sugiriendo una conexión entre la resistencia a insulina sistémica y la expresión hepática de los receptores de adiponectina [56]. Sin embargo, en nuestra cohorte no hay suficientes pacientes con índice HOMA extremo como para plantear un estudio de esta naturaleza y no se han encontrado diferencias significativas en relación a la glucemia o al índice HOMA.

La sobreproducción de radicales libres se ha relacionado con la fisiopatología de la EHGNA. Un exceso de estrés oxidativo no es solo causa de daño celular sino, además, síntoma de una disfunción a nivel mitocondrial y del retículo endoplásmico. En este sentido, se ha descrito disfunción mitocondrial hepática en modelos animales de obesidad inducida por dieta hipercalórica [57]. Por otra parte, existe una estrecha relación entre los procesos inflamatorios y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y cada vez hay más evidencias de que estas moléculas actúan como señales intracelulares implicadas en numerosos procesos, por lo que el papel exacto del estrés oxidativo en la fisiopatología de la EHGNA puede ser complejo. La actividad iNOS es una de las mayores fuentes de óxido nítrico producido por los macrófagos durante la inflamación y es una de las enzimas más importantes implicadas en la producción de estrés oxidativo. En modelos animales, la iNOS juega un papel crucial en el desarrollo de esteatohepatitis [58] y, en cohortes humanas, se han asociado polimorfismos en el gen de la iNOS con el riesgo de esteatohepatitis [59]. Según nuestro conocimiento, este estudio es el primero en describir incrementos en la expresión hepática de iNOS, en relación al origen y progresión de la EHGNA en pacientes obesos mórbidos (**tabla 11**). En nuestra cohorte, la EHGNA se asocia con sobreproducción de radicales libres en el hígado. En este contexto, el incremento significativo de expresión de las enzimas GPx1 e iNOS, en pacientes con probable y clara esteatohepatitis respecto a pacientes con esteatosis simple y pacientes sin EHGNA, puede interpretarse como una estimulación de los mecanismos antioxidantes celulares, en respuesta a una deterioración del estatus redox del hígado (**tabla 11**). Reforzando esta interpretación, el análisis multivariante, reveló que la expresión de GPx1 se asocia

independientemente con el origen y progresión de la EHGNA, mientras que la expresión de iNOS únicamente se asocia con la progresión de la EHGNA.

Los marcadores sistémicos de estrés oxidativo sólo han mostrado diferencias significativas en cuanto a los niveles de nitritos y glutatión oxidado en relación a la progresión de la EHGNA (**tabla 10**) y al año de la cirugía bariátrica únicamente se han detectado cambios moderados en los niveles de estrés oxidativo sistémico (**tabla 19**). En nuestra cohorte, el incremento en la expresión hepática de genes asociados a estrés oxidativo, tiene un efecto marginal sobre los marcadores sistémicos de estrés oxidativo, que probablemente están intensamente influenciados por otros tejidos y órganos, como el tejido adiposo.

Confirmando la hipótesis de trabajo que hemos expuesto con anterioridad, hemos encontrado correlaciones entre los niveles de expresión hepática de los receptores de adiponectina (AdipoR1, AdipoR2) y genes asociados a estrés oxidativo (GRd, GPx1, iNOS) (**figuras 12 y 13**). En este sentido, destaca una marcada correlación entre ambas isoformas del receptor de adiponectina y la enzima GPx1, alcanzando un máximo en el coeficiente de correlación de Pearson de 0,895 entre Adipo R1 y GPx1 en pacientes con esteatosis simple (**figura 12**). Estos datos sugieren que el receptor de adiponectina y GPx1 comparten factores clave, implicados en la regulación de la expresión genética. Por otra parte, el hecho de que el coeficiente de correlación, para AdipoR1, AdipoR2 y GPx1, descienda en pacientes con estatohepatitis (**figuras 12 y 13**), indica que la aparición de la inflamación podría estar interfiriendo en los mecanismos que regulan la expresión genética de dichos genes.

Se han publicado muy pocos trabajos que estudien los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los dos genes codificantes de las isoformas del receptor de adiponectina. Estudios desarrollados en modelos animales han puesto de manifiesto que los niveles de expresión de los receptores de adiponectina en hígado, músculo y tejido adiposo, se regulan en respuesta a cambios nutricionales, probablemente para influir sobre el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a insulina. Sin embargo, el tipo de respuesta de los receptores de adiponectina a los cambios nutricionales varía de un modelo animal a otro, por lo que actualmente se desconoce la función precisa de los receptores de adiponectina en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas. Dos artículos han estudiado la actividad del promotor de los genes de las isoformas del receptor de adiponectina en modelos celulares. Estos artículos han descrito que el promotor de la isoforma AdipoR1 se activa mediante el factor de transcripción FOXO1

[56], conectándolo con las rutas de inflamación, mientras que el promotor de la isoforma AdipoR2 se reprime por el factor ATF3 [42], mostrando una conexión con las rutas endoplásmicas de estrés oxidativo.

En resumen, nuestro estudio muestra incrementos significativos de la expresión, en hígado, de las isoformas del receptor de adiponectina durante el origen y progresión de la EHGNA en obesos mórbidos. Incremento que se desarrolla en estrecha correlación con genes asociados al estrés oxidativo, muy especialmente con GPx1. Consideramos que nuestros resultados aportan nuevas perspectivas sobre el comportamiento preciso de los receptores hepáticos de adiponectina durante la progresión de la EHGNA.

Relación entre los receptores hepáticos de leptina y genes asociados a la señalización de insulina, durante el origen y progresión de la EHGNA en la obesidad mórbida.

Como ya se ha descrito, la resistencia a insulina es un mecanismo generador de esteatosis bien establecido, y varios trabajos clínicos describen que la EHGNA está muy asociada con desarrollo de resistencia a insulina en el propio hígado [83, 114, 119]. Existen evidentes argumentos a favor de que el hígado graso también desarrolle resistencia a leptina [133, 145]. En un hígado sano, la leptina suprime la liberación de glucosa y la lipogénesis, mientras que estimula la β -oxidación de ácidos grasos y la sensibilidad a insulina [64, 69]. Sin embargo, la obesidad se asocia con elevados niveles plasmáticos de leptina, con resistencia a insulina y con hígado graso [64, 69]. En contrapartida, la resistencia a leptina a nivel del hipotálamo está bien establecida [64]. Se sabe que es la responsable de la pérdida del efecto anorexígeno de la hormona en individuos obesos y se conocen los principales mecanismos moleculares implicados: la disminución de los niveles de expresión del receptor de leptina y el incremento de los niveles de SOCS-3 y la disminución del transporte a nivel de la barrera hematoencefálica [64].

Uno de los principales objetivos que se plantearon al inicio del trabajo fue profundizar en los mecanismos moleculares que determinan la resistencia hepática a leptina e insulina durante el desarrollo de la EHGNA ligada a la obesidad. Se han analizado los niveles de expresión de tres genes clave en la señalización de insulina (INS-R, IRS-1, IRS-2) y, en analogía a lo descrito para el hipotálamo, se han estudiado también los niveles de expresión del receptor de leptina y de dos miembros de la familia

de proteínas SOCS (**tabla 13**). Los resultados obtenidos para las proteínas SOCS serán analizados en otro apartado.

En humanos, se han descrito 4 isoformas celulares del receptor de leptina (OB-Ra, -Rb, -Rc, -Rd), codificadas por el mismo gen y generadas mediante splicing alternativo del RNA mensajero [11]. Todas las isoformas celulares comparten el dominio extracelular de unión al ligando y el dominio de anclaje a la membrana pero difieren en la longitud del dominio intracelular [11]. La isoforma OB-Rb se conoce como isoforma larga, mientras que al resto de las isoformas se las denomina genéricamente “isoformas cortas” [11]. De las cuatro isoformas celulares descritas para el receptor de leptina, las más abundantes son la OB-Ra, que es mayoritaria en todos los tejidos estudiados salvo el hipotálamo y la OB-Rb, que es la isoforma predominante en hipotálamo [11]. En cuanto al resto de las isoformas cortas, son minoritarias y muy pocos trabajos han analizado sus niveles de expresión. No puede descartarse la existencia de nuevas variantes con una distribución dependiente del tejido. Algunos artículos han descrito cambios en la relación entre las isoformas OB-Ra y OB-Rb [161, 162]. Dicha relación se incrementa en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos [161] y en el hígado de rata en respuesta a la administración de leptina [162].

Respecto a la función de las isoformas celulares del receptor en la señalización de la leptina, únicamente la isoforma larga posee los dominios necesarios para conectar con las vías intracelulares de transducción JAK-STAT, pero también con las vías MAPK y PI3K [64]. Inicialmente se pensó que únicamente la isoforma larga era capaz de señalizar la leptina, mientras que las isoformas cortas tendrían un papel de “receptor señuelo”, secuestrando leptina de la superficie celular y reduciendo su biodisponibilidad [163, 164]. Con el tiempo este modelo ha resultado deficiente ya que se han publicado varios trabajos que demuestran un papel activo de las isoformas cortas en la señalización de la leptina [165, 166]. Una línea de investigación reciente parte de la hipótesis de que la unidad funcional del receptor de leptina estaría formada por un tetrámero de receptores en el que las isoformas cortas y largas se mezclarían en una proporción que podría ser variable y regulable [165]. Esta unidad funcional podría explicar el papel activo descrito para las isoformas cortas [165]. Sin embargo, queda aún mucho por saber sobre el funcionamiento de los tetrámeros de receptores, más aún si se tiene en cuenta que la proporción de las diferentes isoformas varía en función del tejido y de las condiciones fisiológicas.

En el presente estudio, hemos medido selectivamente la expresión de las dos isoformas predominantes del receptor de leptina en tejido hepático: OB-Ra (isoforma corta) y OB-Rb (isoforma larga). Como era de esperar, en todas las muestras, la isoforma mayoritaria ha sido OB-Ra (**tabla 13**). A pesar de ello, no se aprecian diferencias significativas, respecto a la presencia y progresión de la EHGNA, ni en la concentración ni en la relación entre ambas isoformas (**tabla 13**). Merece sin embargo destacar la elevada concentración de OB-Ra en pacientes sin EHGNA, respecto a los pacientes con EHGNA (**tabla 13**). Diferencia que no es significativa, probablemente debido al reducido tamaño muestral del grupo 0. En futuros estudios sería muy interesante aumentar el tamaño muestral de pacientes obesos mórbidos sin hígado graso, para comprobar si esta diferencia responde a un mecanismo fisiopatológico real de resistencia hepática a leptina. Sin embargo, como analizaremos más adelante, de las correlaciones entre los niveles de expresión de los receptores de leptina y los niveles de genes asociados a la señalización de insulina, sí que pueden derivarse varias conclusiones y perspectivas de trabajo.

La señalización de insulina es un proceso complejo. Muy resumidamente, la unión de la insulina a su receptor de membrana provoca la activación, mediante fosforilación, de dos proteínas conocidas como IRS1 e IRS2 que a su vez activan determinadas vías intracelulares de transducción que culminan en una precisa modulación del metabolismo glucídico y lipídico [172]. En un hígado sano la insulina estimula el incremento de la importación de glucosa (a través de la proteína de membrana GLUT4), inhibe la producción hepática de glucosa, restaura los depósitos de glucógeno y estimula la síntesis de ácidos grasos, permitiendo la exportación de triglicéridos como VLDL [167].

La resistencia a insulina altera profundamente el metabolismo glucídico del hígado, dificultando la síntesis de glucógeno durante el periodo postprandial. La disminución de las reservas de glucógeno hepático se asocia a un incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (enzima clave en el metabolismo del glucógeno) que, unido al fallo en la señalización de insulina, provoca un incremento de la producción hepática de glucosa en ayuno [83, 113].

La lipogénesis hepática se incrementa en pacientes obesos con resistencia a insulina. Este es un dato contradictorio ya que la lipogénesis es una de las consecuencias de la señalización de insulina en los hepatocitos. Esta contradicción aún no ha sido completamente explicada. Algunos autores opinan que las diferentes rutas de

señalización activadas por la insulina en el hígado se alteran independientemente, de forma que la resistencia hepática a insulina afectaría con más intensidad al metabolismo glucídico que al lipídico [113, 114, 142], lo que unido a la hiperinsulinemia y a la hiperlipidemia, habituales en pacientes con síndrome metabólico, favorecería la esteatosis hepática [113, 114, 142].

Nuestra opinión coincide con esta explicación, aunque preferimos observar la resistencia hepática a insulina desde la perspectiva de una disfunción endocrina generalizada. Leptina e insulina comparten vías de señalización en los hepatocitos. La proteína JAK2, que se activa por el receptor de leptina, activa a su vez las proteínas IRS, claves en la señalización de insulina [83]. Los entrecruzamientos en las vías de señalización endocrinas son muy frecuentes. De hecho, el número de vías de transducción diferentes que tiene la célula es inferior al número de receptores hormonales de la membrana plasmática. En consecuencia, la modulación final de las vías intracelulares de transducción es resultado de la integración de numerosas señales procedentes de uniones de hormonas a sus respectivos ligandos en la superficie celular. Por tanto, si existe una sinergia parcial entre leptina e insulina, está justificado esperar que compartan mecanismos moleculares de modulación de la sensibilidad hormonal (concepto fisiológico) y de generación de resistencia (concepto patológico) [167].

Siguiendo esta línea de pensamiento, podría explicarse la intensa correlación encontrada entre los niveles de expresión de genes asociados a la señalización de leptina (OB-Ra, OB-Rb) con los niveles de genes asociados a la señalización e insulina (INSR, IRS-1, IRS-2) (**figuras 15 – 20**). Correlación que alcanza un máximo (coeficiente de Pearson de 0,887) entre la isoforma larga del receptor de leptina (OB-Rb) e IRS-1, en pacientes obesos sin EHGNA (**figura 18**). Hay que destacar que los coeficientes de correlación entre los dos grupos de genes son muy elevados en pacientes sin EHGNA y descienden con la aparición y progresión de la enfermedad hepática (**figuras 15-20**). Una posible explicación de este fenómeno sería que los mecanismos moleculares responsables de la expresión coordinada de genes ligados a la señalización de leptina e insulina podrían perder eficacia con la aparición del hígado graso. En otras palabras, en los hepatocitos de un hígado graso podrían surgir procesos de resistencia que interfiriesen en los mecanismos de regulación de la sensibilidad conjunta a leptina e insulina. Estos datos podrían abrir una nueva línea de investigación encaminada a identificar factores de transcripción comunes a los promotores del receptor de leptina, insulina, IRS-1 e IRS-2.

En cuanto a los niveles de expresión de INS-R, IRS-1 e IRS-2, no se observan diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes (**tabla 13**). Aunque, probablemente, el reducido tamaño muestral del grupo de obesos sin EHGNA haya restado significancia al descenso en los niveles de expresión de IRS-1 respecto a pacientes con hígado graso. En este sentido, se ha sugerido que el control del nivel de expresión de IRS-1 es un elemento clave en los mecanismos que modulan la sensibilidad a insulina [83, 167]. De hecho, se han descrito descensos en la expresión de IRS-1 en tejido adiposo de pacientes con diabetes y obesidad, respecto a individuos sanos [167].

Hemos observado también una marcada correlación entre los niveles de expresión de las dos isoformas del receptor de leptina (OB-Ra y OB-b) y entre los niveles de expresión de las dos proteínas IRS (**figuras 21 y 22**). Nuevamente, los coeficientes de correlación son muy elevados en el grupo de pacientes sin EHGNA (coeficiente de Pearson superior a 0,95 en ambos casos) y disminuyen con el origen y progresión de la enfermedad.

En resumen, nuestros datos abren nuevas perspectivas sobre la conexión existente entre las vías de señalización de leptina e insulina y sugieren además que el origen y desarrollo de la EHGNA afecta a la sinergia existente entre ambas hormonas, consecuencia probablemente del desarrollo de mecanismos de resistencia endocrina. Para confirmar esta hipótesis es necesario incrementar el tamaño muestral del grupo de pacientes obesos sin enfermedad hepática.

Expresión en hígado de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3, durante el origen y progresión de la EHGNA en la obesidad mórbida.

La familia de proteínas SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) está formada por 8 miembros. Son proteínas implicadas en la regulación de procesos inflamatorios y metabólicos. Inhiben la señalización de receptores de citoquinas, entre los que se incluyen los receptores de leptina e insulina, que funcional y estructuralmente pertenecen a la super-familia de receptores de citoquinas. En general, la expresión basal de las proteínas SOCS es muy reducida, incrementándose durante la exposición a ciertas citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, en un mecanismo clásico de retroalimentación [168].

El estudio de los niveles de expresión de SOCS-3 está justificado ya que es uno de los mecanismos moleculares responsables de la resistencia hipotalámica a leptina [64]. Además, SOCS-3 está implicada en la inhibición, por retroalimentación, del receptor de insulina, conectando nuevamente el mecanismo de acción de ambas hormonas [133, 134, 135, 136, 137, 145]. En cuanto a SOCS-1, existen algunas evidencias de un papel relevante en las patologías hepáticas. SOCS-1 participa, junto con SOCS-3, en la represión del receptor de insulina [133]. Sin embargo, un estudio realizado con ratones knockout para SOCS-1 demostró, en contra de lo esperado, que estos ratones tenían acentuada tendencia a desarrollar obesidad y resistencia a insulina cuando eran expuestos a dietas hipercalóricas [169]. También se han publicado trabajos que relacionan polimorfismos en el gen de SOCS-1 asociados a predisposición a obesidad [170]. En un estudio realizado con ratones diabéticos y obesos, la expresión génica intrahepática de SOCS-1 estaba incrementada [134]. Por otra parte, se ha descrito que la leptina actúa como mitogénica en células de hepatocarcinoma y que muchos cánceres de hígado mutan el gen SOCS-1 inactivando su expresión [171]. Por estas razones nos planteamos la hipótesis de que SOCS-1 podría participar en la represión del receptor de leptina y/o contribuir a los procesos de esteatogénesis hepática.

En nuestra cohorte de pacientes, los niveles de expresión de SOCS-1 y SOCS-3 han mostrado una evolución diferente (**tabla 14**). Hemos encontrado correlaciones moderadas entre SOCS-1 y las isoformas del receptor de leptina (**figura 23 y tabla 15**) y entre SOCS-3 y los genes asociados a la señalización de insulina (**figuras 24-27 y tabla 15**). Por otra parte, aunque no llega a ser significativo, el grupo 0 al compararse con los pacientes con EHGNA, ha mostrado tendencia a un menor nivel de expresión de SOCS-1 y a un mayor nivel de expresión de SOCS-3 (**tabla 14**). Nuevamente, será necesario incrementar el tamaño muestral del grupo de pacientes obesos sin EHGNA para comprobar estos datos.

Aunque es conocido que SOCS-1 y SOCS-3 es un represor de la señalización de insulina y leptina, su papel preciso en el hígado graso no está claro [133]. En estudios in vivo con ratones deficientes en SOCS-1 se ha publicado que aumenta la expresión de IRS-2 y mejora la sensibilidad a insulina intrahepática [135, 138]. Nuestros datos sugieren sobre todo una conexión de SOCS-3 con las vías de señalización a insulina durante el origen y desarrollo de la EHGNA, aunque son necesarios más estudios para

comprender el alcance de dicha relación. Sin embargo, como analizaremos a continuación, la relación entre SOCS-1 y la expresión de adipofilina A, sugiere un papel relevante de SOCS-1 en la fisiopatología de la EHGNA.

Expresión hepática de Perilipina 1 y Adipofilina durante el origen y progresión de la EHGNA en obesidad mórbida.

Histológicamente, el hígado graso se caracteriza por la presencia en el citoplasma de los hepatocitos de un exceso de gotas lipídicas (micro- o macrovesiculares) compuestas por triglicéridos. Las inclusiones citoplásmicas de gotas lipídicas existen en numerosos tipos celulares, son frecuentes en órganos asociados con el metabolismo energético y alcanzan su máxima expresión en los tejidos adiposos. Además de actuar como almacén temporal de energía en el citoplasma, la esterificación de ácidos grasos libres y su “retirada” a las gotas lipídicas es un mecanismo que tiene la célula para evitar la toxicidad del exceso de ácidos grasos sobre las membranas celulares. Las gotas lipídicas son orgánulos celulares dinámicos que están gestionados por una familia de proteínas anfifílicas denominadas PAT, nombre que proviene de los tres miembros fundadores de la familia: Perilipina, Adipofilina (también conocida como ADRP: adipocyte differentiation-related protein) y TIP47. Hasta el momento se han descrito dos miembros más (OXPAT y S3-12) elevando a 5 el número de miembros conocidos de la familia [173, 174]. El hecho de que las proteínas de la familia PAT muestren patrones de expresión diferentes según el tejido (e incluso variantes del ARN mensajero) hace pensar que tengan funciones diferentes. La función de las proteínas PAT ha sido estudiada en cultivos celulares de adipocitos en relación a la generación y digestión de las gotas lipídicas. Sin embargo, aún se sabe poco sobre la función precisa de las proteínas PAT en resto de los tejidos. La Perilipina es típica de adipocitos y de tejidos que sintetizan hormonas esteroideas, aunque también se ha descrito en hígado graso [140], mientras que la adipofilina es ubicua y se ha encontrado en todos los tejidos estudiados. Algunos autores han propuesto que una de las principales misiones de la leptina es evitar la acumulación excesiva de triglicéridos, en forma de gotas lipídicas, en tejidos diferentes del tejido adiposo, mediante estímulo de la β -oxidación e inhibición de la lipogénesis en músculo e hígado [175].

Perilipina y adipofilina son dos proteínas PAT, cuya expresión ha sido comprobada en hígado graso [140]. En consecuencia, nos hemos propuesto la siguiente hipótesis de trabajo: durante el origen y progresión de la EHGNA, los incrementos en la expresión de perilipina y adipofilina se podrían relacionar con la expresión de genes asociados a la señalización hepática de adiponectina, leptina e insulina, identificando elementos clave de resistencia endocrina.

La expresión de perilipina ha mostrado incrementos significativos en relación a la presencia pero no a la progresión de la EHGNA (**tabla 16**). En cambio, la expresión de adipofilina muestra una tendencia, no significativa, a incrementar su nivel de expresión con la presencia y progresión de la enfermedad (**tabla 16**). Tendencia que probablemente fuese significativa en tamaños muestrales más numerosos. Además, la correlación entre ambas hormonas es muy débil ($< 0,3$ y no significativa), y el análisis multivariante reveló que únicamente perilipina se asocia independientemente con el origen de la EHGNA, aunque no con la progresión de la misma. Todo ello sugiere que perilipina y adipofilina tienen funciones diferentes en la gestión de las gotas lipídicas durante el desarrollo del hígado graso.

La expresión de adipofilina ha mostrado un buen grado de correlación con la expresión de SOCS-1, únicamente en pacientes con hígado graso, alcanzando un máximo en el coeficiente de Pearson de $R=0,756$ en el grupo de pacientes con esteatohepatitis (**figura 28**). Para confirmar estos resultados, hemos incubado una línea celular de hepatocitos con concentraciones crecientes de ácido oleico en el medio de cultivo durante 24 h. Este es un método establecido, que incrementa considerablemente el contenido intracelular de gotas lipídicas [177]. En este modelo encontramos un considerable incremento de la expresión celular de adipofilina, en intensa correlación (coeficiente de Pearson superior a $R=0,99$) (**figura 29**) con la concentración de ácido oleico en el medio de cultivo. En cuanto a la expresión de SOCS-1, se incrementa considerablemente a concentraciones de ácido oleico superiores a 1 mM.

Se ha publicado que SOCS-1 tiene una elevada afinidad por la proteína JAK, inhibiendo de esta forma la ruta de señalización JAK-STAT (una de las principales vías activadas por la leptina) [171], mientras que SOCS-3 es capaz de unirse directamente al dominio intracelular de la isoforma larga (OB-Rb) del receptor de leptina [168]. En consecuencia, SOCS-3 únicamente podría interaccionar con la isoforma larga OB-Rb del receptor de leptina, mientras que SOCS-1 podría inhibir también la señalización de los complejos multi-isoforma del receptor de leptina (la isoforma corta OB-Ra conserva

un dominio de unión a JAK) [171, 168]. En hipotálamo OB-Rb es la isoforma predominante, lo que se ajusta con el papel descrito para SOCS-3 en la resistencia hipotalámica a leptina [64]. Sin embargo, en hígado la isoforma mayoritaria del receptor de leptina es OB-Ra [11]. Esto unido a las referencias bibliográficas que otorgan un papel relévente para SOCS-1 en las patologías hepáticas y a nuestros propios resultados que asocian SOCS-1 con adipofilina, sugiere que SOCS-1 podría estar implicado en los mecanismos de resistencia a leptina del hígado graso. Esta hipótesis nos abre una nueva línea de investigación.

Análisis de la expresión de factores de transcripción asociados al metabolismo lipídico, durante el origen y desarrollo de la EHGNA.

Con la intención de evaluar posibles alteraciones del metabolismo lipídico del hígado, en asociación con el resto de los genes analizados en el estudio, evaluamos los niveles de expresión de genes codificantes para varios factores de transcripción, claves en la regulación del metabolismo lipídico: SREBP-1, SREBP-2 y PPAR- α . No encontramos diferencias de expresión en relación al origen y progresión de la EHGNA (**tabla 17**), pero detectamos ciertas correlaciones, únicamente relevantes en pacientes con esteatohepatitis, como SREBP-2 con IRS-2 y OB-Rb, y PPAR- α con IRS-2 (**figuras 30-33 y tabla 18**). Son necesarios más datos para evaluar el alcance de dichas asociaciones, aunque el hecho de que sean elevadas en pacientes con esteatohepatitis sugiere que podrían estar implicados mecanismos asociados a la inflamación.

También hemos encontrado una correlación intensa y significativa entre los niveles de expresión de SREBP-2 y PPAR- α , únicamente en paciente con EHGNA. Se ha publicado en un estudio invitro que el incremento de PPAR- α inducido por fenofibrato en ratones, promueve la activación de SREBP-1c a través de un incremento en la velocidad de escisión de SREBP-1c a su forma activa [148]. En la EHGNA se incrementa la expresión de PPAR- α a través de malonil Co A secundario al incremento de lipogénesis, al igual que SREBP-1c, pero además esta correlación puede poner de manifiesto que existe un mecanismo de regulación positiva de SREBP-1c mediado por PPAR- α a través de un incremento en la velocidad de escisión de SREBP-1c a su forma activa, como se ha propuesto en el anterior artículo [148].

CONCLUSIONES

LIMITACIONES

Y

PERSPECTIVAS

6. CONCLUSIONES

- La expresión hepática de las dos isoformas del receptor de adiponectina, ADIPOR1 y ADIPOR2, se incrementa con el origen y desarrollo de la EHGNA en obesos mórbidos, en estrecha correlación con genes pertenecientes a los mecanismos de defensa antioxidante, especialmente con la glutatión peroxidasa. Nuestros datos sugieren la existencia de factores de transcripción comunes a las isoformas del receptor de adiponectina y a genes de la maquinaria antioxidante.
- La expresión de las isoformas del receptor hepático de leptina se correlaciona con la expresión de genes clave en la señalización de insulina. Los niveles de correlación más intensos se aprecian en el grupo de pacientes obesos sin EHGNA. Estos datos sugieren que la sinergia parcial existente entre las rutas de señalización hepática de leptina e insulina se refleja también en los mecanismos de expresión genética de las proteínas implicadas en dicha señalización.
- Las expresiones hepáticas de adipofilina y SOCS-1 se correlacionan únicamente en pacientes obesos con EHGNA. Estos datos han sido verificados en un modelo celular de esteatosis hepática. En dicho modelo, la expresión de adipofilina se correlaciona de forma casi absoluta con el contenido extracelular de ácidos grasos y se correlaciona con la expresión de SOCS-1. Nuestros datos sugieren que SOCS-1 podría estar implicada en los mecanismos hepáticos de resistencia endocrina que se desarrollan en el hígado graso.

6.1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS

En nuestro estudio hemos analizado la expresión hepática de una serie de genes implicados en mecanismos relevantes en la patofisiología de la EHGNA asociada a la obesidad. Hemos evaluado mecanismos celulares de defensa antioxidante y rutas de señalización de hormonas tan importantes en obesidad como la adiponectina la leptina o la insulina.

De nuestros datos han derivado varias conclusiones claras que apoyan algunas de las hipótesis de trabajo propuestas al inicio del estudio. Pero también han surgido nuevas hipótesis que deberían verificarse en futuros proyectos de investigación. Una de las principales limitaciones de nuestro estudio ha sido el reducido tamaño muestral de pacientes obesos sin EHGNA. De hecho pensamos que podríamos haber tenido diferencias significativas en ciertas variables clave, de haber tenido un tamaño muestral mayor. En futuros proyectos se deberá de incrementar el grupo de pacientes obesos sin EHGNA para verificar datos tan relevantes como el descenso en la isoforma corta del receptor de leptina (OB-Ra) e IRS-1 o el incremento en SOCS-1, en relación al origen y desarrollo de la EHGNA. De esa forma podrían identificarse nuevos mecanismos de resistencia hepática endocrina, profundizando en el conocimiento de la patofisiología de la EHGNA y detectando dianas terapéuticas para el desarrollo de futuros fármacos.

Otra de las limitaciones de nuestro estudio deriva de que las principales variables se han obtenido mediante una metodología de análisis de expresión genética. Lo ideal hubiera sido confirmar y ampliar los resultados de expresión genética con “técnicas de proteómica”. De hecho, la activación de proteínas mediante fosforilación, el tráfico de proteínas entre núcleo y citoplasma o el “envío” de proteínas a la maquinaria celular de “reciclado”, son mecanismos fundamentales en la señalización endocrina que no pueden analizarse mediante análisis de expresión genética. Sin embargo, en la actualidad las “técnicas genómicas” requieren menos muestra y son mucho más sencillas de realizar que las “técnicas proteómicas”. Por lo que es frecuente que los estudios comiencen con un análisis genético global y que, al detectar mecanismos relevantes, se profundice con un análisis proteómico. En nuestro caso, el posible mecanismo de resistencia hepática a leptina, basado en un descenso de OB-Ra y

un incremento de SOCS-1, deberá de confirmarse y ampliarse, en futuros proyectos, con técnicas proteómicas.

ABREVIATURAS

7. ABREVIATURAS

AASLD: American Association for de study of Liver Diseases

AdipoR1: receptor de adiponectina 1

AdipoR2: receptor de adiponectina 2

AG: ácidos grasos

AGL: ácidos grasos libres

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa

AUC: Area Under the Curve (o curva ROC)

CEH: células estrelladas hepáticas

ChREBP: Carbohydrate Response Element Binding Protein

CK: citokeratina

CU: ciclo umbral

CYP2E1: citocromo P450 2E1

DAG: diacilglicerol

DM: diabetes mellitus

DNA: deoxyribonucleic acid

DNL: de novo lipogénesis

ECA: ensayo clínico aleatorizado

ECV: enfermedad cardiovascular

EGHNA: Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico

EHNA: esteatohepatitis no alcohólica

GGT: gamma glutamiltransferasa

FA: fosfatasa alcalina

GO: glutatión oxidado

GPX1: glutatión peroxidasa 1

GR: glutatión reducido

GRD: glutatión reductasa

HB: hemoglobina

HDL: High density lipoprotein
HGNA: hígado graso no alcohólico
HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyma A reductase
IL: interleuquina
IMC: índice de masa corporal
iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase
LDL: Low density lipoproteins
MDA: malondialdehído
mRNA: messenger ribonucleic acid
NADPH: Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NAS: NAFLD Activity Score
NASH: Non-Alcoholic SteatoHepatitis
nM: nanómetro
Ob R: receptor de leptina Ob
OMS: Organización Mundial de la Salud
PB: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PNPLA3: fosfolipase patatin-like 3
PNU: polimorfismo de núcleo único
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor (receptor activado proliferador de peroxisoma)
PPIA: isomerasa peptidilprolil A
PRS13: proteína ribosomal S13
RCV: riesgo cardiovascular
RI: resistencia a insulina
RNA: ribonucleic acid
ROC: Receiver Operating Characteristic
SEEDO: Sociedad Española Para el Estudio de la Obesidad
SM: Síndrome Metabólico
SOCS: Supressor Of Cytokine Signalling
SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein
TG: triglicéridos

TGF: Transforming Grow Factor

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TZD: tiazolidinedionas

US: ultrasonografía

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

GLOSARIO DE FIGURAS Y TABLAS

8. GLOSARIO DE FIGURAS Y TABLAS

- **Figura 1.** Relación entre obesidad y enfermedades como el hígado graso no alcohólico (HGNA), la DM2, ECV y otras.....17
- **Figura 2.** Mecanismos de señalización intracelular de leptina.....29
- **Figura 3.** Adiponectina y su estructura.....31
- **Figura 4.** Cambios inducidos durante la obesidad en la secreción de adipocinas que propician el desarrollo de resistencia sistémica a insulina.....38
- **Figura 5.** Las estrategias terapéuticas para la regularización de adiponectina o interacción con la señalización de adiponectina en el HGNA.....46
- **Figura 6.** Mecanismos moleculares de resistencia hepática a insulina.....51
- **Figura 7.** Implicación de las proteínas tisulares de transporte de AGL (CD 36) en la patogénesis de HGNA y la acumulación de grasa ectópica.....54
- **Figura 8.** La resistencia hepática y sistémica a insulina conduce a esteatosis hepática.....55
- **Figura 9.** Factores relacionados con la inflamación en el origen y progresión de la EHGNA.....61
- **Figura 10.** Representación esquemática de la historia natural de la EHGNA a través de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la EHNA.....69

- **Figura 11.** Propuesta de algoritmo para el seguimiento de un paciente con HGNA.....84

- **Figuras 12, 13 y 14.** Representación gráfica de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de GPx1 y Adipo R1-2, y entre Adipo R1-2...123

- **Figuras 15-22.** Representación gráfica de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de las isoformas del receptor de leptina Ob-Ra y Ob-Rb y los factores relacionados con señalización de insulina IRS-1, IRS-2 e INS-R (figuras 15-20). También se muestran las correlaciones entre Ob-Ra – Ob-Rb (figura 21) y entre IRS-1 e IRS-2 (figura 22).....129

- **Figuras 23-27.** Representación gráfica de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de la isoforma del receptor de leptina Ob-Ra y SOCS-1(figura 23) y de las correlaciones entre los factores relacionados con señalización de insulina IRS-1, IRS-2 e INS-R y SOCS-3 (figuras 24, 25 y 26). También se muestran las correlaciones entre SOCS-1 y SOCS-3 (figura 27).
.....133

- **Figura 28.** Representación gráfica de la correlacion lineal entre las concentraciones de mRNA de adipofilina y SOCS-1.....136

- **Figura 29.** Representación gráfica de la correlacion lineal entre las concentraciones de mRNA de adipofilina y SOCS-1 cuantificados en femtogramos de mRNA/picogramos de mRNA housekeeping, en relación a la concentración de ácido oleico en medio de cultivo.....137

- **Figuras 30-33.** Representaciones gráficas de las correlaciones lineales entre las concentraciones de mRNA de los factores asociados a metabolismo lipídico PPAR- α y SREBP-2, el factor asociado a señalización de leptina Ob-Rb y los factores asociados a señalización de insulina IRS-2 y SOCS-3.....141

- **Tabla 1.** Criterios para definir obesidad en grados según el IMC (OMS) modificada por la SEEDO en 1996.....10
- **Tabla 2.** Prevalencia de obesidad en la población española por grupos de edad y sexo.....12
- **Tabla 3.** Riesgo relativo de presentar comorbilidades que confieren el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo.....18
- **Tabla 4.** Definición del síndrome metabólico según los criterios del Adult Treatment Panel III (ATP III), definición actualizada en 2005, y la International Diabetes Federation (IDF).....19
- **Tabla 5.** Causas comunes de esteatosis hepática secundaria.....40
- **Tabla 6.** Estudios que evalúan el RCV en pacientes con y sin HGNA.....63
- **Tabla 7.** Métodos para la evaluación de fibrosis y EHNA.....75
- **Tabla 8.** Secuencias de los cebadores para la amplificación de cDNA por PCR en tiempo real.....110
- **Tabla 9.** Características basales.....118
- **Tabla 10.** Marcadores de estrés oxidativo sanguíneos.....119
- **Tabla 11.** Concentraciones de mRNA hepático de Adipo R1, Adipo R2, GPx1, GRD e iNOS en relación con la presencia y progresión del HGNA.....121
- **Tabla 12.** Coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las concentraciones de mRNA de los parámetros indicados (Adipo R1, Adipo R2 y GPx1 con GRD e iNOS) en el total de pacientes.....124

- **Tabla 13.** Concentraciones de mRNA hepático de Ob-Ra, Ob-Rb, INS-R, IRS-1 e IRS-2 en relación con la presencia y progresión del HGNA.....125
- **Tabla 14.** Concentraciones de mRNA hepático de SOCS-1 y 3 en relación con la presencia y progresión del HGNA.....131
- **Tabla 15.** Coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las concentraciones de mRNA de los parámetros indicados (marcadores asociados a señalización de leptina e insulina con SOCS-1 y 3).....134
- **Tabla 16.** Concentraciones de mRNA hepático de Perilipina A y adipofilina en relación con la presencia y progresión del HGNA.....135
- **Tabla 17.** Concentraciones de mRNA hepático de factores asociados a metabolismo lipídico en relación con la presencia y progresión del HGNA...139
- **Tabla 18.** Coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las concentraciones de mRNA de los parámetros indicados (marcadores asociados a metabolismo lipídico con marcadores asociados a señalización de leptina e insulina).....141
- **Tabla 19.** Comparación de IMC y parámetros sanguíneos antes y un año después de la cirugía.....143

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, et al. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2007; 128(5):184-96.
- 2) Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000; 320:1240-3.
- 3) Aranceta Bartrina J, Serra Majem L, Pérez Rodrigo C, et al. Prevalencia de obesidad en España. *Med Clin (Barc)*. 2005; 125: 460-6.
- 4) Gutiérrez-Fisac JL, Regidor E, Banegas JR, et al. Prevalencia de obesidad en la población adulta española: 14 años de crecimiento continuado. *Med Clin (Barc)*. 2005; 124:196-7.
- 5) Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Muñoz M. Perfil nutricional de los ancianos institucionalizados en España. En: Muñoz M, Aranceta J, Guijarro JL, editores. Libro blanco de la alimentación del anciano en España. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.
- 6) Aranceta Bartrina J, Serra Majem L, Ribas Barba L, et al. Factores determinantes de la obesidad en la población infantil y juvenil española. En: Serra Majem L, Aranceta Bartrina J, editores. Obesidad infantil y juvenil. Estudio enKid. Barcelona: Editorial Masson; 2001. p. 109-28.
- 7) Onat A, Avci GS, Barlan MM, et al. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28:1018-25.

- 8) Troiano RP, Fronguillo EA Jr, Sobal J, et al. The relationship between body weight and mortality: a quantitative analysis of combined information from existing studies. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996; 20:63-75.
- 9) Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. For the IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome – A new worldwide definition. *Lancet.* 2005;366:1059-62.
- 10) Lorenzo C, Serrano-Ríos M, Martínez-Larrad MT, et al. Central adiposity determines prevalence differences of the metabolic syndrome. *Obes Res.* 2003; 11:1480-7.
- 11) Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2010; 316(2): 129-39.
- 12) Lonnqvist F, Nordfors L, Jansson M, et al. Leptin secretion from adipose tissue in women: relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest.* 1997;99: 2398-404.
- 13) Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. Evidence for free and bound leptin in human circulation: studies in lean and obese subjects during short term fasting. *J Clin Invest.* 1996;98(6):1277-82.
- 14) Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, et al. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003;26:2442-50.
- 15) Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, et al. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2010;12(5): 365-83.
- 16) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipospecific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79–83.

- 17) Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J.* 2009;425(1):41-52
- 18) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55:434-8.
- 19) Setji TL, Holland ND, Sanders LL, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic Fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91: 1741-7.
- 20) Adams LA, Feldstein A, Lindor KD, et al. Nonalcoholic fatty liver disease among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction. *Hepatology* 2004;39:909-14.
- 21) Machado M, Marques-Vidal P, Cortez- Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; 45: 600–6.
- 22) Franzese A, Vajro P, Argenziano A, et al. Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1428–32.
- 23) Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1212–8
- 24) Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; 114: 842–5.
- 25) Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 33.

- 26) Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance?. *Hepatology* 2010; 51: 373–5.
- 27) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–30.
- 28) Ma H, Gomez V, Lu L, et al. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 233–237.
- 29) Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 117–21.
- 30) Ma H, Gomez V, Lu L, et al. Expression of adiponectin and its receptors in livers of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 233–7.
- 31) Nannipieri M, Cecchetti F, Anselmino M, et al. Pattern of expression of adiponectin receptors in human liver and its relation to nonalcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2009; 19: 467–74.
- 32) Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, et al. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 237–42.
- 33) Lemoine M, Ratziu V, Kim M, et al. Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2009; 29: 1431–8.
- 34) Musso G, Gambino R, De MF, et al. Adiponectin gene polymorphisms modulate acute adiponectin response to dietary fat: Possible pathogenetic role in NASH. *Hepatology* 2008; 47: 1167–77.

- 35) Wang ZL, Xia B, Shrestha U, et al. Correlation between adiponectin polymorphisms and non-alcoholic fatty liver disease with or without metabolic syndrome in Chinese population. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 1086–1091.
- 36) Tokushige K, Hashimoto E, Noto H, et al. Influence of adiponectin gene polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2009; 44: 976–982.
- 37) Hui Y, Yu-Yuan L, Yu-Qiang N, et al. Effect of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma and co-activator-1alpha genetic polymorphisms on plasma adiponectin levels and susceptibility of non-alcoholic fatty liver disease in Chinese people. *Liver Int* 2008; 28: 385–392.
- 38) Tong Y, Lin Y, Zhang Y, et al. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet* 2009; 10: 15.
- 39) Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, et al. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 1998; 128: 1070-6.
- 40) McClung JP, Roncker CA, Mu W, et al. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8852-7.
- 41) Ristow M, Zarse K, Oberbach A, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8665-70.
- 42) Koh IU, Lim JH, Joe MK, et al. AdipoR2 is transcriptionally regulated by ER stress-inducible ATF3 in HepG2 human hepatocyte cells. *FEBS J* 2010; 277: 2304-17.

- 43) Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 2010; 464: 1313-9.
- 44) Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 2007;13:332-9.
- 45) Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44: 865–73.
- 46) Cheung O, Kapoor A, Puri P, et al. The impact of fat distribution on the severity of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hepatology* 2007; 46: 1091–100.
- 47) Angulo P, Keach JC, Batts KP, et al. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356–62.
- 48) Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 33.
- 49) Palmentieri B, de Sio I, La Mura V, et al. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 485–9.
- 50) Musso G, Gambino R, Biroli G, et al. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438–46.

- 51) Chen J, Talwalkar JA, Yin M, et al. Early Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Using MR Elastography. *Radiology* 2011. 259:749-56.
- 52) McPherson S, Stewart SF, Henderson E, et al. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2010; 59: 1265-9.
- 53) Renata Belfort, M.D., Stephen A. Harrison, M.D., et al. A Placebo-Controlled Trial of Pioglitazone in Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355:2297-307.
- 54) Shimizu A, Takamura T, Matsuzawa N, et al. Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism* 2007; 56: 1478-85.
- 55) De Jonge HJ, Fehrman RS, de Bont ES, et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* 2007; Sep 19; 2:e898.
- 56) Felder TK, Hahne P, Soyak SM, et al. Hepatic adiponectin receptors (ADIPOR) 1 and 2 mRNA and their relation to insulin resistance in obese humans. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 846-51.
- 57) Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, et al. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J* 2009; 17: 183-93.
- 58) Fujita K, Nozaki Y, Yoneda M, et al. Nitric oxide plays a crucial role in the development/progression of nonalcoholic steatohepatitis in the choline-deficient, l-amino acid-defined diet-fed rat model. *Alcohol Clin Exp Res* 2010; 34: 18-24.

- 59) Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, et al. Influence of inducible nitric oxide synthase polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2009; 39: 963-71
- 60) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762-9.
- 61) Bullen JW Jr, Bluher S, Kelesidis T, et al. Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:1079-86.
- 62) Beylot M, Pinteur C, Peroni O. Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats. *Metabolism.* 2006;55:396-01.
- 63) Klempel M.C, Varady K A. Reliability of leptin, but not adiponectin, as a biomarker for diet-induced weight loss in humans. *Nutrition Reviews* 2011; Vol. 69(3):145-54.
- 64) Stergios A, Polyzos MD, Kountouras J, et al. The Potential Adverse Role of Leptin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Gastroenterol* 2011;45(1):50-4.
- 65) Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 2007;131(2):242-56.
- 66) Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, et al. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(5-6):480-5.
- 67) Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf).* 2012;205(2):194-208.

- 68) Ishibashi J, Seale P. Beige can be slimming. *Science*. 2010 May 28;328(5982):1113-4.
- 69) Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009; 50(3):957-69.
- 70) Morris DL, Singer K, Lumeng CN. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jul;14(4):341-6.
- 71) Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008 Jun 5;453(7196):783-7.
- 72) Veilleux A, Caron-Jobin M, Noël S, et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1504-11.
- 73) Carnevalli LS, Masuda K, Frigerio F, et al. S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation. *Dev Cell*. 2010 May 18;18(5):763-74.
- 74) Slawik M, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr*. 2007 Oct;2(1):41-5.
- 75) Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 2011;53:810-820.
- 76) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372(6505): 425-32.
- 77) Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995;269: 546-49.

- 78) Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269: 543-46.
- 79) Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker BM, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-43.
- 80) Cao Q, Mak KM, Ren C, et al. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂- dependant MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2004;279: 4292–4304.
- 81) Ribatti D, Belloni AS, Nico B, et al. Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Peptides.* 2008;29:1596–1602.
- 82) Siegel AB, Zhu AX. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link. *Cancer* 2009; 115:5651–5661.
- 83) Kenneth C. Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. *Gastroenterology* 2012; 142:711–725.
- 84) Freedman D. Obesity - United States, 1988-2008. *MMWR Surveill Summ* 2011; 60(Suppl):73–77.
- 85) Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011; 378:804–814.
- 86) Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011; 121:2111–2117.
- 87) Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, et al. AlternativeM2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesityinduced insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:496–507.

- 88) Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(5):525-40.
- 89) Porepa L, Ray JG, Sanchez-Romeu P, et al. Newly diagnosed diabetes mellitus as a risk factor for serious liver disease. *CMAJ* 2010;182:E526–E531.
- 90) Wang P, Kang D, Cao W, et al. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev* 2011 Sep 5.
- 91) Ortiz-Lopez C, Lomonaco R, Orsak B, et al. Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Diabetes Care* 2012; 35:1–6.
- 92) Barrows BR, Parks EJ. Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1446–52.
- 93) Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with NAFLD. *Hepatology* 2011;55(5):1389-97.
- 94) Adiels M, Taskinen M, Packard C, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49:755–765.
- 95) Adiels M, Westerbacka J, Soro-Paavonen A, et al. Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance. *Diabetologia* 2007; 50:2356–2365.

- 96) Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, et al. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006;16:1118-25.
- 97) Cazanave SC, Gores GJ. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clin Lipidol* 2010;5:71–85.
- 98) Rombouts K, Marra F. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis* 2010;28:229-35.
- 99) Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM, et al. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:913-24.
- 100) Lee T, Mak K, Rackovsky O, et al. Downregulation of hepatic stellate cell activation by retinol and palmitate mediated by adipose differentiation-related protein (ADRP). *J Cell Physiol* 2010;223:648–657.
- 101) Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, et al. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2005;28:2913–2918.
- 102) Goessling W, Massaro JM, Vasan RS, et al. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology* 2008;135:1935–1944, 1944 e1.
- 103) Loannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999-2002. *Am J Gastroenterol* 2006;101:76–82.

- 104) Kim F, Tysseling K, Rice J, et al. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKK β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:989–994.
- 105) Bonapace S, Perseghin G, Molon G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with left ventricular diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011 Dec 30 [Epub ahead of print].
- 106) Van der Meer R, Rijzewijk L, de Jong H, et al. Pioglitazone improves cardiac function and alters myocardial substrate metabolism without affecting cardiac triglyceride accumulation and high-energy phosphate metabolism in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2009;119:2069-2077.
- 107) Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437–443.
- 108) Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* 2005; 10:3093–3099.
- 109) Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhouri N, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *Journal of Hepatology* 2011 vol. 54; 1224–1229.
- 110) Schwabe FR, Maher JJ. Lipids in liver disease: looking beyond steatosis. *Gastroenterology* 2012;142:8–11.
- 111) Teratani T, Tomita K, Suzuki T, et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2011;142:152–165.

- 112) Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52:774–788.
- 113) Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: Implications for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2007;132: 2191–2207.
- 114) Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic, and Clinical Implications. *Hepatology* 2010;51:679-89.
- 115) Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007;20:351-358.
- 116) Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* 2003;29:478-485.
- 117) Adiels M, Taskinen MR, Packard C, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 2006;49:755-765.
- 118) Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:424-431.
- 119) Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004;279:32345-32353.
- 120) Chalasani N, Zobair Y, Lavine JE, et al. The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American

Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol.* 2012; 107: 811-26.

- 121) Vernon G, Baranova A , Younossi ZM . Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 34: 274-85.
- 122) Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.*2004;40(4):578-84.
- 123) Larson-Meyer DE, Heilbronn LK. History of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004 ; 40 : 578 – 84.
- 124) Larson-Meyer DE, Heilbronn LK, Redman LM, et al. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* 2006;29: 1337-44.
- 125) Promrat K , Kleiner DE , Niemeier HM, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis . *Hepatology* 2010;51:121-9.
- 126) Klein EA , Thompson IM , Tangen CM et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer. The selenium and vitamin E cancer prevention trial. *JAMA* 2011;306:1549-56.
- 127) Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygair S, et al. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and metaanalysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1396-402.

- 128) Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI , Barrientose-Gutierrez T, et al. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients . Cochrane Database of Systematic Reviews 2010 Issue 1.
- 129) Negro F , Clements S. Impact of obesity, steatosis and insulin resistance on progression and response to therapy to hepatitis C . J Viral Hepat 2009 ; 16 : 681 – 8 .
- 130) Jacobson IM , McHutchison JG , Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection . N Engl J Med 2011;364:2405-16.
- 131) Garcia-Tsao G, Sanyal J, Grace ND, et al. For the Practice Guidelines Committee of the American Association for the Study of Liver Disease and the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis . Am J Gastroenterol 2007 ; 102 : 2086 – 102 .
- 132) Bruix J , Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update . Hepatology 2011 ; 53 : 1020 – 2 .
- 133) Ueki K, Kadowaki T, Kahn CR. Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. Hepatol Res 2005; 33: 185–192.
- 134) Jamieson E, Chong MM, Steinberg GR, et al. SOCS-1 deficiency enhances hepatic insulin signaling. J Biol Chem 2005; 280: 31516–31521.
- 135) Brady MJ. IRS2 takes center stage in the development of type 2 diabetes. J Clin Invest 2004; 114: 886–888.

- 136) Fujimoto M, Naka T. SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010.
- 137) Farrell GC. Signalling links in the liver: knitting SOCS with fat and inflammation. *J Hepatol.* 2005;43(1):193-6.
- 138) Mouzaki M, Comelli E, Arendt B, et al. Intestinal microbiota in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2013 (Feb 11). [Epub ahead of print].
- 139) Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*(2012), 55: 2005–2023.
- 140) Straub BK, Stoeffel P, Heid H, et al. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology.* 2008;47:1936-1946.
- 141) Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, et al. Adipophilin/perilipin-2 as lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology.* 2013;62(4):617-31.
- 142) Tessari P, Coracina A, Cosma A, et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009;19(4):291-302.
- 143) Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, et al. Gene expression in human NAFLD. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(5):1281-7.

- 144) Sverdlov RS, Wouters K, van Gorp PJ, et al. Early diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in APOE2 knock-in mice and its prevention by fibrates. *J. Hepatol.* 2006; 44(4): 732-741.
- 145) Xiao-Dong Huang, Yan Fan, Hen Zhang, et al. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008 May 14; 14(18): 2888-2893
- 146) Huang J, Jia Y, Fu T, et al. Sustained activation of PPAR α by endogenous ligands increases hepatic fatty acid oxidation and prevents obesity in ob/ob mice. *FASEB J.* 2012;26(2):628-38.
- 147) Knebel B, Haas J, Hartwig S, et al. Liver-specific expression of transcriptionally active SREBP1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass. *PLoS One.* 2012; 7(2): e31812.
- 148) Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, et al. A role for PPAR α in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem. J.* (2005) 389, 413–421
- 149) Alcázar L, Martín Lagos A, Caba Molina M, et al. Expresión en tejido adiposo de la proteína traslocante mitocondrial UCP-1 en la progresión del hígado graso no alcohólico (HGNA) en pacientes obesos. *Rev Esp Enferm Dig* 2012; 104 (Supl. I): 27-122.
- 150) Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, et al. Novel resistin promoter polymorphisms: association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res.* 2004;36(8):564-70.
- 151) Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461–1465.

- 152) Petersen K, Dufour S, Hariri A, et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010; 362:1082–1089.
- 153) Bohte AE, van Werven JR, Bipat S, et al. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol* 2011; 21:87-97.
- 154) Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008;336:924-926.
- 155) Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012 ;56(5):1751-9.
- 156) Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281(1):106-22.
- 157) Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):809-18.
- 158) De Jonge HJ, Fehrman RS, de Bont ES, et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One*. 2007 Sep 19;2(9):e898.
- 159) Hug C, Wang J, Ahmad NS, et al. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10308-13.
- 160) Ho YS, Maguenat JL, Bronson RT, et al. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem*. 1997;272:16644–51.

- 161) Kielar D, Clark JS, Ciechanowicz A, et al. Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism*. 1998;47(7):844-7.
- 162) Cohen P, Yang G, Yu X, et al. Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation. *J Biol Chem*. 2005 Mar 18;280(11):10034-9.
- 163) Uotani S, Bjørbaek C, Tornøe J, et al. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes*. 1999;48(2):279-86.
- 164) White DW, Tartaglia LA. Evidence for ligand-independent homooligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: a proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression. *J Cell Biochem*. 1999;73(2):278-88.
- 165) Bacart J, Leloire A, Levoye A, et al. Evidence for leptin receptor isoforms heteromerization at the cell surface. *FEBS Lett*. 2010 Jun 3;584(11):2213-7.
- 166) Akasaka Y, Tsunoda M, Ogata T, et al. Direct evidence for leptin-induced lipid oxidation independent of long-form leptin receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Oct;1801(10):1115-22.
- 167) Benito M. Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;201(3):297-312.
- 168) Linossi EM, Babon JJ, Hilton DJ, et al. Suppression of cytokine signaling: The SOCS perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Mar 29.
- 169) Emanuelli B, Macotela Y, Boucher J, et al. SOCS-1 deficiency does not prevent diet-induced insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 12;377(2):447-52.

- 170) Gylvin T, Ek J, Nolsøe R, et al. Functional SOCS1 polymorphisms are associated with variation in obesity in whites. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11(3):196-203.
- 171) Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet.* 2001;28(1):29-35.
- 172) Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(4):E581-91.
- 173) Brasaemle DL. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007 Dec;48(12):2547-59.
- 174) Ducharme NA, Bickel PE. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology.* 2008 Mar;149(3):942-9.
- 175) Lee Y, Wang MY, Kakuma T, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23;276(8):5629-35.
- 176) Ruiz-Extremera Á, Carazo Á, Salmerón Á, et al. Factors associated with hepatic steatosis in obese children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53(2):196-201.
- 177) Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 2007;165(2):106-16.

ANEXO

RESUMEN DE LA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Resumen de antecedentes bibliográficos.

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial, cuya prevalencia ha aumentado y continúa aumentando alarmantemente en nuestra sociedad, así como en países en economía en transición, hasta adquirir proporciones epidémicas. Entre las repercusiones clínicas más importantes se encuentra el síndrome metabólico y su exponente hepático, la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA). Nuestro trabajo doctoral se centra en el estudio de los mecanismos implicados en el origen y progresión de la EHGNA en obesidad mórbida.

La prevalencia de la EHGNA ha aumentado rápidamente en paralelo al dramático incremento de la obesidad y la diabetes tipo 2, tanto en la población adulta como pediátrica, por lo que la EHGNA representa la causa más común de enfermedad hepática en el mundo occidental, siendo motivo de preocupación su diagnóstico precoz, estadiaje y tratamiento para evitar la progresión de esta enfermedad a cirrosis hepática y sus complicaciones.

La hipótesis del doble impacto se propuso en la década de los 90 como un modelo para explicar el origen de la esteatosis hepática y su posterior evolución hacia esteatohepatitis. La acumulación de lípidos en los hepatocitos (primer impacto) desencadenaría una serie de eventos citotóxicos (segundo impacto) que culminarían en esteatohepatitis. Este punto de vista inicial ha evolucionado y, en la actualidad, el origen de la esteatosis hepática y su posterior evolución hacia esteatohepatitis se considera un proceso multifactorial en el que los mecanismos más relevantes pueden variar de un paciente a otro, probablemente debido a una combinación de factores genéticos y ambientales. En el caso de la EHGNA ligada a la obesidad mórbida los mecanismos más relevantes se asocian a una alteración funcional y endocrina del órgano graso. El concepto multifactorial de la EHGNA está bien establecido y se conocen los principales mecanismos implicados, siendo la resistencia a insulina uno de los mecanismos centrales. Sin embargo, a una escala más molecular, existen numerosas lagunas sobre las alteraciones que sufre el tejido hepático durante el origen y progresión de la EHGNA.

La adiponectina es la adipoquina más abundante y específica del tejido adiposo. Cada vez hay más evidencia del papel hepatoprotector de la adiponectina en hígado graso no alcohólico. A nivel hepático, la adiponectina incrementa la sensibilización a insulina y posee actividad antifibrogénica - anti-inflamatoria, actuando en los hepatocitos y macrófagos hepáticos (células de Kupffer), respectivamente. El efecto hepatoprotector de la adiponectina y su acción insulinosensibilizante hacen que la adiponectina y el estudio de su fisiología a través de sus receptores hepáticos sean un atractivo potencial terapéutico en el HGNA. Hay datos contradictorios con respecto a la expresión de los receptores AdipoR1 y AdipoR2 en hígado graso no alcohólico. Por una parte, se ha publicado que los niveles de expresión génica del receptor AdipoR2 hepático disminuyen en pacientes con EHNA, en comparación con los controles. Sin embargo, otros estudios no han encontrado variaciones en la expresión génica en la progresión del HGNA, o por lo contrario se ha publicado que el nivel de expresión génica de dichos receptores aumenta o aumenta sólo la isoforma AdipoR2. En estos datos anteriormente indicados pueden influir factores de confusión relacionados con diferencias anatomoclínicas entre individuos de las cohortes estudiadas o diferencias metodológicas sobretodo en la utilización de genes de normalización (housekeeping) para cuantificar la expresión génica de receptores de adiponectina no específicos a nivel hepático. En la progresión del HGNA a esteatohepatitis y fibrosis hepática, la teoría del doble impacto formulada por Day menciona la implicación de las vías de estrés oxidativo y RI como factores determinantes. En un estudio anterior y mediante la utilización de un modelo de ratones obesos y diabéticos, se ha

demostrado sobre-expresión de AdipoR2, que a su vez se demuestra incrementada en relación con la expresión de enzimas antioxidantes hepáticas. También se ha demostrado la conexión entre la expresión génica de receptores de adiponectina y vías del estrés oxidativo en modelos celulares. No se han realizado estudios similares en modelos humanos.

La leptina es una hormona pleiotrópica que en hígado induce inhibición de la lipogénesis, síntesis de glucosa, estimulación de la beta oxidación y la sensibilidad a insulina, y en hipotálamo presenta una función anorexígena, sin embargo, la obesidad está fuertemente asociada con esteatosis hepática y resistencia a insulina. De las cuatro isoformas celulares descritas para el receptor de leptina, las más abundantes son OB-Ra, que es mayoritario en todos los tejidos estudiados salvo el hipotálamo y OB-Rb, que es la isoforma predominante en hipotálamo. En cuanto al resto de las isoformas cortas, son minoritarias y muy pocos trabajos han analizado sus niveles de expresión. Respecto a la función de las isoformas celulares del receptor en la señalización de la leptina, únicamente la isoforma larga posee los dominios necesarios para conectar con las vías intracelulares de transducción JAK-STAT, pero también con las vías MAPK y PI3K. Existen fuertes argumentos a favor de que el hígado graso también desarrolla resistencia a leptina, sin embargo, las bases moleculares de la resistencia a hepática a leptina son en la actualidad desconocidas. En contrapartida, la resistencia a leptina a nivel del hipotálamo está bien establecida. Se sabe que es la responsable de la pérdida del efecto anorexígeno de la hormona en individuos obesos y se conocen los principales mecanismos moleculares implicados: la disminución de los niveles de expresión del receptor de leptina y el incremento de los niveles de SOCS-3.

La resistencia a insulina altera profundamente el metabolismo glucídico del hígado, dificultando la síntesis de glucógeno durante el periodo postprandial. La disminución de las reservas de glucógeno hepático se asocia a un incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (enzima clave en el metabolismo del glucógeno) que, unido al fallo en la señalización de insulina, provoca un incremento de la producción hepática de glucosa en ayuno. Leptina e insulina comparten vías de señalización en los hepatocitos. La proteína JAK2, que se activa por el receptor de leptina, activa a su vez las proteínas IRS, claves en la señalización de insulina. Los entrecruzamientos en las vías de señalización endocrinas son muy frecuentes. De hecho, el número de vías de transducción diferentes que tiene la célula es inferior al número de receptores hormonales de la membrana plasmática. En consecuencia, la modulación final de las vías intracelulares de transducción es resultado de la integración de numerosas señales procedentes de uniones de hormonas a sus respectivos ligandos en la superficie celular. Aunque es conocido que SOCS-1 y SOCS-3 son represores de la señalización de insulina y leptina, su papel preciso en el hígado graso no está claro. En estudios in vivo con ratones deficientes en SOCS-1 se ha publicado que aumenta la expresión de IRS-2 y mejora la sensibilidad a insulina intrahepática.

La lipogénesis hepática se incrementa en pacientes obesos con resistencia a insulina. Este es un dato contradictorio ya que la lipogénesis es una de las consecuencias de la señalización de insulina en los hepatocitos. Esta contradicción aún no ha sido completamente explicada. Algunos autores opinan que las diferentes rutas de señalización activadas por la insulina en el hígado se alteran independientemente, de forma que la resistencia hepática a insulina afectaría con más intensidad al metabolismo glucídico que al lipídico, lo que unido a la hiperinsulinemia y a la hiperlipidemia, habituales en pacientes con síndrome metabólico, favorecería la esteatosis hepática. La elevada entrada de lípidos así como la lipogénesis de novo a través de la glicólisis por la vía acetyl CoA, parecen ser los puntos clave para la acumulación de lípidos en los hepatocitos. Se ha estudiado que SREBP-1c, controla la lipogénesis de novo en el hepatocito, principalmente a través de la regulación de la expresión de genes implicados en ésta, en el metabolismo de los lípidos y en la homeostasis de la glucosa. Por consiguiente, la expresión hepática de SREBP-1c y sus genes diana está incrementada en pacientes con EHGNA en comparación con los individuos sanos. Aunque en condiciones de resistencia a insulina SREBP-1c no debería ser activado, sorprendentemente la hiperinsulinemia estimula la expresión de

SREBP-1c, incluso en estados de intensa resistencia a la insulina, dando lugar a un incremento de lipogénesis de novo.

Durante la obesidad mórbida, la expresión hepática de genes asociados a la señalización de leptina, insulina y metabolismo lipídico cambian en relación con el origen y progresión de la EHGNA, los cuales pueden formar parte de mecanismos de resistencia hepática a leptina e insulina, claves para la progresión de esta enfermedad. Los antecedentes citados en la fisiopatología de la EHGNA y su progresión en relación con las adipoquinas leptina y adiponectina, factores relacionados con resistencia a insulina y factores relacionados con inflamación, entre otros factores, sugieren un cambio en la expresión hepática de los mecanismos de señalización de los factores citados, que contribuyen al origen y progresión del HGNA, así como al desarrollo de síndrome metabólico. Los antecedentes citados en relación con los marcadores de estrés oxidativo "(sobretudo glutathion peroxidasa)" y los mecanismos de señalización de adipoquinas (receptores de adiponectina) en la progresión del HGNA, sugieren un vínculo entre los receptores de adiponectina y las vías de estrés oxidativo.

Hipótesis de trabajo.

De los antecedentes expuestos derivan las siguientes hipótesis de trabajo:

- Los cambios en la expresión hepática de los receptores de adiponectina en la progresión de la EHGNA pueden estar asociados con la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, lo que nos permitiría profundizar en el conocimiento de la señalización hepática de la adiponectina y sus alteraciones en la progresión de la EHGNA.
- Durante la obesidad mórbida, la expresión hepática de genes asociados a la señalización de leptina, insulina y metabolismo lipídico cambia en relación con el origen y progresión de la EHGNA. Los mecanismos de señalización hepática de leptina e insulina comparten factores moleculares que se alteran con el inicio y progresión de la enfermedad y podrían explicar mecanismos de resistencia hepática a leptina e insulina.
- Durante el origen y la progresión de la EHGNA, los incrementos de expresión de perilina 1 y adipofilina se podrían relacionar con la expresión de genes asociados a la señalización hepática de adiponectina, leptina e insulina, identificando elementos clave de resistencia endocrina.

Objetivos.

Para la validación de las hipótesis de trabajo, antes expuestas, nuestro estudio se ha estructurado en los siguientes objetivos concretos:

- 1) Valorar la presencia y progresión de la EHGNA a partir de biopsias hepáticas, según el método de Kleiner.
- 2) Evaluar parámetros bioquímicos relacionados con perfil hepático, resistencia a insulina, metabolismo lipídico y adipoquinas, así como marcadores de estrés oxidativo en sangre durante el origen y progresión de la EHGNA.
- 3) Evaluar, mediante técnicas de RT-PCR a tiempo real, la expresión de una serie de genes asociados a la señalización de adiponectina, leptina, insulina, proteínas PAT, metabolismo lipídico y estrés oxidativo en biopsias hepáticas intraoperatorias realizadas a pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

4) Establecer un vínculo entre los niveles de receptores de adiponectina hepáticos y el nivel de estrés oxidativo hepatocitario en distintos estadios de la EHGNA mediante la medición de niveles sanguíneos de marcadores de estrés oxidativo, así como la cuantificación del nivel de expresión génica de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo: GPX1, GRD e iNOS, en biopsias hepáticas realizadas a la cohorte de pacientes citada.

5) Establecer un vínculo entre los niveles de expresión hepática de los genes asociados a señalización de leptina, insulina y metabolismo lipídico durante el origen y progresión de la EHGNA, cuantificando estos niveles en las biopsias hepáticas realizadas a la cohorte de pacientes citada.

6) Establecer un vínculo entre los niveles de expresión de proteínas PAT y los genes medidos anteriormente con la intención de identificar marcadores claves de resistencia hepática endocrina.

7) Valorar la evolución de la actividad de adiponectina a nivel plasmático, marcadores sanguíneos relacionados con el síndrome metabólico (glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL, insulina, HOMA-IR), marcadores de perfil hepático (transaminasas y GGT) y marcadores sanguíneos de estrés oxidativo tras la cirugía bariátrica mediante la realización de análisis de sangre a la cohorte de pacientes citada un año después de la cirugía.

Descripción de la cohorte de estudio.

Se ha realizado un primer estudio de corte transversal en el que se han incluido 60 sujetos, en total 18 hombres y 42 mujeres, con obesidad mórbida ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$), sometidos a cirugía bariátrica en el Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España).

Se ha realizado segundo estudio observacional, analítico, con seguimiento de la cohorte de pacientes citada (al final del estudio han quedado 42 pacientes), a los que se ha realizado una valoración estadística de la evolución del IMC y parámetros plasmáticos: glucosa e insulina, leptina y adiponectina, perfil hepático, perfil lipídico y de estrés oxidativo; antes y un año después de la cirugía.

Se ha realizado un tercer estudio en un modelo celular in vitro de esteatosis hepática para verificar algunos datos obtenidos en la cohorte de pacientes en relación a la asociación entre adipofilina y SOCS-1. Los criterios de exclusión para los estudios que han incluido a la cohorte de pacientes han sido: los trastornos hepáticos primarios, además de aquellos que presentan EHGNA secundario a patologías como la deficiencia de alfa-1-antitripsina, la hepatitis infecciosa o enfermedad de Wilson, identificados por los marcadores de la enfermedad específica. El consumo de alcohol máximo permitido en los participantes del estudio ha sido como máximo de 30 g por semana en hombres y 20 g por semana en las mujeres. El comité de ética del Hospital Universitario San Cecilio ha aprobado el estudio y todos los sujetos han aceptado y firmado el consentimiento informado escrito.

Breve descripción de la metodología experimental empleada.

Para el estudio de corte transversal las biopsias hepáticas han sido obtenidas en el momento de la cirugía bariátrica. Para el estudio observacional, analítico, con seguimiento de la cohorte se han tomado muestras de sangre antes de la cirugía, después de 10 horas de ayuno postoperatorio y un año después de la cirugía. Para el diseño del estudio de modelo celular se han utilizado cultivos de la línea celular establecida llamada PLC-PRF-5 (hepatocarcinoma humano), que sintetizan en la superficie el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

Para la determinación de los parámetros bioquímicos, las muestras de sangre han sido procesadas y analizadas por métodos de rutina dentro de las 24 horas siguientes a la extracción en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario San Cecilio. En cada paciente, se han analizado los niveles de glucosa (mg / dl), insulina (mU / ml), triglicéridos (mg / dl), colesterol total (mg / dl), lipoproteínas de baja densidad (LDL) colesterol (mg / dl), lipoproteínas de alta densidad (HDL), colesterol (mg / dl), alanina aminotransferasa (ALT) (U / l), aspartato aminotransferasa (AST) (U / l) y gamma glutamiltransferasa (GGT) (U / l). En todos los pacientes se ha calculado el índice HOMA-IR, que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células beta pancreáticas.

Los niveles de adiponectina y leptina en plasma se han medido utilizando el kits comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de estrés oxidativo sanguíneo se han determinado mediante técnicas espectrofotométricas utilizadas ampliamente en investigación.

Para el estudio anatomopatológico, todas las biopsias hepáticas han sido evaluadas por un único patólogo con experiencia utilizando el sistema de puntuación validada por Kleiner. Este sistema de puntuación histológico cuantifica los cambios de actividad necroinflamatoria y esteatósicos (esteatosis, inflamación lobular y balonización), dando lugar a resultados para actividad de EHGNA que oscilan entre 0 y 8. Las puntuaciones mayores o iguales a 5 han sido diagnosticadas como hígado graso, las puntuaciones entre 3 y 4 han sido diagnosticadas como probable o clara esteatohepatitis, las puntuaciones de 1 y 2 han sido diagnosticadas como hígado graso sin inflamación, y la puntuación 0 fue diagnosticada como no EHGNA. En función de esta puntuación los pacientes fueron divididos en tres grupos:

Grupo 1. Pacientes obesos mórbidos sin EHGNA.

Grupo 2. Pacientes obesos mórbidos con EHGNA pero sin esteatohepatitis.

Grupo 2. Pacientes obesos mórbidos con probable o clara esteatohepatitis.

El estudio de expresión de genes asociados a la señalización hepática de adiponectina, leptina e insulina, se ha desarrollado mediante la técnica de Real Time RT-PCR. Se han utilizado kits comerciales para la extracción del RNA total hepático, para su retrotranscripción a cDNA y para el seguimiento, en tiempo real, de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se ha utilizado una plataforma de PCR a tiempo real: CFX96 Real Time System de BioRad.

El modelo *in vitro* de esteatosis hepática se ha desarrollado en cultivos de la línea celular PLC-PRF-5 (hepatocarcinoma humano), que sintetizan en la superficie el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) (sólo antígeno). Durante el trascurso de los experimentos la confluencia celular inicial ha oscilado entre el 60 y el 70%, y se han añadido al medio de cultivo concentraciones de ácido oleico entre 0,125 y 2 mM. Para favorecer la solubilidad del ácido oleico en el medio de cultivo se ha suplementado con un 0,1% de albúmina. Los métodos para medir la expresión de genes en cultivo celular han sido idénticos a los empleados en biopsias hepáticas. Con la salvedad de pequeñas modificaciones a la hora de extraer el RNA

El análisis estadístico de los datos se ha realizado mediante el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

Breve descripción de resultados.

Los pacientes fueron clasificados en 3 grupos: 10 pacientes sin NAFLD (grupo 1), 33 con esteatosis hepática pero sin inflamación (grupo 2) y 44 con probable o clara esteatohepatitis (grupo 3).

· La expresión hepática de las dos isoformas del receptor de adiponectina, ADIPOR1 y ADIPOR2, se incrementa con el origen y desarrollo de la EHGNA en obesos mórbidos, en estrecha correlación con genes pertenecientes a los mecanismos de defensa antioxidante, especialmente con la glutatión peroxidasa. Nuestros datos sugieren la existencia de factores de transcripción comunes a las isoformas del receptor de adiponectina y a genes de la maquinaria antioxidante.

La comparación entre las expresiones medias entre el grupo 1 (pacientes sin EHGNA) y el resto de los grupos (pacientes con EHGNA), únicamente mostró tendencias no significativas hacia el aumento para SOCS-1 y hacia el descenso para los receptores de insulina y leptina, IRS-1 y SOCS-3. Sin embargo se encontraron correlaciones entre la expresión de las isoformas del receptor hepático de leptina y la expresión de genes clave en la señalización de insulina. Los niveles de correlación más intensos se aprecian en el grupo de pacientes obesos sin EHGNA. Estos datos sugieren que la sinergia parcial existente entre las rutas de señalización hepática de leptina e insulina se refleja también en los mecanismos de expresión genética de las proteínas implicadas en dicha señalización.

Las expresiones hepáticas de adipofilina y SOCS-1 se correlacionan únicamente en pacientes obesos con EHGNA. Estos datos han sido verificados en un modelo celular de esteatosis hepática. En dicho modelo, la expresión de adipofilina se correlaciona de forma casi absoluta con el contenido extracelular de ácidos grasos y muestra una correlación fuerte con la expresión de SOCS-1. Nuestros datos sugieren que SOCS-1 podría estar implicada en los mecanismos hepáticos de resistencia endocrina que se desarrollan en el hígado graso.

Conclusiones.

En pacientes obesos mórbidos sin EHGNA, los elevados niveles de correlación entre genes asociados a la señalización de leptina e insulina sugieren que ambas rutas de señalización comparten factores de expresión comunes. Sin embargo, la reducción en esas correlaciones durante la aparición y desarrollo de la EHGNA, sugiere que la homeostasis endocrina hepática se afecta con la enfermedad del hígado graso. Por otra parte, el elevado nivel de correlación encontrado entre los receptores de adiponectina y genes asociados a estrés oxidativo sugiere mecanismos de regulación genética comunes.

Nuestro estudio presenta nuevas perspectivas sobre la señalización hepática de adiponectina y sobre los mecanismos que conducen a resistencia hepática a leptina y adiponectina, durante el origen y progresión de la EHGNA.

